



# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Si vous êtes en cotutelle internationale, remplissez ce champs en notant : Cotutelle internationale avec "nom de l'établissement", sinon effacer ce texte pour qu'il n'apparaisse pas à l'impression

---

**Présentée et soutenue par :**

**Diane BEUZELIN**

**le** vendredi 18 décembre 2015

**Titre :**

Rôle des récepteurs nucléaires PPAR gamma et PPAR alpha dans la conversion d'adipocytes blancs humains en adipocytes bruns/brites

---

**École doctorale et discipline ou spécialité :**

ED BSB : Biologie structurale et fonctionnelle

**Unité de recherche :**

INSERM U1048, Institut des maladies métaboliques et cardiovasculaires, équipe 4

**Directeur/trice(s) de Thèse :**

Pr. Dominique LANGIN

**Jury :**

Pr. Isabelle CASTAN (Présidente)

Pr. Daniel RICQUIER (Rapporteur)

Pr. Bart STAELS (Rapporteur)

Pr. Walter WAHLI (Rapporteur)



## REMERCIEMENTS

En préambule à ce travail, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et mes sincères remerciements à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ce travail.

Je souhaite remercier en premier lieu mon directeur de thèse, Dominique Langin, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe. Je te remercie d'avoir cru en moi pour accomplir ce travail de recherche et pour m'avoir donnée la chance de m'épanouir pleinement dans cette équipe. Je t'en suis très reconnaissante.

Je voudrais tout d'abord remercier infiniment Valentin Barquissau, sans qui une grande partie de ce travail de thèse n'aurait sans doute pas pu être fait. Tu as été un pilier pour moi durant toute cette thèse et ça malgré un début un peu difficile à cause de ma timidité. Merci d'avoir toujours été là, pendant ces longues journées de manip en radioactivité, pour tes avis critiques et avisés lors de la rédaction du manuscrit ou de la préparation de l'oral. J'ai eu énormément de plaisir à travailler avec toi.

Mes remerciements s'adressent également aux membres du jury: Je remercie vivement le Pr Isabelle Castan pour avoir accepté de présider le jury, ainsi que le Pr Daniel Ricquier, le Pr Bart Staels et le Pr Walter Wahli pour avoir accepté d'évaluer mon travail en tant que rapporteurs. Merci pour votre investissement dans la correction et l'évaluation de ce travail. Je tiens aussi à remercier Hervé Guillou et Didier Pisani, les membres de mon comité de thèse pour leurs soutiens ; vos remarques constructives ont participé à la réussite de cette thèse.

Un énorme merci à toute la bande des « filles » Marinne Houssier, Pauline Morigny, Marine Coué, Claire Laurens, Lucile Mir et Véronika Mayerova avec qui j'ai grandi tout au long de cette thèse. Merci de m'avoir toujours soutenue, pour ces superbes soirées jeux de société et ces nombreux fous rires (les histoires du 1000 bornes, de l'intolérance au lactose et du pyjama sont toutes collector). Vous êtes de véritables amies et j'espère que l'on restera en contact.

Je remercie également les autres membres de l'équipe 4 pour m'avoir accompagnée dans la réalisation de ces travaux de doctorat. Merci pour votre disponibilité sans faille et pour les moments que nous avons passés ensemble. Un grand merci à Aline Mairal pour toujours avoir été là pour répondre à mes très très nombreuses questions et pour m'avoir aidée dans mes recherches ; merci pour tes conseils et ton écoute. Un énorme merci d'être restée si tard ce

fameux soir de l'envoi du manuscrit et pour le coup de main lors de l'impression couleur de la thèse. Merci à Marie-Adeline Marquès qui répond toujours présente. Merci pour ta gentillesse et encore désolée pour tes yeux après toutes ces heures passées au microscope à fluorescence. Merci à Nathalie Viguerie et à Emilie Montastier pour votre expertise en stats et nos discussions scientifiques et personnelles.

Je voudrais remercier « les musclés » Cédric Moro, Virginie Bourlier, Geneviève Tavernier et plus particulièrement Katie Louche, ma chère voisine de bureau qui garde toujours ça bonne humeur malgré le « petit écureuil » qui mange toujours à côté d'elle. Merci à Etienne Mouisel d'avoir toujours eu un mot rigolo pour moi. Merci à Sylvie Caspar-Bauguil, Corinne Lefort, Dominique Larrouy et à Laurent Monbrun, d'avoir été là pour moi quand j'avais des questions.

Un grand merci au plateau Get-TQ (Frédéric Martins et Jean-José Maoret) pour votre disponibilité et ces discussions enrichissantes (le ViiA 7 va me manquer un peu), et aussi à Jean-Jérôme Soueix à pour m'avoir appris plusieurs astuces en informatique et pour cette superbe scène « geek » dans la vidéo de thèse. Merci aussi au personnel administratif : Pascale Limousin, Sébastien Mortier, Emeline Guittonneau.

Mes remerciements vont également vers les collègues actuels et passés du laboratoire : Marta Fernández Galilea, Claire Ghi-lain, Sophie Bonnel, Sarah Berend, Corentin Roudet, Jennifer Saussède, Balbine Roussel, François Crampes, Isabelle Vila et Pierre Marie Badin. J'oublie sans doute beaucoup d'autres personnes et je m'en excuse.

J'adresse mes sincères remerciements et ma reconnaissance à nos collaborateurs Niçois et Toulousain : Maud Giroud, Didier Pisani, Ez-Zoubir Amri, Jean-Claude Chambard, Rayane Ghandour Guillaume Emmanuel Béranger, Hervé Guillou, Alexandra Montagner et Arnaud Polizzi avec qui ce fut un plaisir de travailler.

Mes derniers remerciements et non les moindres s'adressent à ma famille et mes amies. Je remercie infiniment mes parents, Jean-Michel et mon frère Marco, pour votre amour et pour votre soutien dans les bons et les mauvais moments. Merci de m'avoir encouragée, écoutée (malgré le jargon scientifique) et poussée à aller de l'avant. Je n'aurais jamais pu réussir cela sans vous, cette thèse c'est aussi la vôtre.

## Rôle des récepteurs nucléaires PPAR $\gamma$ et PPAR $\alpha$ dans la conversion d'adipocytes blancs humains en adipocytes bruns/brite

**Résumé :** Chez les mammifères, deux types de tissu adipeux (TA) sont présents: le TA blanc, qui est l'organe de stockage et de libération des lipides, et le TA brun, qui est un organe spécialisé dans la production de chaleur grâce à l'expression de la protéine découplante mitochondriale UCP1. Chez l'homme, la présence d'un TA brun métaboliquement actif est inversement corrélée à l'obésité et au diabète de type 2. Ce TA brun est composé de deux types distincts de cellules thermogéniques, les adipocytes bruns classiques présents dans des dépôts spécifiques et les adipocytes «brite» (brown-in-white). Chez la souris, les adipocytes « brite » apparaissent dans le TA blanc lors d'une exposition au froid et sont protecteurs contre l'insulinorésistance induite par l'obésité. Ainsi le «brunissement» du TA blanc ouvre la voie à de nouvelles approches thérapeutiques pour lutter contre les pathologies associées à l'obésité. Toutefois, la capacité des adipocytes blancs humains à acquérir un métabolisme brun/brite reste méconnue. Notre étude cherche donc à identifier les changements moléculaires et métaboliques associés à la conversion d'adipocytes blancs humains différenciés en adipocytes « brite », après un traitement par des agonistes des récepteurs nucléaires PPAR $\gamma$  ou PPAR $\alpha$ .

Dans un premier temps, nous avons montré *in vitro* que les cellules hMADS (adipocytes humains dérivés des cellules souches mésenchymateuses), différenciées en adipocytes blancs sont convertis en adipocytes « brites » par les agonistes PPAR $\gamma$  et PPAR $\alpha$ . Ces adipocytes brites ont une activité mitochondriale élevée et expriment la protéine découplante UCP1. Dans un deuxième temps, nous avons mis en évidence que le brunissement s'accompagne d'un profond changement métabolique. La mise en place d'un cycle futile lipolyse/ré-estérification couplé à une augmentation de l'oxydation des acides gras permet de fournir les substrats nécessaires à la thermogenèse mitochondriale. A l'inverse, le transport et l'oxydation du glucose sont diminués notamment suite à l'inhibition de la pyruvate déshydrogénase par la protéine PDK4. A la place le glucose va être dirigé vers la voie de la glycéronéogenèse pour fournir le glycérol-3-phosphate nécessaire à la synthèse des triglycérides. Ainsi, l'ensemble du métabolisme des adipocytes « brite » est réorganisé vers l'utilisation des acides gras comme source principale d'énergie.

Enfin, nous avons validé l'implication de PPAR $\alpha$  dans les mécanismes de brunissement *in vivo* grâce à l'utilisation de souris dont le gène codant pour PPAR $\alpha$  a été invalidé. L'induction du brunissement par un agoniste  $\beta_3$ -adrénergique nous a permis de confirmer que PPAR $\alpha$  est nécessaire à l'expression optimale des gènes thermogéniques et au brunissement du tissu adipeux blanc.

L'ensemble de ces données permet d'affirmer que chez l'homme, les adipocytes blancs sont capables de se convertir en adipocytes « brite ». Cette conversion s'accompagne de changements métaboliques qui favorisent l'utilisation intracellulaire des acides gras, ce qui pourrait diminuer leur niveau plasmatique limitant ainsi leur stockage ectopique dans les tissus insulinosensibles.



# TABLE DES MATIERES

<b>AVANT-PROPOS</b> .....	<b>1</b>
<b>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>3</b>
<b>I. LES PPARS</b> .....	<b>5</b>
1. LES DIFFERENTS ISOTYPES DE PPARS.....	5
2. REPARTITION TISSULAIRE .....	7
3. LES LIGANDS NATURELS ET PHARMACOLOGIQUES .....	8
a. Les ligands de PPAR $\alpha$ .....	8
<i>Les ligands naturels</i> .....	8
<i>Les ligands synthétiques</i> .....	9
b. Les ligands de PPAR $\beta/\delta$ .....	9
c. Les ligands de PPAR $\gamma$ .....	10
<i>Les ligands naturels</i> .....	10
<i>Les ligands synthétiques</i> .....	10
4. MECANISMES DE REGULATION DE LA TRANSCRIPTION .....	11
a. Activation de la transcription .....	11
b. Répression de la transcription .....	13
c. Le rôle des cofacteurs.....	14
d. Modifications post-traductionnelles des PPARs .....	16
<i>La phosphorylation des PPARs</i> .....	16
<i>L'ubiquitylation des PPARs</i> .....	17
<i>La sumoylation des PPARs</i> .....	17
5. ROLES PHYSIOLOGIQUES DES PPARS DANS LE METABOLISME LIPIDIQUE .....	18
a. Rôles des PPARs dans le foie .....	18
b. Rôles des PPARs dans le muscle .....	20
c. Rôles des PPARs dans le pancréas.....	22
<b>II. L'OBESITE</b> .....	<b>24</b>
1. DEFINITION.....	24
2. EPIDEMIOLOGIE.....	24
3. LA BALANCE ENERGETIQUE .....	25

a.	Les apports énergétiques .....	26
b.	La dépense énergétique .....	27
	<i>Le métabolisme de repos ou basal</i> .....	28
	<i>La thermogenèse adaptative</i> .....	29
	<i>L'activité physique</i> .....	30
4.	FACTEURS GENETIQUES.....	32
5.	CONSEQUENCES DE L'OBESITE .....	33
a.	Pathologies liées à l'obésité .....	34
b.	Surmortalité.....	36
<b>III.</b>	<b>LE TISSU ADIPEUX BLANC.....</b>	<b>37</b>
1.	DISTRIBUTION ANATOMIQUE.....	37
2.	COMPOSITION CELLULAIRE .....	39
a.	L'adipocyte blanc.....	39
b.	La fraction stroma-vasculaire.....	40
	<i>Les progéniteurs</i> .....	40
	<i>Les cellules endothéliales</i> .....	41
	<i>Les cellules immunitaires</i> .....	42
c.	Innervation du tissu adipeux blanc.....	44
	<i>Système nerveux et adipogenèse</i> .....	45
3.	L'ADIPOGENESE DES ADIPOCYTES BLANCS .....	45
a.	Facteurs de l'engagement adipocytaire .....	46
	<i>Les BMPs</i> .....	46
	<i>ZFP423</i> .....	47
b.	Facteurs de la différenciation adipocytaire .....	48
	<i>Les étapes de la différenciation adipocytaire</i> .....	48
	<i>Les PPARs</i> .....	49
	<i>Les C/EBPs</i> .....	50
	<i>Autres facteurs</i> .....	50
c.	L'expansion du tissu adipeux.....	51
4.	FONCTIONS METABOLIQUES DU TISSU ADIPEUX.....	52
a.	L'entrée des acides gras dans l'adipocyte .....	52
b.	La synthèse des TG .....	54
c.	La lipogenèse .....	56



	<i>Régulation de la lipogenèse</i> .....	57
d.	La lipolyse .....	58
	<i>L'ATGL</i> .....	58
	<i>La LHS</i> .....	59
	<i>La MGL</i> .....	59
	<i>Régulation physiologique de la lipolyse</i> .....	60
	<i>Dérégulation de la lipolyse lors de l'obésité</i> .....	61
5.	UN ORGANE SECRETOIRE.....	63
a.	Les adipokines.....	64
	<i>Effets sur l'homéostasie énergétique</i> .....	64
	<i>Effets sur l'inflammation: les cytokines, interleukines et chimiokines</i> .....	66
b.	Les lipokines .....	67
<b>IV.</b>	<b>LE TISSU ADIPEUX BRUN</b> .....	<b>69</b>
1.	LE TISSU ADIPEUX BRUN CHEZ LES MAMMIFERES .....	69
a.	Les nouveau-nés, les hibernants et les rongeurs .....	70
b.	Redécouverte de TA brun chez l'Homme adulte .....	70
c.	Localisation et morphologie.....	72
	<i>Morphologie du TA brun</i> .....	73
	<i>Innervation du TA brun</i> .....	74
	<i>Vascularisation du TA brun</i> .....	76
2.	THERMOGENESE .....	77
a.	Découplage de la chaîne respiratoire .....	78
b.	La protéine découplante UCP1 .....	79
	<i>Activation d'UCP1</i> .....	80
	<i>Les autres UCPs</i> .....	81
c.	Régulation de la thermogénèse .....	84
	<i>Contrôle de l'expression d'UCP1 par les catécholamines</i> .....	84
	<i>Les hormones thyroïdiennes</i> .....	85
	<i>Peptides natriurétiques</i> .....	87
	<i>BMP8b</i> .....	87
3.	ORIGINE DES ADIPOCYTES THERMOGENIQUES .....	87
a.	Deux types d'adipocytes bruns .....	88
b.	L'origine des adipocytes bruns .....	89

<i>Différenciation de novo de progéniteurs</i> .....	90
<i>Transdifférenciation</i> .....	90
<i>Le TA brun humain : adipocytes bruns ou brites ?</i> .....	91
4. LES FACTEURS DE L'ADIPOGENESE ET DU DEVELOPPEMENT DES ADIPOCYTES	
BRUNS ET BRITES .....	93
a. Facteurs de l'engagement adipocytaire brun/brite .....	93
<i>L'axe EWS/YBX/BMP7</i> .....	93
<i>Early B-Cell Factor-2 (EBF2)</i> .....	93
b. Facteurs et cofacteurs de la différenciation adipocytaire brune/brite .....	94
<i>PRDM16</i> .....	94
<i>PGC1<math>\alpha</math> et RIP140</i> .....	95
<i>Les PPARs</i> .....	96
<i>ZPF516</i> .....	97
<i>FOXC2</i> .....	98
c. Facteurs circulant impliqués dans le recrutement et de l'activation des adipocytes bruns/brites .....	99
<i>L'irisine</i> .....	99
<i>Le FGF21</i> .....	99
<i>Les prostaglandines</i> .....	100
<i>La meteorine-like</i> .....	100
5. LE METABOLISME DES ADIPOCYTES BRUNS/BRITES .....	101
a. Clairance des acides gras et du glucose sanguin.....	101
<i>Acides gras</i> .....	101
<i>Glucose</i> .....	101
<i>Consommation respective des acides gras et du glucose chez l'Homme</i> .....	102
b. Cycle de lipolyse/ré-estérification.....	103
c. L'oxydation des acides gras .....	105
<i>Réaction de bêta-oxydation</i> .....	106
6. LE TISSU ADIPEUX BRUN ET LA LUTTE CONTRE L'OBESITE .....	107
a. Données chez la souris .....	107
b. Présence du TA brun chez l'homme .....	109
c. Potentiel thérapeutique de l'activation du TA brun chez l'Homme.....	112
<i>Exposition au froid</i> .....	112

<i>Isoprénaline et éphédrine</i> .....	113
<i>Agonistes <math>\beta_3</math>-adrénergiques</i> .....	113
<i>Capsinoïdes et berbérine</i> .....	114
<i>L'exercice et l'irisine</i> .....	115
<b>OBJECTIFS</b> .....	<b>117</b>
<b>RÉSULTATS</b> .....	<b>119</b>
<b>ARTICLE 1</b> .....	<b>121</b>
<b>Résultats complémentaires</b> .....	<b>123</b>
<i>Résultats de l'analyse des puces à ADN</i> .....	123
<i>Production de lactate et de pyruvate à partir du glucose lors du brunissement des adipocytes blancs.</i> .....	126
<i>Expériences de compétition de substrat</i> .....	129
<i>Conséquences métaboliques de la perte de PDK4 dans les adipocytes brites</i> .....	130
<b>ARTICLE 2</b> .....	<b>133</b>
<b>DISCUSSION - PERSPECTIVES</b> .....	<b>135</b>
<b>CONCLUSION</b> .....	<b>149</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>151</b>
<b>ANNEXES</b> .....	<b>211</b>



## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure générale des récepteurs nucléaires PPARs, d'après (Seimandi et al., 2005) .....	6
Figure 2 : Mécanismes d'actions des PPARs pour activer la transcription génique.....	12
Figure 3 : Mécanismes de répression de la transcription par les PPARs, d'après (Feige et al., 2006).....	14
Figure 4 : Echange dépendant du ligand des complexes corépresseurs et coactivateurs, d'après (Feige et al., 2006).....	15
Figure 5 : Rôle des PPARs dans l'efflux de cholestérol .....	20
Figure 6 : Surpoids et obésité dans le monde d'après les données de l'OMS, the Lancet et l'Insee 2014.....	25
Figure 7 : La balance énergétique, d'après l'OMS 2000 .....	27
Figure 8 : Composante de la dépense énergétique journalière.....	28
Figure 9 : Les maladies métaboliques associées à l'obésité, adapté de (Kanneganti and Dixit, 2012).....	34
Figure 10 : Répartition du tissu adipeux chez l'Homme, d'après (Gesta et al., 2007) .....	38
Figure 11 : Représentation schématique d'un adipocyte blanc.....	39
Figure 12 : La diversité cellulaire du tissu adipeux blanc.....	42
Figure 13 : Les différentes étapes et facteurs impliqués dans l'adipogenèse.....	48
Figure 14 : Entrée des acides gras dans l'adipocyte.....	54
Figure 15 : Voies de synthèse des triglycérides .....	56
Figure 16 : La lipogenèse .....	57
Figure 17 : Contrôle de l'ATGL et la LHS adapté de (Nielsen et al., 2014) .....	60
Figure 18 : Contrôle de la lipolyse adipocytaire adapté de (Arner and Langin, 2014) .....	62
Figure 19 : Le tissu adipeux : un organe sécrétoire.....	63
Figure 20 : Localisation anatomique des dépôts de tissu adipeux brun chez l'Homme adulte, le nourrisson et le rongeur d'après (Enerback, 2010) .....	73
Figure 21 : Morphologie des adipocytes bruns .....	74
Figure 22 : Innervation du TA brun d'après (Morrison et al., 2012) .....	75
Figure 23 : Découplage de la chaîne respiratoire .....	79
Figure 24 : Mécanismes proposés pour le transport de protons par UCP1 .....	81
Figure 25 : Contrôle de l'expression d'UCP1 .....	86
Figure 26 : Les différentes origines des adipocytes bruns, brites et blancs .....	90

Figure 27 : Les différents facteurs contrôlant l'adipogenèse brune, brite et blanche .....	99
Figure 28 : Les différentes origines du glycérol-3-phosphate.....	104
Figure 29 : La béta-oxydation des acides gras .....	107
Figure 30 : Diagramme de Venn .....	123
Figure 31 : Concentration de lactate dans le milieu après 1 ou 3 heures d'incubation .....	126
Figure 32 : Concentration de pyruvate dans le milieu après 1 ou 3 heures d'incubation .....	127
Figure 33 : Expression génique de la LDH $\alpha$ et MCT4.....	128
Figure 34 : Expression génique de MCT1 et MCT2.....	128
Figure 35 : Expérience de compétition de substrats.....	130
Figure 36 : Effets du siPDK4 sur le devenir du glucose. ....	131
Figure 37 : Représentation schématique de la régulation du métabolisme énergétique par le complexe pyruvate déshydrogénase (PDH). ....	140
Figure 38 : Conséquences morphologiques et métaboliques de la conversion d'adipocytes blancs humains en adipocytes brites par les agonistes de PPAR $\gamma$ et de PPAR $\alpha$ . ....	148

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Corpulence d'un individu en fonction de l'IMC .....	24
Tableau 2 : Origines et effets sur l'homéostasie glucidique des adipokines.....	65
Tableau 3 : Origine et effets sur l'inflammation des adipokines .....	67
Tableau 4 ; Les différentes UCPs humaines, d'après (Damon.M 2006).....	82
Tableau 5 : Liste non-exhaustive des principaux marqueurs des adipocytes blancs, brites et bruns, d'après (Peirce et al., 2014).....	92
Tableau 6 : Implication du tissu adipeux brun et des adipocytes brites dans le métabolisme des rongeurs d'après (Lidell et al., 2014) .....	109
Tableau 7 : Principales études rétrospectives et prospectives évaluant la présence du TA brun et son action sur le métabolisme du glucose et des acides gras chez l'Homme d'après (Celi et al., 2015).....	111
Tableau 8 : Processus biologiques enrichis d'après la base de données DAVID : analyse 1	124
Tableau 9: Processus biologiques enrichis d'après la base de données DAVID : analyse 2 .	125





## ABREVIATIONS

18F-FDG: Fluorodésoxyglucose  
 $\alpha$ -AR: récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques  
 $\beta$ -AR: récepteurs  $\beta$ -adrénergiques  
ACC: Acétyl-CoA carboxylase  
ACT: Acylcarnitine translocase  
ADN: Acide désoxyribonucléique  
ADP: Adénosine diphosphate  
AG: Acide gras  
AKT: Protéine kinase B  
AMPC: Adénine mono-phosphate cyclique  
AMPK: Kinase dépendante de l'AMP  
ANGPTL2: Angiopoietin-Like 2  
ANP: Atrial natriuretic peptide  
AQP7: Aquaporin 7  
ARN: Acide ribonucléique  
ATGL: Adipose triglyceride lipase  
ATP: Adenosine tri-phosphate  
BMP: Bone morphogenetic protein  
BNP: Brain natriuretic peptide  
C/EBP: CAAT enhancer binding protein  
CBP: CREB binding protein  
CoA: Coenzyme A  
CPT: Carnitine palmitoyltransferase  
DBD: DNA Binding Domain  
DG: Diglycérade  
DGAT: Diacylglycérade acyltransferase  
DIO2: Deiodinase iodothyronine 2  
FABP: Fatty-acid-binding proteins  
FADH<sub>2</sub>: Flavine adénine dinucléotide H<sub>2</sub>  
FATP: Fatty-acid-transport proteins  
FGF21: Fibroblast growth factor 2  
FOXO2: Forkhead box C2

FSV: Fraction stroma-vasculaire  
FTO: Fat mass and Obesity-associated protein  
G3P: Glycérol-3 phosphate  
GK: Glycérol kinase  
GLUT: Transporteur au glucose de type 4  
GMPc: Guanine mono-phosphate cyclique  
HAT: Histone acétyltransférase  
HDAC: Histone désacétylase  
HDL: High density lipoprotein  
hMADS: Human Multipotent Adipose-Derived Stem cells  
IL: Interleukine  
IMC: Indice de masse corporelle  
IRS: Insulin receptor substrate  
KLF: Kruppel like factor  
LBD: Ligand Binding Domain  
LDL: low density lipoprotein  
LPL: Lipoprotein lipase  
LXR: Liver X recpetor  
MAPK: Mitogen-activated protein kinases  
MCAD: Medium chain acyl-coA dehydrogenase  
MCP1: Protéine de chémio-attraction des monocytes 1  
MG: Monoacylglycérol  
Myf5: Myogenic factor 5  
NA: Noradrénaline  
NADH, H<sup>+</sup> : Nicotinamide adénine dinucléotide H, H<sup>+</sup>  
Ncor: Nuclear receptor co-repressor  
NEAT: Non exercise activity thermogenesis  
OMS: Organisation mondiale de la santé  
PAI-1: Inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1  
PDE-3B: Phosphodiesterase 3B  
PET-CT: Positron emission tomography – computed tomography  
PCK1: Phosphoénol pyruvate carboxykinase cytosolique  
PGC1 $\alpha$ : PPAR gamma co-activator 1 $\alpha$   
PI3K: Phosphatidyl-inositol-3kinase

PKA: Protéine kinase A  
PKG: Protéine kinase G  
PPAR: Peroxisome Proliferator-Activated Receptors  
PPRE: Élément de réponse aux PPAR  
PRDM16: PRD1-BF1-RIZI homologous  
RB: Protéine de tumeur du rétinoblastome  
RBP4: Retinol binding protein 4  
RIP140: Receptor binding protein 140  
RT-PCR: Reverse transcriptase- polymerase chain reaction  
RXR: Retinoid X receptor  
SMRT: Silencing mediator for retinoic acid receptor and thyroid hormone receptor  
SNS: Système nerveux sympathique  
SPPARM: selective PPAR modulator  
SRC: Co-activateur des récepteurs aux stéroïdes  
SREBP1c: Sterol responsive element binding protein 1c  
TA: Tissu adipeux  
TG: Triglycéride  
TRL: lipoprotéines riches en triglycérides  
TNF $\alpha$ : Tumor necrosis factor alpha  
TZD: Thiazolidinedione  
UCP: uncoupling protein  
VLDL: Very low low density lipoprotein



---

# **AVANT-PROPOS**

---

L'obésité se caractérise par un excès de graisse corporelle, c'est la conséquence d'une dérégulation de l'homéostasie énergétique. C'est un véritable problème de santé publique car l'accumulation de tissu adipeux prédispose au développement d'un certain nombre de désordres métaboliques parmi lesquels l'insulino-résistance, le syndrome métabolique et le diabète de type II.

Chez les mammifères, deux types de tissus adipeux sont présents, le tissu adipeux blanc et le tissu adipeux brun. La fonction principale du tissu adipeux blanc est de stocker l'énergie excédentaire sous forme de lipides et de la rendre disponible quand les apports sont insuffisants pour les besoins de l'organisme. Le tissu adipeux brun est spécialisé dans le maintien de la température corporelle grâce à la thermogénèse sans frisson. Récemment, chez la souris, les adipocytes « brites » ont été identifiés dans le tissu adipeux blanc après une exposition au froid. Ils possèdent des caractéristiques des adipocytes bruns et améliorent les paramètres métaboliques. Ainsi, augmenter la présence de ces adipocytes constitue-t-elle une cible thérapeutique pour lutter contre les pathologies associées à l'obésité.

Les PPARs (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors) constituent une famille de récepteurs nucléaires. Leurs rôles dans la régulation de nombreux métabolismes, et plus particulièrement dans les métabolismes glucidique et lipidique, font d'eux des cibles thérapeutiques dans le traitement des hyperlipidémies et de l'insulino-résistance. De plus, les PPARs jouent un rôle dans le développement et le métabolisme des adipocytes bruns et brites.

Durant l'introduction de cette thèse, nous allons tout d'abord faire un rappel sur les mécanismes d'actions des PPARs. Ensuite, après l'exposé des pathologies associées à l'obésité due au déséquilibre de la balance énergétique, nous allons nous focaliser sur le développement et le métabolisme du tissu adipeux blanc. Enfin, dans une dernière partie, nous allons développer le rôle du tissu adipeux brun dans la thermogénèse, le métabolisme énergétique et sa place dans les thérapeutiques actuelles pour la lutte contre l'obésité. Le rôle des PPARs dans le métabolisme des adipocytes blancs et bruns sera développé dans leurs parties respectives.

---

**REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

---





## **I. LES PPARs**

La superfamille des récepteurs nucléaires regroupe des facteurs de transcription de nature protéique qui sont activés par un ligand et se fixent sur des séquences d'ADN spécifiques, à proximité des gènes qu'ils régulent, pour en modifier l'activité transcriptionnelle. Plusieurs récepteurs nucléaires ont été identifiés et classés en différentes familles présentant des caractéristiques et des mécanismes d'action communs. Les récepteurs nucléaires PPARs (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors) appartiennent à cette superfamille, ils ont été nommés ainsi en raison de la prolifération des peroxyosomes qu'ils induisent dans le foie des rongeurs suite à leur activation (Issemann and Green, 1990). Les PPARs régulent l'expression de nombreux gènes cibles impliqués dans de multiples fonctions cellulaires et processus physiologiques.

### **1. Les différents isotopes de PPARs**

A ce jour, trois isotopes, codés par des gènes différents, PPAR $\alpha$  (NR1C1), PPAR $\beta/\delta$  (NR1C2), et PPAR $\gamma$  (NR1C3) ont été identifiés chez les vertébrés. PPAR $\alpha$  a été le premier des trois PPARs à être identifié, d'abord chez la souris en 1990 (Issemann and Green, 1990), puis les trois groupes ont été trouvés chez les Xénopes et chez l'Homme (Dreyer et al., 1992; Kliewer et al., 1994; Sher et al., 1993). Chez les mammifères, PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$  ont été facilement identifiés et respectent la nomenclature établie chez le Xénope. Cependant, l'homologie avec le troisième isotope PPAR $\beta$  étant moins évidente, il fut nommé alternativement PPAR $\delta$ . Ces trois isotopes diffèrent par leurs distributions tissulaires, leurs ligands et leurs rôles physiologiques (Berger and Moller, 2002; Desvergne and Wahli, 1999).

Chez l'Homme le gène PPAR $\alpha$  se situe sur le chromosome 22 en position 22q12 - q13.1, le gène PPAR $\gamma$  est situé sur le chromosome 3 à la position 3p25, enfin, PPAR $\beta$  est localisé sur le chromosome 6, à la position 6p21.1 - p21.2 (Desvergne and Wahli, 1999; Greene et al., 1995; Sher et al., 1993; Yoshikawa et al., 1996). Par rapport aux autres PPAR, le gène de PPAR $\gamma$  a la particularité de donner 4 transcrits distincts (PPAR $\gamma$ 1, PPAR $\gamma$ 2, PPAR $\gamma$ 3 et PPAR $\gamma$ 4) par épissage alternatif et l'utilisation de promoteurs différents (Fajas et al. 1998). Les transcrits de PPAR $\gamma$ 1, PPAR $\gamma$ 3 et PPAR $\gamma$ 4 sont traduits en protéines identiques tandis que PPAR $\gamma$ 2 contient une trentaine d'acides aminés supplémentaires à son extrémité N-terminale (Elbrecht et al., 1996; Fajas et al., 1998; Sundvold and Lien, 2001).

Les trois isotypes de PPARs présentent une organisation en domaines, notés de A (à l'extrémité N-terminale) à F (extrémité C-terminale) (Desvergne and Wahli, 1999; Nagy and Schwabe, 2004; Renaud and Moras, 2000) (Figure 1).

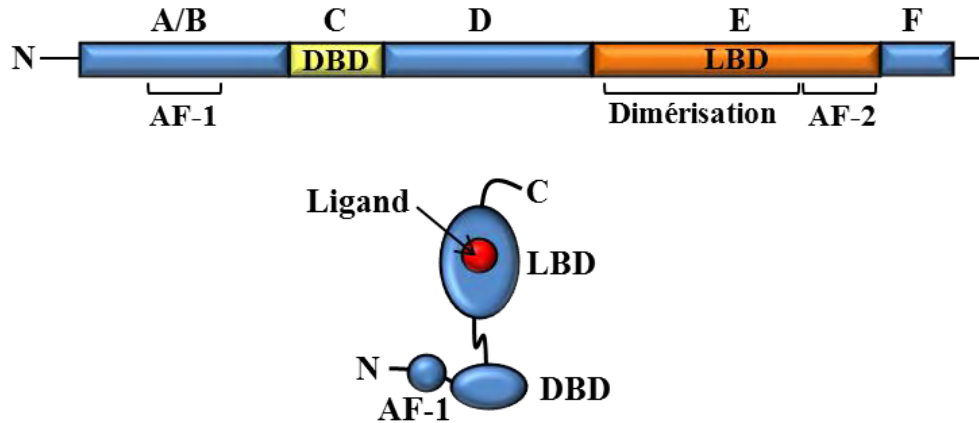


Figure 1 : Structure générale des récepteurs nucléaires PPARs, d'après (Seimandi et al., 2005)

Les PPARs sont composés de multiples domaines fonctionnels, notés de A (à l'extrémité N-terminale) à F (extrémité C-terminale). Un domaine A/B qui possède un domaine de transactivation ligand-dépendant AF-1 (Activation Function-1 motif). Un domaine C très conservé comprenant le domaine de fixation à l'ADN nommé DBD (DNA Binding Domain). Un domaine D, ou « domaine » charnière qui joue un rôle conformationnel. Un domaine E contenant le domaine de fixation du ligand nommé LBD (Ligand Binding Domain). Le LBD contient aussi le domaine de transactivation ligand-dépendant AF-2 qui lie les co-régulateurs. Un domaine F carboxy-terminal dont le rôle reste mal connu à ce jour.

Les structures en doigt de zinc du domaine de liaison des récepteurs nucléaires à l'ADN forment une structure globulaire, capable de reconnaître une séquence de six nucléotides AGGTCA localisée en région 5' de l'ADN cible. Pour agir au niveau nucléaire, les PPARs sont obligés de se lier à un partenaire d'hétérodimérisation qui est le récepteur de l'acide 9-*cis* rétinolique appelé RXR. Comme pour PPAR $\gamma$ , RXR existe sous 3 isotypes ; RXR $\alpha$ , RXR $\beta$  et RXR $\gamma$ . (A et al., 2004; Gearing et al., 1993; Mangelsdorf et al., 1992). L'association de PPAR avec RXR est indépendante de la liaison de PPAR à son ligand et de sa liaison à l'ADN : ce serait la liaison de RXR avec l'ADN qui serait importante pour la formation de l'hétérodimère PPAR/RXR, et non la capacité de PPAR à reconnaître celui-ci (Feige et al., 2005; Temple et al., 2005). L'hétérodimère est permissif, il peut être activé par la liaison d'un ligand de RXR ou PPAR. La liaison simultanée des ligands sur les deux récepteurs rend le complexe plus efficace pour activer la transcription du gène cible (Feige et al., 2006; Kliewer et al., 1992).

L'hétérodimère PPAR/RXR reconnaît un élément de réponse fonctionnel, nommé PPRE (Peroxisome Proliferator Responsive Element) (Wahli et al., 1995). Ces PPRE sont du type DR-1 (direct repeat 1), c'est-à-dire constitués de deux séquences de six nucléotides AGGTCA directement répétées et séparées par un seul nucléotide. Les PPARs interagissent avec le

premier motif hexamérique situé en 5' et RXR occupe le deuxième motif en 3' (A et al., 1997; Chandra et al., 2008). Certaines particularités spécifiques aux PPRE permettent la liaison sélective de l'hétérodimère RXR/PPAR plutôt que les autres homo-ou hétérodimères qui reconnaissent aussi des éléments DR-1. Il s'agit de la répétition imparfaite des séquences hexamériques, une extension du site situé en 5' du premier hexamère en présence d'une adénine comme nucléotide séparant les deux motifs hexamérique. Au final cela donne la séquence consensus PPRE suivante: 5' -AACT AGGNCA A AGGTCA - 3' (Desvergne and Wahli, 1999; Juge-Aubry et al., 1997).

## 2. Répartition tissulaire

PPAR $\alpha$  est exprimé chez les rongeurs et chez l'Homme dans de nombreux tissus tels que le foie, les reins, le cœur, les muscles squelettiques et le TA brun, ainsi que dans une grande variété de cellules vasculaires, les cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins et les monocytes/macrophages (Inoue et al., 1998; Su et al., 1998). De manière générale, l'expression tissulaire et histologique de PPAR $\alpha$  est cohérente avec son rôle majeur dans l'activation de l'oxydation mitochondriale et péroxysomale des acides gras. Les principaux organes qui catalysent des acides gras (cœur, muscle squelettique, foie, muqueuse intestinale, rein, TA brun) expriment des niveaux élevés de PPAR $\alpha$  (Grygiel-Gorniak, 2014; Mandard et al., 2004).

PPAR $\beta/\delta$  est exprimé de façon ubiquitaire chez l'homme. C'est l'isotype le plus abondant dans le cerveau, la peau et le muscle squelettique. Le statut nutritionnel semble constituer un régulateur important de l'expression de PPAR $\beta/\delta$ . Le jeûne réduit fortement son expression dans le rein, le foie et le muscle squelettique (Escher et al., 2001; Holst et al., 2003). Les fonctions de PPAR $\beta/\delta$  sont essentielles au bon fonctionnement de l'organisme puisque ce dernier joue un rôle très important dans l'inflammation, l'athérosclérose, l'obésité, la fertilité, la thermogénèse, le cancer et le système nerveux (Bishop-Bailey and Bystrom, 2009; Grygiel-Gorniak, 2014; Wagner and Wagner, 2010).

L'expression de PPAR $\gamma$  dépend du tissu considéré. Ainsi, PPAR $\gamma$ 1 est présent dans de nombreux tissus alors que PPAR $\gamma$ 2 est restreint au tissu adipeux (Vidal-Puig et al., 1997). PPAR $\gamma$ 3 est très abondant dans les macrophages, le gros intestin ainsi que dans le tissu adipeux blanc (Fajas et al., 1998; Lehrke and Lazar, 2005). PPAR $\gamma$ 4 est exprimé dans les cellules endothéliales. PPAR $\gamma$  joue un rôle très important dans la différenciation des adipocytes, dans la sensibilisation à l'insuline, dans le cancer, dans l'inflammation, l'athérosclérose, les

désordres rétiens, et dans la réponse immunitaire (Ahmadian et al., 2013; Grygiel-Gorniak, 2014; Szeles et al., 2007).

### 3. Les ligands naturels et pharmacologiques

Certains ligands des PPARs peuvent se fixer aux trois isoformes tandis que d'autres sont spécifiques d'un isotype donné. Les données de cristallographie du LBD (ligand binding domain) des PPARs ont montré que la poche de liaison au ligand est assez large, leur permettant ainsi de lier un grand nombre de ligands (Uppenberg et al., 1998; Xu et al., 2001). De plus, l'intérêt thérapeutique des PPARs dans le traitement des désordres métaboliques a abouti à la fabrication de nombreux ligands synthétiques de très forte affinité.

#### a. Les ligands de PPAR $\alpha$

##### *Les ligands naturels*

Ce qui est caractéristique de PPAR $\alpha$ , c'est son vaste spectre de ligands. PPAR $\alpha$  peut être activé par une large variété d'acides gras branchés, saturés et insaturés dont l'acide palmitique, l'acide stéarique, l'acide palmitoléique, l'acide oléique, l'acide linoléique et l'acide arachidonique (Bishop-Bailey and Wray, 2003; Forman et al., 1997). PPAR $\alpha$  semble avoir une meilleure affinité pour les acides gras polyinsaturés que pour les acides gras saturés, et les acyl-CoA des acides gras à très longue chaîne sont de meilleurs ligands et activateurs que leurs acides gras correspondants. (Hostetler et al., 2006; Hostetler et al., 2005). La lipoprotéine lipase et l'ATGL favorisent aussi la production de ligands de PPAR $\alpha$  en agissant sur les lipoprotéines circulantes (Haemmerle et al., 2011; Ruby et al., 2010; Ziouzenkova et al., 2003). L'affinité pour PPAR $\alpha$  est de l'ordre du  $\mu$ M ou du nM en fonction des ligands, largement compatibles avec les concentrations circulantes mais surtout compatibles avec les concentrations intracellulaires et intranucléaires estimées de ces acides gras (Hostetler et al., 2006; Lin et al., 1999).

Les ligands les plus puissants se trouvent parmi les eicosanoïdes qui proviennent de la voie de dégradation de l'acide arachidonique par la lipoxigénase pour la formation de leucotriènes (LT) et les acides hydroxyeicosatétraénoïques (HETE), ou via la voie de la cyclooxygénase qui produit les prostaglandines (PG). Ainsi l'acide (8(S)-HETE) et le leukotriène B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), des médiateurs de l'inflammation, sont des ligands sélectifs de PPAR $\alpha$  (Devchand et al., 1996; Narala et al., 2010). Le 9(S)- et le 13(S)-acide hydroxyoctadécadiénoïque (9(S)-HODE et 13(S)-HODE), provenant de l'action de la lipoxigénase sur l'acide linoléique et des

lipoprotéines de basse densité (LDL) oxydées, sont également des ligands de PPAR $\alpha$ . Cependant, ces derniers ne sont pas sélectifs de PPAR $\alpha$ . Ils peuvent également activer PPAR $\gamma$  et  $\beta/\delta$  (Delerive et al., 2000).

### *Les ligands synthétiques*

Des ligands synthétiques de PPAR $\alpha$  sont des molécules de la famille des fibrates (clofibrate, bezafibrate, fénofibrate, WY-14643, gemfibrozil), utilisés dans le traitement des hypertriglycéridémies (Kliwer et al., 2001; Willson et al., 2000). Le clofibrate est le chef de file de cette classe et a été identifié avant que PPAR $\alpha$  ne soit découvert (Hess et al., 1965). Ces ligands sont généralement de faible affinité et doivent être utilisés à forte dose pour exercer leur activité hypolipémiante. Certains fibrates, comme le fénofibrate, le clofibrate, le GW7647 et le GW9578 (Brown et al., 2001) ont une très grande spécificité pour PPAR $\alpha$ . Des antagonistes spécifiques de PPAR $\alpha$  ont aussi été développés comme le GW6471 et le MK866 (Kehrer et al., 2001; Xu et al., 2002).

### **b. Les ligands de PPAR $\beta/\delta$**

Comme les autres PPARs, PPAR $\beta/\delta$  interagit avec les acides gras saturés et insaturés tels que l'acide dihomog- $\gamma$ -linoléique, l'EPA (eicosapentaenoic acid) et l'acide arachidonique et la carbaprostacycline, une prostaglandine hémisynthétique. Ces composés sont capables de l'activer à des concentrations de l'ordre du micromolaire (Forman et al., 1997). Sa sélectivité de ligand est intermédiaire entre PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$  (Xu et al. 1999). L'acide palmitique, et son analogue métabolique l'acide 2-bromopalmitique, ont été identifiés comme des agonistes de PPAR $\beta/\delta$  (Amri et al., 1995). Des eicosanoïdes comme les prostaglandines PGA2 et PGD2 sont également capables d'activer ce récepteur (Yu et al., 1995).

Afin d'étudier les rôles physiologiques de PPAR $\beta/\delta$ , des ligands synthétiques avec une haute sélectivité ont été développés tels que le GW0742, le GW2433, le GW9578, le L-783483, et le GW501516 (Berger and Moller, 2002; Graham et al., 2005; Nagasawa et al., 2006). PPAR $\beta/\delta$  favorise le métabolisme des acides gras, réduit l'inflammation liée aux macrophages et inhibe l'hypertrophie cardiaque, ce qui le place comme potentielle cible thérapeutique dans le traitement l'obésité et de ses complications. Aucun ligand de PPAR $\beta/\delta$  n'est encore utilisé pour un usage thérapeutique et très peu d'essais thérapeutiques avec des agonistes de PPAR $\beta/\delta$  ont été réalisés. Ses agonistes diminuent le niveau de LDL, le taux plasmatique de triglycérides et augmentent le taux de lipoprotéines de haute densité (HDL) (Riserus et al., 2008; Sprecher et

al., 2007). Ainsi, le développement d'agonistes de PPAR $\beta/\delta$  est une cible thérapeutique potentielle pour de nombreuses pathologies, notamment l'hyperlipidémie ou l'hypercholestérolémie.

### c. Les ligands de PPAR $\gamma$

#### *Les ligands naturels*

Les ligands endogènes de PPAR $\gamma$  sont des acides gras, avec une préférence pour les acides gras polyinsaturés tels que l'acide linoléique, l'acide arachidonique et l'acide eicosapentaénoïque, à des concentrations micromolaires (Dussault and Forman, 2000; Xu et al., 1999). Des dérivés des prostaglandines tels que la 15-desoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandine J<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>) ont été identifiés comme des agonistes des PPAR $\gamma$ . Des lipides oxydés tels que le 9-HODE (acide 9-hydroxyoctadécadiénoïque), le 13-HODE (acide 13-hydroxyoctadécadiénoïque) et le 15-HETE (acide 15-hydroxyeicosatétraénoïque) produits par des cyclooxygénases et des lipoxygénases ont aussi été décrits comme des activateurs de PPAR $\gamma$  (Forman et al., 1995; Nagy et al., 1998; Nosjean and Boutin, 2002). Un alkyl phospholipide oxydé, l'hexadecyl azelaoyl phosphatidylcholine, a été proposé comme un ligand agoniste endogène de PPAR $\gamma$  avec un K<sub>d</sub> de 40nM (Davies et al., 2001).

#### *Les ligands synthétiques*

Les thiazolidinediones (TZD) sont les activateurs synthétiques de PPAR $\gamma$  les plus connus, ils ont la propriété d'améliorer la sensibilité à l'insuline et de diminuer la glycémie chez les patients diabétiques de type 2. La troglitazone a été le premier médicament approuvé pour cette utilisation, suivi par la pioglitazone et la rosiglitazone. Leur mécanisme d'action est resté inconnu jusqu'en 1995, où leur haute affinité pour PPAR $\gamma$  fut découverte (Lehmann et al., 1995). Les effets bénéfiques des TZD sur la résistance à l'insuline sont maintenant bien établis. Il en est de même pour leurs effets indésirables : rétention hydrique, prise de poids par activation de l'adipogenèse, œdèmes des membres inférieurs et fractures. Ces effets indésirables ont conduit à l'arrêt de l'utilisation thérapeutique de plusieurs TZD (Cho and Momose, 2008; Knouff and Auwerx, 2004).

Afin de diminuer les effets indésirables des agonistes de PPAR $\gamma$ , de nouvelles générations de médicaments ont été développées. Ceux-ci comprennent des agonistes synthétiques non TZD comme l'isoxazolidinediones (JTT-501) et le GW-7845 qui activent PPAR $\gamma$  et possèdent des propriétés anti-diabétiques et anti-carcinogènes chez les rongeurs (Heppner et al., 2005;

Yamazaki et al., 2000). Les composés synthétiques chimiques ne sont pas les seuls à posséder la capacité à activer PPAR $\gamma$ : des agonistes de ce récepteur nucléaire ont été découverts dans la composition de certaines plantes médicinales (Wang et al., 2014a).

Beaucoup de recherches s'intéressent actuellement aux agonistes partiels SPPARM (selective PPAR modulator). Le concept des agonistes partiels se base sur les changements conformationnels induits par la liaison du ligand sur le récepteur PPAR $\gamma$ . Ces changements sont différents selon le ligand et le tissu considéré et entraînent le recrutement de facteurs de transcription (co-répresseurs ou co-activateurs) différents. Ainsi, divers ligands peuvent, *via* un même récepteur nucléaire, induire des réponses biologiques différentes. Les SPPARM de PPAR $\gamma$  ont pour objectif de dissocier l'effet sur la différenciation adipocytaire de l'effet sur le métabolisme du glucose (Higgins and Depaoli, 2010; Zhang et al., 2007). Beaucoup de ces agonistes partiels induisent chez les animaux une plus faible prise de poids tout en conservant leurs effets bénéfiques sur le glucose plasmatique, l'inflammation et d'autres pathologies (Chang et al., 2008; Liu et al., 2015). Les essais cliniques sur certains de ces agonistes partiels, l'halofenate, le metaglidasen, l'INT131 et le telmisartan montrent des résultats encourageants avec une rétention hydrique et une prise de poids moindre que pour les agonistes totaux, combinées avec une diminution de l'hémoglobine glyquée (DePaoli et al., 2014; Wright et al., 2000).

En parallèle, des antagonistes de PPAR $\gamma$  ont été développés comme le BADGE (bisphenol diglycidyl ether) et le LG-100641 (Mukherjee et al., 2000; Wright et al., 2000).

#### **4. Mécanismes de régulation de la transcription**

Des études récentes révèlent l'existence d'une grande diversité de complexes protéiques coactivateurs et corépresseurs capables d'interagir avec les membres de la superfamille des récepteurs nucléaires et de conditionner leur activité transcriptionnelle. Leurs interactions avec les récepteurs nucléaires peuvent mener à une régulation transcriptionnelle positive ou négative selon le ligand fixé (Feige et al., 2006).

##### **a. Activation de la transcription**

Il existe deux principaux modes d'action par lesquels les PPARs peuvent réguler de façon positive l'expression des gènes cibles (Figure 2).

## A-Activation ligand-dépendante    B-Activation ligand-indépendante

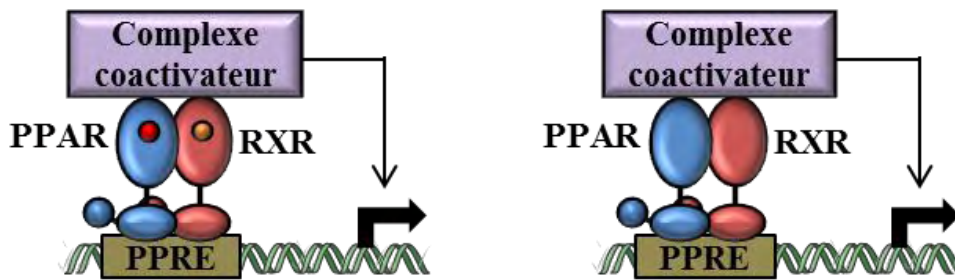


Figure 2 : Mécanismes d'actions des PPARs pour activer la transcription génique

Le récepteur nucléaire PPAR forme un dimère avec le récepteur aux rétinoïdes RXR. Ce dimère se lie à une séquence d'ADN spécifique PPRE (Peroxisome Proliferator Responsive Element) et recrute un complexe coactivateur pour induire la transcription. L'activation de la transcription peut se faire avec ou sans la liaison des ligands sur les récepteurs nucléaires RXR et PPARs.

Les PPARs peuvent activer directement la transcription de leurs gènes cibles après hétérodimérisation avec RXR, liaison sur les régions promotrices du gène au niveau d'un PPRE et recrutement d'un complexe coactivateur. Ce complexe coactivateur modifie la structure de la chromatine et facilite le recrutement de l'ARN polymérase II et l'assemblage de la machinerie de transcription au niveau du promoteur (Spiegelman and Heinrich, 2004; Yu and Reddy, 2007). De nombreux complexes coactivateurs ont été identifiés en fonction du type cellulaire, de la nature du ligand fixé par le PPAR et du gène transcrit (Dilworth and Chambon, 2001; McKenna and O'Malley, 2002). Le recrutement de ces complexes au promoteur est un phénomène rapide qui se répète plusieurs fois en une minute. De plus, il semblerait que ces complexes coactivateurs fonctionnent en combinaison entre eux et de façon spécifique au gène considéré en intégrant à la fois des informations venant de la liaison de PPAR à l'ADN et des informations provenant des cascades de signalisation déclenchées par les régions régulatrices des gènes à transcrire (Glass, 2006)

Bien que les PPARs exercent leur activité principalement de façon dépendante des ligands, certaines études montrent que ces récepteurs possèdent une activité basale importante en absence de ligand exogène. En effet, PPAR et RXR sont capables de se dimériser en l'absence de ligand et de se lier aux promoteurs de certains gènes cibles. Cependant, le débat continue pour déterminer si les PPARs sont capables d'être activés de façon indépendante d'un ligand via les régions AF-1 et AF-2 (activation par changement de conformation de l'hélice 12 par liaison à l'ADN ou par des coactivateurs) ou si l'activation résulte d'une présence de très faibles concentrations d'un ligand endogène (Feige et al., 2006).



### **b. Répression de la transcription**

Globalement, il existe de nombreux mécanismes par lesquels les PPARs peuvent réguler négativement l'expression des gènes. Ces mécanismes peuvent être dépendants ou indépendants de la fixation à l'ADN et de la présence de ligands (Figure 3).

Tout d'abord, l'hétérodimère PPAR/RXR peut se former en l'absence de ligand et se fixer sur la séquence PPRE de certains gènes cibles et réprimer la transcription en interagissant avec des corépresseurs (Feige et al., 2006). Ensuite, les PPARs peuvent avoir des effets inhibiteurs sur d'autres voies de signalisation en modulant les interactions avec des corépresseurs et des facteurs de transcription de façon dépendante du ligand. Ce phénomène, nommé trans-répression, est spécifique d'un promoteur mais semble être indépendant de la liaison du récepteur à l'ADN (Pascual and Glass, 2006; Varga et al., 2011). La trans-répression peut se dérouler par deux mécanismes distincts:

- Soit l'hétérodimère PPAR/RXR séquestre le facteur de transcription empêchant sa fixation à l'ADN et la transcription de son gène cible. C'est l'un des mécanismes responsable de l'action anti-inflammatoire des PPARs. Par exemple, dans les lymphocytes T, le facteur de transcription NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells) est dissocié du promoteur de l'IL2 pour se fixer sur PPAR $\gamma$  (Yang et al., 2000).

- Soit le complexe PPAR/RXR séquestre les cofacteurs nécessaires à l'activation de la transcription d'un gène cible. Ainsi, un phénomène de compétition peut s'installer lorsque les PPARs sont plus affins pour les complexes coactivateurs que le facteur de transcription du gène cible, entraînant la répression de la transcription de ce dernier. Ce mécanisme est observé notamment pour la répression du gène iNOS (inductible nitric oxide synthase) où PPAR $\gamma$  séquestre le cofacteur CBP et empêche aussi la transactivation de iNOS par NF $\kappa$ B, AP1 et STAT1. A l'inverse, le relargage de complexes corépresseurs par les PPARs peut inhiber l'activité transcriptionnelle du gène cible. (Li et al., 2000; Ricote et al., 1998)

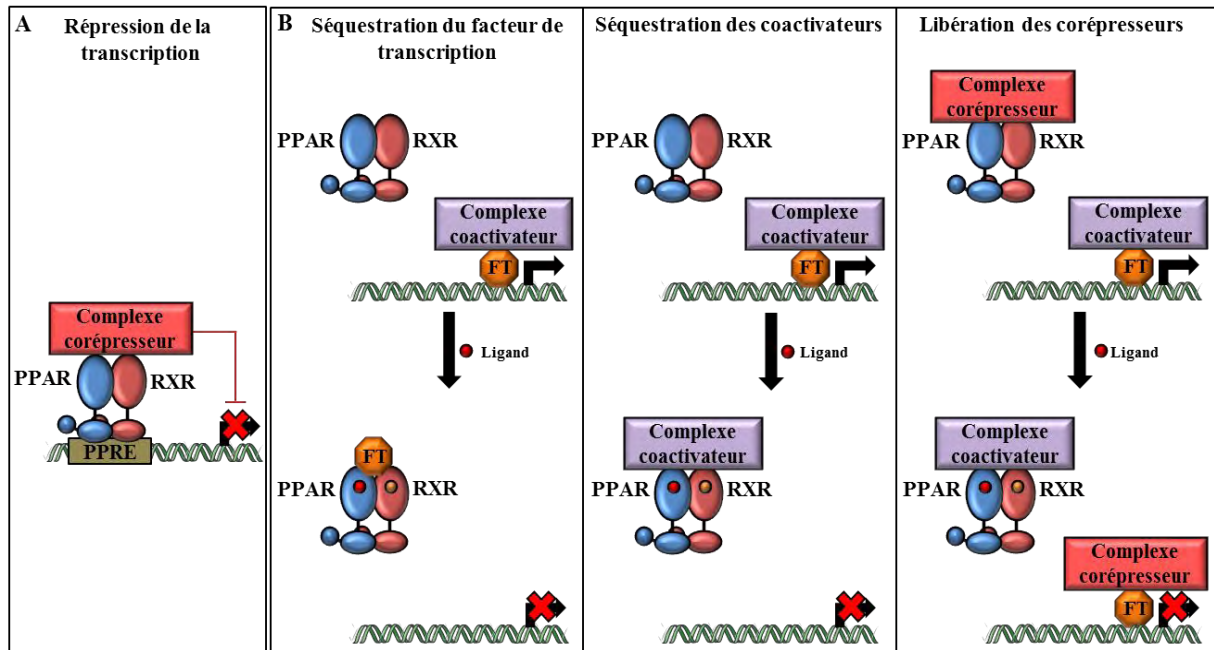


Figure 3 : Mécanismes de répression de la transcription par les PPARs, d'après (Feige et al., 2006)

A : Répression de la transcription par les PPARs en l'absence de ligand. (B) Mécanismes de transrépression de la transcription. FT : Facteur de transcription.

### c. Le rôle des cofacteurs

Les cofacteurs sont des protéines capables d'activer (coactivateurs) ou de réprimer (corépresseurs) l'activité transcriptionnelle d'un récepteur nucléaire, soit par ouverture de la chromatine, soit en modulant le recrutement de la machinerie transcriptionnelle. Le remodelage de la chromatine par acétylation, méthylation, phosphorylation ou ubiquitinylation et le repositionnement des nucléosomes est un phénomène nécessaire à la fixation du facteur de transcription sur l'ADN et à la formation d'un complexe d'initiation de la transcription (Aranda and Pascual, 2001; Feige et al., 2006).

Certains gènes cibles des PPARs sont maintenus dans un état inactif, en absence de ligands ou en présence d'antagonistes, par l'association constitutive de l'hétérodimère RXR/PPAR avec de multiples co-répresseurs à activité histone désacétylase comme NCoR (Nuclear receptor Co-Repressor) ou SMRT (Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid hormone receptor) (Jones and Shi, 2003; Nagy et al., 1997; Yu and Reddy, 2007). Leur effet répressif sur la transcription passe essentiellement par le recrutement des histones désacétylases (HDACs) qui induisent une compaction de la chromatine (Robyr et al., 2000). La reconnaissance de ces corépresseurs par des récepteurs nucléaires se fait par des peptides hélicoïdaux nommés «boîtes CoRNR» (Hu and Lazar, 1999). D'autres classes de corépresseurs répriment l'activité des récepteurs

nucléaires par compétition avec les coactivateurs et le recrutement d'HDAC, notamment RIP140 et Rb qui interagissent avec PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$  (White et al., 2004).

Les protéines TBL1 (Transducin  $\beta$ -like 1) et TBLR1 sont associées à ces complexes corépresseurs (Zhang et al., 2006). Ce sont des facteurs protéiques d'échange des corépresseurs nucléaires (NCoEx) qui facilitent la transition d'un état réprimé à un état transcriptionnellement actif en réalisant l'échange entre un complexe corépresseur et un complexe coactivateur. Lors de la liaison du ligand aux récepteurs nucléaires, NCoEx recrute la machinerie d'ubiquitylation pour induire la dégradation par le protéasome des corépresseurs et facilite ainsi le recrutement de coactivateurs et l'activation de la transcription (Perissi et al., 2004; Perissi and Rosenfeld, 2005) (Figure 4).

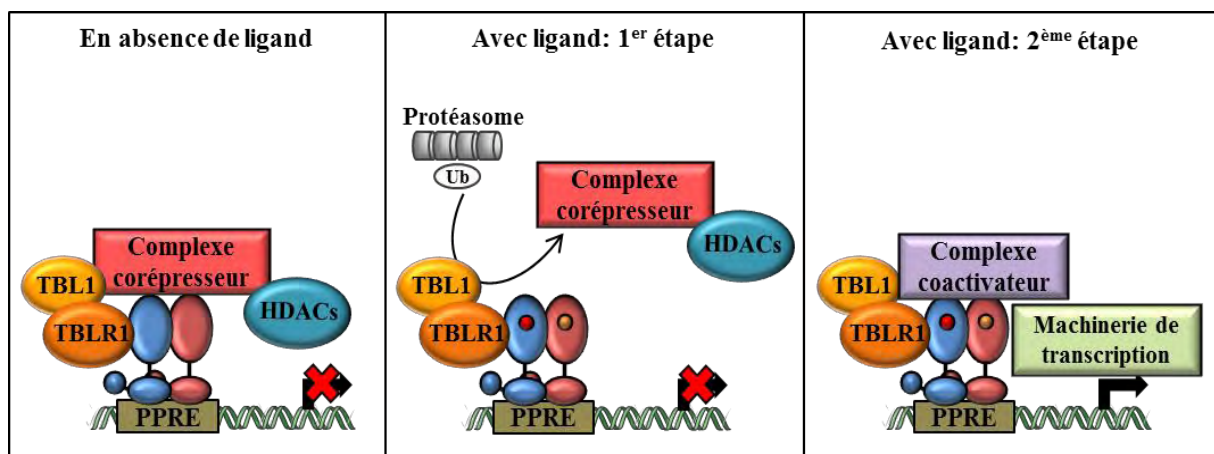


Figure 4 : Echange dépendant du ligand des complexes corépresseurs et coactivateurs, d'après (Feige et al., 2006)  
HDAC: histone deacetylase; TBL1: Transducin  $\beta$ -like 1; TBLR1: Transducin  $\beta$ -like receptor 1; Ub: ubiquitin.

Les coactivateurs agissent directement de manière spécifique aux ligands avec les récepteurs nucléaires au niveau du domaine AF-2 du LBD possédant le motif LXXLL (L étant une leucine et X un acide aminé non défini) (Heery et al., 1997; Viswakarma et al., 2010). Les coactivateurs incluent les CBP/300 et les protéines de la famille p160 (SRC1/NCOA1, TIF2/SRC2 et pCIP/RAC3/ACTR/AIB1/TRAM1/SRC3) (Dowell et al., 1997; Zhang et al., 2004a). Ces protéines présentent des activités enzymatiques HAT qui décompactent l'ADN, mais également jouent un rôle important dans le recrutement du complexe transcriptionnel Pol II (Yu and Reddy, 2007). On trouve aussi les ubiquitine-ligases E6-AP (Nawaz et al., 1999), les complexes SWI/SNF (SWItch / Sucrose Non Fermenting) remodelant la chromatine (Salma et al., 2004; Wang, 2003) et les protéines méthyltransférases CARM-1 (Chen et al., 1999; Yadav et al., 2008). Un deuxième ensemble de co-activateurs contient PBP (PPAR binding

protein) et TRAP (thyroid hormone receptor-associated protein) qui, avec d'autres sous-unités, vont former un pont entre le récepteur nucléaire CBP/p300 et la machinerie transcriptionnelle facilitant son recrutement (Kornberg, 2005; Roeder, 2005; Zhu et al., 1997). En plus de ces cofacteurs transcriptionnels classiques, les PPARs possèdent des cofacteurs propres qui régulent spécifiquement leur action au niveau de différents tissus cibles comme PGC1 $\alpha$  et  $\beta$  (Hondares et al., 2006; Vega et al., 2000).

Cet échange de complexes antagonistes constitue une cible privilégiée pour des molécules synthétiques capables de réguler l'activité des facteurs de transcription tels que les PPARs. Ainsi, des agonistes de ces récepteurs nucléaires fonctionnent comme de véritables hormones et favorisent la fixation d'un complexe coactivateur. Au contraire, certains antagonistes des PPARs permettent d'inhiber le recrutement des complexes activateurs, et, dans la plupart des cas, favorisent même la fixation d'un complexe corépresseur verrouillant la transcription du gène.

#### **d. Modifications post-traductionnelles des PPARs**

Certaines modifications des PPARs peuvent entraîner la modulation de leur activité transcriptionnelle. A ce jour, trois types de modifications sont décrites.

##### ***La phosphorylation des PPARs***

L'activité des PPARs peut être modulée par phosphorylation activatrice ou inhibitrice en fonction du résidu modifié, de l'isotype et de la kinase mise en jeu (Burns and Vanden Heuvel, 2007). La phosphorylation des PPARs entraîne de profondes modifications conformationnelles qui se traduisent par des changements de l'affinité de ces récepteurs nucléaires pour leurs propres ligands, pour RXR, pour leurs cofacteurs et même pour leurs gènes cibles (Feige et al., 2006). Il a été montré que la phosphorylation de la sérine 273 de PPAR $\gamma$  dans le tissu adipeux par Cdk5 (cyclin-dependent kinase 5) et ERK (Extracellular signal-regulated kinase), est induite chez des souris obèses et diabétiques (Banks et al., 2015; Choi et al., 2014). Cette phosphorylation ne modifie pas la capacité adipogénique de PPAR $\gamma$  mais modifie l'expression d'un sous-ensemble spécifique de gènes cibles de PPAR $\gamma$  lié à l'obésité, notamment l'adipsine et l'adiponectine (Choi et al., 2010). Cette phosphorylation, médiée par Cdk5 et ERK chez les souris, est bloquée par les antidiabétiques comme les TZD ou les agonistes partiels de PPAR $\gamma$  comme le MRL24 (Choi et al., 2011). De même, chez l'Homme, l'amélioration de la sensibilité à l'insuline lors d'un traitement par un TZD est

inversement corrélée à la phosphorylation de la sérine 273 (Choi et al., 2010). D'autres cascades de signalisation intracellulaire telles que celles déclenchées par les protéines kinase A et C sont capables de phosphoryler les PPARs, et les conséquences de la phosphorylation sur l'activité des PPARs sont propre à chaque isotype (Gray et al., 2005; Lazennec et al., 2000; Rochette-Egly, 2003). Parmi les autres régulations indirectes de l'activité des PPARs, citons la phosphorylation possible de RXR et de la plupart des cofacteurs associés (Jonas and Privalsky, 2004; Misra et al., 2002).

### ***L'ubiquitylation des PPARs***

L'ubiquitine est une protéine fixée de façon covalente sur les protéines par des enzymes à activité ubiquitine ligase dans le but de les diriger vers le protéasome 26S où ces dernières seront dégradées. L'ubiquitylation des PPARs se fait au niveau de résidus lysine et permet la régulation des niveaux cellulaires des récepteurs (Dennis and O'Malley, 2005; Lonard and O'Malley, 2009). Le processus de dégradation de PPAR $\gamma$  est déclenché par la liaison de ses ligands via un mécanisme qui requiert l'activation du domaine AF2 ainsi qu'une conformation particulière de ce récepteur. Cette dégradation est inhibée par la fixation du corépresseur RIP140 (Genini and Catapano, 2006; Hauser et al., 2000). Par contre, les agonistes de PPAR $\alpha$  et PPAR $\beta/\delta$  stabilisent le récepteur empêchant sa dégradation (Blanquart et al., 2002). De façon intéressante, de nombreux cofacteurs tels que p300 peuvent posséder une activité ubiquitine-ligase (Grossman et al., 2003).

### ***La sumoylation des PPARs***

La sumoylation (Small Ubiquitin-like MOdifier) est un processus similaire à l'ubiquitylation par lequel des protéines SUMO sont liées de façon covalente aux protéines cibles. La sumoylation régule différents mécanismes biochimiques dont la stabilité de la protéine, la translocation nucléaire et la transcription des gènes. Cette sumoylation, selon le résidu lysine ciblé, peut exercer un effet inhibiteur ou activateur sur PPAR $\gamma$  et PPAR $\alpha$  mais n'affecte pas leur localisation nucléaire (Gill, 2005).

PPAR $\gamma$ 1 peut être sumoylé au niveau de ses lysines 77 et 365 (107 et 395 pour PPAR $\gamma$ 2) (Feige et al., 2006). La sumoylation de K77 située dans le domaine AF-1 est dépendante du ligand et régule de façon négative l'activité transcriptionnelle du récepteur nucléaire. La sumoylation de K365 dans les macrophages est indépendante du ligand et conduit à des effets trans-répresseurs au niveau du promoteur de la iNOS. PPAR $\gamma$  sumoylé se fixe sur le complexe NCoR, empêchant

son ubiquitinylation et sa dégradation (Diezko and Suske, 2013; Lu et al., 2013). De même, la sumoylation de la lysine 185 de PPAR $\alpha$  diminue son activité transcriptionnelle par le recrutement du corépresseur NCoR (Pourcet et al., 2010).

## 5. Rôles physiologiques des PPARs dans le métabolisme lipidique

Les PPARs contrôlent l'expression de gènes impliqués dans de nombreux processus biologiques différents. Les PPARs jouent un rôle dans l'inflammation via la transrépression des gènes pro-inflammatoires (Wahli and Michalik, 2012), dans le cycle cellulaire et le cancer (Michalik et al., 2004) et dans l'homéostasie glucidique et lipidique sur lesquelles nous allons nous focaliser. Par conséquent, les agonistes ou antagonistes des PPARs sont utilisés dans de nombreuses thérapeutiques (pour review voir (Millar, 2013; Montagner and Wahli, 2013; Peters et al., 2012; Staels and Fruchart, 2005; Yessoufou and Wahli, 2010). Nous allons ici faire un rappel succinct du rôle des PPARs dans le foie, le muscle et le pancréas dans le métabolisme lipidique. Les rôles des PPARs dans les tissus adipeux seront abordés dans leurs paragraphes respectifs.

### a. Rôles des PPARs dans le foie

PPAR $\alpha$  est fortement exprimé dans le foie, il contrôle l'expression de nombreux gènes impliqué dans le métabolisme lipidique (Wang, 2010). Les souris dont le gène codant pour PPAR $\alpha$  a été invalidé présentent une hausse des acides gras circulants et une stéatose hépatique, de par leur incapacité à induire l'expression des gènes de l'entrée et de l'oxydation des acides gras (Aoyama et al., 1998; Kersten et al., 1999; Sugden et al., 2002). En effet, PPAR $\alpha$  régule de nombreux gènes impliqués dans les étapes importantes de ce processus, de l'absorption des acides gras jusqu'à leur dégradation (Lefebvre et al., 2006; Rakhshandehroo et al., 2009).

Le foie détermine la quantité de HDL (High-Density Lipoprotein) dans le plasma en régulant la synthèse et le catabolisme des HDL. Les agonistes de PPAR $\alpha$  augmentent l'expression des principales apolipoprotéines des HDL chez l'Homme, les apolipoprotéines A-I (Apo A-I) et A-II (Apo A-II) (Vu-Dac et al., 1995; Vu-Dac et al., 1994). Ces apolipoprotéines sont impliquées dans le transport inverse du cholestérol des cellules périphériques vers le foie, où l'excès de cholestérol sera éliminé dans la bile. Ce processus nécessite les transporteurs ABCA1 (ATP Binding Cassette A-1) (export) et du récepteur SR-BI/CLA1 (influx), tous deux sous la dépendance de PPAR $\alpha$  et LXR $\alpha$  dans les macrophages et l'intestin (Chinetti et al., 2001; Knight et al., 2003). De plus, l'activation de PPAR $\alpha$  diminue le rapport cholestérol estérifié sur

cholestérol libre (CE/CL) en diminuant l'activité de l'ACAT (acylCoA : cholesterol acyl transferase) dans les macrophages, ce qui contribue à l'augmentation de la quantité de cholestérol libre disponible pour l'efflux. PPAR $\alpha$  régule aussi de nombreux gènes impliqués dans la clairance hépatique des lipoprotéines de très basse densité (VLDL). Les agonistes de PPAR $\alpha$  augmentent l'expression de la LPL hépatique et le taux plasmatique de l'apolipoprotéine A-V, un activateur de la LPL, ce qui augmente l'hydrolyse des triglycérides issus des VLDL et des chylomicrons (Prieur et al., 2003; Vu-Dac et al., 2003). Au contraire, PPAR $\alpha$  réprime l'expression de l'apolipoprotéine CIII (Apo C-III), un inhibiteur endogène de la LPL hépatique (Figure 5).

La cétogenèse dans le foie est essentielle durant le jeûne, car les acides gras issus du tissu adipeux sont captés par le foie où ils sont oxydés dans les mitochondries pour produire les corps cétoniques. PPAR $\alpha$  est induit par le jeûne et est nécessaire pour la cétogenèse en régulant l'expression de la mHMG-CoAS (hydroxyméthylglutaryl-CoA synthase mitochondriale (Kersten et al., 1999; Knight et al., 2005).

Les agonistes de PPAR $\beta/\delta$  augmentent le taux de HDL chez les souris diabétiques et l'Homme (Leibowitz et al., 2000; Oliver et al., 2001). Comme pour PPAR $\alpha$ , les agonistes de PPAR $\beta/\delta$  contrôlent le métabolisme des lipoprotéines en augmentant l'expression des apolipoprotéine A-II dans le foie et l'expression du transporteur ABCA1 via LXR $\alpha$  dans les macrophages (Ogata et al., 2009; Thulin et al., 2008). Les données concernant l'effet des agonistes de PPAR $\beta/\delta$  sur le métabolisme hépatique sont rares et contradictoires. Un article montre que la surexpression de PPAR $\beta/\delta$  dans des hépatocytes humains et chez des souris db/db diminue la stéatose hépatique en diminuant l'activation de SREBP1c, et par conséquent la lipogenèse (Qin et al., 2008). Un autre article montre que l'expression ectopique de PPAR $\beta/\delta$  dans le foie induit une hausse de la synthèse de glycogène et de la synthèse d'acides gras mono-insaturés par lipogenèse *de novo* (Liu et al., 2011). Enfin, il a été montré qu'un agoniste de PPAR $\beta/\delta$  inhibe la sécrétion de glucose hépatique dans des souris obèses (Lee et al., 2006).

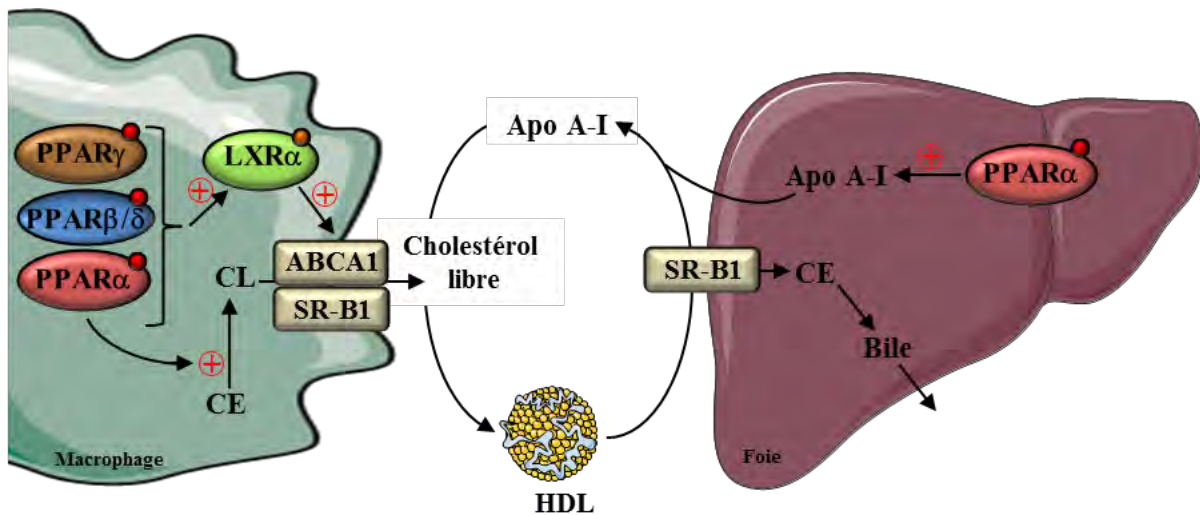


Figure 5 : Rôle des PPARs dans l'efflux de cholestérol

L'activation de PPAR $\alpha$  dans les macrophages augmente le taux de cholestérol libre (CL) par rapport au taux de cholestérol estérifié (CE), augmentant ainsi le taux de cholestérol libre pour l'efflux. Dans les macrophages, les trois isotypes de PPARs augmentent l'expression du transporteur impliqué dans l'efflux de cholestérol, ABCA1, de manière indirecte via LXR $\alpha$ . PPAR $\alpha$  augmente aussi l'expression de SR-B1, un deuxième transporteur du cholestérol, et dans le foie, il augmente l'expression d'un accepteur de cholestérol indispensable à l'efflux du cholestérol : l'apolipoprotéine A-I (Apo A-I). Les lipoprotéines de haute densité (HDL) ainsi formées vont alors retourner dans le foie où le cholestérol sera éliminé dans la bile.

Les effets de PPAR $\gamma$  dans le foie restent débattus. Certaines études montrent qu'il favorise la stéatose hépatique en augmentant les gènes impliqués dans l'absorption et le stockage des lipides (Way et al., 2001). L'expression ectopique de PPAR $\gamma$  dans le foie de souris entraîne une stéatose hépatique (Yu et al., 2003), tandis que la délétion spécifique de PPAR $\gamma$  dans les hépatocytes, empêche l'accumulation de lipides dans le foie des souris misent sous un régime gras (Gavrilova et al., 2003). A l'inverse, d'autres montrent que la sur-expression de PPAR $\gamma$  dans le foie empêche la stéatose hépatique et la fibrose car les acides gras sont séquestrés dans le tissu adipeux (Nan et al., 2009; Nan et al., 2011). De plus, chez l'Homme de nombreuses études ont démontré que le traitement par TZD réduit la stéatose hépatique non alcoolique (Kallwitz et al., 2008; Musso et al., 2012). Comme pour les deux autres isotypes, PPAR $\gamma$  augmente l'expression d'ABCA1 dans les macrophages et favorise l'efflux de cholestérol (Ogata et al., 2009).

### **b. Rôles des PPARs dans le muscle**

PPAR $\beta/\delta$  est l'isotype majoritairement exprimé dans le muscle. L'expression de PPAR $\beta/\delta$  est plus élevée dans les fibres de type I oxydatives, par rapport aux fibres de type II glycolytiques (Ehrenborg and Krook, 2009). L'activation de PPAR $\beta/\delta$  induit un certain nombre de gènes impliqués dans la capture et l'oxydation des acides gras (LPL, CD36, CPT1b et



PGC1 $\alpha$ ) dans le muscle squelettique (Dressel et al., 2003; Kramer et al., 2007). Ainsi, l'activation de PPAR $\beta/\delta$  par un agoniste prévient l'obésité, augmente la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline dans le muscle squelettique (Coll et al., 2010). Le jeûne prolongé et l'exercice d'endurance sont caractérisés par une augmentation de l'expression de PPAR $\beta/\delta$  dans le muscle squelettique de la souris (Holst et al., 2003; Luquet et al., 2003), indiquant que PPAR $\beta/\delta$  est le récepteur qui médie l'augmentation de l'oxydation des acides gras lors du jeûne. La surexpression de PPAR $\beta/\delta$  dans les muscles augmente la proportion de fibres oxydatives qui sont riches en mitochondries et stimule le métabolisme oxydatif mitochondrial. Ceci est associé à une augmentation d'environ 90% des capacités d'endurance, une diminution de l'adiposité et une résistance au diabète induit par l'alimentation (Gaudel et al., 2008; Luquet et al., 2003). Inversement, la délétion spécifique conduit à une plus grande proportion de fibres glycolytiques et à une résistance à l'insuline (Schuler et al., 2006).

Comme PPAR $\beta/\delta$ , PPAR $\alpha$  est plus abondant dans les fibres oxydatives que dans les fibres glycolytiques. Dans des cellules de muscle squelettique humain *in vitro*, PPAR $\alpha$  a été induit précocement lors de la différenciation des myocytes (Muoio et al., 2002b). Une corrélation entre l'expression de PPAR $\alpha$ , la proportion de fibres de type I et l'exercice d'endurance a été trouvée dans le muscle squelettique humain (Kramer et al., 2006; Russell et al., 2003). Similairement à PPAR $\beta/\delta$ , PPAR $\alpha$  affecte le métabolisme des lipides. L'activation de PPAR $\alpha$  par un agoniste dans les myotubes humains stimule l'oxydation des lipides et une diminution de l'accumulation de triglycérides (Muoio et al., 2002b). Cela indique une redondance dans les fonctions de PPAR $\alpha$  et  $\beta/\delta$  dans le contrôle du métabolisme des acides gras (Muoio et al., 2002a). Cependant, contrairement à PPAR $\beta/\delta$ , les souris surexprimant PPAR $\alpha$  dans le muscle squelettique diminuent l'expression de GLUT4 et deviennent insulino-résistantes. À l'inverse, les souris dont le gène codant PPAR $\alpha$  a été invalidé spécifiquement dans le muscle, sont plus tolérantes au glucose, présentent une absorption musculaire du glucose augmentée et une accumulation de triglycérides intramusculaires (Finck et al., 2005).

Le niveau de la protéine PPAR $\gamma$  est relativement faible dans le muscle squelettique. *In vitro*, les TZD améliorent le transport du glucose stimulé par l'insuline dans des myocytes humains (Kramer et al., 2001; Verma et al., 2004). L'expression d'une forme constitutivement active de PPAR $\gamma$  dans le muscle squelettique de souris empêche la mise en place d'une intolérance au glucose et l'insulino-résistance du muscle squelettique lors d'un régime riche en graisses (Amin et al., 2010). La délétion spécifique de PPAR $\gamma$  dans le muscle squelettique

donne des résultats contradictoires. Dans la première étude, la perte de PPAR $\gamma$  a donné lieu à une résistance à l'insuline des muscles squelettiques ainsi que du tissu adipeux et du foie. En revanche, la deuxième n'a observé aucun changement dans l'homéostasie du glucose musculaire, tandis que la sensibilité à l'insuline hépatique est compromise. Dans les deux cas, un traitement aux TZD a amélioré la sensibilité à l'insuline des animaux, soulignant l'importance du tissu adipeux et du foie pour les actions hypoglycémiantes des TZD (Hevener et al., 2003; Norris et al., 2003).

### c. Rôles des PPARs dans le pancréas

Les trois isotypes sont exprimés dans le pancréas. Dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques matures, PPAR $\beta/\delta$  est fortement exprimé, alors que les niveaux de PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$  sont relativement faibles (Ravnskjaer et al., 2010). Cependant, la fonction de PPAR $\beta/\delta$  dans le pancréas reste mal définie. Dans des cellules  $\beta$ -pancréatiques de rat, la production de ligands de PPAR $\beta/\delta$  à partir du glucose, induit la sécrétion d'insuline (Cohen et al., 2011; Ravnskjaer et al., 2010). De plus, une étude récente montre que PPAR $\beta/\delta$  est indispensable pour la différenciation de cellules souches embryonnaires humaines en cellules  $\beta$ -pancréatiques capables de sécréter de l'insuline (Li et al., 2015). Cependant, la délétion de PPAR $\beta/\delta$  dans le compartiment épithélial du pancréas de souris augmente le nombre d'îlots et la sécrétion d'insuline (Iglesias et al., 2012).

PPAR $\alpha$  est important pour augmenter l'oxydation des acides gras et diminuer la sécrétion d'insuline à jeun. Les souris invalidées pour le gène PPAR $\alpha$  ont une forte augmentation de l'insulinémie à jeun par rapport aux souris témoins (Gremlich et al., 2005). Dans les cellules pancréatiques humaines et murines, l'activation de PPAR $\alpha$  est protectrice contre la lipotoxicité des acides gras (Frigerio et al., 2010; Holness et al., 2003; Lalloyer et al., 2006). Le traitement avec un agoniste de PPAR $\alpha$  améliore la fonction des cellules  $\beta$ -pancréatiques chez le rongeur résistant à l'insuline (Bergeron et al., 2006). A l'inverse, dans des souris ob/ob, l'absence de PPAR $\alpha$  entraîne un dysfonctionnement des cellules bêta du pancréas caractérisé par une réduction de la taille des îlots  $\beta$ -pancréatiques et une diminution de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Lalloyer et al., 2006).

PPAR $\gamma$  induit l'expression de gènes clés impliqués dans la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose (GSIS). Les TZD ont été montrés pour améliorer GSIS chez les rongeurs et chez l'Homme (Lupi et al., 2004; Masuda et al., 1995; Ohtani et al., 1996). L'activation de PPAR $\gamma$

par des agonistes et sa surexpression dans des cellules  $\beta$ -pancréatiques augmentent la mobilisation du calcium intracellulaire et la sécrétion d'insuline. Ceci est médié par l'augmentation de l'expression du récepteur aux acides gras GPR40 et de GLUT2. De plus, les agonistes de PPAR $\gamma$  induisent l'expression d'ABCA1 dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques, ce qui réduit la teneur en graisse des îlots et améliore la sécrétion d'insuline. Cependant, les résultats d'études *in vivo* ont été contradictoires, avec des études montrant des altérations de la masse des cellules bêta, mais aucun changement dans l'homéostasie du glucose chez les souris dépourvues du récepteur PPAR $\gamma$  dans leur cellules bêta. D'autres montrent que la perte de PPAR $\gamma$  dans le pancréas conduit à une hyperglycémie et une détérioration de la GSIS (Rosen et al., 2003; Welters et al., 2012).

## II. L'OBESITE

### 1. Définition

L'Organisation mondiale de la santé (OMS) définit le surpoids et l'obésité comme une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui peut nuire à la santé. Depuis 1998, l'obésité est reconnue comme maladie chronique et comme une épidémie. Le plus simple calcul pour estimer de degré de surpoids est l'indice de masse corporelle (IMC). L'indice de masse corporelle est égal à la masse (exprimée en kilogrammes) divisée par le carré de la taille (en mètre). Un IMC entre 18,5 et 25 kg/m<sup>2</sup> est considéré comme normal chez un adulte et entre 25 et 30 kg/m<sup>2</sup>, on parle de surpoids (surcharge pondérale). L'individu est considéré comme obèse au-delà de 30 kg/m<sup>2</sup> (WHO, 2010). (Tableau 1)

IMC (en kg/m <sup>2</sup> )	Classification
< 16,5	Dénutrition
Entre 16,5 et 18,5	Maigreur
Entre 18,5 et 24,9	Corpulence normale
Entre 25 et 29,9	Surpoids
Entre 30 et 34,9	Obésité modérée
Entre 35 et 39,9	Obésité sévère
A partir de 40	Obésité morbide ou massive

Tableau 1 : Corpulence d'un individu en fonction de l'IMC

Bien que cette échelle soit pratique pour définir l'obésité, une évaluation de la masse grasse est plus réaliste car elle prend en compte l'IMC, l'âge et le sexe de l'individu. La masse grasse mesure le pourcentage de masse de tissu adipeux par rapport à la masse musculaire grâce à des balances à impédancemétrie. Entre 20 et 50 ans, un taux normal de graisse se situe entre 10 et 20% chez l'homme et 20 à 30% chez la femme. Une mesure fine de la masse, la localisation et la distribution des graisses peuvent être effectuées par des méthodes non invasives comme l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et par absorptiométrie biphotonique (DEXA) (Shen and Chen, 2008; Verdich et al., 2011).

### 2. Epidémiologie

Selon l'OMS, en 2014, plus de 1,9 milliards d'adultes sont en surpoids et parmi eux 600 millions sont obèses, ce qui représente 39% d'adultes en surpoids et 13% d'obèses. Depuis les années 80, la prévalence de l'obésité a plus que doublé dans le monde (Figure 6). De plus, le

surpoids touche 42 millions d'enfants, notamment dans les pays en voie de développement, ce qui laisse présager une forte augmentation de la prévalence de l'obésité dans les prochaines années. Si la tendance actuelle se poursuit, près de la moitié de la population mondiale adulte sera en surpoids ou obèse d'ici 2030 (WHO, 2015). On estime que le surpoids et l'obésité sont à l'origine d'environ 5 % des décès dans le monde, ce qui pourrait conduire à un arrêt de l'augmentation de l'espérance de vie dans les prochaines années pour certains pays (Ng et al., 2014). L'obésité est à la fois une préoccupation de santé publique mais aussi financière, l'impact économique total de l'obésité avoisinant les 2 000 milliards de dollars chaque année, soit 2,8 % du PIB mondial (Richard Dobbs, 2014).

**Proportion de personnes en surpoids et obèses dans quelques pays (IMC > 25)**  
(par rapport à la population du pays)

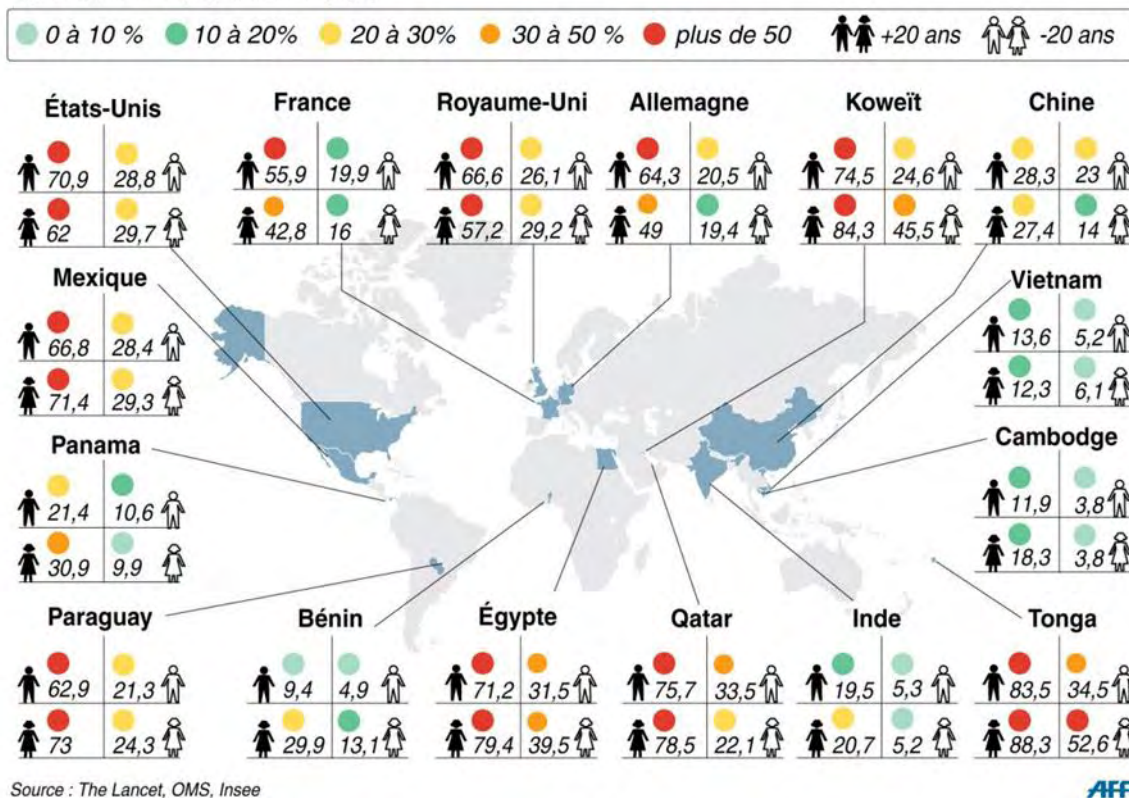


Figure 6 : Surpoids et obésité dans le monde d'après les données de l'OMS, the Lancet et l'Insee 2014

Bien que causée par une interaction complexe entre génétique et environnement, l'obésité est toujours la conséquence ultime d'un déséquilibre à long terme de la balance énergétique, généralement provoqué par un excès d'apports et/ou une diminution des dépenses énergétiques.

### 3. La balance énergétique

L'homéostasie énergétique résulte de l'équilibre entre les apports d'énergie contenus dans les aliments (AE : apports d'énergies) et les dépenses d'énergie (DE). La résultante de ces

deux composantes est appelée balance énergétique. La masse corporelle demeure stable lorsque l'apport et la dépense énergétiques s'équivalent. De façon générale, dans toute situation où les apports ne compensent pas les dépenses, cela induit un déséquilibre de la balance énergétique :  $AE < DE$  entraîne un amaigrissement, ou un ralentissement de la croissance des enfants; à l'inverse,  $AE > DE$  entraîne un stockage excessif sous forme de graisses. Un simple déséquilibre énergétique d'environ 5 % est suffisant pour induire une augmentation annuelle de 5 kg de masse grasse, et au fil du temps peut aboutir au développement de l'obésité (Swinburn et al., 2004; Ziegler et al., 2000). De multiples régulations physiologiques sont impliquées dans l'optimisation de la prise alimentaire et du stockage, de la mobilisation des réserves énergétiques en réponse aux besoins de l'organisme (Figure 7).

#### **a. Les apports énergétiques**

Les apports énergétiques correspondent à l'ensemble de l'énergie apportée sous forme de boisson ou de nourriture et qui peut être métabolisée par l'organisme. L'énergie des aliments est fournie par les glucides, les protéines, les lipides et l'alcool. La valeur énergétique varie d'un macronutriment à l'autre. Une femme devrait en moyenne consommer 2000 kcal par jour pour couvrir ses dépenses sans modifier sa masse corporelle, et un homme environ 2500 kcal/j. Globalement, de mauvaises habitudes alimentaires se sont ancrées dans la vie de tous les jours. L'augmentation de la taille des portions, la prise de collations, l'accessibilité à des aliments variés et l'évolution des prix ont contribué à une consommation calorique excessive (Misra et al., 2010; Swinburn et al., 2004). De plus, la consommation d'aliments agréables en bouche active le circuit de récompense et de plaisir, favorisant l'appétit et entraînant généralement une augmentation des quantités ingérées (Volkow et al., 2012). Les facteurs psychologiques comme le stress, l'anxiété ou des pathologies comme la dépression sont souvent associés à une augmentation de la prise alimentaire et à l'obésité (Singh, 2014; Sinha and Jastreboff, 2013). Tous ces bouleversements alimentaires couplés à une sédentarisation et une baisse des activités physiques ont favorisé l'apparition de l'épidémie d'obésité actuelle (Swinburn and Egger, 2004).

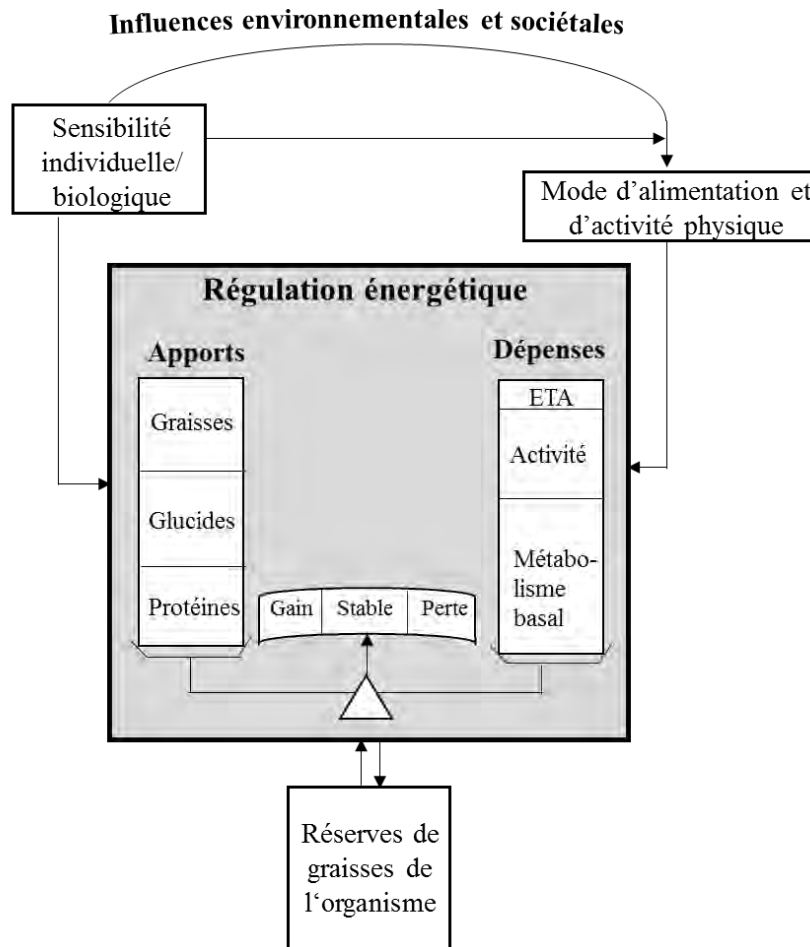


Figure 7 : La balance énergétique, d'après l'OMS 2000

Le bilan énergétique est positif lorsque l'apport énergétique est supérieur à la dépense, ce qui favorise la prise de poids. À l'inverse, un bilan énergétique négatif favorise la diminution des réserves de graisses de l'organisme et la perte de poids. Ce schéma montre les principes fondamentaux de l'équilibre et de la régulation énergétiques. Le poids est régulé par une série de processus physiologiques qui ont la capacité de le maintenir dans des limites relativement étroites (poids stable). Toutefois, des influences sociétales et environnementales importantes modulent l'apport et la dépense. La sensibilité des individus à ces influences dépend de facteurs génétiques et biologiques tels que le sexe, l'âge et l'activité hormonale. On estime que les facteurs diététiques et l'activité physique sont les facteurs intermédiaires modifiables à travers lesquels les forces favorisant la prise de poids s'exercent. ETA = Effet thermique des aliments.

### **b. La dépense énergétique**

L'organisme parvient à réguler cette balance énergétique en jouant sur la prise alimentaire, mais également au niveau des différents postes de dépense énergétique que sont : le métabolisme de base, la dépense énergétique liée à l'activité musculaire et la dépense énergétique associée à la thermorégulation. La dépense énergétique journalière ou globale, comprend la dépense énergétique de repos et les dépenses associées à la prise alimentaire et à l'activité physique (Figure 8).

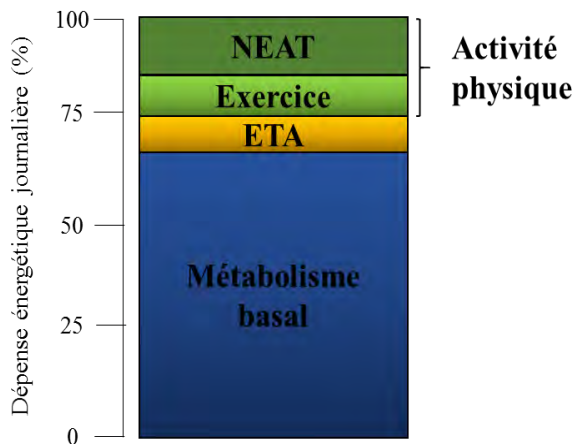


Figure 8 : Composante de la dépense énergétique journalière

Les trois composantes de la dépense énergétique journalière sont le métabolisme basal (60-65%), l'effet thermique des aliments (ETA, 10%) et l'activité physique (de 20 à 25%). L'activité physique se décompose en l'exercice physique et la thermogénèse non liée à l'exercice volontaire (NEAT). La somme de ces trois composantes correspond à la quantité d'énergie qui doit être apportée par l'alimentation pour maintenir son poids.

### ***Le métabolisme de repos ou basal***

Le métabolisme de repos ou basal est défini comme la dépense énergétique mesurée le matin, au repos, en position allongée, à thermoneutralité, 12 à 14 heures après le dernier repas, sans activité intellectuelle importante. Ce métabolisme de base correspond à la dépense énergétique nécessaire aux fonctions vitales de l'organisme : maintien des gradients électrochimiques et de la température corporelle, fonctionnement des grandes fonctions physiologiques (circulation, respiration, excrétion, tonus musculaire). Chez un individu adulte ayant une activité physique modérée, on estime que le métabolisme de repos représente environ 60% de la dépense énergétique totale, soit 1300 kcal chez la femme et 1650 kcal chez l'homme sur 24 heures. La contribution des différents organes à la dépense énergétique est très différente. La majeure partie du métabolisme de repos est due à la dépense énergétique d'organes tels que le foie, le cerveau, le cœur, les reins et les muscles au repos. Le tissu adipeux et la peau n'interviennent que très peu. Ainsi, le métabolisme basal varie en fonction de la masse maigre et particulièrement de la masse musculaire (Speakman and Selman, 2003). On estime que la masse maigre peut expliquer 70 à 80% de la variabilité interindividuelle du métabolisme de repos (Bergouignan and Blanc, 2006). Ceci explique aussi les différences de métabolisme observées en fonction du sexe : un homme présente un métabolisme basal 5 à 8% plus élevé que celui d'une femme de même masse, de taille et d'âge égaux. Il en est de même pour l'effet de l'âge ou de la prise de poids: le vieillissement induit une fonte musculaire, provoquant une diminution du métabolisme basal (Henry, 2000; Johnstone et al., 2005). Les principaux régulateurs du métabolisme basal sont les hormones thyroïdiennes et la noradrénaline.



L'hypothyroïdie induit une diminution de 30 à 50% du métabolisme basal, quand l'hyperthyroïdie l'amplifie. Ce phénomène serait dû à l'influence des hormones thyroïdiennes sur la respiration mitochondriale couplée et découplée (Lombardi et al., 2007). Le stress affecte également le métabolisme basal en stimulant le système nerveux sympathique : on observe alors une libération d'adrénaline qui stimule le métabolisme basal, notamment par son action au niveau cardiaque. Le métabolisme de repos n'est pas le métabolisme minimal, car c'est au cours du sommeil que la dépense énergétique est la plus basse, en raison de l'absence de tonus musculaire.

### *La thermogenèse adaptative*

La thermogenèse adaptative correspond à l'énergie dissipée sous forme de chaleur en réponse à la prise alimentaire, ou à des changements environnementaux tels que le froid et le stress. Parmi ces facteurs, la thermogenèse postprandiale représente à peu près 10% des dépenses énergétiques quotidiennes et varie selon la taille, la composition et l'heure du repas (Jequier et al., 1987; Rothwell and Stock, 1979). Elle est le résultat de 2 composantes: l'une dite obligatoire, et l'autre facultative. La thermogenèse postprandiale obligatoire correspond aux processus de digestion et de stockage des nutriments, elle varie en fonction de la composition de l'aliment et des voies métaboliques impliquées dans son stockage. La transformation du glucose en glycogène requiert 5% de l'énergie contenue dans le glucose, elle est de 25% si celui-ci est stocké sous forme de triglycérides. Le stockage des lipides dans le tissu adipeux demande environ 2% de l'énergie ingérée sous forme de lipides. Quant à la transformation des protéines, elle nécessite 25% de l'énergie des protéines ingérées afin d'assurer la stimulation de la synthèse protéique à partir des acides aminés. La thermogenèse postprandiale facultative, quant à elle, intervient en condition de suralimentation. Cela se traduit par une activation du système nerveux sympathique pour dissiper, sous forme de chaleur, l'apport excessif d'énergie au niveau du tissu adipeux brun. Ce mécanisme est bien documenté chez les rongeurs qui possèdent des capacités thermogéniques importantes au niveau de leur tissu adipeux brun (Cannon and Nedergaard, 2004).

La thermogenèse liée à l'exposition au froid, dépend de la température extérieure. Lorsque la température est en dessous de la thermoneutralité, des mécanismes de productions de la chaleur sont mises en place afin d'éviter l'hypothermie (Silva, 2006). Chez l'Homme et chez le rongeur, cette production de chaleur est réalisée par le muscle (thermogenèse frissonnante) et par le TA brun (thermogenèse sans frisson). L'activité thermogénique du TA brun est due à la présence

d'une protéine nommée UCP1 (uncoupling protein 1), qui dissipe le gradient électrochimique sous forme de chaleur en court-circuitant l'ATP-synthase. L'énergie issue de l'oxydation des substrats n'est plus convertie sous forme d'ATP mais dissipée sous forme de chaleur (Cannon and Nedergaard, 2004). Cette production de chaleur dépend de la quantité de tissu et de son niveau d'activation par le système nerveux sympathique. L'activité thermogénique du muscle et du TA brun et leur rôles dans les dépenses énergétiques, chez l'Homme et le rongeur, seront abordés plus en détails dans le paragraphe IV-Le tissu adipeux brun.

### ***L'activité physique***

L'activité physique spontanée représente environ 20% de la dépense énergétique totale chez une personne sédentaire, mais cette part est très variable et peut atteindre jusqu'à 60% de la dépense énergétique totale lors d'efforts prolongés. L'activité physique est séparée en deux composantes: d'une part l'activité physique non liée à l'exercice (non exercise activity thermogenesis, NEAT), et l'activité physique associée à l'exercice.

**L'activité physique non liée à l'exercice** est la composante principale de l'activité quotidienne, aussi bien pour les personnes sédentaires ou celles pratiquant une activité physique régulière. La NEAT se réfère aux dépenses d'énergie non volontaires, telles que le maintien de la posture assise ou debout, parler ou encore faire les courses et les mouvements liés à la nervosité. La NEAT est donc l'élément le plus variable de la dépense d'énergie entre individus, allant de 10 à 15 % du total des dépenses d'énergie quotidiennes chez les personnes très sédentaires à 50 % ou plus chez les personnes très actives (Dauncey, 1990; Levine, 2004; Livingstone et al., 1991). Le travail est un facteur important dans les variations inter-individuelles. Lorsque l'on compare deux individus adultes de taille, d'âge et de sexe similaire, un travailleur moyen qui passe la plupart de son temps en position assise a une NEAT de travail de 700 kcal par jour. Un sujet travaillant principalement dans une position debout peut augmenter sa NEAT professionnelle jusqu'à 1400 kcal par jour, voire 2000 kcal par jour pour une profession agricole (Levine, 2007).

L'activité de la NEAT est influencés par la sur- et la sous-alimentation. Chez l'homme, le degré d'activation de la NEAT induite par la surnutrition est prédictive de la susceptibilité à la prise de poids (Levine et al., 1999). Ainsi, les individus capables d'induire efficacement la NEAT, dissipent 69% de l'excès d'énergie sous forme de chaleur. A l'inverse, la dépense énergétique liée à la NEAT est la variable la plus affectée dans des circonstances de sous-alimentation. Les mécanismes neurobiologiques exacts impliqués dans la régulation de la NEAT ne sont pas

encore clairement élucidés. Cela semble impliquer une multitude de mécanismes neuronaux associés à un réseau de médiateurs très complexe (ghréline, AgRP, leptine, ...). L'un d'entre eux, l'orexine, semble être un modulateur de la NEAT. Le système orexine est impliqué dans le contrôle de l'éveil et du sommeil, et de la régulation de l'activité physique spontanée (Kotz et al., 2008). Les données expérimentales indiquent que des injections d'orexine A ou d'un antagoniste dans le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus induisent une augmentation ou une diminution, respectivement, dose-dépendante de l'activité physique spontanée, et par conséquent de la NEAT (Kiwaki et al., 2004; Perez-Leighton et al., 2012). Enfin, le niveau d'orexine A plasmatique est négativement corrélé avec l'adiposité chez l'Homme, pouvant en partie expliquer la diminution de la NEAT (Adam et al., 2002)

**L'exercice physique** induit également une dépense énergétique liée à un travail musculaire. Cette dépense est proportionnelle à la masse musculaire mise en jeu, à l'intensité et à la durée du travail musculaire effectué. Au cours des dernières décennies, la sédentarisation de la société, via l'utilisation de la voiture et des transports en commun dans les déplacements du quotidien et via la mécanisation des travaux agricoles, domestiques et industriels, a entraîné une diminution de l'activité physique. On estime que la dépense énergétique journalière a diminué de 600kcal entre les années 1920 et 1990. Aujourd'hui, dans les pays industrialisés, on considère que l'apport de l'exercice physique dans la dépense énergétique est négligeable (Levine, 2004; Levine, 2007). Au sein de la population de l'étude NHANES, 36,1% des sujets sont sédentaires, 47,6% ont une faible activité physique et seulement environ 16% ont une activité physique régulière (Loprinzi et al., 2014; Sisson et al., 2012). De plus, parmi les sujets pratiquant une activité physique régulière, la pratique n'excédait généralement pas plus de 2h par semaine, ce qui représente une dépense moyenne d'énergie d'au maximum 100 kcal/jour et contribue à 1-2% de la variance de la dépense énergétique total (Levine, 2007).

L'exercice physique joue un rôle primordial dans la prévention de l'obésité (Warburton et al., 2006) et l'OMS recommande au moins 30 minutes d'activité physique régulière, d'intensité modérée, plusieurs fois par semaine pour réduire le risque de développer les maladies associées à l'obésité. Ceci peut être facilement atteint via une augmentation des dépenses énergétiques par la NEAT (Levine, 2007).

#### 4. Facteurs génétiques

Il existe une grande inégalité chez les individus pour la prise, le maintien ou la perte de poids. Ces différences sont familiales et héréditaires. Les prédispositions génétiques et la vie dans un environnement « obésogène » influencent le développement d'une obésité.

Au cours des dernières années, les progrès dans l'analyse génomique ont permis de découvrir de nombreux gènes prédisposant à l'obésité ainsi que certains marqueurs moléculaires impliqués dans cette pathologie. Le risque pour un enfant de développer une obésité est plus important si l'un des parents est obèse : en effet, il a été démontré une forte corrélation entre le poids d'enfant adopté et l'IMC des parents biologique. Aucune relation n'existe avec l'IMC des parents adoptifs (Stunkard et al., 1986). L'héritabilité de l'obésité explique environ 50 à 70% de la variation de l'IMC (Bouchard et al., 1988; Farooqi and O'Rahilly, 2000). Certaines formes rares d'obésité sont causées par des mutations d'un seul gène, en général des gènes de la voie leptine-mélanocortine. Ces obésités sont généralement très sévères et débutent à l'enfance. Il s'agit de mutations des gènes de la leptine (LEP) (Montague et al., 1997), de son récepteur (LEPR) (Farooqi et al., 2007), de la pro-opiomélanocortine (POMC), cible centrale de la leptine (Krude et al., 2003), et de la proconvertase 1 (PCSK1), une enzyme de clivage de POMC (Jackson et al., 1997), du récepteur hypothalamique aux mélanocortines de type 4 (MC4R) (Lubrano-Bertheliet et al., 2006) et du gène SIM1 impliqué dans le développement de l'hypothalamus (Holder et al., 2000). En résumé, la leptine agit sur l'hypothalamus via fixation sur son récepteur et déclenche la sécrétion de la protéine dérivée de la POMC, l' $\alpha$ MSH, qui exerce un rôle anorexigène par fixation sur le récepteur MC4R. Les mutations du gène MC4R sont les plus fréquentes causes d'obésité monogénique : elles représentent 2 à 3 % des obésités de l'enfant et de l'adulte avec plus de 166 mutations décrites (Hinney et al., 2013).

Les obésités monogéniques ne représentent qu'une partie infime de tous les cas d'obésité. De nombreux gènes sont modulés par l'environnement, la nutrition et les dépenses énergétiques. L'étude des polymorphismes génétiques, a permis d'identifier de nombreux gènes impliqués dans l'obésité. Le meilleur exemple est le gène FTO (fat mass and obesity associated) : les personnes homozygotes pour l'allèle à risque pèsent 3 kg de plus et ont une augmentation de 67% du risque de développer une obésité par rapport à la population non porteuse. Le gène FTO est à ce jour celui qui prédispose le plus à l'obésité et à la prise de poids, mais sa contribution n'explique qu'un faible pourcentage de la variation de l'IMC (Loos and Yeo, 2014). Malgré cela, on ignore encore aujourd'hui la fonction de la protéine qu'il code et comment sa mutation

favorise l'apparition de l'obésité. Récemment, une association a été établie entre un polymorphisme sur le gène FTO (rs1421085 T/C) et le brunissement du TA blanc. Ce polymorphisme perturbe un motif du répresseur ARID5B conduisant à la dérégulation d'IRX3 et d'IRX5 durant la phase précoce de la différenciation adipocytaire. Le doublement de l'expression de ces activateurs entraîne le développement d'adipocytes blancs à la place d'adipocytes bruns, et par conséquent une réduction de la thermogénèse mitochondriale (Claussnitzer et al., 2015).

A ce jour, plus de 50 gènes sont associés avec l'obésité. Même si chaque gène pris individuellement, n'exerce qu'un faible rôle sur la masse et la composition corporelle de l'Homme, la contribution de ces gènes devient réellement significative lorsqu'ils interagissent avec des facteurs externes puissants tels que le déséquilibre énergétique (Sandholt et al., 2010).

## **5. Conséquences de l'obésité**

Les conséquences sanitaires de l'obésité et de la surcharge pondérale sont multiples et variées. C'est le cinquième facteur de risque de décès au niveau mondial et elle conduit à l'apparition de nombreuses pathologies comme le diabète de type II, des maladies cardiovasculaires et l'hypertension, certaines perturbations endocriniennes et métaboliques, des problèmes respiratoires, des complications ostéo-articulaires, certains cancers, le développement d'une stéato-hépatite non alcoolique ou des problèmes psychologiques (Kopelman, 2000; Martin-Rodriguez et al., 2015) (Figure 9)

Cependant, tous les obèses ne sont pas égaux face aux risques encourus. On estime que 10 à 25% de la population obèse est dite métaboliquement saine, c'est-à-dire ne développant pas les altérations métaboliques classiquement associées à l'obésité (Karelis et al., 2004a; Karelis et al., 2004b).

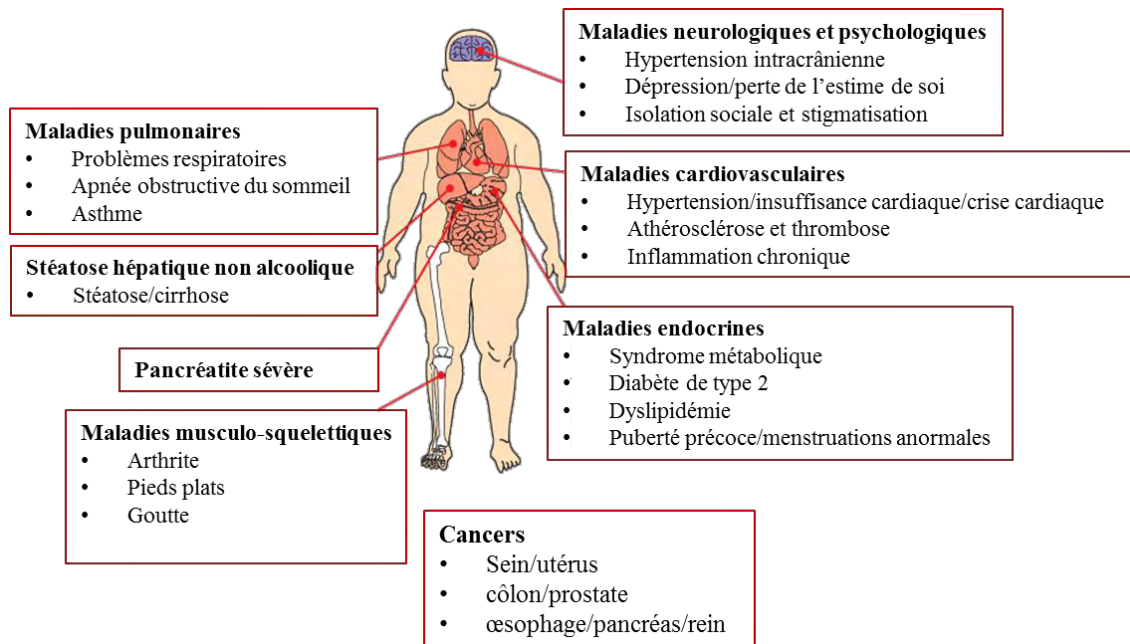


Figure 9 : Les maladies métaboliques associées à l'obésité, adapté de (Kanneganti and Dixit, 2012)

### a. Pathologies liées à l'obésité

L'une des plus importantes conséquences de l'obésité est le développement du syndrome métabolique. Ce dernier n'est pas considéré comme une maladie en soi, mais comme un problème métabolique générale. D'après la Fédération International du Diabète (IDF), la définition clinique du syndrome métabolique repose sur la présence d'une obésité centrale: tour de taille > 94 cm chez les hommes et > 80 cm chez les femmes, associé à la présence d'au moins deux des facteurs suivants:

- Une hypertriglycéridémie : triglycérides > 150 mg/dL (1,7 mmol/L), ou un traitement spécifique de ce trouble lipidique ;
- Une dyslipidémie : un faible taux d'HDL cholestérol: HDL < 40 mg/dL (1,03 mmol/L) chez les hommes et < 50 mg/dL (1,29 mmol/L) chez les femmes, ou un traitement spécifique de ce trouble lipidique ;
- Une élévation de la pression sanguine : une tension artérielle systolique  $\geq$  130 mmHg et/ou une tension artérielle diastolique  $\geq$  85 mmHg ou un traitement d'une hypertension précédemment diagnostiquée ;
- Une glycémie à jeun  $\geq$  100 mg/dL (5,6 mmol/L), ou un diabète de type 2 avéré.

Le syndrome métabolique est souvent observé chez les patients obèses présentant une obésité abdominale et constitue un stade précoce de plusieurs maladies comme le diabète de

type 2 et les maladies cardiovasculaires (Hoffman et al., 2015; Perrone-Filardi et al., 2015). La relation entre diabète et obésité est tellement étroite qu'il existe un terme le désignant «diabésité». Il est clairement établi que le risque de développer un diabète de type 2 augmente avec l'IMC et diminue avec la perte de poids, seule ou combinée à l'activité physique (Farak and Gaballa, 2011; Golay and Ybarra, 2005; Williams and Kelley, 2000). En effet 75% des personnes diabétiques sont obèses ; pour une femme obèse, le risque de développer un diabète de type 2 est multiplié par 10 et par 8 pour un homme. L'adiposité viscérale en particulier augmente le risque d'hyperinsulinémie et d'intolérance au glucose, contribuant à l'apparition et au développement d'un diabète de type II (Vazquez et al., 2007).

Chez les femmes, l'obésité est le troisième prédicteur le plus puissant des maladies cardiovasculaires, après l'âge et l'hypertension. Le risque de crise cardiaque pour une femme obèse est environ quatre fois celui d'une femme de corpulence normale du même âge (Lean et al., 1998). L'obésité, notamment viscérale, est un facteur de risque bien établi de risque d'hypertension artérielle, d'insuffisance cardiaque, d'athérosclérose et de thrombose. Les mécanismes à l'origine de l'hypertension sont multiples. Le débit cardiaque est augmenté chez les patients obèses en raison de l'augmentation du flux sanguin vers le tissu adipeux, entraînant des répercussions sur la structure et la fonction cardiaque. Divers facteurs comme l'inflammation à bas bruit, la dyslipidémie, la suractivité du système nerveux sympathique et du système rénine angiotensine augmentent la résistance vasculaire systémique chez les patients obèses, et par conséquent favorisent l'hypertension (Rheume et al., 2011; Winter et al., 2008).

L'obésité entraîne d'autres complications telles que des problèmes respiratoires, notamment le syndrome d'apnée du sommeil, et aussi des problèmes articulaires tels que l'arthrose liés aux contraintes mécaniques exercées sur le cartilage des principales articulations porteuses (genoux, hanches, lombaires). Ces complications mécaniques sont source de sédentarité et d'inactivité physique, ce qui contribue à l'entretien du surpoids et de l'obésité. L'accumulation de tissu adipeux intra-abdominal augmente l'incidence de certains cancers chez les personnes obèses (Basen-Engquist and Chang, 2011). Chez la femme, on estime que les cancers de l'endomètre et plus de la moitié des cancers du sein post-ménopause sont attribuables à une augmentation du poids ( $IMC > 29 \text{ kg/m}^2$ ) (Han et al., 2006; Krebs et al., 2006). Chez l'homme, l'obésité est associée à un risque élevé de cancer colorectal, de la prostate et du rein (Chow et al., 2000).

Enfin, l'obésité s'accompagne généralement d'altérations de l'état psychologique des individus. Plusieurs travaux ont mis en évidence que les obèses souffrent de discrimination du fait de la minceur et de la perfection véhiculées par les médias dans notre société. Cela participe au développement d'une sensation de mal-être et d'exclusion pouvant générer une grande anxiété et parfois une dépression (Gortmaker et al., 1993; Swallen et al., 2005)

**b. Surmortalité**

Il existe une relation positive entre la mortalité et l'indice de masse corporelle. Par rapport à un poids normal, les personnes ayant un IMC de  $30 \text{ kg/m}^2$  ont une augmentation du taux de mortalité (Flegal et al., 2013). Cette surmortalité est d'autant plus marquée si l'obésité survient tôt dans la vie. Cependant, les dernières études suggèrent que l'association entre IMC et surmortalité tend à s'estomper au fil du temps. Selon certaines études, il n'y a plus de risque de mortalité accrue pour les personnes en surpoids ou obèses de grade 1 ( $\text{IMC} < 35 \text{ kg/m}^2$ ) aujourd'hui comparé aux valeurs de 1970. Néanmoins, le risque est maintenu pour les obésités plus sévères (Flegal et al., 2013; Mehta et al., 2014). Cependant, cela reste controversé car d'autres études montrent que le nombre d'années de vie perdues lié à l'obésité n'a pas évolué (Fontaine et al., 2003; Greenberg, 2013). Il est important de noter que la relation entre l'IMC et la mortalité diffère avec le sexe et entre populations ethniques.

Si cette baisse est confirmée, cela suggère que l'amélioration de la prévention, du dépistage et de la prise en charge des maladies associées à l'obésité mise en place ces dernières années commence à avoir un impact dans la réduction des effets néfastes de l'obésité sur la santé.



### **III. LE TISSU ADIPEUX BLANC**

Le tissu adipeux, dont la quantité est directement la conséquence de la balance énergétique, joue un rôle central dans l'homéostasie lipidique. Il existe deux types de tissus adipeux (TA) chez les mammifères, aux morphologies et fonctions très différentes : le tissu adipeux blanc et le tissu adipeux brun. Le tissu adipeux blanc est la principale réserve énergétique capable d'accumuler et libérer des acides gras stockés sous forme de triglycérides en fonction des besoins énergétiques. Initialement considéré comme étant un simple lieu de stockage et de mobilisation de l'énergie ainsi qu'un isolateur thermique, le TA blanc est connu aujourd'hui pour être impliqué dans une variété de fonctions telles que la réponse immunitaire, l'inflammation, la reproduction, l'homéostasie glucidique et le métabolisme énergétique. C'est aussi un organe endocrine (Rosen and Spiegelman, 2006; Trayhurn, 2005).

#### **1. Distribution anatomique**

Le tissu adipeux blanc se répartit dans l'organisme en plusieurs dépôts. On distingue un tissu adipeux blanc de soutien, ou de protection mécanique, et un tissu adipeux de réserve énergétique. Le tissu de soutien est constitué de tissu conjonctif lâche caractérisé par une abondante matrice extracellulaire. Il est peu sensible aux variations nutritionnelles et sa répartition anatomique est en lien avec sa fonction : il est retrouvé autour des orbites, dans les paumes des mains, dans la plante des pieds et autour des articulations. Le tissu adipeux de réserve correspond au site de réserve énergétique. Son développement varie donc en fonction de la balance énergétique. On distingue deux grands types de dépôts possédant des caractéristiques propres : le TA blanc sous-cutané (TASC) et le tissu adipeux blanc viscéral (TAV) (Figure 10A).

Le TASC est une couche de gras localisée entre les muscles et la peau qui représente 80% du TA de l'organisme d'un individu sain. On le retrouve au niveau abdominal, des cuisses, des fessiers et de la face. Le TA sous-cutané abdominal peut être divisé en deux parties selon sa localisation par rapport à l'aponévrose : une couche superficielle (entre la peau et l'aponévrose) et une couche profonde (sous l'aponévrose).

Le TAV est un tissu profond qui entoure les viscères ; il sert de protection aux contraintes mécaniques auxquelles les organes sont soumis. Les grands dépôts intra-abdominaux sont aux niveaux péritonéal (omental, mésentérique), retro-péritonéal (periaortique, perirénal) et intrapelvien (gonadique et urogénital) (Gesta et al., 2007). Ce tissu adipeux est

deux fois plus important chez l'homme que chez la femme (10-20% contre 5-10% de la masse grasse). Chez les rongeurs, les dépôts sont quasiment similaires à l'homme à l'exception de la présence d'un tissu adipeux péri-gonadique (Cinti, 2005).

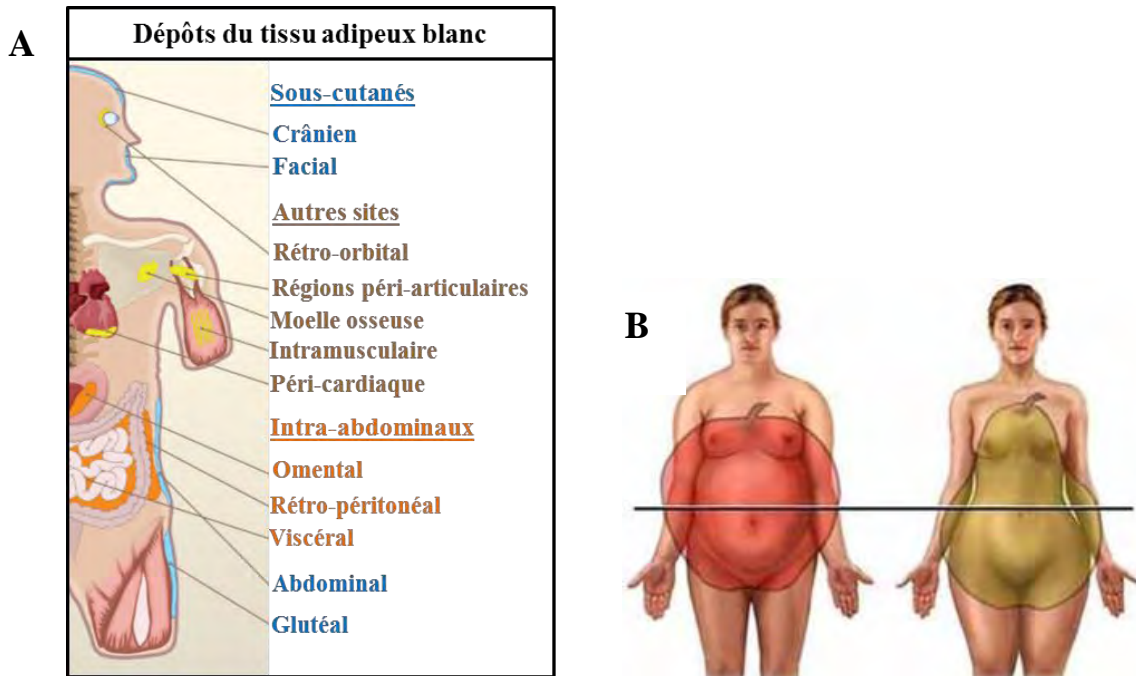


Figure 10 : Répartition du tissu adipeux chez l'Homme, d'après (Gesta et al., 2007)

(A) Les différents dépôts sous-cutanés et viscéraux du tissu adipeux blanc.

(B) L'obésité androïde est une répartition de la masse grasse principalement dans la partie supérieure du corps, au niveau abdominal, qui se développe principalement chez l'homme. Chez la femme, la masse grasse est répartie principalement au niveau sous-cutané dans la partie inférieure du corps : on parle d'obésité gynoïde.

Des différences sexuelles existent dans les capacités de stockage et d'expansion du TA. La femme développe plutôt une obésité dite gynoïde (forme de poire), avec le développement du TA sous-cutané au niveau des régions mammaires et fessières (Wajchenberg, 2000). A l'inverse, l'homme et la femme après la ménopause, développent une obésité dite androïde (forme de pomme) avec le développement du TA viscéral (principalement omental et mésentérique) (Figure 10B). Il est maintenant bien reconnu que l'obésité de type androïde est associée à un risque élevé de complications métaboliques liées à l'obésité: maladies cardiovasculaires, résistance à l'insuline, diabète de type 2, contrairement à l'accumulation de graisses sous-cutanées (Jensen, 2008; Masuzaki et al., 2001). De même, le TASC abdominal superficiel semble plutôt protecteur alors que le TASC profond semble être délétère car positivement corrélé à l'insulino-résistance et aux dysfonctions hépatiques (Kelley et al., 2000; Smith et al., 2001; Tordjman et al., 2012).

Cette notion de localisation du TA est essentielle puisque selon que le TA soit sous-cutané ou soit viscéral, son organisation cellulaire ainsi que son activité métabolique et sécrétoire vont varier ce qui explique en partie les disparités concernant le risque de développement de pathologies métaboliques et cardiovasculaires (Lafontan and Girard, 2008).

## 2. Composition cellulaire

Au niveau histologique, le tissu adipeux blanc est constitué de la fraction stroma-vasculaire (FSV) et d'adipocytes blancs matures.

### a. L'adipocyte blanc

L'adipocyte blanc mature est la principale cellule qui compose le tissu adipeux. Du point de vue morphologique, plus de 90% du volume de l'adipocyte est constitué d'une vacuole lipidique unique, le reste étant constitué d'un cytoplasme mince, d'un noyau refoulé sur le côté et de quelques mitochondries allongées et des autres organites (Figure 11). La gouttelette lipidique est revêtue de nombreuses protéines, comme la périlipine, qui protègent les lipides de l'hydrolyse par les lipases (lipolyse) dans des conditions basales, mais sont nécessaire à la lipolyse stimulée. Par conséquent et selon les besoins énergétiques, la taille de cette cellule peut varier de 20 à 200  $\mu\text{M}$  de diamètre (Fujimoto and Parton, 2011; Sztalryd and Kimmel, 2014). Outre cette capacité de stockage des lipides, l'adipocyte blanc possède une activité sécrétrice libérant de nombreux facteurs agissant de façon paracrine et/ou endocrine.

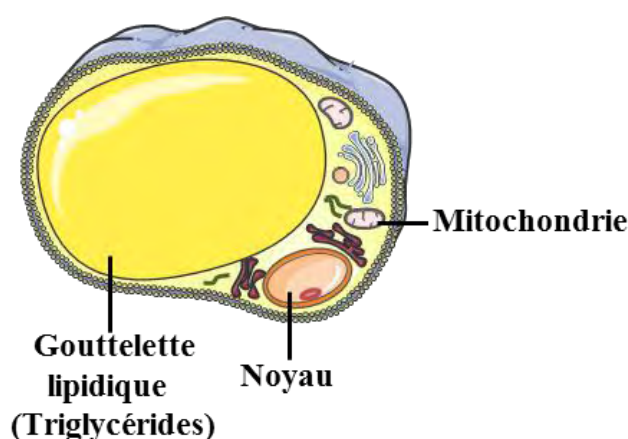


Figure 11 : Représentation schématique d'un adipocyte blanc

### **b. La fraction stroma-vasculaire**

La FSV contient des cellules stromales comprenant des progéniteurs adipocytaires, des cellules endothéliales et des cellules immunitaires.

#### *Les progéniteurs*

L'adipocyte mature étant une cellule incapable de proliférer et de se diviser, les nouveaux adipocytes proviennent de la prolifération et/ou du recrutement de cellules progénitrices suivis de leur différenciation. Chez l'homme adulte, ce renouvellement des adipocytes est estimé à environ 10% chaque année (Spalding et al., 2008). Ces cellules permettent également la formation de nouveaux adipocytes lors d'apports énergétiques excessifs. Les analyses phénotypiques des cellules de la FSV ont révélé la présence de préadipocytes, ainsi que la présence de cellules souches multipotentes capables de proliférer et de se différencier en plusieurs types cellulaires (Pittenger et al., 1999; Prunet-Marcassus et al., 2006). Les préadipocytes sont des précurseurs des adipocytes déjà engagés dans le lignage adipocytaire. Ces préadipocytes constituent un pool duquel vont pouvoir dériver les adipocytes après une étape de différenciation. Du fait de leur engagement, ils appartiennent à une population différente des cellules progénitrices mais sont morphologiquement indifférenciables des fibroblastes (Sengenès et al., 2005a).

La FSV du TA est une source de cellules immatures et multipotentes appelées adipose stem cells (ASC). Ces cellules sont assimilées à des cellules souches mésenchymateuses multipotentes par leur capacité à se différencier en plusieurs types cellulaires : ostéoblastes, chondroblastes et adipocytes (Baer, 2014; Zuk et al., 2002). L'expression des marqueurs membranaires CD34+, CD29+, Sca-1+, CD90+, CD24+ et l'absence de marqueurs hématopoïétiques (Lin- et CD45-) et endothéliaux (CD31-) permet d'isoler les progéniteurs adipocytaires blancs des autres populations cellulaires de la FSV par cytométrie en flux. Une transplantation de ces cellules chez des souris nude (souris immunodéficientes) ou dans le tissu adipeux résiduel de souris lipodystrophiques donne lieu à un dépôt de tissu adipeux normal (Rodeheffer et al., 2008; Tang et al., 2008). A ce jour, aucun marqueur spécifique ne permet d'identifier sans ambiguïté les progéniteurs adipocytaires, c'est pourquoi les combinaisons de marqueurs utilisés diffèrent d'une étude à l'autre. En ce qui concerne la localisation des progéniteurs du TA, des études histologiques récentes suggèrent qu'ils résident à proximité des vaisseaux sanguins, où ils coexistent avec les péricytes et les cellules endothéliales (Lin et al.,

2010). Certaines études suggèrent que les progéniteurs dériveraient des péricytes du fait qu'ils expriment des marqueurs communs comme PDGFR $\beta$  (platelet-derived growth factor receptor  $\beta$ ) et le facteur à doigt de zinc ZFP423, tandis que d'autres avancent qu'il s'agit de deux populations distinctes de cellules (Gupta et al., 2012; Maumus et al., 2011; Tang et al., 2008). Néanmoins, même si leur emplacement exact dans la niche vasculaire n'a pas été déterminé avec précision, il est clair qu'il existe une relation étroite entre progéniteurs adipocytaires et vasculaires.

Enfin, plusieurs équipes ont également démontré une production d'adipocytes à partir de cellules souches hématopoïétiques issues de la moelle osseuse via la circulation sanguine. La capacité de ces cellules à générer des adipocytes a été vérifiée *in vivo* par des études de transplantation cellulaire chez la souris (Crossno et al., 2006; Sera et al., 2009; Tomiyama et al., 2008). Chez l'Homme, le suivi de patients ayant subi une greffe de moelle osseuse, a permis d'estimer que les cellules souches hématopoïétiques issues de la moelle osseuse contribuent pour 10 % à la population des adipocytes sous-cutanée (Ryden et al., 2015).

### ***Les cellules endothéliales***

La faible vascularisation apparente du tissu adipeux est due à la taille élevée des adipocytes. La diminution de la taille des adipocytes lors du jeûne chez l'animal permet de mettre en évidence un réseau capillaire important autour de chaque adipocyte (Figure 12) (Rosell and Belfrage, 1979). Chez l'Homme, ces cellules endothéliales sont caractérisées par l'expression de CD34 $^{+}$  et CD31 $^{+}$  et sont indispensables au développement et au maintien du TA. En effet, les phénomènes d'angiogenèse et d'adipogenèse sont étroitement liés, des expériences d'implantation de préadipocytes transfectés par une forme dominante négative de PPAR $\gamma$  empêchant l'adipogenèse, montrent une inhibition de l'angiogenèse au site d'implantation. A l'inverse, l'inhibition de l'angiogenèse par un anticorps neutralisant anti-VEGFR2 inhibe l'adipogenèse (Fukumura et al., 2003). De plus des analyses en cytométrie de flux montrent que le pourcentage de cellules endothéliales dans la FSV reste constant quel que soit l'IMC. Ainsi, l'augmentation du volume du tissu adipeux est proportionnelle à l'augmentation de l'angiogenèse (Miranville et al., 2004). Cette relation entre angiogenèse et adipogenèse est renforcé par le fait que certains progéniteurs adipocytaires résident dans des niches vasculaires ou ils coexistent avec des péricytes et des cellules endothéliales, les sécrétions des cellules endothéliales affectant la prolifération et les capacités adipogéniques des

cellules progénitrices qui elle-même stimulent l'angiogénèse (Maumus et al., 2008; Neels et al., 2004; Nishimura et al., 2007).

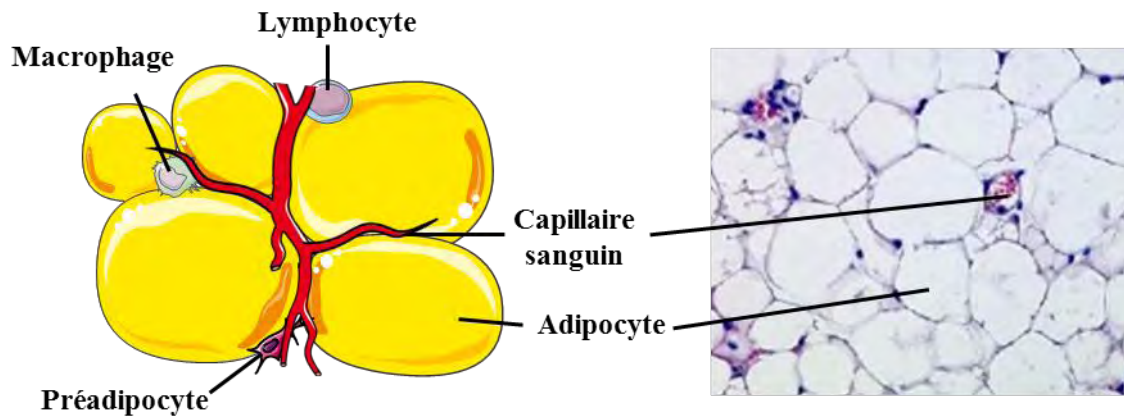


Figure 12 : La diversité cellulaire du tissu adipeux blanc

Dans le tissu adipeux, les adipocytes sont regroupés en lobules irrigués par un réseau capillaire. Au sein de ces lobules, les adipocytes tassés les uns contre les autres prennent une forme polyédrique. En plus des adipocytes, le tissu adipeux contient des cellules immunitaires comme les macrophages et les lymphocytes, des progéniteurs adipocytaires et des cellules endothéliales.

### ***Les cellules immunitaires***

La fraction stroma-vasculaire comprend une population d'origine hématopoïétique, principalement des macrophages et des lymphocytes.

Il existe deux types de macrophages dans le TA, les macrophages résidents du tissu et les macrophages recrutés sur un site d'inflammation sous l'effet de cytokines. Les macrophages résidents dans les tissus peuvent être considérés comme les surveillants de l'intégrité tissulaire. Leur rôle est de phagocyter les débris cellulaires et les pathogènes (Galli et al., 2011). L'obésité s'accompagne d'une augmentation du nombre de macrophages chez l'Homme et chez les rongeurs (Harman-Boehm et al., 2007; Weisberg et al., 2003). A l'inverse, une perte de poids entraîne une diminution du nombre de macrophages dans le TA blanc (Clement et al., 2004). La plupart de ces macrophages vient de la circulation sanguine, attirés par les nombreux chimio-attractants sécrétés par le TA (Kanda et al., 2006).

Selon le type de stimulus, les monocytes peuvent être différenciés en macrophages pro-inflammatoires (M1 ou classique) par le lipopolysaccharide bactérien (LPS) et des cytokines pro-inflammatoires, comme l'interféron  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) et l'interleukine 12 (IL12). L'augmentation des macrophages de type M1 est corrélée avec la résistance à l'insuline. En effet, les cytokines pro-inflammatoire sécrétées par le macrophage M1 inhibent la signalisation insulinique

(Osborn and Olefsky, 2012). A l'inverse, l'IL4 et IL13 confèrent aux macrophages un profil d'activation dite «alternative» ou anti-inflammatoire M2 (ou encore activée) (Olefsky and Glass, 2010). Cette polarisation des macrophages vers le profil M2 est dépendante de PPAR $\beta/\delta$  et PPAR $\gamma$ . En effet, les souris dépourvues du récepteur PPAR $\gamma$  ou PPAR $\beta/\delta$  macrophagiques ont une polarisation des macrophages vers le type M2 compromise et par conséquent sont plus sujettes à la résistance à l'insuline (Kang et al., 2008; Odegaard et al., 2007). Les éosinophiles sont essentiels pour la polarisation des macrophages vers un phénotype M2, car ce sont les principales cellules exprimant IL4 et IL13 dans le tissu adipeux blanc. Or, lors de l'obésité le nombre d'éosinophiles est diminué, ce qui diminue le nombre de macrophage M2 et favorise la résistance à l'insuline (Spencer and Weller, 2010; Wu et al., 2011). On estime que 10% de la FSV du TA blanc chez les normo-pondérés est constitué de macrophages de phénotype M2, tandis que ce nombre augmente à 40-50% dans le TA blanc d'obèses et, ces macrophages ont tendance à être de type M1 (Lumeng et al., 2007; McNelis and Olefsky, 2014).

La lignée lymphoïde est constituée de lymphocytes T et B, des cellules NK (natural killer) et NKT (natural killer T). Elles sont toutes produites dans la moelle osseuse. Par reconnaissance d'antigènes spécifiques, les lymphocytes T et B jouent un rôle important dans l'immunité adaptative. Les lymphocytes T auxiliaires (CD4) sont des intermédiaires de la réponse immunitaire, qui prolifèrent après contact avec une cellule présentatrice d'antigènes. Les cellules T CD4<sup>+</sup> peuvent être divisées en cellules Treg et Th. Les cellules Th1 produisent des cytokines pro-inflammatoires et les cellules Th2, produisent des cytokines anti-inflammatoires. Les lymphocytes T cytotoxiques (CD8) détruisent les cellules infectées exprimant l'antigène spécifique qu'ils reconnaissent. Les lymphocytes B, une fois activés par la présentation d'un antigène par une autre cellule immunitaire, se transforment en plasmocytes, cellules capables de produire en masse des anticorps dirigés contre l'antigène présenté (Lee and Lee, 2014).

Au sein du TA de sujets diabétiques, la quantité de lymphocytes CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> est corrélée avec le tour de taille des patients (Kintscher et al., 2008). Chez la souris nourrie avec un régime riche en graisse, les cellules T CD8<sup>+</sup> sont augmentées dans le TA blanc viscéral, tandis que les cellules CD4<sup>+</sup> Treg sont diminuées (Feuerer et al., 2009; Nishimura et al., 2009). Cette infiltration des lymphocytes CD8<sup>+</sup> précède l'infiltration des macrophages et favorise le recrutement et l'activation des macrophages vers un phénotype M1, ainsi que l'insulino-résistance (Lumeng et al., 2009; Nishimura et al., 2009). Étonnamment, des souris déficientes

en lymphocytes B et T (souris rag-/-) soumises à un régime gras sont plus résistantes à l'insuline par rapport aux témoins. Chez ces souris, l'insulino-résistance préexistante peut être reversée par un transfert de cellules T CD4<sup>+</sup>, mais pas par les cellules T CD8<sup>+</sup>, les cellules Th2 étant les médiateurs de cette amélioration métabolique, bien que d'autres mécanismes potentiels ne puissent pas être exclus (Nishimura et al., 2009; Winer et al., 2009).

Les cellules NK et NKT impliquées dans l'immunité innée, sont capables de lyser des cellules étrangères à l'organisme de manière antigène-indépendante. Le rôle exact de cellules NKT dans l'inflammation liée à l'obésité et l'insulino-résistance est encore mal compris. La diminution du nombre de cellules NKT chez les personnes obèses indique un potentiel rôle anti-inflammatoire des cellules NKT dans le TA (Lynch et al., 2012). Cependant, les études sur des souris déplétées en cellules NKT et soumises à un régime gras ont donné des résultats contradictoires. L'inflammation et la sensibilité à l'insuline du TA par rapport aux souris témoins sont soit améliorées, soit aggravées (Satoh et al., 2012; Schipper et al., 2012).

Les mastocytes sont des cellules granuleuses présentes essentiellement dans les tissus conjonctifs. Bien que moins abondantes que les macrophages, leur nombre augmente dans le tissu adipeux viscéral de souris ou d'Homme obèses (Liu et al., 2009). Ces mastocytes vont alors sécréter des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor alpha) (Altintas et al., 2011). L'augmentation des mastocytes dans le tissu adipeux viscéral de la souris obèse joue un rôle dans la mise en place de l'insulino-résistance. En effet, la déplétion ou l'inactivation des mastocytes diminue l'inflammation et améliore le profil métabolique de souris placées en régime gras (Liu et al., 2009; Shi and Shi, 2012). D'autres cellules de l'immunité, comme les cellules dendritiques et les neutrophiles participent à l'inflammation du TA blanc lors de l'obésité (Mraz and Haluzik, 2014).

### **c. Innervation du tissu adipeux blanc**

Le tissu adipeux blanc est innervé par le système nerveux sympathique : celui-ci module son développement et ses fonctions endocrines et métaboliques (Bowers et al., 2004). Classiquement, le neurotransmetteur du système nerveux central est la noradrénaline mais les fibres peuvent aussi libérer d'autres neurotransmetteurs comme le neuropeptide Y. Des études récentes chez le rat ont démontré l'existence d'une innervation parasympathique du TA blanc, cependant ces résultats sont controversés (Giordano et al., 2006; Kreier and Buijs, 2007). L'innervation sympathique diffère entre les dépôts adipeux, des expériences de marquage montrant que les neurones innervant le TA sous-cutané sont différents de ceux innervant les



organes intra-abdominaux (TA abdominal, foie et pancréas) (Kreier et al., 2006). De plus, la quantité des récepteurs adrénergiques diffère entre le TA sous-cutané et le TA viscéral entraînant des différences de réponse lipolytique aux catécholamines (voir paragraphe « régulation de la lipolyse ») (Langin, 2006). Le système nerveux sympathique contrôle aussi la synthèse et la sécrétion de certaines adipokines. La stimulation des récepteur  $\beta$ -AR diminue la sécrétion de leptine et d'adiponectine par le TA et augmente la libération des cytokines pro-inflammatoire comme le TNF $\alpha$  et l'IL6 (Fu et al., 2007). Ces modifications peuvent contribuer à la résistance à l'insuline.

De nombreux signaux circulant (hormones, adipokines, acides gras) agissent directement sur différentes populations neuronales et particulièrement sur l'hypothalamus. Ils participent au contrôle de la prise alimentaire, de la dépense énergétique et de l'homéostasie glucidique (Jordan et al., 2010). En plus de ces signaux, une innervation afférente du TA blanc a été démontrée par l'utilisation de marqueurs antérogrades (Song et al., 2009). Bien que pour l'instant on ne connaisse pas les signaux modulateurs de l'activité de ces fibres, leur rôle pourrait être d'informer le cerveau sur le niveau des stocks lipidiques. En effet, quand une destruction sélective de ces fibres est réalisée au niveau épидидymaire, le poids des autres dépôts est augmenté (Bartness and Song, 2007; Shi et al., 2005).

### *Systeme nerveux et adipogenèse*

L'activation sympathique a un effet inhibiteur sur les processus de développement du TA. La noradrénaline inhibe la prolifération des précurseurs adipocytaires via les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques. La dénervation sympathique locale du tissu adipeux chez les rongeurs conduit à une augmentation de leur masse grasse causée par une augmentation du nombre de préadipocytes et d'adipocytes matures (Cousin et al., 1993; Foster and Bartness, 2006). Par contre, la libération du neuropeptide Y entraîne une stimulation de l'angiogenèse, de la prolifération et la différenciation de nouveau adipocytes aboutissant à un développement de la masse adipeuse. Ces effets peuvent contre balancer ceux de la noradrénaline (Kuo et al., 2007).

### **3. L'adipogenèse des adipocytes blancs**

Pour devenir des adipocytes matures, les progéniteurs adipocytaires vont suivre les différentes étapes de l'adipogenèse. L'adipogenèse permet le passage d'une cellule stromale mésenchymateuse en pré-adipocyte puis en adipocyte mature. L'adipogenèse se déroule en

deux grandes étapes. La première correspond à l'engagement, ou détermination, de la cellule progénitrice (cellule multipotente ayant des potentiels de différenciation dans plusieurs lignages : adipocytaire, myogénique et ostéogénique par exemple) dans la voie adipocytaire pour donner un préadipocyte (cellule engagée ayant un potentiel restreint au lignage adipocytaire). La deuxième étape est la différenciation adipocytaire qui représente le passage du préadipocyte à l'adipocyte mature (Rosen and MacDougald, 2006). La cinétique de développement du TA est variable selon les espèces et la localisation du tissu adipeux. Chez les rongeurs, le tissu adipeux blanc est indétectable macroscopiquement au cours de l'embryogenèse. A la naissance, les dépôts périgonadique puis sous-cutané apparaissent, suivis des autres tissus viscéraux. Chez l'Homme, le tissu adipeux se développe au cours du second trimestre de gestation. A la naissance, les dépôts viscéraux et sous-cutanés sont apparents (Poissonnet et al., 1984).

**a. Facteurs de l'engagement adipocytaire**

Le processus de détermination encore peu connu, correspond à l'engagement de la cellule souche dans la lignée adipocytaire et la perte de son potentiel de différenciation en d'autres lignages cellulaires. En effet, la majorité des études sur l'adipogenèse se font sur des lignées cellulaires immortalisées, telles que les fibroblastes embryonnaires de souris 3T3-L1 et 3T3-F442A, qui sont déjà engagées dans le lignage adipocytaire (Green and Meuth, 1974). Néanmoins, certains facteurs susceptibles d'orienter le précurseur mésenchymateux vers le lignage adipeux ont été identifiés (Figure13).

***Les BMPs***

Plusieurs membres de la famille des Bone morphogenetic proteins (BMPs) sont capables d'induire l'engagement adipocytaire. Une exposition des cellules mésenchymateuses multipotentes CH310T1/2 à du BMP4 ou du BMP2 dans un milieu adipogénique engage ces cellules vers un lignage adipogénique alors que le milieu seul n'y parvient pas (Hata et al., 2003; Tang et al., 2004). L'influence du BMP-2 sur ces cellules CH310T1/2 semble en revanche plus complexe puisqu'à faible concentration, il stimule l'engagement vers le lignage adipogénique alors qu'à de fortes concentrations il stimule l'engagement vers le lignage ostéogénique (Wang et al., 1993). Les BMPs activent par phosphorylation p38MAPK et les facteurs de transcription Smad1/5/8 (small mother against decapentaplegic), qui recrutent à leur tour Smad4. Le complexe Smad1/5/8/4 entre alors dans le noyau et régule l'expression de plusieurs gènes cibles possédant des éléments de réponse aux Smads (SBE, smad-binding elements) dans leur promoteur (Massague et al., 2005). Le promoteur du gène de la lysyloxidase

(Lox), qui est nécessaire à la différenciation, possède un élément de réponse à Smad1/4, sa délétion empêchant l'adipogenèse (Huang et al., 2009). Les BMPs augmentent aussi la transcription de PPAR $\gamma$ 2 via les Smads, et son activité transcriptionnelle via l'activation de p38MAPK (Hata et al., 2003).

### **ZFP423**

ZFP423, une protéine à doigt de zinc, est un autre facteur impliqué dans l'engagement adipocytaire. L'expression de ZFP423 dans des fibroblastes murins non-adipogéniques permet d'augmenter l'expression de PPAR $\gamma$ 2 et d'induire l'adipogenèse alors que la délétion de ZFP423 dans des cellules 3T3-L1 empêche leur différenciation. De plus, des embryons de souris dont le gène codant pour ZFP423 a été invalidé, présentent une forte diminution de l'adipogenèse blanche et brune (Gupta et al., 2010). ZFP423 forme un complexe inactif avec WISP2 (WNT1 inducible signaling pathway protein 2) et lors d'une stimulation au BMP4, le complexe ZFP423/WISP2 est dissocié par les Smads permettant à ZFP423 d'entrer dans le noyau et d'amplifier les effets des BMPs sur l'engagement dans les voies adipogéniques blanche et brune (Gupta et al., 2010; Hammarstedt et al., 2013).

Enfin, les voies de signalisation de delta fos B et de Wnt sont impliquées dans le devenir des cellules mésenchymateuses. Le facteur delta fos B inhibe l'adipogenèse en favorisant la différenciation ostéogénique (Sabatakos et al., 2000), tandis que l'activation de la voie Wnt inhibe également la différenciation adipocytaire en favorisant l'orientation myogénique (Ross et al., 2000).

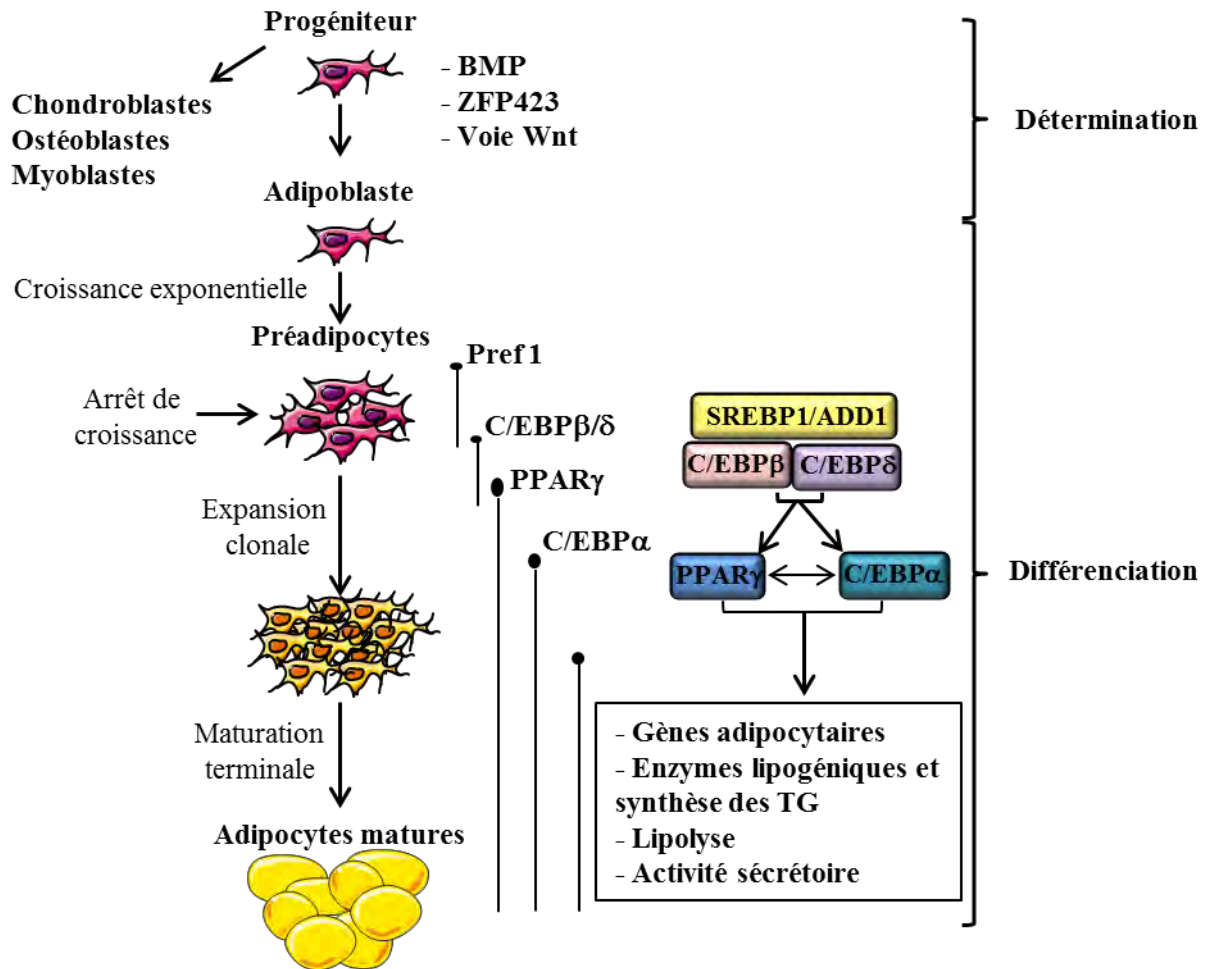


Figure 13 : Les différentes étapes et facteurs impliqués dans l'adipogenèse

L'adipogenèse consiste en la formation d'un adipocyte à partir d'une cellule progénitrice. L'engagement de cette dernière dans la voie adipocytaire conduit à la formation d'un préadipocyte qui se différencie ensuite en adipocyte. L'expression temporelle des principaux facteurs de l'adipogenèse est indiquée par les traits verticaux. BMPs: bone morphogenetic proteins, ZFP423: zinc finger protein 423, Pref1: préadipocyte factor 1, C/EBPs: CCAAT/enhancer binding proteins; PPAR $\gamma$ : peroxisome proliferator-activated receptor gamma, ADD1/SREBP1: adipocyte determination- and differentiation-dependent factor/sterol regulatory element-binding protein 1.

## b. Facteurs de la différenciation adipocytaire

### *Les étapes de la différenciation adipocytaire*

La différenciation adipocytaire se fait en plusieurs étapes. Premièrement, la différenciation des adipoblastes en préadipocytes nécessite un arrêt de la croissance lorsque les cellules arrivent à confluence, suivi d'une expansion clonale mitotique (Gregoire et al., 1998). Ensuite, les préadipocytes s'engagent dans l'adipogenèse proprement dite, comprenant une phase de différenciation précoce suivie d'une différenciation terminale.

Les événements précoces concernent en particulier le remodelage de la matrice extracellulaire (MEC) et du cytosquelette. Au cours de la différenciation adipocytaire, la composition de la MEC est fortement modifiée. D'une structure riche en fibronectine, sa composition va évoluer vers une structure de type lame basale, composée essentiellement de laminine, collagène IV et d'entactine (Lilla et al., 2002). L'ensemble de ces remodelages matriciels permet alors aux préadipocytes de subir une étape d'expansion clonale. Le préadipocyte commence à exprimer certains marqueurs très précoces de la différenciation adipocytaire comme la LPL (lipoprotein lipase), les facteurs de transcription C/EBP $\beta$  et  $\delta$  (CCAAT/ enhancer-binding protein), les PPARs et le facteur de détermination et différenciation adipocytaire ADD1/SREBP-1c (adipocyte determination and differentiation factor 1/sterol regulatory element binding protein-1c) (Gregoire, 2001; Rosen and MacDougald, 2006; Rosen et al., 2000). Ces facteurs sont activés par l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) et les glucocorticoïdes (Yeh et al., 1995). Jusqu'à ce stade, les cellules possèdent encore la capacité de proliférer.

Une fois l'arrêt de l'expansion clonale mitotique, les cellules vont alors progressivement perdre l'expression du marqueur Pref-1 (Preadipocyte factor 1) utilisé pour différencier les pré-adipocytes des adipocytes matures (Wang and Sul, 2009). A l'inverse, l'expression des enzymes et protéines de la synthèse et de la mobilisation des triglycérides (TG) augmente, comme la FAS (fatty acid synthase), la LHS (lipase hormono sensible), le transporteur du glucose GLUT4 et la protéine de transport des acides gras aP2 (adipocyte protein 2). Le préadipocyte commence à accumuler des lipides qui sont d'abord stockés dans de petites gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme. Ces gouttelettes vont fusionner entre elles pour laisser place à une unique vacuole lipidique qui va occuper la quasi-totalité du contenu de la cellule. Enfin l'adipocyte va développer sa capacité de sécrétion hormonale. L'expression transitoire de C/EBP $\beta$ , C/EBP $\delta$  et ADD1/SREBP1 lors de la phase précoce permet l'induction des deux facteurs de transcription majeurs de l'adipogenèse que sont C/EBP $\alpha$  et PPAR $\gamma$  (Farmer, 2006; Kim and Spiegelman, 1996; Yeh et al., 1995). Ces deux facteurs se régulent mutuellement et participent à la fois au processus d'adipogenèse et à la transcription de nombreux gènes codant des protéines impliquées dans le métabolisme adipocytaire ; ils resteront exprimés tout au long de la vie de l'adipocyte. (Farmer, 2006).

### ***Les PPARs***

PPAR $\gamma$  appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires, c'est le facteur clé de l'adipogenèse, son expression est nécessaire et suffisante pour induire la différenciation des

préadipocytes. A l'inverse, sa délétion empêche toute différenciation adipocytaire (Rosen and MacDougald, 2006; Tontonoz et al., 1994). Les deux isoformes sont induites lors de l'adipogenèse mais des études *in vitro* et *in vivo* montre que PPAR $\gamma$ 2 est plus efficace pour promouvoir l'adipogenèse et joue un rôle majeur dans le contrôle transcriptionnel de la maturation terminale de l'adipocyte (Mueller et al., 2002; Zhang et al., 2004b). En effet, il est responsable de l'expression de nombreux gènes marqueurs de la différenciation adipocytaire, tels que la LPL ou la protéine de transport des acides gras (aP2) (Rosen et al., 2000; Tontonoz and Spiegelman, 2008). Une autre étude montre que les souris déficientes en PPAR $\gamma$ 2 développent une résistance à l'insuline mais possèdent encore du tissu adipeux, suggérant que PPAR $\gamma$ 1 peut compenser en partie la perte de PPAR $\gamma$ 2 (Medina-Gomez et al., 2005).

### ***Les C/EBPs***

Les facteurs de transcription C/EBPs forment des homo- ou hétérodimères via leur domaine leucine zipper et se lient aux régions régulatrices des gènes possédant une séquence CCAAT. Les C/EBPs  $\beta$  et  $\delta$  sont induits de façon très précoce et transitoire au cours de l'adipogenèse, et jouent un rôle clé dans l'enclenchement de la maturation terminale (Rosen and MacDougald, 2006). La génération de souris invalidées pour C/EBP $\beta$  et/ou C/EBP $\delta$  a permis de montrer que ces facteurs sont importants dans la formation des adipocytes blancs et bruns, la double délétion entraînant une perte de TA plus prononcée (Tanaka et al., 1997). L'induction plus tardive de C/EBP $\alpha$  est nécessaire pour l'adipogenèse blanche. Des souris déficientes pour C/EBP $\alpha$ , qui ont été sauvées de la mort par réexpression de C/EBP $\gamma$  dans le foie, montrent une absence presque totale de tissu adipeux blanc (Linhart et al., 2001). Cependant, C/EBP $\alpha$  ne peut pas fonctionner efficacement en l'absence de PPAR $\gamma$ : en effet, C/EBP $\alpha$  est incapable de restaurer la différenciation de cellules embryonnaires déficientes pour PPAR $\gamma$ 2 alors que PPAR $\gamma$ 2 restaure la différenciation de cellules déficientes pour C/EBP $\alpha$  (Rosen et al., 2002). L'expression exogène de PPAR $\gamma$  dans des cellules déficientes pour C/EBP $\alpha$  ont montré que C/EBP $\alpha$  n'est pas indispensable pour l'accumulation de lipides et l'expression des gènes adipocytaires, mais qu'il est nécessaire à l'acquisition de la voie de signalisation insulinique et plus particulièrement du transporteur du glucose GLUT4 (El-Jack et al., 1999; Wu et al., 1999).

### ***Autres facteurs***

Une analyse transcriptomique des ARNm exprimés au cours de la phase précoce de l'adipogenèse *in vitro* et dans le tissu adipeux *in vivo* suggère que de nombreux autres facteurs

transcriptionnels aux fonctions pro- ou anti-adipogéniques constituent potentiellement des régulateurs importants de la différenciation adipocytaire (Fu et al., 2005; Soukas et al., 2001). Par exemple Krox20 (ou Egr2, early growth response gene 2), est activé au début du programme adipogénique des cellules 3T3-L1 et non seulement favorise l'expression de C/EBP $\beta$  mais coopère également avec C/EBP $\beta$  pour faciliter l'adipogenèse terminale (Chen et al., 2005). Les facteurs de transcription Kruppel-like factors (KLFs), appartenant à la famille des facteurs à doigts de zinc, sont décrits comme étant pro-adipogéniques ou anti-adipogéniques (Brey et al., 2009). KLF15 et 5 favorisent la différenciation adipocytaire notamment l'expression de GLUT4 et PPAR $\gamma$  respectivement tandis que KLF2 et 7 répriment l'expression de PPAR $\gamma$ 2 (Banerjee et al., 2003; Mori et al., 2005; Oishi et al., 2005). D'autres facteurs de transcription favorisent l'adipogenèse dont STAT5A/5B (active signal transducer and activator of transcription), et le régulateur circadien BMAL1 (Floyd and Stephens, 2003; Kim and Spiegelman, 1996; Shimba et al., 2005). Enfin, il existe des facteurs anti-adipogéniques : la famille des GATAs (GATA-binding proteins) qui inhibent l'expression de PPAR $\gamma$ 2 (Tong et al., 2000; Tong et al., 2005) et deux membres de la famille des C/EBPs, C/EBP $\epsilon$  (ou CHOP) et C/EBP $\gamma$ , par leur liaison inhibitrice avec C/EBP $\beta$  (Rosen and MacDougald, 2006). Une diminution d'expression de ces facteurs est observée au cours de la différenciation.

### c. L'expansion du tissu adipeux

Physiologiquement, le développement du TA connaît deux périodes d'accroissement, l'une à la naissance et l'autre à l'adolescence. Il garde cependant la capacité de se développer tout au long de la vie en fonction des besoins énergétiques (Spalding et al., 2008). Lorsque la balance énergétique est en faveur des apports, le volume du TA blanc augmente pour permettre le stockage de l'énergie sous forme de lipides. Tant que l'individu possède la capacité de stocker des graisses dans le TA, les dépôts ectopiques de lipides et les complications métaboliques sont rares. Le TA se développe dans un premier temps par hypertrophie adipocytaire, c'est-à-dire par une augmentation du volume des adipocytes, augmentant leurs capacités de stockage. Selon le concept de limite d'expansion du TA, l'adipocyte accumulerait des triglycérides jusqu'à atteindre un volume maximal (Gray and Vidal-Puig, 2007). Au-delà, une phase d'hyperplasie se met en place, conduisant à une augmentation du nombre d'adipocytes via l'adipogenèse (Wang et al., 2013b). En revanche, une fois différenciées, les cellules ne retournent pas au stade de précurseurs, la perte de poids étant associée à une diminution de la taille et non du nombre des adipocytes. Elles restent donc disponibles pour stocker de nouveau (Spalding et al., 2008). Par conséquent, il est impossible de baisser le volume de la masse grasse au-delà d'un certain

seuil après le recrutement de nouveaux adipocytes lors de la prise de poids. L'expansion du tissu adipeux peut se faire différemment entre le TASC et le TAV. La fraction stromale du tissu adipeux sous-cutané présente un potentiel adipogénique supérieur à celle du tissu adipeux viscéral car beaucoup plus riche en précurseurs adipocytaires. Suite à un régime gras, le TASC s'étend par hyperplasie et privilégie donc la production de nouveaux adipocytes à partir des précurseurs présents dans la FSV, alors que l'expansion du TAV résulte d'une hypertrophie des adipocytes existants (Joe et al., 2009). De plus, lorsque le TA ne peut pas s'accroître davantage, les lipides ne sont plus stockés dans les adipocytes et s'accumulent de façon ectopique dans le foie, les muscles ou encore le pancréas où ils exercent des effets lipotoxiques et entraînent une résistance à l'insuline de ces organes.

Ce remodelage cellulaire du tissu adipeux va mener aussi à une altération de ses propres fonctions métaboliques et sécrétoires, à l'origine du développement de nombreuses complications métaboliques (Lewis et al., 2002).

#### **4. Fonctions métaboliques du tissu adipeux**

Au-delà de son rôle d'isolant thermique et mécanique, le tissu adipeux blanc est la principale réserve énergétique de l'organisme. Ce stock de lipides reste mobilisable en fonction des besoins métaboliques de l'organisme. Globalement la gestion de l'énergie se fait grâce à deux voies métaboliques principales: la lipogenèse et la lipolyse.

##### **a. L'entrée des acides gras dans l'adipocyte**

Les acides gras incorporés dans les adipocytes sont fournis par le plasma, soit sous forme d'acides gras non estérifiés liés à l'albumine, soit sous forme de triglycérides incorporés dans des lipoprotéines riches en TG (VLDL, very low density lipoproteins ou chylomicrons). La lipoprotéine lipase (LPL), localisée à la surface de l'endothélium capillaire, hydrolyse les triglycérides des lipoprotéines plasmatiques en acides gras. La LPL est synthétisée par les adipocytes et est régulée à plusieurs niveaux. Au niveau transcriptionnel, le promoteur est activé par les facteurs de transcription SREBP1 et PPAR $\gamma$ . Une fois synthétisé, la LPL est maturée par la protéine LMF1 (lipase maturation factor 1) pour la rendre catalytiquement active. Au niveau de la paroi des cellules endothéliales, la LPL se lie à la glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein-binding protein 1 (GPIHBP1). Non seulement la GPIHBP1 va transporter la LPL à travers les cellules endothéliales, mais une fois du côté luminal de l'endothélium capillaire, GPIHBP1 stabilise la LPL, lui permettant d'hydrolyser les lipoprotéines (Goulbourne et al., 2014). L'activité de la LPL est régulée par la famille des



ANGPTL (angiopoietin like), et particulièrement par l'ANGPTL4 qui inhibe son activité. Une fois inactivée, la LPL se dissocie de GPIHBP1 (Chi et al., 2015). Elle est aussi régulée en fonction du statut nutritionnel (Sukonina et al., 2006). En réponse à l'alimentation, l'augmentation du flux sanguin et donc du volume microvasculaire dans le TA contribue à augmenter la surface d'exposition de la LPL aux lipoprotéines et favorise l'absorption des acides gras. A l'inverse ; pendant un jeûne, l'augmentation de la transcription d'ANGPTL4 diminue l'activité de la LPL (Wang and Eckel, 2009).

Les acides gras libérés sont ensuite transportés dans la cellule par plusieurs transporteurs. Dans le TA, les gènes responsables du transport et du trafic intracellulaire des gras sont augmentés par les agonistes de PPAR $\gamma$  (Martin et al., 1998). Le récepteurs membranaire FAT/CD36 (Fatty Acid Translocase/CD36), les protéines de transports FATPs (fatty acid transport proteins) et une protéine de la membrane liant les acides gras FABPpm (peripheral membrane-bound fatty acid binding protein) (Kazantzis and Stahl, 2012; Thompson et al., 2010). CD36 est présent sur de nombreux types cellulaires, dans les adipocytes il facilite le transport des acides gras par un mécanisme encore inconnu. Les souris invalidées pour le gène CD36 présentent un défaut de capture des acides gras entraînant une augmentation du taux plasmatique de VLDL et d'acides gras libres. De même, l'invalidation de FATP1 diminue le transport des acides gras dans le TA (Coburn et al., 2000; Wu et al., 2006b). Enfin, contrairement à CD36 et FATP, FABPpm n'est pas une protéine transmembranaire mais est associée à la membrane plasmique. Comme CD36, son expression est augmentée au cours de la différenciation et elles participent ensemble au transport des acides gras. (Chabowski et al., 2007). De par leur nature lipophile il est également probable qu'une petite partie des acides gras diffuse passivement à travers la membrane plasmique. Une fois dans le cytoplasme, les acides gras sont convertis en acyl-CoA par l'acyl-CoA synthétase, ou par la protéine de transport FATP1, pour les acides gras à longue chaîne. Les acides gras libres sont transportés et orientés dans les différentes voies métaboliques par des FABP cytosoliques ou par les ACBPs (Acyl-CoA binding protein) pour les acyl-CoA (Storch and McDermott, 2009) (Figure 14).

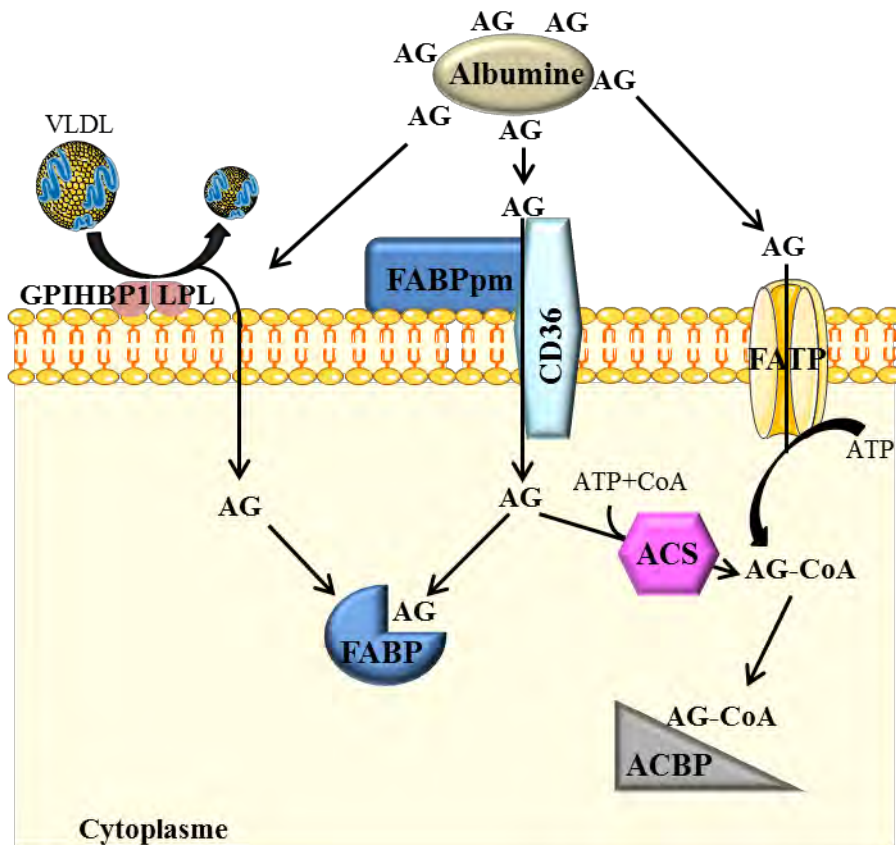


Figure 14 : Entrée des acides gras dans l'adipocyte

La lipoprotéine lipase (LPL) hydrolyse les TG contenus dans les VLDL et conduit à la libération des acides gras et du glycérol. Ces acides gras libres entrent dans l'adipocyte via les transporteurs FATPs ou FABPpm/CD36, ou diffusent directement dans l'adipocyte. Les acides gras peuvent se lier aux FABPs ou être convertis en Acyl-CoA par l'ACS et sont transportés dans le cytoplasme par l'ACBP. ACBP: acyl-CoA binding protein, ACS: acyl-CoA synthetase, AG: acide gras, FABP: fatty acid binding protein, FABPpm: fatty acid binding protein plasma membrane, FATP: fatty acid transport protein, GPIHBP1: glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein-binding protein 1, LPL: lipoprotein lipase, VLDL: very low density lipoprotein.

### b. La synthèse des TG

La biosynthèse des triglycérides (TG) a lieu au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique, ils sont ensuite stockés dans les gouttelettes lipidiques. Les TG sont synthétisés selon deux voies majeures, la voie du glycérol-3-P et la voie du monoacylglycérol (MG). La voie du glycérol-3-P, est majoritaire dans la plupart des types cellulaires, en revanche, la voie du MG est prédominante dans l'intestin grêle, où elle assure la formation des TG à partir des MG dérivés de l'alimentation. Pour la première voie, les acyl-CoA sont en présence de glycérol-3-P estérifiés en TG par l'action successive de différentes acyl transférases : GPAT, AGPAT, LIPIN et DGAT (Figure 15). Les MG entre dans la voie de synthèse au niveau du diacylglycérol en combinant du monoacylglycérol avec un acyl-CoA via la MGAT (Takeuchi and Reue, 2009).

Il est important de noter que les intermédiaires de la synthèse des TG, l'acide lysophosphatidique, l'acide phosphatidique et le diacylglycérol sont aussi des seconds messagers et des précurseurs pour la synthèse des phospholipides (Shi and Cheng, 2009). Les enzymes de la voie de synthèse des TG interviennent sous de multiples isoformes, avec des activités enzymatiques comparables et de faibles différences dans leur expression, leur localisation tissulaire et leur régulation (Yen et al., 2008). L'hypothèse principale pouvant expliquer cette observation est que chaque enzyme pourrait être spécialisée dans la catalyse des différents types d'AG des TG.

La synthèse de TG nécessite du glycérol et des acides gras. Dans le foie et le TA brun, le glycérol est phosphorylé en glycérol-3-phosphate (G3P) par la glycérol kinase (GK). En revanche, dans les adipocytes blancs humains et murins, la captation du glycérol et l'activité GK sont faibles. Le glycérol-3-P est alors obtenu via le dihydroxyacétone produit lors de la glycolyse et par la voie de la glycéronéogenèse. La glycéronéogenèse est la production de glycérol-3-P à partir de substrats gluconéogéniques comme le pyruvate, le lactate et certains acides aminés (Forest et al., 2003). La contribution de la glycolyse et de la glycéronéogenèse pour la production de glycérol-3-P varie selon le statut nutritionnel. En condition post-prandiale, la source majeure est la glycolyse par l'action de la glycérophosphate déshydrogénase et en condition de jeûne, le glycérol-3-P est issu principalement de la glycéronéogenèse contrôlée par la PCK1 (phosphoenolpyruvate carboxykinase), elle-même régulée au niveau transcriptionnel par les glucocorticoïdes et PPAR $\gamma$  (Cadoudal et al., 2007; Hanson and Reshef, 2003).

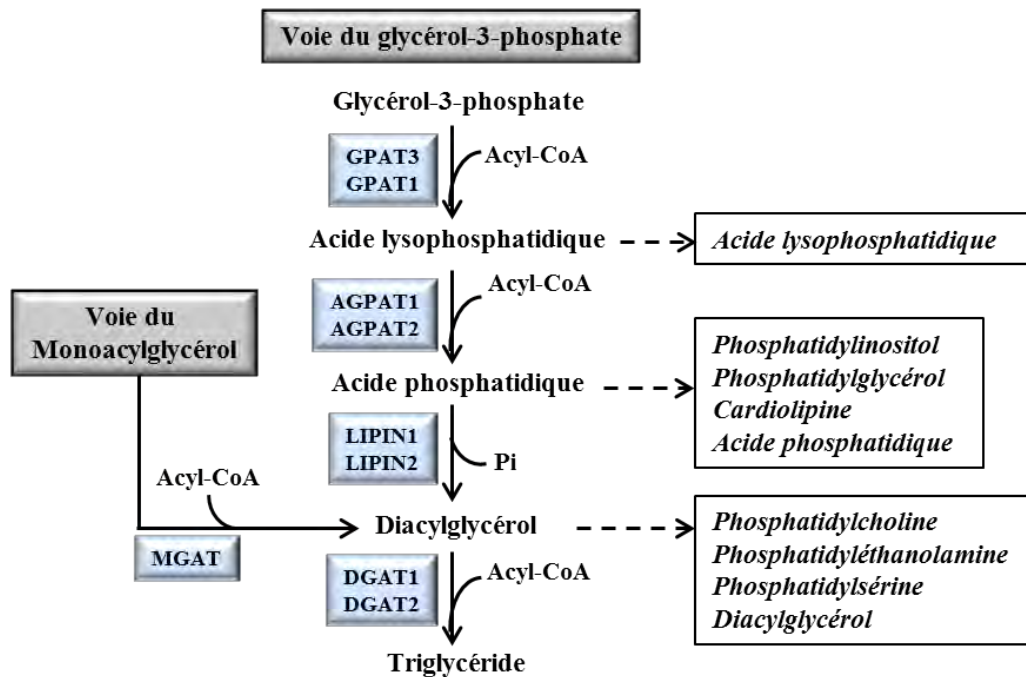


Figure 15 : Voies de synthèse des triglycérides

Dans les adipocytes, la voie du glycérol-3-phosphate est prédominante sur la voie du monoacylglycérol. Les isoformes les plus pertinentes des différentes enzymes sont indiquées. Les intermédiaires de la voie de synthèse qui peuvent servir de messagers cellulaires ou de précurseurs d'espèces lipidiques sont indiqués en italique. AGPAT : 1-acylglycérol-3-phosphate, DGAT : diacylglycérol, GPAT : glycérol-3-phosphate acyltransférase, MGAT : monoacylglycérol.

### c. La lipogenèse

Les acides gras peuvent aussi provenir d'une synthèse endogène à partir du glucose, on parle alors de lipogenèse ou encore de lipogenèse *de novo*. Chez les rongeurs, la lipogenèse est réalisée dans le foie et le TA. Par contre, chez l'Homme, la lipogenèse est majoritairement hépatique et elle n'est qu'accessoire dans le TA, excepté suite à un régime alimentaire riche en glucides (Diraison et al., 2003). Le glucose est transporté par le transporteur constitutif GLUT1 et le transporteur régulé par l'insuline GLUT4. Le pyruvate produit à partir de la glycolyse est transformé dans la mitochondrie en acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase (PDH). L'acétyl-CoA est clivé du citrate dans le cytoplasme grâce à l'enzyme ATP citrate lyase (ACLY), puis l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) et la fatty acid synthase (FAS) interviennent de façon successive pour catalyser la formation des acides gras à longue chaîne saturée. L'action de différentes élongases et désaturases permet ensuite de synthétiser les différents types d'acides gras, puis comme précédemment décrit, ces acides gras sont estérifiés pour donner des TG (Figure 16).

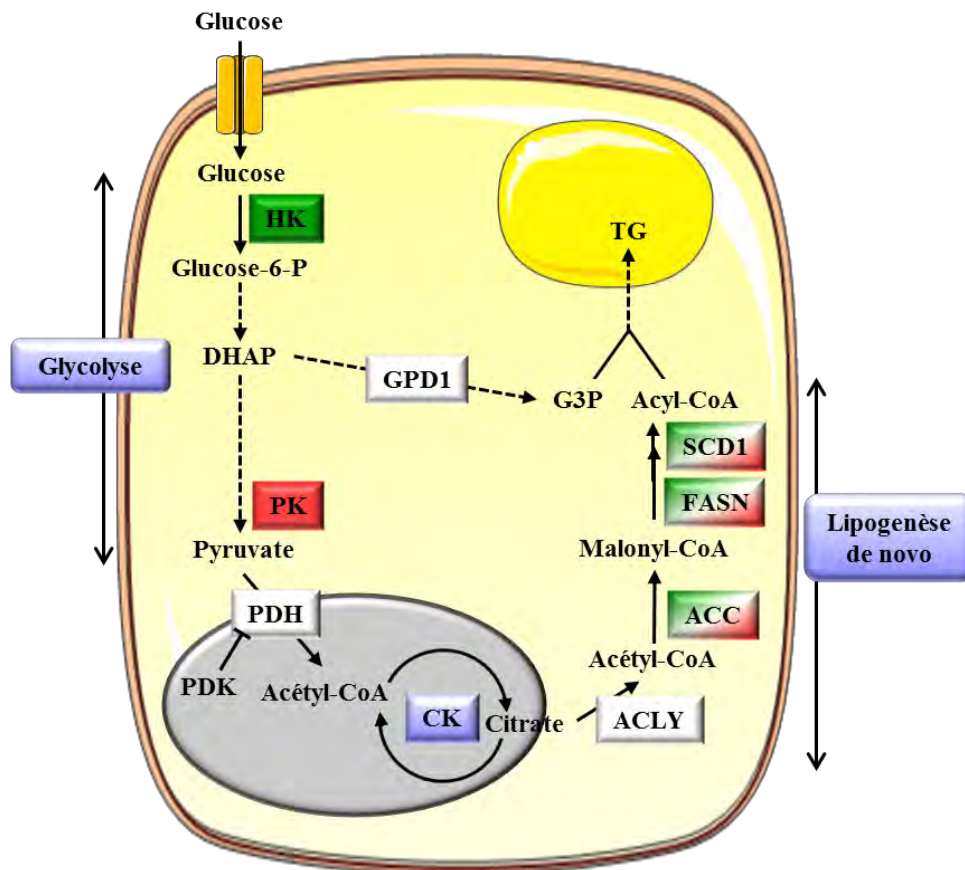


Figure 16 : La lipogenèse

Le principal rôle du tissu adipeux est de stocker l'énergie sous forme de triglycérides. En présence d'insuline, le transport du glucose est stimulé. Le glucose est immédiatement phosphorylé en glucose-6-phosphate par l'hexokinase (HK) avant de rentrer dans la glycolyse pour produire du pyruvate. Le pyruvate entre dans la mitochondrie où il est transformé en acétyl-CoA par la PDH. L'acétyl-CoA est transformé en citrate dans le cycle de Krebs, puis sort de la mitochondrie par un système de navette. Il est ensuite transformé successivement en acétyl-CoA, malonyl-CoA puis en acide gras par les enzymes de la lipogenèse. L'acyl-CoA peut alors être estérifié en TG. Les enzymes en vert sont contrôlées par le facteur de transcription SREBP1 et celles en rouge par ChREBP. ACC : Acétyl-CoA carboxylase, ACLY: ATP citrate lyase, CK: cycle de Krebs, DHAP: dihydroxyacétone phosphate, FASN: fatty acid synthase, G3P: glycérol-3-phosphate, GPD1: glycérol-3-phosphate déshydrogénase 1, PDH: complexe pyruvate déshydrogénase, PDK: pyruvate déshydrogénase kinase, PK: pyruvate kinase, SCD1: stéaroyl-CoA désaturase 1, TG: triglycéride.

### Régulation de la lipogenèse

L'insuline et le glucose sont les deux principaux inducteurs de l'expression des enzymes de la glycolyse et de la lipogenèse. A court terme, l'insuline va tout d'abord induire la relocalisation de GLUT4 à la membrane plasmique favorisant l'entrée du glucose. Il contrôle aussi le niveau d'activité PDH via l'expression des pyruvate déshydrogénase kinases (PDKs). A l'inverse, les catécholamines, en augmentant les niveaux intracellulaires d'AMPc, et l'AMPK exercent une action anti-lipogénique par la phosphorylation de l'ACC.

A plus long terme, les effets de l'insuline sont relayés par le facteur de transcription SREBP1 et ceux du glucose par le carbohydrate-responsive element-binding protein (ChREBP) (Strable and Ntambi, 2010). Le rôle de SREBP dans le foie est bien établi via sa liaison sur les éléments de réponse SRE des gènes cibles. Par contre, son rôle dans le contrôle de la lipogenèse dans le TA est plus controversé. En effet, l'inactivation de SREBP1 dans le TA ne diminue pas l'expression des gènes lipogéniques, et sa surexpression conduit à des souris lipodystrophiques (Sekiya et al., 2007; Shimomura et al., 1998). Le facteur de transcription ChREBP agit en synergie avec SREBP. Il y a deux isoformes de ChREBP : l'isoforme la plus abondante, ChREBP $\alpha$ , est activée la première en réponse au glucose et se fixe sur l'élément de réponse ChoRE de ChREBP $\beta$  pour induire son expression. ChREBP $\beta$ , l'isoforme la plus active au niveau transcriptionnel, elle va induire l'expression des gènes de la lipogenèse et son activité reste élevée quelles que soient les concentrations de glucose dans la cellule (Herman et al., 2012). De plus, dans le TA, l'expression de ChREBP $\beta$  et l'augmentation de la lipogenèse qui en résulte sont corrélées avec la sensibilité à l'insuline chez les souris et les hommes obèses. Cet effet bénéfique pourrait être lié à la sécrétion d'adipokines et/ou de lipokines produites par la voie de la lipogenèse (Kursawe et al., 2013).

#### **d. La lipolyse**

Quand les besoins en énergie augmentent, la lipolyse assure la dégradation des TG contenus au sein de la gouttelette lipidique de l'adipocyte. Quand elle est complète, elle aboutit à l'hydrolyse des TG en trois molécules d'acides gras et une molécule de glycérol. Trois lipases sont impliquées : l'adipose triglycéride lipase (ATGL), la lipase hormono-sensible (LHS) et la monoglycéride lipase (MGL) (Bezaire et al., 2009b; Lafontan and Langin, 2009). Les AG et le glycérol sont libérés dans le sang afin de fournir l'énergie nécessaire aux tissus périphériques, principalement le foie pour le glycérol et les muscle pour les AG. Une partie des AG libérés ne sortent pas de l'adipocyte et sont ré-estérifiés en TG. La lipolyse nécessite l'interaction de nombreux facteurs comme les protéines associées aux gouttelettes lipidiques (perilipines), les lipases et des cofacteurs.

#### ***L'ATGL***

L'ATGL est la première lipase intervenant dans la lipolyse, elle a une grande affinité pour les TG et les dégrade en DG. Elle contrôle la lipolyse basale et stimulée (Zimmermann et al., 2004). L'ATGL est localisée au niveau de la gouttelette lipidique, colocalisée avec G0S2 qui inhibe son activité (Yang et al., 2010). L'inactivation du gène ATGL chez la souris ou la

surexpression de G0S2 entraînent une augmentation de masse grasse à cause d'un défaut de la lipolyse. A l'inverse les animaux déficients en G0S2 sont minces. Cependant dans les deux cas, les souris ont une meilleure tolérance à l'insuline et au glucose (El-Assaad et al., 2015; Heckmann et al., 2014). Cette lipase fonctionne en duo avec le co-activateur CGI-58 (Comparative Gene Identification 58/ABHD5) qui potentialise son activité TG hydrolase. En condition non stimulée, CGI-58 est lié à la protéine structurale de la gouttelette lipidique adipocytaire, la périlipine 1. Comme l'activation de l'ATGL nécessite une interaction avec CGI-58, dans cette configuration CGI-58 est incapable d'activer l'ATGL (Boeszoermyeni et al., 2015). Quand la lipolyse est activée, la périlipine est phosphorylée par la PKA qui permet la dissociation de CGI-58 qui va interagir avec l'ATGL (Granneman et al., 2007). La liaison de CGI-58 n'entre pas en compétition avec celle de G0S2 car il se lie à une région différente (Lu et al., 2010). (Figure 17).

### ***La LHS***

La deuxième lipase est la lipase hormonosensible (LHS). La LHS est capable de catalyser de nombreux substrats comme les TG, les DG et les MG, les esters de cholestérol et de rétinol, avec une préférence d'activité pour les DG. L'activation de la LHS est régulée par phosphorylation réversible de sérines par la PKA et la PKG. La phosphorylation de la LHS démasque son site catalytique et permet la formation d'un complexe avec FABP4. Ce complexe va subir une translocation du cytoplasme vers la gouttelette lipidique. FABP4 agit comme une chaperone qui facilite la captation des AG et les dirige hors de la cellule (Smith et al., 2007). Enfin, la phosphorylation de la périlipine 1 favorise son association avec la LHS et l'accès aux substrats lipidiques (Bezaire et al., 2009b; Miyoshi et al., 2007) (Figure 17).

### ***La MGL***

La lipase des monoglycérides (MGL) hydrolyse ensuite les MAG en glycérol et AG libres. Sa forte présence dans le tissu adipeux et sa grande spécificité pour les MAG suggèrent que la MGL n'est pas une enzyme limitante (Karlsson et al., 1997). Dans des souris invalidées pour le gène MGL, malgré une accumulation de MG dans les tissus, l'activité hydrolase n'est pas abolie du fait de la compensation par la LHS (Taschler et al., 2011).



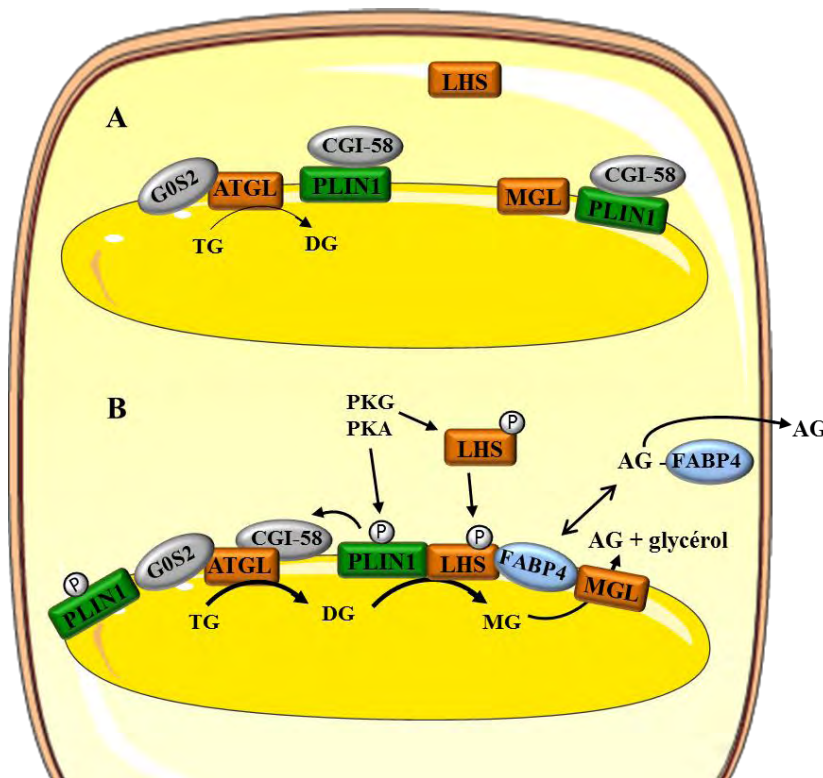


Figure 17 : Contrôle de l'ATGL et la LHS adapté de (Nielsen et al., 2014)

(A) A l'état basal, CGI-58 est complexé avec PLIN1 et l'activité de ATGL est faible. La LHS est située dans le cytoplasme.

(B) Quand la lipolyse est induite, la phosphorylation de PLIN1 par PKA libère CGI-58 qui s'associe avec l'ATGL, ce qui augmente son activité. La phosphorylation de la LHS par la PKA ou la PKG favorise son activation et son association avec FABP4 et la translocation de ce complexe à la surface de la gouttelette lipidique. La phosphorylation de la périlipine modifie la structure de la gouttelette lipidique et va favoriser les activités de la LHS et de l'ATGL. Agissant comme une protéine chaperone, FABP4 va faire la navette pour les AG hydrolysés de la gouttelette lipidique à la membrane plasmique de l'adipocyte où ils sont libérés. AG : acide gras, ATGL : adipose triglycéride lipase, CGI-58 : comparative gene identification 58/ABHD5, DG : diacylglycérol, FABP4 : fatty acid-binding protein 4, G0S2 : G0/G1 switch 2, LHS : lipase hormono-sensible, MG : monoacylglycérol, MGL : monoglycéride lipase, PKA : protéine kinase A, PKG : protéine kinase G, PLIN1 : Perilipin 1, TG : triglycéride.

### Régulation physiologique de la lipolyse

La lipolyse est contrôlée par de nombreux facteurs. Nous allons nous intéresser uniquement aux catécholamines, aux peptides natriurétiques et à l'insuline, les régulateurs majeurs de la lipolyse chez l'Homme (Lafontan and Langin, 2009). Les catécholamines (noradrénaline et adrénaline) sont des agents lipolytiques majeurs agissant via des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques ( $\beta$ -AR) couplés à une protéine Gs. Elles induisent ainsi une stimulation de l'adénylate cyclase (AC), entraînant une production d'AMPc et l'activation de la lipolyse par la PKA (Lafontan and Langin, 2009). Il existe trois sous-types de récepteurs  $\beta$ -AR. Les récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$  sont exprimés dans de nombreux tissus tandis que le récepteur  $\beta_3$  est prédominant dans le TA de rongeurs. Dans les adipocytes blancs humain, les récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$  activent la lipolyse, tandis que chez le rongeur c'est le récepteur  $\beta_3$ . Le rôle physiologique



du récepteur  $\beta_3$  dans le TA blanc est néanmoins questionnable car il ne contribue pas à la lipolyse induite par les catécholamines, cependant son rôle est primordial pour induire la lipolyse dans le TA brun (Tavernier et al., 1996). Les peptides natriurétiques ANP (atrial natriuretic peptide) et BNP (brain natriuretic peptide) stimulent la lipolyse via leur récepteur NPRA. Ce récepteur possède une activité guanylate cyclase permettant la production de GMPc. La PKG induit alors, comme la PKA, une stimulation de la lipolyse par phosphorylation des perilipines et de la LHS (Moro et al., 2005; Sengenès et al., 2005b). (Figure 18).

Dans l'adipocyte, l'insuline est l'hormone anti-lipolytique principale. L'insuline diminue le niveau d'AMPc via l'activation de la nucléotide phosphodiesterase cyclique (PDE3B). La fixation de l'insuline à son récepteur induit son autophosphorylation qui favorise l'activation de la phosphatidyl kinase-3 (PI3K). La génération de PIP3 active la protéine kinase B (AKT) qui à son tour active la PDE3B qui dégrade l'AMPc en AMP, diminuant en conséquence l'activité de la PKA. Le nombre de molécules et de récepteurs anti-lipolytiques passant par des récepteurs couplés aux protéines  $G_i$  est très important. Les catécholamines peuvent engendrer une inhibition de la lipolyse suite à leur liaison aux récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques ( $\alpha_2$ -AR). L'activation ou l'inhibition de la lipolyse par les catécholamines dépendra de leur affinité et du nombre relatif de récepteurs  $\beta_{1/2}$ -AR et  $\alpha_2$ -AR. Le récepteur des prostaglandines E de type EP3 (EP3-PG-R), le récepteur à l'adénosine de type A1 (A1-R), le récepteur du neuropeptide Y/peptide YY (NPY-Y), les récepteurs à l'acide nicotinique GPR109a et au lactate GPR81 inhibent aussi l'activité adénylate cyclase (Arner and Langin, 2014; Bezair et al., 2009).

### ***Dérégulation de la lipolyse lors de l'obésité***

L'activité lipolytique est différente entre les dépôts adipeux, le tissu adipeux viscéral possédant une activité lipolytique plus importante que le tissu adipeux sous-cutané (Ostman et al., 1979; Wajchenberg, 2000). Cette disparité s'explique par les différences de niveau d'expression des récepteurs adrénérgiques, le TASC ayant une forte activité  $\alpha_2$ -AR et une faible densité de récepteurs  $\beta$ -adrénérgiques. A l'inverse, les adipocytes viscéraux ont moins de récepteurs  $\alpha_2$ -AR, ce qui explique leur sensibilité aux catécholamines. Ces différences entre dépôts sont également présentes dans l'effet antilipolytique de l'insuline, les adipocytes viscéraux étant moins sensibles à l'action de l'insuline que les adipocytes sous-cutanés (Arner and Langin, 2014; Lafontan and Langin, 2009; Sadie-Van Gijzen et al., 2010). Par conséquent, dans un contexte obésogène où l'expansion du tissu adipeux intra-abdominal se fait

principalement par une hypertrophie des adipocytes, sa position anatomique favorise le drainage des acides gras libérés directement au niveau hépatique par la veine porte, contribuant à une diminution de la sensibilité à l'insuline et à une augmentation de la production de glucose par le foie.

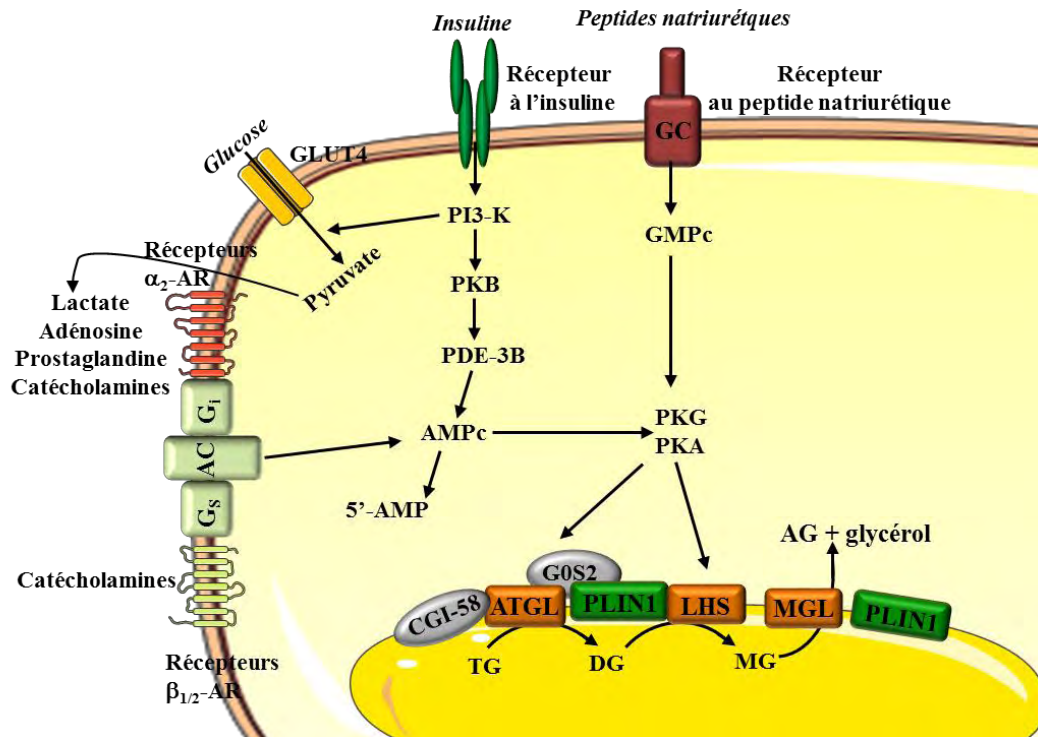


Figure 18 : Contrôle de la lipolyse adipocytaire adapté de (Arner and Langin, 2014)

La lipolyse est stimulée par les catécholamines (adrénaline et noradrénaline) qui stimulent la production d'AMP cyclique (AMPc) et activent la protéine kinase A (PKA). Les peptides natriurétiques (ANP : atrial natriuretic peptide et BNP : brain natriuretic peptide) favorisent la production de GMP cyclique (GMPc) qui active la protéine kinase G (PKG). Les protéines PKG et PKA activent la LHS (lipase hormono-sensible), l'ATGL (adipose triglyceride lipase) et la phosphorylation de la périlipine 1 (PLIN1). L'insuline, par l'activation de la phosphodiesterase-3B (PDE-3B), induit la dégradation de l'AMPc en 5'-AMP mais n'influe pas sur la voie des peptides natriurétiques.  $\alpha_2$ -AR : récepteur  $\alpha_2$ -adrénergique,  $\beta_{1/2}$ -AR : récepteur  $\beta_{1/2}$ -adrénergiques, AC : adénylate cyclase, AG : acide gras, CGI-58 : comparative gene identification 58/ABHD5, DG : diacylglycérol, GOS2 : G0/G1 switch 2, GC : guanylate cyclase, GLUT4 : transporteur du glucose 4, MG : monoacylglycérol, MGL : monoglycérine lipase, PI3-K : phosphatidylinositol-3 phosphate kinase, PKB : protéine kinase B, TG : triglycéride.

En revanche, plusieurs études ont démontré que l'obésité se caractérise par une diminution de la lipolyse induite par les catécholamines et une augmentation de la lipolyse basale dans le TA blanc sous-cutané. Ces altérations s'expliquent par un défaut d'expression/activité de la LHS et de l'ATGL (uniquement observées en situation d'insulino-résistance), des récepteurs  $\beta$ -AR mais aussi de la périlipine 1 (Arner and Langin, 2014; Jocken et al., 2007; Lafontan and Langin, 2009). Une inhibition de la lipolyse serait un mécanisme protecteur contre les effets délétères des acides gras dans les dépôts ectopiques (Lafontan and Langin, 2009; Nielsen et al., 2004). Ainsi l'expansion du TA sous cutané plus apte à stocker qu'à libérer des AG peut protéger

contre l'invasion lipidique du foie et différer l'apparition des troubles métaboliques. Cette relation entre diminution des capacités lipolytiques du TA et amélioration de la sensibilité à l'insuline a été établie chez des souris hétérozygotes pour la LHS ou traitées avec un inhibiteur de la LHS et chez des souris spécifiquement déficientes pour le gène ATGL dans le tissu adipeux (Girousse et al., 2013; Schoiswohl et al., 2015).

## 5. Un organe sécrétoire

Le TA blanc est un important organe endocrine chez les mammifères. Les adipocytes synthétisent et libèrent des hormones peptidiques, appelées adipokines, ou des lipides appelés lipokines, qui agissent soit localement de façon autocrine et/ou paracrine, soit de façon endocrine. Elles ont des rôles physiologiques extrêmement variés, résumés dans la figure 19. Certaines adipokines sont produites par les adipocytes tandis que d'autres sont produites par la FSV. Comme tout organe dynamique, le profil sécrétoire du TA change en fonction de la quantité de tissu adipeux. Etant donné le nombre important d'adipokines sécrété par le tissu adipeux, nous allons nous intéresser aux rôles de quelques-unes d'entre elles.

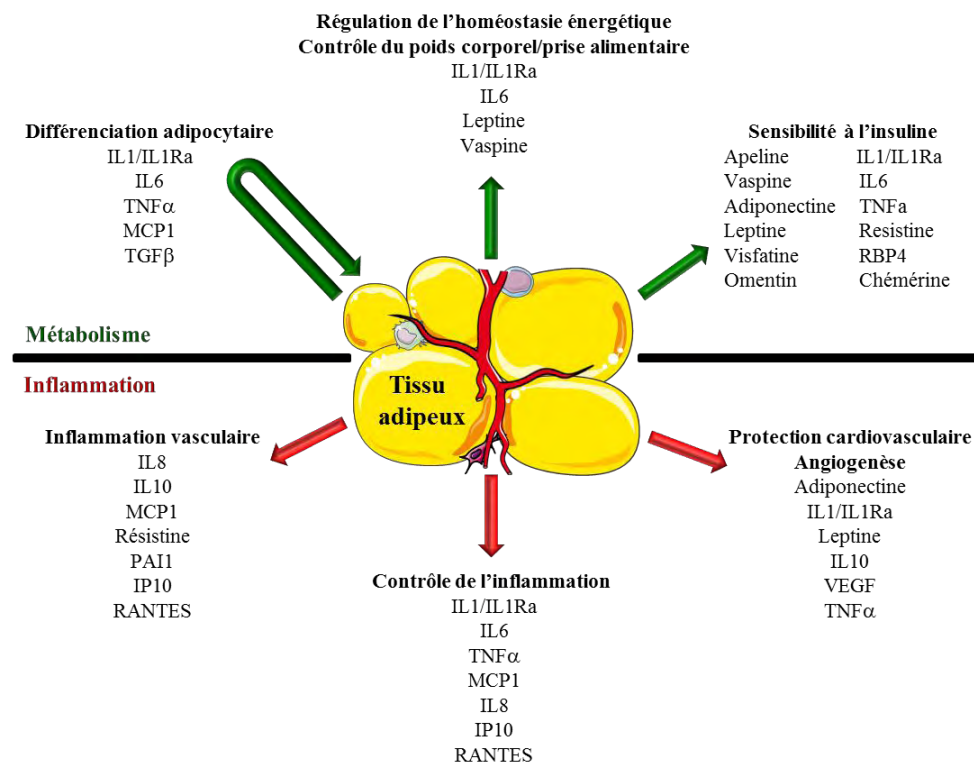


Figure 19 : Le tissu adipeux : un organe sécrétoire

IL: interleukine, IP10: interferon gamma-induced protein 10, MCP1: monocyte chemoattractant protein 1, RANTES: regulated on activation, normal T cell expressed and secreted, PAI-1: plasminogen activator inhibitor-1, TNF $\alpha$ : tumor necrosis factor alpha, VEGF: vascular endothelial growth factor, TGF $\beta$ : transforming growth factor beta, IL1Ra: interleukin-1 receptor antagonist.

### a. Les adipokines

#### *Effets sur l'homéostasie énergétique*

La leptine est codée par le gène *ob* et est presque exclusivement produite par les adipocytes, sa concentration plasmatique est donc proportionnelle à l'adiposité de l'individu. La leptine est une hormone de la satiété qui agit au niveau de l'hypothalamus : elle inhibe la prise alimentaire et augmente la dépense énergétique (Cowley et al., 2001). La leptine agit par l'intermédiaire de ses récepteurs (gène *db*) qui sont exprimés dans de nombreux organes. Cependant, les rôles périphériques de la leptine ne sont pas parfaitement compris. Une des caractéristiques de l'obésité est la mise en place d'une hyperleptinémie menant à une hyperphagie et à une résistance à la leptine (Farooqi and O'Rahilly, 2014). L'hyperleptinémie joue un rôle dans l'état inflammatoire du tissu adipeux en induisant la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$  et IL6) par les macrophages.

L'adiponectine est produite par les adipocytes et circule à des concentrations extrêmement élevées (5-10  $\mu$ g/ml) (Arita et al., 1999). Contrairement à la plupart des autres adipokines, elle voit sa concentration plasmatique diminuer chez les sujets obèses et/ou diabétiques. Elle possède des effets anti-diabétiques, anti-athérogènes et anti-inflammatoires. Ses actions passent par les récepteurs AdipoR1 et AdipoR2, qui par activation de la protéine kinase AMP (AMPK) dans le foie et le muscle squelettique, vont améliorer la sensibilité à l'insuline et le métabolisme glucidique. Elle induit aussi la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires et inhibe le recrutement des monocytes (Kadowaki et al., 2006; Kadowaki et al., 2014). Un traitement par les agonistes de PPAR $\gamma$  augmentent le taux d'adiponectine chez des sujets diabétiques de type 2 (Hirose et al., 2002; Yu et al., 2002). De plus, la double activation de PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$ , dans le tissu adipeux de souris, augmente à la fois le niveau d'adiponectine plasmatique et l'expression des AdipoRs, ce qui améliore la sensibilité à l'insuline des animaux (Tsuchida et al., 2005). Récemment, un agoniste pharmacologique de l'adiponectine administrable par voie orale a été développé et améliore les maladies liées à l'obésité chez l'animal, ouvrant une nouvelle approche thérapeutique dans le traitement du diabète de type 2 chez l'homme (Okada-Iwabu et al., 2013).

L'apeline est un peptide sécrété par les adipocytes mais aussi par de nombreux autres types cellulaires. Son expression adipocytaire peut être induite par l'insuline, le TNF $\alpha$ , les glucocorticoïdes et l'hormone de croissance (Boucher et al., 2005; Daviaud et al., 2006; Kralisch et al., 2007; Wei et al., 2005). L'apeline est le ligand du récepteur APJ. Ce récepteur

est présent au niveau du système nerveux central, des poumons, du cœur, des cellules endothéliales ainsi que sur les adipocytes (Castan-Laurell et al., 2011). L'administration d'apeline chez la souris normo-pondérée et obèse insulino-résistante entraîne une baisse de la glycémie et améliore la tolérance au glucose via une stimulation du transport de glucose et de l'oxydation des AG dans le muscle et le tissu adipeux (Dray et al., 2008). Le système cardiovasculaire est une des cibles de l'apeline puisqu'une administration intraveineuse diminue la pression artérielle et augmente la fréquence cardiaque (Cao et al., 2015; Castan-Laurell et al., 2005). L'apeline semble également avoir une action centrale car elle pourrait être impliquée dans le contrôle de la prise alimentaire (Lv et al., 2012; O'Shea et al., 2003). Son expression tissulaire comme ses niveaux plasmatiques augmentent chez les patients obèses et diabétiques de type 2, ce qui suggère la mise en place d'une résistance à l'apeline chez ces personnes (Cao et al., 2015).

Lors de leur découverte, l'omentine et la visfatine, des peptides sécrétés principalement par le tissu adipeux viscéral, ont été décrits comme améliorant le métabolisme du glucose et la sensibilité à l'insuline. Cependant, d'autres études ont remis en cause leurs effets bénéfiques, notamment l'effet l'insulino-mimétique de la visfatine (Rabe et al., 2008). A l'inverse, la résistine est augmentée avec l'obésité et diminue la sensibilité à l'insuline (Steppan et al., 2001). Les autres adipokines ayant un rôle bénéfique ou délétère dans le métabolisme énergétique sont listées dans le tableau ci-dessous (pour revue voir (Cao, 2014; Kershaw and Flier, 2004; Ouchi et al., 2011)).

NOM	SOURCE	FONCTION dans l'homéostasie glucidique		Variation avec l'obésité
Leptine	Adipocytes	Bénéfique	Signal de la satiété, augmente les dépenses énergétiques	↗
Adiponectine	Adipocytes	Bénéfique	Améliore l'homéostasie énergétique, la sensibilité à l'insuline et le transport du glucose	↘
Vaspine	FSV vicérale	Bénéfique	Améliore la sensibilité à l'insuline et diminue la prise alimentaire	↗
Apeline	FSV + adipocytes	Bénéfique	Améliore la sensibilité à l'insuline	↗
Resistine	FSV + Adipocytes	Délétère	Entraine une intolérance au glucose et à l'insuline	↗
IL6	Adipocytes + FSV	Délétère	Altère le signal insulinique	↗
TNF $\alpha$	FSV	Délétère	Altère le signal insulinique	↗
RBP4	Adipocytes + Macrophage	Délétère	Altère le signal insulinique et induit la néoglucogénèse hépatique	↗

Tableau 2 : Origines et effets sur l'homéostasie glucidique des adipokines

***Effets sur l'inflammation: les cytokines, interleukines et chimiokines***

Le tissu adipeux sécrète aussi une grande variété de cytokines. Certaines pro-inflammatoires, comme le TNF $\alpha$  et les interleukines 6, et d'autres anti-inflammatoires comme d'IL10. Ces cytokines pro-inflammatoires ont un rôle dans le développement de l'inflammation du TA lors de l'obésité et entraînent une accumulation de macrophages et de lymphocytes dans le TA (Kraakman et al., 2015; Uysal et al., 1997; Vieira-Potter, 2014).

Le TNF $\alpha$  est une cytokine pro-inflammatoire produite essentiellement par les macrophages de la FSV. Il est au centre de l'état inflammatoire chronique à bas bruit présent avec l'obésité. Il coordonne le recrutement, l'activation des cellules inflammatoires et l'expression d'autres cytokines pro-inflammatoires (Leal Vde and Mafra, 2013). Le TNF $\alpha$  a été la première adipokine suspectée de faire le lien entre obésité, inflammation et diabète (Hotamisligil et al., 1993). L'augmentation du TNF $\alpha$  favorise le développement de l'insulino-résistance dans le muscle squelettique et le tissu adipeux car il augmente la phosphorylation inhibitrice d'IRS1 et diminue la translocation de GLUT4 (Cawthorn and Sethi, 2008; Steinberg et al., 2006). Le TNF $\alpha$  possède un effet lipolytique en induisant une augmentation des taux intracellulaires d'AMPc et une phosphorylation activatrice de la LHS et une diminution de la protéine G0S2 (Bezaire et al., 2009a; Yang et al., 2011). Ces acides gras issus de la lipolyse vont être captés par les macrophages, puis stockés dans des gouttelettes lipidiques sans entraîner la polarisation des macrophages vers un phénotype pro-inflammatoire M1. Ceci est probablement un mécanisme pour préserver l'homéostasie du TA (Caspar-Bauguil et al., 2015).

L'IL6 est produite par de nombreuses cellules, notamment les cellules endothéliales et les fibroblastes, et par la FSV. En l'absence d'inflammation, le tissu adipeux semble contribuer de 15 à 30% au niveau d'IL6 circulante (Mohamed-Ali et al., 1997). Sa sécrétion et sa concentration sont positivement liées à l'insulino-résistance, par inhibition de l'autophosphorylation du récepteur à l'insuline, et à l'hyperlipidémie, via l'augmentation de la lipolyse. L'IL6 réprime aussi l'expression de l'adiponectine (Lyngso et al., 2002; Nieto-Vazquez et al., 2008). Au niveau central, l'IL6 intervient dans la régulation énergétique. L'inactivation génique de l'IL-6 donne des souris obèses intolérante au glucose (Stenlof et al., 2003), ce phénotype peut être inversé par l'injection centrale d'IL6 (Wallenius et al., 2002).

MCP1 est une protéine chimioattractante (chimiokine) qui permet le recrutement des précurseurs macrophagiques, les monocytes. L'expression basale de la cytokine MCP1 est en général très faible, mais elle augmente fortement avec l'obésité et diminue avec la perte de

poids (Christiansen et al., 2005; Takahashi et al., 2003). Son expression peut être induite par différents stimuli tels que l'IL1 et le TNF $\alpha$ . En effet, MCP1 a été détectée dans de nombreux processus inflammatoires associés à une infiltration de cellules mononucléées comme l'athérosclérose (Hansson, 2005). Dans les situations d'obésité, MCP1 est produite essentiellement par les macrophages et contribue à la résistance à l'insuline dans le TA en diminuant la voie de la signalisation insulinaire. MCP1 inhibe également la croissance et la différenciation des adipocytes en diminuant l'expression d'un certain nombre de gènes adipogéniques dont PPAR $\gamma$  (Juge-Aubry et al., 2005; Sartipy and Loskutoff, 2003).

Les autres cytokines ayant un rôle dans l'inflammation sont listées dans le tableau ci-dessous.

NOM	SOURCE	FONCTION dans l'inflammation		Variation avec l'obésité
Adiponectine	Adipocytes	Bénéfique	Inhibition TNF $\alpha$ et NF $\kappa$ B	↘
IL10	FSV+ Adipocytes	Bénéfique	Anti-inflammatoire, diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires	↗
IL1Ra	Monocytes + Neutrophiles	Bénéfique	Anti-inflammatoire par liaison sur le récepteurs IL1	↗
IL1	Macrophages + Monocytes	Délétère	Pro-inflammatoire	↗
MCP1	FSV + Adipocytes	Délétère	Protéine chimiotactique des macrophages	↗
TNF $\alpha$	FSV	Délétère	Activation de NF $\kappa$ B et des cellules inflammatoires	↗
IL6	Adipocytes + FSV	Délétère	Pro-inflammatoire	↗
IL8	Macrophages+ Monocytes	Délétère	Recrutement des monocytes et des lymphocytes T	↗
Leptine	Adipocytes	Délétère	Structure "cytokine like", induit la production de TNF $\alpha$ et IL6	↗
Resistine	Macrophages	Délétère	Marqueur inflammatoire	↗
PAI-1	FSV	Délétère	Protéine de la phase aiguë de l'inflammation	↗
Visfatine	FSV vécérale	Délétère	Cytokine pro-inflammatoire, module la production de cytokines et chimiokines	↗
ANGPTL2	Adipocytes	Délétère	Promotion de l'inflammation	↗
RANTES	Monocytes + Lymphocytes	Délétère	Pro-inflammatoire	↗

Tableau 3 : Origine et effets sur l'inflammation des adipokines

### b. Les lipokines

Au même titre que les adipokines, le tissu adipeux est capable de produire et de sécréter des lipides bioactifs. Ils sont principalement issus de la transformation de lipides, membranaires

mais ils couvrent toute la gamme des lipides allant de simples acides gras saturés à des molécules complexes. Certains de ces lipides appelés lipokines ont un rôle dans le métabolisme énergétique. Ce terme est apparu en 2008 dans la littérature lors de la mise en évidence de la sécrétion et des effets du C16:1n7 palmitoleate (Cao et al., 2008). L'acide palmitoléique libéré par le tissu adipeux inhibe l'activité de SCD1, contribuant à la prévention de la stéatose hépatique induite par l'alimentation, et augmente la sensibilité à l'insuline dans le muscle de souris. Une étude plus récente montre que des souris nourries avec un régime supplémenté en palmitoléate ont une augmentation de l'expression de SREBP1c, de la FAS et une stéatose hépatique par rapport aux souris témoins. Paradoxalement, elles ont une meilleure sensibilité à l'insuline (Guo et al., 2012). Chez l'Homme, la relation entre l'abondance du palmitoléate dans le tissu adipeux et/ou dans la fraction lipidique du plasma et des paramètres métaboliques tels que l'obésité, la résistance à l'insuline et la stéatose hépatique, a fait l'objet de beaucoup d'études (Hodson and Karpe, 2013). Des associations positives entre le niveau de palmitoléate plasmatique et la sensibilité à l'insuline ont été trouvées par certaines études (Stefan et al., 2010), tandis que d'autres ne trouvent aucune relation (Fabbrini et al., 2011). De plus, l'abondance du palmitoléate dans la fraction lipidique du plasma est positivement associée à la concentration en TG plasmatique et à l'adiposité (Paillard et al., 2008). D'autres études sont donc nécessaires pour mieux comprendre les effets du palmitoléate sur l'homéostasie énergétique.

La sécrétion par les adipocytes d'acide lysophosphatidique (LPA) (Rancoule et al., 2014), de certaines prostaglandines, dont PGE2 (Fain et al., 2000), des endocannabinoides, et de l'anandamide (Annuzzi et al., 2010) sont encore d'autres exemples de lipokines. Récemment, il a été mis en évidence que la famille des esters d'acides gras branchés (liaison ester entre un AG et un AG hydroxylé) participe au métabolisme énergétique. La concentration plasmatique de l'un d'entre eux, l'hydroxy acide palmitique acide stéarique, est fortement corrélée à la sensibilité à l'insuline et est diminuée chez l'homme et la souris obèse ou insulino-résistant. Il améliore la glycémie, augmente la sécrétion d'insuline par le pancréas et diminue l'inflammation chez la souris (Yore et al., 2014).



## **IV. LE TISSU ADIPEUX BRUN**

A la différence du tissu adipeux blanc, dont la fonction est de stocker les lipides sous forme de triglycérides pour assurer les besoins énergétiques de l'organisme en tout temps, le TA brun met en réserve des lipides pour réaliser la thermogénèse. En effet, lors de l'exposition au froid, le TA brun permet à l'animal de conserver une température corporelle optimale et ainsi d'assurer le bon fonctionnement de son métabolisme (Cannon and Nedergaard, 2004).

Le TA brun est présent chez les animaux hibernants et chez les nouveau-nés, chez lesquels son rôle dans la régulation de la température corporelle est primordial. Ce n'est que récemment que plusieurs études ont montré que le TA brun persistait chez l'homme adulte (Cypess et al., 2009; van Marken Lichtenbelt et al., 2009; Virtanen et al., 2009). L'abondance des mitochondries et sa riche vascularisation donnent à ce tissu sa couleur brune ainsi que la capacité d'oxyder les lipides pour produire de la chaleur, ou thermogénèse. Cette propriété fait du TA brun une cible thérapeutique de choix pour lutter contre l'obésité (Sacks and Symonds, 2013).

### **1. Le tissu adipeux brun chez les mammifères**

Il existe dans le règne animal deux types de réponses face aux variations de température de l'environnement. La première, qui consiste à faire varier la température corporelle au gré de l'environnement, est utilisée par les espèces dites poïkilothermes. La seconde méthode, adoptée par les espèces homéothermes telles que les oiseaux et les mammifères, consiste à maintenir la température corporelle à un niveau fixe propre à chaque espèce (Hayes and Garland, 1995). Cette particularité permet aux organismes homéothermes d'assurer l'ensemble de leurs fonctions physiologiques de façon permanente, même dans des environnements thermiques défavorables, ce qui nécessite de disposer d'un système de production de chaleur endogène (Cannon and Nedergaard, 2004).

Cette chaleur est produite par un organe spécialisé, le TA brun. Le TA brun est un acquis évolutif qui s'est développé très tôt dans l'évolution des mammifères (la clade des Euthériens), apportant un avantage qui leur a permis de se libérer des fluctuations environnementales. Le tissu adipeux brun existe aussi dans une espèce de marsupiaux non euthériens (le *Sminthopsis crassicaudata*) mais celui-ci est incapable de produire de la chaleur en réponse au froid (Polymeropoulos et al., 2012). Le tissu adipeux brun fut observé pour la première fois par le naturaliste suisse Konrad Gessner en 1551, qui décrit le TA brun comme n'étant « ni graisse ni chair » (*nec pinguitudo nec caro*).

**a. Les nouveau-nés, les hibernants et les rongeurs**

La capacité thermogénique du TA brun n'a été reconnue qu'à partir des années 1960 (Donhoffer et al., 1964; Smith, 1962). C'est un organe spécialisé dans la production de chaleur sans contraction musculaire, la thermogénèse sans frisson. Le TA brun est présent tout au long de la vie chez les rongeurs mais diminue rapidement après la naissance chez les mammifères de grande taille, à l'exception du porc qui ne possède pas de TA brun actif à la naissance (Berg et al., 2006). Ce TA est d'une importance particulière dans des situations diverses impliquant une exposition au froid, notamment la naissance et l'hibernation.

Historiquement, le tissu adipeux brun a été découvert chez les hibernants et était appelé la glande de l'hibernation. L'hibernation n'est jamais continue au cours de l'hiver, c'est une répétition d'épisodes de torpeur, un état de vie ralentie avec une température basse, en alternance avec des "réveils" au cours desquels l'animal se réchauffe spontanément pour revenir à l'euthermie (Dark, 2005). La thermogénèse du TA brun est particulièrement importante lors de cette phase car la basse température du corps ne permet pas de frissonner (Horwitz et al., 1985; Kitao and Hashimoto, 2012). Ces réveils répondent à un besoin impératif, car ils sont extrêmement coûteux en énergie: ils représenteraient 83% de la dépense totale en période d'hibernation (Cannon and Nedergaard, 2004).

Le TA brun est indispensable lors de la naissance pour compenser le choc thermique pour les nouveau-nés passant d'un environnement à 37°C à un environnement à 20-25°C. (Aherne and Hull, 1966; Nicholls and Locke, 1984). Or les nouveau-nés sont incapables de frissonner, ils dépendent uniquement de la thermogénèse du TA brun, abondant autour des grands vaisseaux qui arrivent et repartent du cœur (Enerback, 2010). La première documentation incontestée de TA brun humain a été fournie en 1902 par Shinkishi Hatai qui décrit un tissu dans la région cervicale d'embryons humains comme ressemblant au TA brun chez les rongeurs. Il a longtemps été admis que le TA brun fonctionnel était restreint à la période néonatale afin de produire la chaleur nécessaire au stress thermique de la naissance, puisqu'il était progressivement remplacé par du TA blanc pendant l'enfance pour disparaître à l'âge adulte (Lean, 1989).

**b. Redécouverte de TA brun chez l'Homme adulte**

Le TA brun fut longtemps considéré comme un organe vestigial régressant avec l'âge et n'ayant comme seule fonction que le maintien de la température corporelle chez le nouveau-né. Cependant, la conclusion de l'absence de TA brun chez l'adulte n'a jamais été

complètement acceptée. En effet, des examens histologiques post-mortem montrent la présence de TA brun chez les travailleurs en plein air, exposés au froid, alors que les personnes travaillant à l'intérieur n'en ont pas (Huttunen et al., 1981). La découverte d'UCP1 chez les rongeurs, mais aussi chez l'homme comme la protéine clé qui confère ses propriétés thermogéniques au TA brun confirme que les mécanismes moléculaires nécessaires pour la thermogenèse sont présents chez l'adulte (Lean et al., 1986; Ricquier et al., 1982). De plus, la présence d'adipocytes bruns chez l'adulte est rapportée dans les cas de phéochromocytome, une tumeur de la glande médullo-surrénale conduisant à une sécrétion excessive de catécholamines (Garruti and Ricquier, 1992; Ricquier et al., 1982). Chez ces patients, l'activité du TA brun est élevée et positivement corrélée aux taux plasmatiques des métabolites des catécholamines (Wang et al., 2011). Les études qui ont tenté de déterminer la capacité fonctionnelle du TA brun chez l'Homme se sont avérées longtemps décevantes. En effet, la mesure de la température dans le TA brun interscapulaire et péirénal humain lors d'une stimulation avec un sympathomimétique, l'éphédrine, a montré que la thermogenèse attribuable au TA brun est faible par rapport à celle du muscle squelettique. (Astrup, 1986; Astrup et al., 1985a; Cunningham et al., 1985).

Il a fallu attendre l'évolution des techniques d'imagerie pour que le TA brun refasse parler de lui. La tomographie à émission de positons PET-CT (positron emission tomography – computed tomography) lors de l'injection d'un analogue non-hydrolysable du glucose, le 18-FDG (18-fluorodeoxyglucose), permet de visualiser les tissus qui incorporent d'importantes quantités de glucose, tels que les tumeurs. Cette technique a permis de mettre en évidence les localisations du TA brun, grâce à son activité métabolique élevée. En effet, chez des patients adultes, des zones particulières des régions supraclaviculaire, para-vertébrale, para-aortique, périnéales et dans le cou, connues pour absorber une quantité importante de FDG, glucose se relèvent être en fait du TA brun (Hany et al., 2002; Nedergaard et al., 2007).

Enfin, en 2009, la parution simultanée de trois articles dans le *New England Journal of Medicine* démontre la présence d'un tissu adipeux brun métaboliquement actif chez l'adulte. Chez des volontaires sains, une exposition au froid (deux heures à 16°C avant le scan), augmente l'absorption du 18-FDG glucose de 15 fois dans les tissus adipeux situés au niveau supra-claviculaire et dans la région du cou. Des biopsies de la région du cou où cette augmentation d'absorption a été observée révèlent la présence d'adipocytes multiloculaires et de la protéine UCP1, confirmant la nature brune du tissu. De plus, ces études établissent une corrélation négative entre la prévalence et l'activité du TA brun et l'âge, le pourcentage de

graisse corporelle et l'IMC chez l'Homme (Cypess et al., 2009; van Marken Lichtenbelt et al., 2009; Virtanen et al., 2009).

Depuis l'intérêt scientifique pour le TA brun n'a cessé d'augmenter et de nombreuses études ont ensuite confirmé la présence d'un TA brun métaboliquement actif chez l'homme et son implication dans la dépense énergétique et la régulation de la masse grasse (Celi et al., 2015). Cette propriété fait du TA brun une cible thérapeutique de choix pour lutter contre l'obésité, malgré la quantité relativement faible de ce tissu chez l'homme adulte (Sacks and Symonds, 2013).

### **c. Localisation et morphologie**

Comparée au TA blanc, la quantité de TA brun est faible. Chez le rongeur les dépôts de TA brun sont localisés au niveau des régions interscapulaire, péri-aortique, péricardiaque, périnéales et entre les muscles du cou, ainsi que dans les creux axillaires. Le plus grand dépôt de TA brun chez la souris, le TA brun interscapulaire (iBAT), est principalement trouvé chez les nouveau-nés et les enfants en bas âge (environ 80% du TA brun) et disparaît ensuite progressivement après l'enfance (Enerback, 2010; Heaton, 1972). L'iBAT est le dépôt le plus étudié car le plus facile d'accès. Il est considéré comme le dépôt le plus important car il permet de réchauffer le sang qui est amené au cœur (Rauch and Hayward, 1969). Chez l'Homme adultes, le dépôt le plus important est le TA brun supra-claviculaire permettant de réchauffer le sang provenant de la périphérie et allant au cerveau. Les autres dépôts se situent dans plusieurs zones dispersées : aux niveaux para-aortique, cervical, para-vertébral et autour de plusieurs organes tels que le cœur, les reins ou le pancréas (Cinti, 2005; Sacks and Symonds, 2013) (Figure 20).

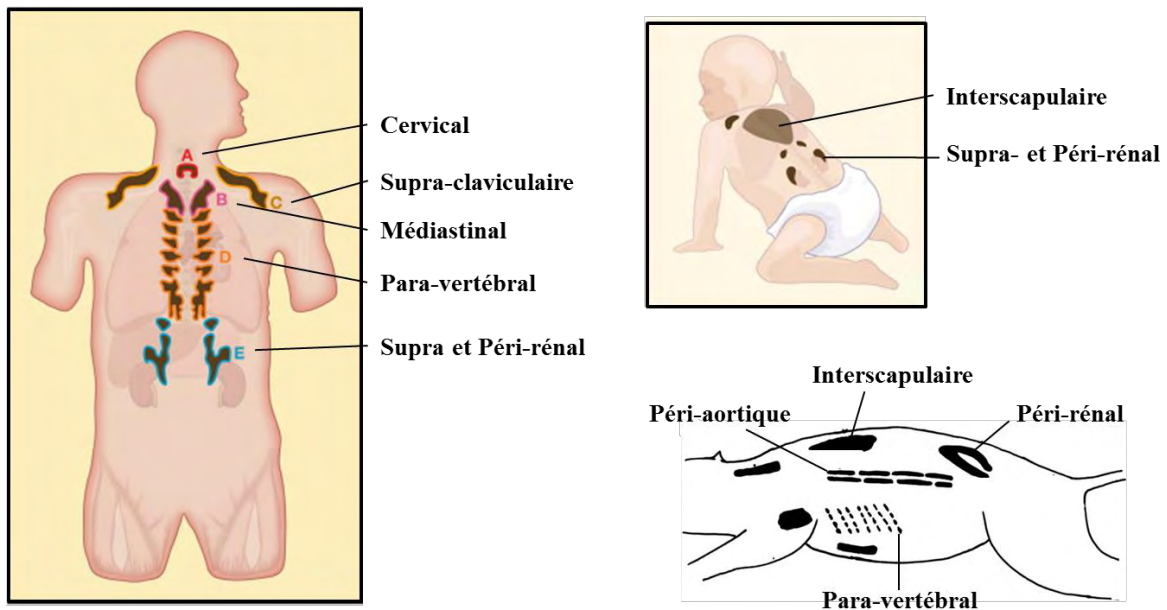


Figure 20 : Localisation anatomique des dépôts de tissu adipeux brun chez l'Homme adulte, le nourrisson et le rongeur d'après (Enerback, 2010)

### ***Morphologie du TA brun***

Les cellules les plus abondantes dans le TA brun sont les adipocytes bruns qui sont responsables de la production de chaleur. L'adipocyte brun a une forme polygonale, un noyau central et de nombreuses gouttelettes lipidiques, lui donnant ainsi une apparence multiloculaire. Il est plus petit que l'adipocyte blanc avec un diamètre moyen de 25 à 50 $\mu$ M. Sa couleur brune est causée par la forte concentration en cytochromes contenu dans les nombreuses mitochondries qui occupent presque l'ensemble du cytoplasme (Tam et al., 2012). Ces mitochondries ont une morphologie particulière avec un très grand nombre de crêtes mitochondriales et expriment la protéine découplante UCP1 (uncoupling protein 1) qui permet la production de chaleur (Ricquier and Kader, 1976). (Figure 21).

Seulement la moitié des cellules du TA brun sont des adipocytes. Comme pour le TA blanc, à côté de ces cellules coexistent des préadipocytes, des cellules endothéliales, des péricytes et des mastocytes (Geloan et al., 1990; Himms-Hagen et al., 1994).

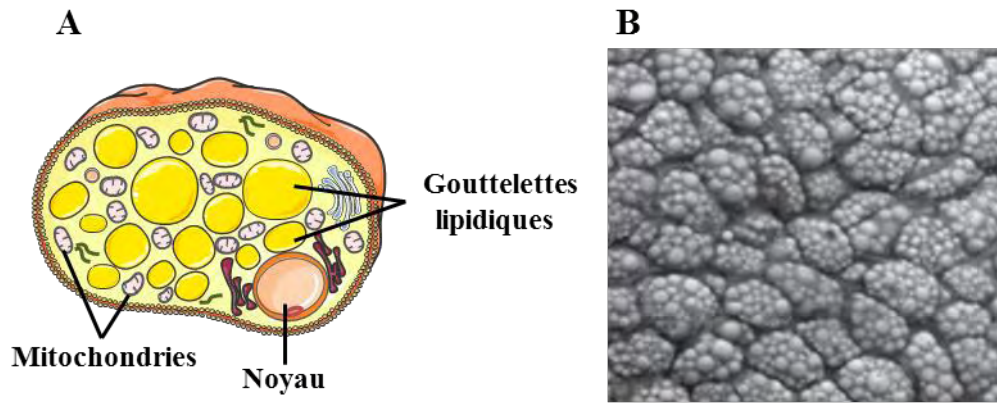


Figure 21 : Morphologie des adipocytes bruns  
 (A) Représentation schématique d'un adipocyte brun. (B) Image de microscopie électronique d'adipocytes bruns multiloculaires du TA brun interscapulaire de souris, d'après (Bartelt and Heeren, 2014).

### ***Innervation du TA brun***

Le tissu adipeux brun est densément innervé, presque exclusivement par le système nerveux sympathique. Lors d'une exposition au froid, les thermorécepteurs vont s'activer et les informations sont envoyées au noyau pré-optique de l'hypothalamus via les nerfs sensoriels. (Schepers and Ringkamp, 2010). Ces thermorécepteurs font partie de la famille des canaux cationiques (transient receptor potentiel (TRP) family of cation channels). Ils sont exprimés au niveau périphérique, situés à la surface de la peau, et au niveau central, situés sur la paroi des organes intra-abdominaux et de la moelle épinière pour y permettre le maintien des conditions idéales au bon fonctionnement des organes vitaux (Morrison et al., 2012). Dans la famille des TRP, on trouve un récepteur sensible au froid, le TRPM8, et trois récepteurs sensibles au chaud, les TRPV1, 3 et 4.

Le noyau pré-optique de l'hypothalamus est le centre de contrôle de la température de l'organisme : celui-ci intègre les signaux environnementaux afin d'agir de façon appropriée sur le système nerveux sympathique. L'activation du système nerveux sympathique périphérique et la libération de noradrénaline stimulent les récepteurs adrénergiques pour induire la thermogénèse. Les trois principaux types de récepteurs adrénergiques ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  et  $\beta$ ) sont présents sur les adipocytes. Parmi les trois sous-types de récepteurs adrénergiques bêta, le récepteur  $\beta_3$ -adrénergique est sans doute le plus important dans les adipocytes bruns matures car il médie la réponse thermogénique (Morrison et al., 2012; Morrison and Nakamura, 2011). (Figure 22)

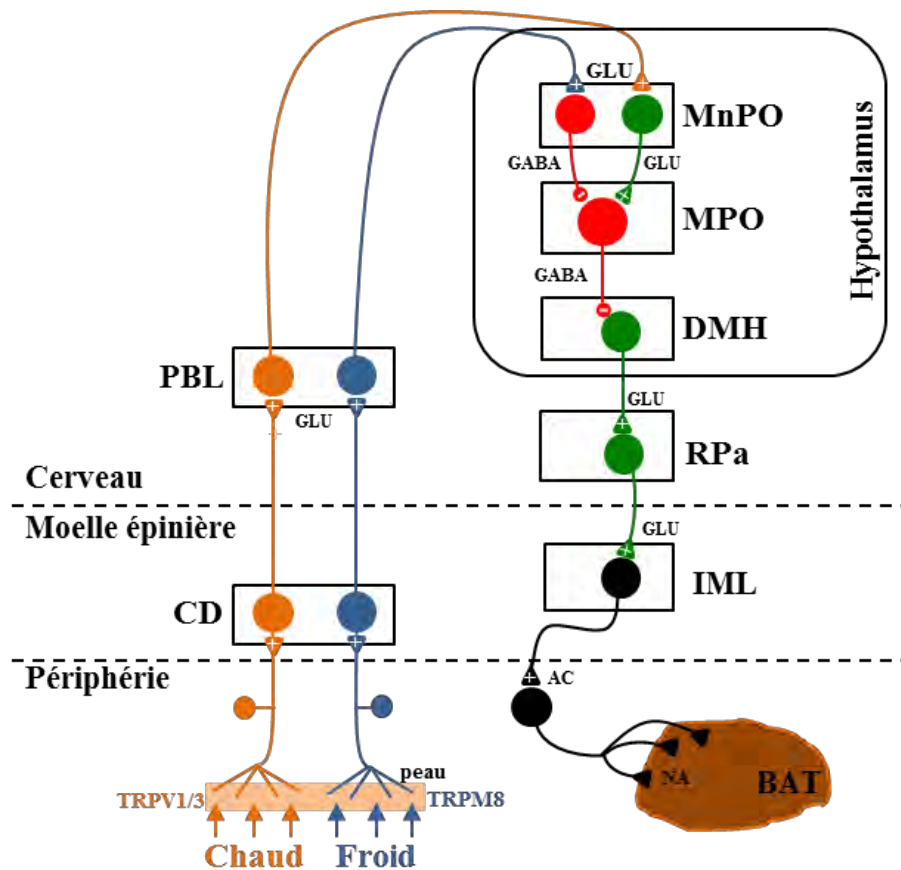


Figure 22 : Innervation du TA brun d'après (Morrison et al., 2012)

La perception thermique est réalisée par les TRPV1/3 pour le chaud et TRVM8 pour le froid. Le message nerveux est ensuite transmis grâce à des prolongements axonaux vers la corne dorsale (CD) puis au noyau parabrachial latéral (PBL). Le PBL contient des neurones glutamatergiques qui se projettent vers le noyau préoptique médian (MnPO) de l'hypothalamus. Les neurones du noyau préoptique médial (MPO) peuvent être activés par les afférences glutamatergiques (GLU) provenant du MnPO relayant les stimuli thermiques cutanés chauds. A l'inverse, ils sont inhibés par les afférences GABAergiques (GABA) provenant du MnPO et relayant les stimuli thermiques cutanés froids. Les neurones du MPO, qui déchargent de façon spontanée en conditions de thermoneutralité, voient leur taux de décharge diminuer proportionnellement à la baisse de la température, afin de lever graduellement l'inhibition sur les neurones situés en aval tels que le noyau dorsomédian de l'hypothalamus (DMH). Le DMH se projette vers le noyau du raphé pallidus (RPar) qui est la région du système nerveux central contenant les neurones pré-moteurs sympathiques. Le système nerveux sympathique contrôle le TA brun dans les segments thoraciques de la colonne intermédiaire latérale de la moelle épinière (IML). Celui-ci, sous l'influence de neurones pré-moteurs sympathiques du RPa, libère la noradrénaline (NA) qui active la thermogénèse du TA brun. AC : acétylcholine, GABA : acide  $\gamma$ -aminobutyrique, GLU : glutamate, TRPV1/3 et TRPM8 : transient receptor potentiel V1/3 and M8.

Il n'existe pas de données probantes au sujet de l'innervation parasympathique. Seul le TA brun médiastinal possède une innervation parasympathique, la majorité des dépôts bruns étant uniquement innervée par le système nerveux sympathique (Giordano et al., 2004). L'administration d'un bloquant du système sympathique à un rongeur le rend incapable de maintenir sa température corporelle au cours d'une exposition au froid (Landsberg et al., 1984; Thomas and Palmiter, 1997). Inversement, si on lui administre un agoniste  $\beta$ 3-adrénergique,

comme le CL316,243, il augmente sa température corporelle de façon comparable à celle que l'on observe après exposition au froid (Himms-Hagen et al., 1994).

Comme pour le TA blanc, une innervation afférente du TA brun interscapulaire vers le cerveau a récemment été mise en évidence par l'utilisation de virus marqueurs du transport antérograde. Les régions marquées par le virus sont en partie les mêmes que celle de l'innervation efférente du système nerveux sympathique. La fonction de cette boucle de rétroaction reste encore mal connue, mais elle pourrait avoir un rôle dans la thermogénèse (Bartness et al., 2010; Himms-Hagen et al., 1990; Ryu et al., 2015).

### ***Vascularisation du TA brun***

Le TA brun est très vascularisé et possède des anastomoses artério-veineuses permettant une distribution optimale de la chaleur, la densité vasculaire étant d'environ 5 à 10 fois plus élevée dans le TA brun que dans le TA blanc (Lever et al., 1985). L'activation aiguë et chronique du TA brun lorsque les animaux sont exposés au froid sont toutes deux associées à une augmentation du flux sanguin vers le tissu et à une angiogénèse via, notamment, l'expression de VEGFA (Asano et al., 1999; Sun et al., 2014). A l'inverse, la suppression ciblée de VEGFA entraîne une raréfaction des capillaires et le « blanchiment » du TA brun qui se caractérise par un dysfonctionnement mitochondrial et une accumulation de gouttelettes lipidiques (Shimizu et al., 2014). Ce phénomène est aussi observé lors d'une l'obésité induite par l'alimentation chez la souris à cause de la diminution de l'expression de VEGFA (Tonello et al., 1999).

La stimulation du système nerveux sympathique peut induire une vasodilatation, en stimulant la production d'oxyde nitrique (NO) par les adipocytes bruns. Les adipocytes bruns expriment à la fois et l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) et l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS). Dans l'adipocyte brun, cette libération de NO est causée par l'augmentation des taux d'AMPc intracellulaires, donc généralement en parallèle de l'induction de la thermogénèse. Néanmoins, cette vasodilatation causée par le NO des cellules adipeuses brunes peut se faire aussi indépendamment de la production de chaleur (Abreu-Vieira et al., 2015; Kikuchi-Utsumi et al., 2002; Nisoli et al., 1997). La vasodilatation du TA brun chez les rongeurs est étroitement liée à la réponse thermogénique consommant de l'oxygène (Foster and Depocas, 1980). La connexion entre la thermogénèse et la circulation sanguine a également été démontrée indirectement chez des souris invalidées pour le gène UCP1, car celles-ci ne parviennent pas à



augmenter le flux sanguin dans le TA brun en réponse à l'activation  $\beta_3$ -adrénergique, tandis que le flux sanguin dans le TA brun chez les souris sauvages est augmenté (Granneman et al., 2003).

Cette augmentation du flux sanguin vers le tissu adipeux brun est induite par le système nerveux sympathique et est nécessaire pour assurer un approvisionnement suffisant en oxygène et en nutriments du TA brun et facilite la distribution de la chaleur produite dans le reste du corps (Foster and Frydman, 1978).

## 2. Thermogenèse

L'homéothermie est possible grâce à la régulation d'un équilibre entre la production de chaleur de l'animal, ou thermogenèse, et les pertes de chaleur imposées par l'environnement, ou thermolyse. Lors d'une exposition aiguë au froid, afin d'éviter l'hypothermie, des mécanismes de limitation des pertes de chaleur, sont mis en jeu dans un premier temps (comportement, isolation, réponses vasomotrices) (Nakamura and Morrison, 2008). Si ces processus sont insuffisants pour limiter les pertes thermiques, l'animal est contraint d'augmenter sa production de chaleur, il s'agit de la thermogenèse.

La thermogenèse est un processus multifactoriel incluant la thermogenèse obligatoire et la thermogenèse facultative ou adaptative. La thermogenèse obligatoire est la résultante de l'activité du métabolisme basal, c'est-à-dire une conséquence de l'ensemble des réactions exothermiques. Cette thermogenèse représente les deux tiers de la chaleur produite par l'organisme (Clapham, 2012). Le terme de thermogenèse facultative ou adaptative regroupe trois effecteurs qui sont : (i) les muscles dans le cadre de l'activité physique volontaire ou du frissonnement lors d'une exposition au froid, (ii) le tractus digestif pendant la digestion et (iii) le TA brun qui est stimulé pendant une exposition au froid (Clapham, 2012; Silva, 2006; van Marken Lichtenbelt and Daanen, 2003). Ces trois sources de thermogenèse sont dites facultatives ou adaptatives car elles sont activées par le SNC de façon temporaire en réponse à une modification de l'environnement. Toutefois, elles sont essentielles à l'adaptation et à la survie de l'organisme face aux modifications de l'environnement (Cannon and Nedergaard, 2004; Silva, 2006).

Chez tous les endothermes, lors d'une exposition courte au froid, la thermogenèse repose principalement sur les contractions asynchrones des muscles squelettiques antagonistes ne générant pas de mouvement volontaire mais stimulant les processus oxydatifs. Cela entraîne une consommation ainsi qu'une resynthèse accrue d'ATP, mécanismes générateurs de chaleur,

mais entrave la locomotion. De fait, la thermogénèse de frisson est relativement invalidante et tend à s'estomper progressivement lors d'une exposition prolongée au froid pour être remplacée par une thermogénèse sans frisson (Haman et al., 2010; van Ooijen et al., 2005).

Cette capacité thermogénique du TA brun est due à une perméabilité importante de la membrane interne mitochondriale aux protons, qui permet de dissiper le gradient électrochimique indépendamment de l'ATP synthase. Cela a pour conséquence de dissocier le fonctionnement de la chaîne respiratoire de la synthèse d'ATP, l'énergie étant alors libérée sous forme de chaleur : la respiration de la mitochondrie est dite découplée.

**a. Découplage de la chaîne respiratoire**

La production de chaleur des adipocytes bruns est associée à la consommation d'oxygène et de nutriments comme le glucose, les acides gras et les protéines. Les processus cataboliques de l'organisme (glycolyse, cycle de Krebs,  $\beta$ -oxydation) entraînent la production de coenzymes réduits NADH,  $H^+$  et  $FADH_2$ . Dans les mitochondries, les coenzymes cèdent leurs deux électrons à un système de transporteurs qui, par une cascade de réactions d'oxydo-réduction, amènent ces électrons jusqu'à l'accepteur final, l'oxygène moléculaire. Le transfert des électrons d'un complexe à l'autre de la chaîne respiratoire est associé à l'expulsion de protons dans l'espace intermembranaire. La membrane interne étant très peu perméable aux protons, ceux-ci s'accumulent et engendrent un gradient électrochimique. L'ATP synthase (complexe V) utilise le gradient de protons pour transférer un phosphate à une molécule d'ADP pour former l'ATP. La respiration est alors couplée à la production d'énergie sous forme d'ATP on parle de phosphorylation oxydative (Brown, 1992) (Figure 23).

Le gradient de proton n'est pas uniquement consommé par l'ATP synthase. D'autres transporteurs mitochondriaux de la membrane interne comme le transporteur de phosphate, du glutamate, du pyruvate et de l'adénosine disphosphate utilise le gradient de proton pour transporter ces molécules dans la matrice mitochondriale. Toute diminution du gradient de protons découple la phosphorylation oxydative, on parle alors de découplage mitochondrial. Les mitochondries des adipocytes bruns présentent une forte respiration découplée. La protéine responsable de ce découplage, nommée UCP (uncoupling protein) lors de sa découverte, est située dans la membrane mitochondriale interne. Elle agit comme un canal à protons qui dissipe le gradient électrochimique sous forme de chaleur en court-circuitant l'ATP-synthase (Nicholls and Locke, 1984; Ricquier and Kader, 1976). Depuis la découverte de cette protéine, plusieurs

homologues d'UCP ont été identifiés, UCP1 est la protéine responsable du découplage dans le tissu adipeux brun car uniquement exprimée dans ce tissu.

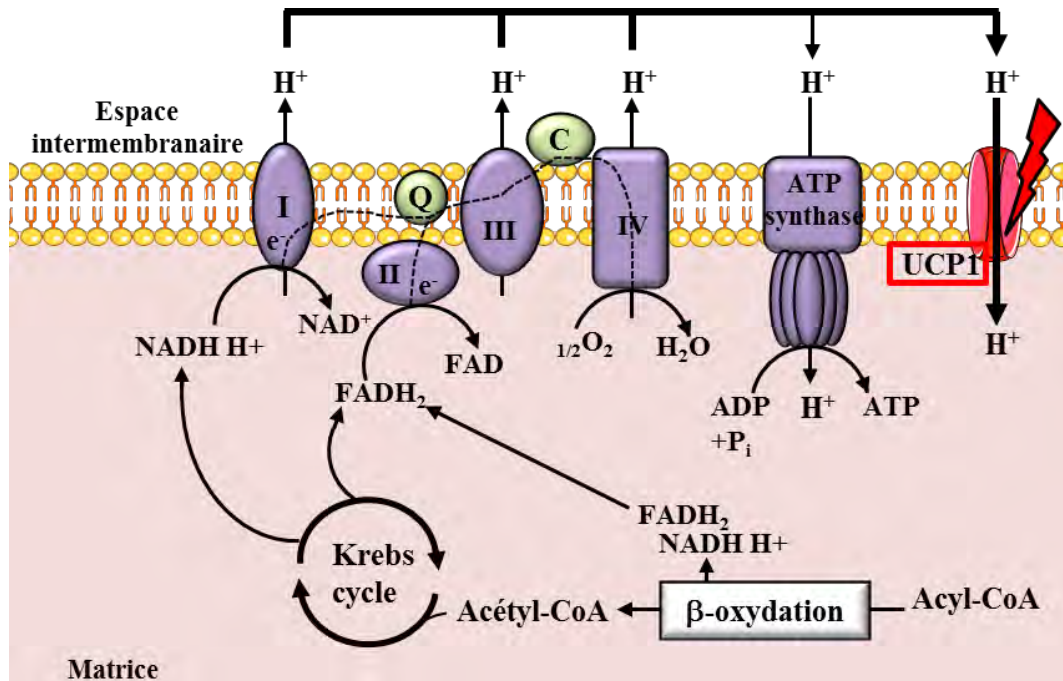


Figure 23 : Découplage de la chaîne respiratoire

Les acyl-CoA mitochondriaux sont transformés en acétyl-CoA, en  $\text{NADH}, \text{H}^+$  (Nicotinamide adénine dinucléotide H,  $\text{H}^+$ ) et  $\text{FADSH}_2$  (Flavine adénine dinucléotide H2) par la β-oxydation, puis entrent dans le cycle de Krebs pour donner des  $\text{FADH}_2$  et des  $\text{NADH}, \text{H}^+$  nécessaires au fonctionnement de la chaîne respiratoire. La chaîne respiratoire mitochondriale se situe dans la membrane interne de la mitochondrie. Elle est composée de quatre complexes permettant d'établir le gradient de protons. Complexe I: NADH-quinone oxydoréductase, complexe II: succinate-quinone oxydoréductase, complexe III: quinol-cytochrome c oxydoréductase, complexe IV: cytochrome c oxydase. Ce gradient de protons induit la synthèse d'ATP par le complexe V (ATP synthase). En présence de la protéine UCP1, le complexe V est court-circuité, permettant la libération de chaleur sans production d'ATP. C : Cytochrome C, Q Ubiquinone, UCP1 : Uncoupling protein 1.

### b. La protéine découplante UCP1

Les protéines découplantes appartiennent à la super famille des transporteurs mitochondriaux (Nubel and Ricquier, 2006). Ces protéines d'environ 300 acides aminés et d'un poids moléculaire de 34 kDa sont des homodimères constitués de monomères de même structure : trois domaines de 100 résidus comprenant deux régions hydrophobes (hélices  $\alpha$ ) reliées par des segments hydrophiles. Les hélices  $\alpha$  aménagent un canal tandis que les segments hydrophiles servent de portes assurant l'activité et la sélectivité du transporteur (Arechaga et al., 2001). La protéine UCP1 a été identifiée, purifiée et clonée entre 1976 et 1986 (Aquila et al., 1985; Bouillaud et al., 1985; Lin and Klingenberg, 1980; Ricquier and Kader, 1976). UCP1 est une protéine agissant sous forme de dimère qui est particulièrement abondante dans les mitochondries des adipocytes bruns. Elle représente environ 5-8% de la teneur totale en protéines mitochondriales (Rousset et al., 2004). La quantité totale de protéine découplante peut

être multipliée jusqu'à 10 fois en réponse à une exposition prolongée au froid (Jacobsson et al., 1994; Milner and Trayhurn, 1989). La protéine UCP1 est le marqueur des adipocytes bruns, sa présence est indissociable du processus de thermogénèse. Des manipulations génétiques d'inactivation du gène chez la souris montrent que les souris deviennent incapables de maintenir leur température corporelle si elles sont exposées en aigue à 4°C (Enerback et al., 1997).

Il a longtemps été considéré qu'UCP1 était spécifique du TA brun, cependant de récentes études ont montré qu'elle pourrait être également présente dans les muscles lisses, le TA blanc (Nibbelink et al., 2001; Porter, 2006) ou le thymus (Carroll et al., 2005).

### *Activation d'UCP1*

L'activité de la protéine peut être modulée par différentes molécules principalement les acides gras et les nucléotides. Néanmoins, le mécanisme par lequel UCP1 active le découplage reste incomplètement élucidé.

Le transport des protons par UCP1 est inhibé par les nucléotides di- et triphosphate (GDP, GTP, ADP ou ATP). L'affinité pour les nucléotides monophosphate est environ 50 fois moindre (Nicholls, 1974). Une concentration de GDP de l'ordre du mM est capable d'inhiber le découplage de mitochondries isolées du TA brun. Les acides gras sont des activateurs du transport de protons catalysé par UCP1 dans les mitochondries (Huang, 2003). Sur des mitochondries isolées, l'ajout de palmitate entraîne une immédiate dépolarisation et l'augmentation concomitante de la respiration. Lorsque l'infusion de palmitate est arrêtée, le potentiel de membrane est progressivement restauré (Locke and Nicholls, 1981). D'autres cofacteurs sont nécessaires pour l'activation d'UCP1 comme le coenzyme Q (Echtay et al., 2000; Sluse et al., 2006), l'anion superoxyde  $O_2^-$  (Echtay et al., 2002), des produits de peroxydation lipidique comme le 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) (Echtay et al., 2005) ou les rétinoïdes (Tomas et al., 2004).

Actuellement, le mécanisme exact de l'activation d'UCP1 reste incertain. Deux modèles concurrents sont discutés (Cannon and Nedergaard, 2004; Divakaruni et al., 2012) (Figure 24):

- Soit UCP1 est un canal protonique utilisant uniquement le potentiel de membrane pour faire passer des protons depuis l'espace intermembranaire vers la matrice mitochondriale. Le transport des protons se ferait grâce à la présence de résidus donneurs/receveurs tel que le

glutamate ou l'aspartate, le long des segments transmembranaires (Esteves et al., 2004; Fedorenko et al., 2012; Klingenberg et al., 1999).

- Soit UCP1 est un membre d'une famille de transporteurs d'anions, notamment un transporteur d'acides gras anioniques. Les acides gras sous forme protonée traverseraient la membrane interne indépendamment d'UCP1. Une fois dans la matrice, en raison de la différence de pH, les protons se dissocieraient des acides gras. Les acides gras retourneraient alors dans l'espace intermembranaire sous forme anionique via UCP1 (Breen et al., 2006; Garlid et al., 1998).

Dans ces deux modèles les acides gras sont des cofacteurs indispensables. Cependant, cette idée est encore débattue (Shabalina et al., 2004).

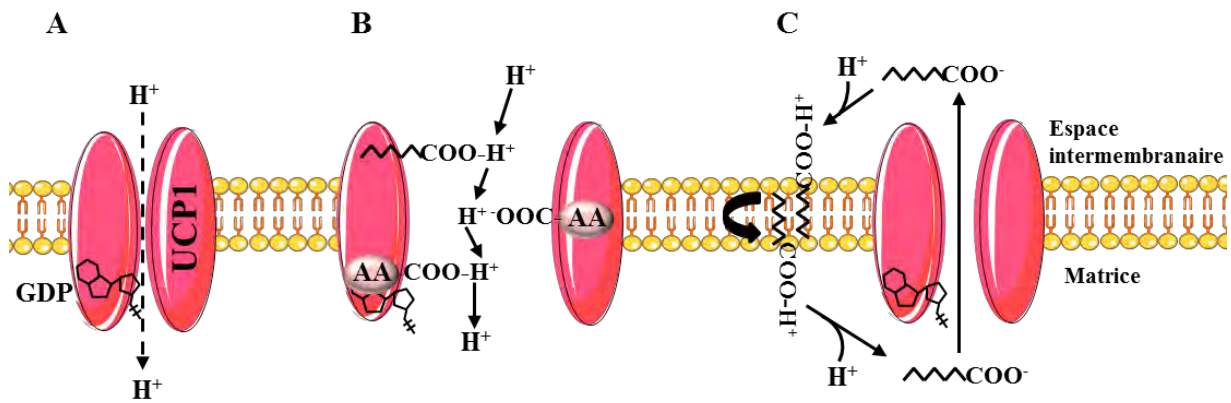


Figure 24 : Mécanismes proposés pour le transport de protons par UCP1

(A) A l'état basal, la guanosine diphosphate (GDP) diminue le découplage d'UCP1. (B-C) Deux mécanismes ont été proposés pour l'activation de la protéine découplante UCP1 par des acides gras libres. (B) Dans le modèle canal à proton, des groupes carboxyliques des acides gras ( $R\text{-COOH}$ ) et certains acides aminés ( $AA\text{-COOH}$ ) acceptent les protons ( $H^+$ ) à partir de l'espace intermembranaire et les transportent dans la matrice mitochondriale à travers UCP1. Les acides gras seraient nécessaires pour compenser l'absence de groupes donneur / accepteur de protons à des positions cruciales dans le canal. (C) Dans le modèle transporteur d'anion, des anions d'acides gras ( $R\text{-COO}^-$ ) sont transportés à partir de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire par UCP1 où ils sont protonés. Dans leur forme protonée, ils sont capables de passer dans la matrice à travers la membrane. Dans la matrice, le proton est ensuite libéré et le cycle recommence.

### ***Les autres UCPs***

La famille des protéines découplantes comporte sept représentants chez les mammifères (UCP1, UCP2, UCP3, UCP4, UCP5, HDMCP et KMCP1) et un représentant chez les oiseaux, les poissons, et dans le règne végétal (Ricquier and Bouillaud, 2000). Contrairement à UCP1, 2 et 3, le rôle physiologique des autres UCP est peu connu. (Tableau 4).

Gène	Localisation chromosomique (Homme)	% homologie	Localisation tissulaire	Quantité (% des protéines mitochondriales)
UCP1	4q31		TA brun et TA blanc, muscle lisse, thymus	5-8%
UCP2	11q13	59% UCP1	Ubiquitaire sauf dans le foie	0,03%
UCP3	11q13	57% UCP1	Muscle	0,01%
UCP4	6p12,2-q12	30% UCP1	Cerveau	ND
UCP5	Xq24	33% UCP1	Cerveau	ND
HDMCP	14q32,31	25% UCP1	Carcinome hépatique	ND
KMCP1	13q14,11	80% UCP5	Rein	ND

Tableau 4 ; Les différentes UCPs humaines, d'après (Damon.M 2006)

L'homologie protéique entre UCP2 et UCP1 est de 59%, UCP3 présente 72% de similarité avec UCP2 et 57% avec UCP1. L'expression d'UCP2 est ubiquitaire, quant à la protéine UCP2, son expression tissulaire est plus variable, détectée uniquement dans certains tissus, comme la rate, le poumon, l'intestin, l'estomac et le tissu adipeux blanc (Nubel and Ricquier, 2006). UCP3 est majoritairement exprimée dans le muscle squelettique et le TA brun. L'homologie entre UCP1, UCP2 et UCP3 laisse penser à une activité biochimique similaire. Ces protéines sont beaucoup moins exprimées dans le muscle qu'UCP1 dans le TA brun, et donc le découplage induit par UCP2 et 3 devrait être beaucoup plus faible que celui d'UCP1 (Pecqueur et al., 2001). Les recherches indiquent qu'elles sont peu ou pas impliquées dans la thermogénèse ou le contrôle de la dépense énergétique, mais ces résultats diffèrent selon les modèles d'études. La fonction découplante d'UCP2 et 3 reste encore débattue (Couplan et al., 2002; Gong et al., 2000; Mills et al., 2003).

UCP2 et UCP3 ont un rôle dans le métabolisme et dans la limitation de la production de radicaux libres endogènes. Quand le gradient de protons est très élevé, la chaîne respiratoire laisse des électrons s'échapper vers la matrice mitochondriale, formant ainsi des espèces réactives de l'oxygène (EAO). Cependant, une légère diminution du gradient de protons (de l'ordre de 10 %) peut diminuer fortement (de 50 à 70 %) la production d'EAO (Starkov, 2006). L'inhibition d'UCP2 ou 3 par le GDP dans la mitochondrie augmente le potentiel de membrane et la production d'EAO (Negre-Salvayre et al., 1997; Talbot et al., 2004). UCP2 et 3 sont aussi activées suite à une production importante d'EAO par le HNE (4-Hydroxy-2-Nonenal), issu de la peroxydation des phospholipides membranaires (Brand et al., 2004).

UCP3 est fortement exprimée dans des situations où la quantité d'acides gras dépasse la capacité oxydative des mitochondries (régime riche en lipides, jeûne, effort intense, muscles glycolytiques) (Schrauwen and Hesselink, 2002). Une surexpression modérée d'UCP3 humain

dans les muscles glycolytiques de souris induit un découplage mitochondrial et une résistance à l'obésité lors d'un régime riche en graisse (Tiraby et al., 2007). UCP3 permettrait d'exporter les acides gras anioniques hors de la mitochondrie pour limiter l'accumulation d'acides gras dans la matrice et leur peroxydation (Bezaire et al., 2007; Brand and Esteves, 2005; Schrauwen et al., 2002). Les protéines découplantes pourraient également transporter d'autres molécules chargées comme le pyruvate (UCP3) ou la glutamine (UCP2). Le rôle d'UCP2 serait de contrôler l'alimentation du cycle de Krebs en limitant l'apport du pyruvate, produit de la glycolyse, en faveur des acides gras et de la glutamine (Bouillaud, 2009; Pecqueur et al., 2008), tandis qu'UCP3 aurait pour fonction l'exportation du pyruvate mitochondrial vers le cytoplasme pour être métabolisé en lactate ou servir de précurseur à d'autres voies métaboliques (Criscuolo et al., 2006; Pecqueur et al., 2008).

Il existe une relation entre la sécrétion d'insuline par les cellules du pancréas et la protéine découplante UCP2. L'ATP active la fermeture d'un canal potassique, créant une dépolarisation qui permet l'entrée du calcium dans la cellule  $\beta$ -pancréatique qui stimule la sécrétion d'insuline. UCP2 intervient en diminuant le gradient de protons et donc la synthèse d'ATP, empêchant la fermeture du canal potassique en diminuant la synthèse d'ATP. Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* démontrent que la modulation de l'expression ou de l'activité d'UCP2 modifie la sécrétion d'insuline (Bordone et al., 2006; De Souza et al., 2007; Wang et al., 1999) tandis que d'autres études sont en contradiction (Produit-Zengaffinen et al., 2007). De plus, chez l'Homme, des études génétiques montrent l'influence du polymorphisme -866G/A d'UCP2 sur le diabète de type 2. Les îlots de personnes saines porteuses de l'allèle A (plus forte expression d'UCP2) sécrètent moins d'insuline que les porteurs de l'allèle G et ont un risque accru de développer un diabète de type 2 (D'Adamo et al., 2004; Gable et al., 2006; Sasahara et al., 2004).

D'autres implications des UCP ont été établies, notamment dans l'inflammation, l'athérosclérose, la réponse immunitaire et l'activité neuronale (Nubel and Ricquier, 2006). Cependant, seule UCP1 est capable d'induire le découplage mitochondrial nécessaire à la production de chaleur en cas d'exposition au froid. L'activité thermogénique des adipocytes bruns et d'UCP1 doit être finement régulée afin d'être active uniquement en cas de chute de la température corporelle.

### c. Régulation de la thermogénèse

L'activation de la thermogénèse et la transcription d'UCP1 sont principalement sous le contrôle du système nerveux sympathique. Mais plusieurs systèmes hormonaux, facteurs de transcription et kinases sont impliqués dans la régulation de l'expression d'UCP1. Le gène UCP1 est localisé sur le chromosome 4 chez l'Homme, et la quantité d'UCP1 est principalement régulée au niveau transcriptionnel.

#### *Contrôle de l'expression d'UCP1 par les catécholamines*

Le principal système de contrôle de l'activation des adipocytes bruns est la noradrénaline libérée par les terminaisons sympathiques. Il a très tôt été mis en évidence qu'un traitement chronique avec de la noradrénaline chez des rongeurs induit la thermogénèse, reproduisant partiellement les effets d'une acclimatation au froid (Leblanc and Pouliot, 1964; Mory et al., 1984). En plus des nerfs sympathiques, les macrophages constituent un second circuit parallèle pour commander la thermogénèse sans frissons. En effet, l'exposition au froid de souris entraîne l'activation des macrophages vers un type M2 anti-inflammatoire qui sécrète des catécholamines. L'absence de ces macrophages conduit à un défaut de la thermogénèse en réponse au froid (Nguyen et al., 2011).

Dans les adipocytes bruns matures, la noradrénaline interagit avec les récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$  adrénergiques. La stimulation du récepteur de  $\beta$ 3-adrénergique (ADRB3), stimule fortement la thermogénèse (Champigny et al., 1992; Ricquier et al., 1986). Bien que le récepteur adrénergique  $\alpha_1$  soit abondamment exprimé dans le TA brun, sa stimulation représente au maximum 10 % de la thermogénèse du TA brun chez les rongeurs (Cannon and Nedergaard, 2004). L'ADRB3 est couplé à une protéine Gs qui active l'adénylate cyclase, induisant ainsi l'augmentation de la concentration intracellulaire en AMPc. L'AMPc permet l'activation de la PKA et de la lipolyse. Les acides gras vont agir à la fois comme inducteurs du découplage mitochondrial (activateurs d'UCP1) et comme substrats énergétiques pour la mitochondrie (Chechi et al., 2013; Harms and Seale, 2013).

La voie de l'AMPc/PKA va aussi induire l'expression d'UCP1. Sa transcription est régulée par de nombreux facteurs de transcriptions différents ayant chacun un élément de réponse au niveau du promoteur d'UCP1 (Bonet et al., 2013). La phosphorylation du facteur de transcription CREB (facteur de transcription sensible à l'AMPc), va activer p38MAPK. Une fois p38MAPK activé, celui-ci phosphoryle le facteur de transcription ATF-2, qui se fixe sur les promoteurs d'UCP1 et de PGC1 $\alpha$  au niveau de l'élément de réponse CRE. PGC1 $\alpha$  est un co-activateur de



la transcription essentiel de l'adipocyte brun, interagissant avec d'autres facteurs de transcription pour favoriser l'expression de la biogenèse mitochondriale et du métabolisme oxydatif (Cao et al., 2004; Robidoux et al., 2005). PGC1 $\alpha$  agit comme un co-activateur du complexe PPAR/RXR qui active l'expression d'UCP1 par liaison sur un PPRE au niveau de son promoteur. Ainsi, traiter des adipocytes bruns avec des agonistes de PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  ou RXR induit l'expression d'UCP1 ainsi que l'expression de PGC1 $\alpha$ , mais cela nécessite la présence d'acide rétinoïque (Barbera et al., 2001; Hondares et al., 2006; Petrovic et al., 2008). L'acide rétinoïque peut à la fois se lier sur son récepteur RAR et sur PPAR, et activer les deux hétérodimères PPAR/RXR et RAR/RXR qui vont se fixer à leurs éléments de réponse respectifs sur le promoteur distal d'UCP1 (Larose et al., 1996; Rabelo et al., 1996). Contrairement aux agonistes de PPAR, l'induction de l'expression d'UCP1 par l'acide rétinoïque ne nécessite pas la présence de PGC1 $\alpha$ , mais est dépendante de p38MAPK. (Teruel et al., 2003; Uldry et al., 2006).

L'activité du complexe PPAR/PGC1 $\alpha$  est modulée par un autre co-activateur spécifique du TA brun, PRDM16 (Voir paragraphe PRDM16). PRDM16 interagit avec plusieurs facteurs de transcription (PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  et C/EBPs) et cofacteurs (PGC1 $\alpha$  et PGC1 $\beta$ ) pour renforcer leur activité transcriptionnelle. Il est nécessaire pour la liaison de C/EBP $\beta$  au niveau du promoteur proximal d'UCP1 (Figure 25).

### ***Les hormones thyroïdiennes***

Outre le contrôle sympathique de l'activité du TA brun, les hormones thyroïdiennes sont nécessaires au le développement et à la différenciation du TA brun. La triiodothyronine (T<sub>3</sub>) est bien connue pour être un inducteur de la biogenèse mitochondriale et des capacités fonctionnelles des mitochondries chez les mammifères (Lanni et al., 2003; Triandafillou et al., 1982). La concentration plasmatique en hormones thyroïdiennes augmente au cours d'une exposition au froid. Dans les adipocytes bruns, la deiodinase iodothyronine 2 (DIO2) permet la conversion de la thyroxine tétraiodothyronine (T<sub>4</sub>), peu active, en triiodothyronine (T<sub>3</sub>), active. La PKA induit l'expression de la DIO2 via CREB, entraînant la production intracellulaire de T<sub>3</sub>. La T<sub>3</sub> est capable de se lier au récepteur nucléaire aux hormones thyroïdiennes (TR) et d'induire l'expression d'UCP1 et de PGC1 $\alpha$  (Bianco and McAninch, 2013; Silvestri et al., 2005; Wulf et al., 2008) (Figure 25). Des études réalisées chez le rongeur indiquent que la délétion du gène codant la protéine DIO2 entraîne une diminution importante de l'expression d'UCP1, et s'accompagne d'un dysfonctionnement de la thermogénèse et d'une intolérance au froid (de

Jesus et al., 2001; Ribeiro et al., 2010). La T<sub>3</sub> agit en synergie sur le système nerveux central pour maintenir de la température corporelle (Ribeiro et al., 2001; Silva, 1995; Whitaker et al., 1990).

De même l'hyperthyroïdisme entraîne une augmentation de l'activité du TA brun. A l'inverse l'hypothyroïdisme diminue l'activation du TA brun par la noradrénaline et est associé à une faible température corporelle (Carvalho et al., 1996; Lahesmaa et al., 2014).

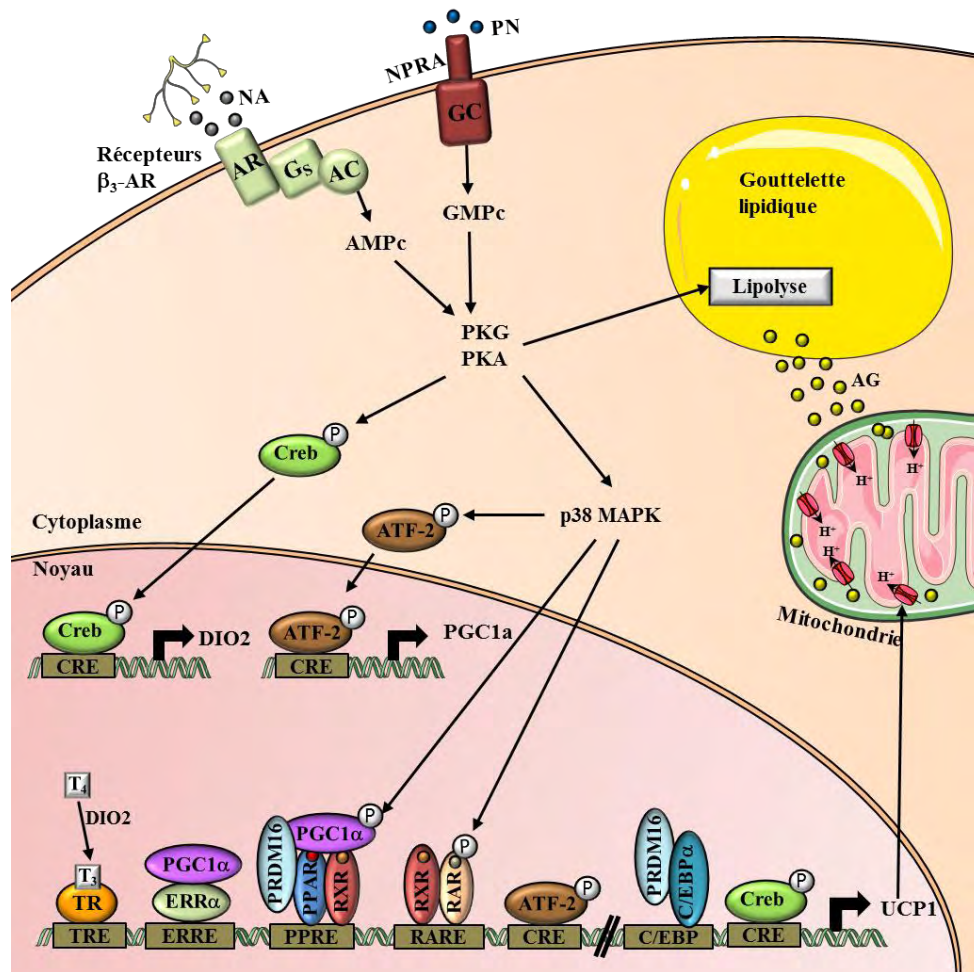


Figure 25 : Contrôle de l'expression d'UCP1

La noradrénaline (NA) et les peptides natriurétiques (NP), via leur liaison à leurs récepteurs respectifs conduisent à l'activation de l'adénylyl-cyclase (AC) et la production d'AMP cyclique (AMPc) ou bien à l'activation de la guanylate cyclase (GC) produisant du GMP cyclique (GMPc). L'AMPc et le GMPc activent les protéines kinase A ou G (PKA/PKG) qui induisent la lipolyse des triglycérides contenus dans la gouttelette lipidique. Les acides gras sont oxydés par la mitochondrie pour produire de la chaleur via UCP1. La phosphorylation de p38MAPK, par la PKA et la PKG, et de CREB (C-AMP Response Element-binding protein), par la PKA, permet la phosphorylation des acteurs impliqués dans la transcription des gènes mitochondriaux, des co-activateurs d'UCP1 et d'UCP1. ATF-2: Activating transcription factor 2, AG: Acide gras C/EBP: CCAAT/enhancer binding protein, CRE: cAMP Response Element, ERRα: Estrogen-Related Receptor alpha, ERRE: Estrogen Receptor Reponse Element, PRDM16: PR domain containing 16, NPRA: Atrial Natriuretic Peptide Receptor, PPAR: Peroxisome Proliferator-Activated Receptors, RAR: Retinoic Acid Receptor, RXR: Retinoid X receptor, RARE: Retinoic Acid Response Element, PPRE: Peroxisome Proliferator Reponse Element, TR: Thyroid hormone Receptor, TRE: Thyroid hormone Response Element, T4: Tétraiodothyronine, T3: triiodothyronine.

### *Peptides natriurétiques*

Les formes actives des peptides natriurétiques les plus étudiées sont le peptide natriurétique auriculaire (ANP) et le peptide natriurétique de type B (BNP) produits par le cœur. Ces facteurs réduisent la pression artérielle et le débit cardiaque, contrôlent l'homéostasie du sodium et de l'eau et sont également connus pour favoriser la lipolyse dans les adipocytes. Des études récentes ont montré que les peptides natriurétiques contrôlent la prise alimentaire et la thermogénèse du TA brun (Bordicchia et al., 2012; Whittle and Vidal-Puig, 2012).

Récemment, il a été démontré que l'exposition au froid induit une augmentation de la sécrétion et des niveaux d'ANP et de BNP circulants chez la souris. De plus, dans un modèle de souris déficiente pour le récepteur de clairance aux peptides natriurétiques, l'augmentation des niveaux d'ANP et de BNP stimulent l'expression d'UCP1. De même, le traitement d'adipocytes humains par du BNP ou de l'ANP stimule l'expression d'UCP1. Le mécanisme sous-jacent implique l'activation de la p38MAPK-ATF2 et PGC1 $\alpha$  (Bordicchia et al., 2012). De plus, les peptides natriurétiques déclenchent la lipolyse et le brunissement par l'activation de la voie GMPc/PKG qui fonctionne en parallèle de la voie  $\beta$ -adrénergique/PKA. Enfin, les niveaux plasmatiques élevés de peptides natriurétiques et l'exposition au froid sont connus pour activer le système nerveux sympathique. Il est donc difficile de savoir si les peptides natriurétiques contrôlent directement la thermogénèse indépendamment ou en synergie avec les catécholamines (Coue and Moro, 2015).

### *BMP8b*

Le Bmp8b est produit par les cellules adipeuses brunes, son expression augmente pendant la différenciation. Le BMP8b agit de façon autocrine pour amplifier la réponse thermogénique des adipocytes bruns à l'activation adrénergique. De ce fait, les souris déficientes en BMP8b sont intolérantes au froid. L'injection dans le cerveau de Bmp8b augmente l'influx sympathique vers le TA brun, mais pas vers d'autres tissus et conduit à la perte de poids des souris. Le BMP8b est aussi exprimé dans le muscle squelettique et le tissu adipeux blanc, mais sa fonction dans ces tissus est inconnue (Whittle et al., 2012).

### **3. Origine des adipocytes thermogéniques**

Pendant longtemps, on a pensé que les adipocytes blancs et bruns dérivait d'un précurseur commun, ce précurseur donnant naissance à des pré-adipocytes blancs ou bruns en fonction du dépôt adipeux. Cette hypothèse a été remise en question par plusieurs groupes de

chercheurs montrant que les adipocytes bruns proviennent d'un progéniteur commun aux muscles squelettiques et au derme, originaire du dermomyotome central (mesoderme paraxial) exprimant le facteur engrailed-1 (Atit et al., 2006). Cette observation a été confirmée par des approches de suivi cellulaire chez la souris, démontrant que les myocytes et les adipocytes bruns, mais pas les adipocytes blancs, dérivent de précurseurs exprimant le facteur de régulation myogénique Myf5 (Seale et al., 2008). Une étude de traçage avec un autre marqueur myogénique, Pax7, établit la divergence entre les myoblastes et les progéniteurs d'adipocytes bruns entre les jours embryonnaires 9,5 et 11,5 chez les souris (Lepper and Fan, 2010; Seale et al., 2000). Enfin des études du transcriptome et du protéome des adipocytes bruns classiques montrent qu'il ressemble à celui des cellules du muscle squelettique et non à celui du TA blanc (Forner et al., 2009; Timmons et al., 2007). De par sa localisation anatomique et les difficultés à prélever le TA brun, aucun progéniteur brun n'a pu être identifié pour l'instant chez l'homme (Figure 26).

Les adipocytes blancs proviennent de cellules du mésoderme latéral négatives pour Myf5. Certains adipocytes blancs, notamment ceux de la tête, auraient pour origine la crête neurale (Billon et al., 2007). Les TA blancs viscéraux auraient une origine mésothéliale, ce qui n'est pas le cas pour le TA blanc sous-cutané (Chau et al., 2014). Plusieurs études récentes ont mis en évidence que les adipocytes de certains dépôts adipeux blanc proviennent de précurseur Myf5<sup>+</sup>/Pax3<sup>+</sup>, ce qui complique l'identification d'un progéniteur adipocytaire distinct entre précurseurs blanc et brun (Sanchez-Gurmaches and Guertin, 2014) (Figure 26). De plus, les cellules endothéliales murines du TA blanc et brun partagent des caractéristiques ultrastructurales communes avec les péricytes, une population de cellules souches qui peut se différencier en pré-adipocytes (Tran et al., 2012). Ces cellules exprimant Zfp423 sont capables de se différencier à la fois en adipocytes blancs et bruns (Gupta et al., 2012; Tang et al., 2008). Ainsi l'idée générale que les adipocytes bruns et blancs proviennent de précurseurs complémentaires distincts se révèle en fait plus complexe. Les adipocytes blancs peuvent provenir de multiples précurseurs distincts, certains communs avec les adipocyte bruns.

#### **a. Deux types d'adipocytes bruns**

Des études animales ont montré que, hormis les adipocytes bruns trouvés dans les dépôts spécifiques, des adipocytes semblables aux adipocytes bruns apparaissent au sein du TA blanc sous cutané de souris suite à une exposition au froid, une stimulation  $\beta_3$ -adrénergique ou des agonistes pharmacologiques comme ceux de PPAR $\gamma$  (Petrovic et al., 2010; Young et al., 1984).

Ces adipocytes, nommés adipocytes brites (pour « brown in white ») ou beiges, désignent les cellules qui ont la même morphologie, phénotype et fonctions que les adipocytes bruns (nombreuses mitochondries, expression d'UCP1 et PGC1 $\alpha$ , gouttelettes lipidiques multiloculaires et fonction thermogénique) (Sidossis and Kajimura, 2015). Ce processus est appelé « browning/brunisation » du TA blanc. Néanmoins, cette capacité étant différente entre les dépôts, les adipocytes brites sont plus abondants dans le TA blanc sous cutanée et quasiment absent dans le TA blanc viscéral chez la souris (Walden et al., 2012).

Malgré leurs similitudes, les adipocytes brites diffèrent des adipocytes bruns classiques (ceux de la souris) au niveau de l'expression basale d'UCP1 (Wu et al., 2012). Alors que les adipocytes bruns classiques expriment fortement UCP1 même dans des conditions non stimulées, les adipocytes brites nécessitent une stimulation  $\beta$ -adrénergique ou un traitement avec des agonistes de PPAR $\gamma$  pour provoquer l'expression d'UCP1 à des niveaux suffisant pour induire un découplage de la chaîne respiratoire (Lehr et al., 2009; Shabalina et al., 2013).

La stimulation des adipocytes brites permet d'améliorer les paramètres métaboliques des rongeurs (Bartelt and Heeren, 2014). La perspective de les faire apparaître chez l'Homme dans des dépôts adipeux blancs chez l'obèse suscite désormais un grand engouement de la communauté scientifique.

#### **b. L'origine des adipocytes brites**

Bien que le progéniteur brite ne soit pas clairement identifié à l'heure actuelle, les adipocytes brites ont une signature génique qui diffère de celles des adipocytes bruns classiques trouvés dans le TA brun interscapulaire (Wu et al., 2012). Les adipocytes brites proviennent d'un lignage Myf5 négatif, et un sous-ensemble d'adipocytes brites (10 à 15%) proviennent de précurseurs qui expriment MYH11, l'un des marqueurs les plus sélectifs pour les cellules musculaires lisses (Long et al., 2014). Cependant, en fonction des dépôts, on peut trouver des adipocytes brites soit Myf5 négatif soit Myf5 positif (Sanchez-Gurmaches et al., 2012; Shan et al., 2013). Ainsi, les adipocytes brites ont probablement des origines différentes en fonction des dépôts adipeux. Deux hypothèses se font face, pour expliquer l'origine des adipocytes brites chez la souris : les adipocytes brites résulteraient soit de la trans-différenciation des adipocytes blancs matures, soit de la différenciation *de novo* d'un pool spécifique de précurseurs (Figure 26).

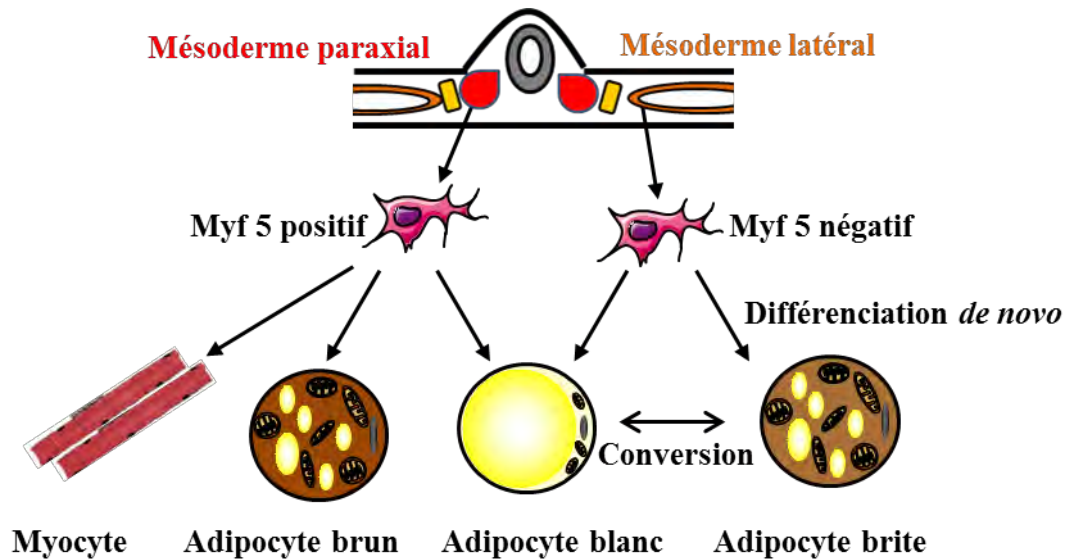


Figure 26 : Les différentes origines des adipocytes bruns, brites et blancs

Les adipocytes bruns et les myocytes ont un progéniteur commun Myf5 positif provenant du mésoderme paraxial. Les adipocytes blancs ont une origine soit Myf5-positif, soit Myf5-négatif, selon le dépôt de TA blanc considéré. Les adipocytes brites peuvent provenir de la différenciation de novo de progéniteurs Myf5-négatifs ou de la conversion d'adipocytes blancs.

### ***Différenciation de novo de progéniteurs***

Le concept de différenciation *de novo* est soutenu par des études de souris génétiquement modifiées pour marquer et suivre les adipocytes en fonction des conditions expérimentales. L'étude de Wang a mis au point un système inductible, permettant le marquage des adipocytes matures juste avant une exposition au froid ou un traitement avec un agoniste  $\beta$ -adrénergique pour induire le brunissement du TA blanc. Cela conduit à l'émergence d'adipocytes brites non marqués dérivant donc de la différenciation de précurseurs (Wang et al., 2013b).

Dans le TA blanc périgonadique, un progéniteur commun entre les adipocytes blancs et brites a été mis en évidence chez la souris. Ces précurseurs bipotents expriment le facteur PDGFR $\alpha$  (Platelet-derived growth factor receptor  $\alpha$ ) et sont étroitement associés aux vaisseaux sanguins. Suite à un régime gras ou une stimulation  $\beta_3$ -adrénergique, les cellules PDGFR $\alpha$  sont capables de donner des adipocytes blancs et brites respectivement (Lee et al., 2012). De même, in vitro, la culture des cellules PDGFR $\alpha^+$  donne lieu à la fois à des adipocytes exprimant ou non UCP1.

### ***Transdifférenciation***

La transdifférenciation est l'interconversion d'une cellule somatique adulte dans un autre type de cellule somatique sans retour préalable à un état indifférencié (Graf, 2011). L'idée d'une

transdifférenciation se base sur la présence d'adipocytes dans un état intermédiaire entre le blanc et le brun (« pauciloculaire ») au cours du processus d'adaptation au froid ou à des agonistes  $\beta_3$ -adrénergiques (Barbatelli et al., 2010). De plus, une grande partie des adipocytes brites nouvellement formés dans le TA blanc sous-cutané sont négatives pour le BrdU ou le Ki67, indiquant que la prolifération mitotique n'est pas requise pour la différenciation adipocytaire brite induite par le froid (Frontini et al., 2013; Himms-Hagen et al., 2000).

Des études de suivi d'adipocytes brites marqués chez la souris montrent que ces adipocytes, qui apparaissent lors d'une exposition au froid dans le TA inguinal, retrouvent une morphologie et l'expression de gènes caractéristiques des adipocytes blancs lors du retour des souris à thermoneutralité. Ces adipocytes blancs peuvent être alors convertis à nouveau en adipocytes brites lors d'une nouvelle stimulation au froid (Lee et al., 2015; Rosenwald et al., 2013). De plus, cette transdifférenciation a été démontrée dans des adipocytes humains. Des adipocytes blancs différenciés en culture à partir de précurseurs de la fraction stroma-vasculaire sont convertis en adipocytes de type brun si l'expression de PGC1 $\alpha$  est augmentée par des vecteurs adénoviraux (Tiraby et al., 2003). De même, des cellules souches mésenchymateuses, isolées à partir de dépôts de TA blanc de sujets humains, ont d'abord été différenciées en adipocytes blancs, puis traitées à la rosiglitazone, un agoniste de PPAR $\gamma$ . Ces cellules se sont converties en adipocytes brites exprimant UCP1 et dotées d'une activité de découplage mitochondrial augmentée par rapport aux adipocytes blancs. (Elabd et al., 2009; Pisani et al., 2011).

En conclusion, l'origine cellulaire des adipocytes brites est encore controversée. Il est probable que la différenciation de novo et la transdifférenciation des adipocytes coexistent *in vivo* et ne soient donc pas mutuellement exclusives.

### ***Le TA brun humain : adipocytes bruns ou brites ?***

Avant de concevoir de futures thérapies ciblant le TA brun chez l'Homme, il est essentiel de connaître l'identité brune ou brite des adipocytes présents dans les différents dépôts. La comparaison approfondie du profil d'expression des adipocytes bruns, brites et blancs a permis d'identifier plusieurs gènes/marqueurs exprimés préférentiellement soit dans les adipocytes bruns classiques, soit dans des adipocytes brites chez les rongeurs. Les niveaux d'expression de ces gènes ont été mesurés dans plusieurs dépôts de TA brun humain chez l'adulte et l'enfant (Cypess et al., 2013; Lidell et al., 2013; Petrovic et al., 2010; Sharp et al., 2012; Wu et al., 2012) (Tableau 5).

Marqueurs des adipocytes blancs	Marqueurs des adipocytes brites	Marqueurs des adipocytes bruns
TCF21	UCP1	UCP1
LEPTIN	CD137	ZIC1
DPT	EPSTI1	LHX8
RESISTIN	TBX1	TBX15
HOXC8	TMEM26	MYIPF
ADIPONECTIN	CITED1	miR-133
	SHOX2	miR-206

Tableau 5 : Liste non-exhaustive des principaux marqueurs des adipocytes blancs, brites et bruns, d'après (Peirce et al., 2014)

Sur la base des profils d'expression de ces gènes, le TA brun de nourrissons humains est composé d'adipocytes exprimant ZIC1 un gène spécifique de l'adipocyte brun classique, alors que le niveau d'expression du marqueur brite TBX1 est inférieur par rapport à l'adulte (Lidell et al., 2013). En comparaison, le TA brun adulte exprime des niveaux élevés de gènes adipocytaires brites comme TBX1, CD137, TMEM26 et CITED1 dans les régions supraclaviculaires (Cypess et al., 2013; Lidell et al., 2013; Sharp et al., 2012). Toutefois, le TA brun adulte humain possède les deux populations de cellules thermogéniques. Les régions profondes du cou seraient composées d'adipocytes bruns classiques avec une forte expression d'UCP1 et de ZIC1, tandis que les couches intermédiaires seraient composées d'adipocytes brites, avec une expression plus modérée d'UCP1 (Cypess et al., 2013; Jespersen et al., 2013).

La validité des marqueurs est discutée, car plusieurs marqueurs reflètent beaucoup plus la localisation anatomique dans laquelle les adipocytes résident plutôt que leur identité brune ou brite (de Jong et al., 2015). En effet, ZIC1, HOXC8, HOXC9, et TCF21 affichent des profils d'expression différentiels suivant l'axe antéro-postérieur, indiquant une relation entre la localisation anatomique et l'identité des tissus adipeux, voire éventuellement leurs fonctions. Selon ces auteurs, seulement ZIC1 (brun), CD137, EPSTI1, TBX1, TMEM26 (Brite), et TCF21 (blanc) sont des marqueurs capables de différencier correctement les trois types d'adipocytes. Enfin, certains auteurs mettent en doute la distinction entre adipocytes brites et adipocytes bruns classiques et considèrent que ces cellules devraient simplement être nommées adipocytes bruns (Rosenwald and Wolfrum, 2014).

Néanmoins, peu importe le lignage des adipocytes blancs, bruns ou brites, le programme adipogénique général et le même pour tous les adipocytes. C'est l'expression de facteurs spécifiques à chaque type d'adipocyte qui va déterminer leur identité (Seale, 2015).



## 4. Les facteurs de l'adipogenèse et du développement des adipocytes bruns et brites

### a. Facteurs de l'engagement adipocytaire brun/brite

#### *L'axe EWS/YBX/BMP7*

La protéine de liaison à l'ARN EWS (EWSR1) est le régulateur clé de l'engagement adipocytaire brun. L'inactivation de la protéine chez la souris conduit à une perte quasi-complète de la différenciation adipocytaire brune (Park et al., 2013). Les préadipocytes bruns invalidés pour EWS expriment de façon ectopique des gènes spécifiques du muscle, ce qui suggère qu'EWS1 contrôle le choix du destin cellulaire entre le myocyte et l'adipocyte brun. EWS interagit avec son partenaire YBX1 pour induire l'activation transcriptionnelle et la production de BMP7. BMP7 agit avec d'autres facteurs sur la différenciation des cellules du dermomyotome en préadipocytes bruns et sur la maturation des préadipocytes bruns en adipocytes bruns fonctionnels. *In vivo*, BMP7 augmente l'accumulation de lipides et l'expression d'UCP1 dans le TA brun ; les animaux invalidés pour BMP7 présentent un défaut de développement du TA brun. (Tseng et al., 2008). Un traitement des cellules dépourvues de EWS avec du BMP7 rétablit complètement la différenciation adipocytaire brune (Park et al., 2013).

La protéine EWS régule également le développement des adipocytes brites chez la souris adulte. Plus précisément, des souris haploinsuffisantes pour EWS ont une altération du brunissement en réponse à la rosiglitazone ou aux agonistes de  $\beta_3$ -adrénergiques (Park et al., 2013). BMP2 et BMP4 induisent l'engagement des adipocytes blancs, BMP4 réprimant l'expression d'UCP1 dans les adipocytes bruns. Cependant, plusieurs études montrent que BMP4 et BMP7 favorisent l'apparition d'adipocytes brites au sein du TA blanc humain et murin (Elsen et al., 2014; Qian et al., 2013). On peut émettre l'hypothèse que les adipocytes brites peuvent être induits par BMP4 ou BMP7, tandis que les adipocytes bruns classiques ne sont induits que par BMP7 (Figure 27).

#### *Early B-Cell Factor-2 (EBF2)*

EBF2 joue un rôle important dans la promotion de l'adipogenèse en agissant en amont de PPAR $\gamma$  (Akerblad et al., 2002; Jimenez et al., 2007). C'est un marqueur sélectif des précurseurs adipogéniques bruns et brites car responsable du contrôle et du maintien de l'identité brune des précurseurs (Wang et al., 2014b). Les souris présentant une inactivation

invalidées d'EBF2 affichent une perte presque complète des caractéristiques propres au TA brun avec expression réduite ou absente de presque tous les gènes spécifiques du TA brun, tandis que les marqueurs adipogéniques généraux, tels que PPAR $\gamma$ , ne sont pas affectés. A l'inverse, l'expression ectopique d'EBF2 dans les myoblastes ou dans des préadipocytes blancs entraîne le programme de différenciation des adipocytes bruns (Rajakumari et al., 2013; Wang et al., 2014b). Mécanistiquement, EBF2 facilite la liaison à l'ADN des facteurs de transcription comme PPAR $\gamma$  et PRDM16 pour stimuler la transcription des gènes du TA brun dont UCP1.

**b. Facteurs et cofacteurs de la différenciation adipocytaire brune/brite**

***PRDM16***

L'acteur majeur de la détermination des adipocytes brun est la protéine PRDM16. Elle est 15 fois plus abondante dans les adipocytes bruns que dans les blancs. PRDM16 est fortement exprimée dans les lignées d'adipocytes bruns et son niveau d'expression est très fortement accru lors de la différenciation des adipocytes en culture (Seale et al., 2007). PRDM16 est la protéine conférant à la cellule brune son identité, elle joue un rôle essentiel dans le programme de différenciation des adipocytes bruns et dans leur activité oxydative et thermogénique.

PRDM16 est une protéine en doigt de zinc qui contrôle l'aiguillage entre adipocyte brun et myocyte. L'expression ectopique de PRDM16 dans des précurseurs myogéniques favorise leur différenciation en adipocytes bruns en inhibant les gènes myogéniques tels que MyoD et la myogénine (Kajimura et al., 2009; Seale et al., 2008). A l'inverse, la perte de PRDM16 dans les précurseurs bruns de souris fait disparaître les caractéristiques des adipocytes bruns et induit celles des myocytes (Seale et al., 2008; Seale et al., 2007). Une autre étude montre que le TA brun chez les animaux mutants est morphologiquement indiscernable de celui de leurs homologues sauvage à la naissance et jusqu'à 3 mois d'âge. Après, le TA brun va perdre progressivement ses fonctions thermogéniques et adopter les caractéristiques du TA blanc (gouttelette lipidique uniloculaire et niveaux réduits d'UCP1). Cela aboutit à un dysfonctionnement du TA brun et une sensibilité au froid des souris (Harms et al., 2014; Kajimura et al., 2008).

La capacité de PRDM16 à stimuler le phénotype brun est due à son association avec d'autres facteurs de transcription. Des études mécanistiques indiquent que PRDM16 se lie et améliore la fonction transcriptionnelle de PPAR $\gamma$ , PPAR $\alpha$ , du récepteur aux hormones thyroïdiennes, de PGC1 $\alpha$ , et de C/EBP $\beta$  (Hondares et al., 2011b; Kajimura et al., 2009; Seale

et al., 2008; Seale et al., 2007) par recrutement de MED1, un coactivateur l'ARN polymérase II (Harms et al., 2015). L'expression ectopique de PRDM16 dans le tissu adipeux blancs entraîne la brunisation de celui-ci (Kajimura et al., 2008; Seale et al., 2011; Seale et al., 2007). Sa délétion après l'étape clé de séparation entre le lignage musculaire et adipocytaire brun dans le tissu adipeux de souris compromet la différenciation des adipocytes blancs mais ne touche pas le tissu adipeux brun déjà formé (Cohen et al., 2014) (Figure 27).

D'autres facteurs de transcription, comme EHMT1 (euchromatic histone lysine-N-méthyltransférase 1), forment un complexe avec PRDM16 et favorisent l'adipogenèse brune en stabilisant PRDM16 et la méthylation des histones des gènes myogéniques (Ohno et al., 2013). Plac8 est un activateur en amont de C/EBP $\beta$  qui induit la différenciation du tissu adipeux brun (Jimenez-Preitner et al., 2011). En revanche, TLE3 est un cofacteur du TA blanc qui inhibe la fonction de PRDM16 et supprime la différenciation adipocytaire brune et la thermogénèse (Villanueva et al., 2013). En plus de ces régulateurs de la transcription, plusieurs microARN tels que miR-133, miR-193b et miR-365 ciblent PRDM16 (Sun et al., 2011; Yin et al., 2013).

### ***PGC1 $\alpha$ et RIP140***

PGC1 $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$ ) fut identifié comme partenaire d'interaction de PPAR $\gamma$  dans des adipocytes bruns (Puigserver et al., 1998). PGC1 $\beta$  fut découvert peu de temps après par homologie de séquence. PGC1 $\alpha$  est un co-activateur interagissant avec plusieurs facteurs de transcriptions tels que PPAR $\gamma$ , RXR et T3R (Hondares et al., 2006). Il est le régulateur central de la mitochondriogenèse dans de nombreux types cellulaires (Tiraby and Langin, 2005).

Les souris dont le gène codant PGC1 $\alpha$  ou PGC1 $\beta$  ont été invalidés ont une expression réduite des gènes mitochondriaux dans de nombreux tissus, entraînant une altération des réponses métaboliques à l'exposition au froid et à la faim. Sa surexpression dans les adipocytes blancs humains active la mitochondriogenèse et l'expression d'UCP1 (Mazzucotelli et al., 2007; Tiraby et al., 2003). PGC1 $\alpha$  n'est pas nécessaire pour la différenciation des adipocytes bruns, mais il contrôle l'activation des gènes thermogéniques en réponse aux agonistes  $\beta$ -adrénergique via p38MAPK (Cao et al., 2004; Uldry et al., 2006)

L'expression de PGC1 $\alpha$  est négativement régulée par le RIP140 qui inhibe la différenciation adipocytaire brune (Hallberg et al., 2008). L'expression de RIP140 dans le tissu adipeux et le muscle squelettique réprime la biogenèse mitochondriale et le métabolisme

oxydatif (Christian et al., 2005; Leonardsson et al., 2004; Powelka et al., 2006). Son ablation génétique provoque l'émergence de cellules adipeuses brunes dans le TA blanc (Kiskinis et al., 2014). En outre, RIP140 peut supprimer l'expression d'UCP1 via LXR $\alpha$  dans les adipocytes bruns en empêchant la liaison du complexe PPAR $\gamma$  / PGC1 $\alpha$  au promoteur d'UCP1 (Wang et al., 2008).

Les membres de la famille Rétinoblastome (Rb), dont p107, régulent également négativement l'expression du gène PGC1 $\alpha$ . Les souris déficientes pour p107 ont une forte brunisation du tissu adipeux blancs et une expression accrue d'UCP1 et de PGC-1 $\alpha$  (Hansen et al., 2004; Scime et al., 2005).

### *Les PPARs*

PPAR $\gamma$  est le facteur principal de la différenciation adipocytaire blanche et brune. Les activateurs de PPAR $\gamma$ , en particulier ceux de la classe des thiazolidinediones (TZD), sont des activateurs particulièrement puissants de l'expression des gènes thermogéniques dans le TA brun et blanc. PPAR $\gamma$  est connu pour induire le brunissement du tissu adipeux blanc (Petrovic et al., 2008; Petrovic et al., 2010; Pisani et al., 2011). Les agonistes de PPAR $\gamma$  induisent aussi la biogenèse et le découplage mitochondrial par l'induction de l'expression de PGC1 $\alpha$  (Hondares et al., 2006; Wilson-Fritch et al., 2004) (Figure 27).

Plusieurs mécanismes par lequel les TZD peuvent induire la transcription de gènes thermogéniques ont été décrits. La protéine SIRT1 déacétyle les Lys268 et Lys293 de PPAR $\gamma$ . Cette forme déacétylée de PPAR $\gamma$  se lie plus efficacement à PRDM16 pour induire l'expression des gènes thermogéniques et le brunissement du TA blanc (Qiang et al., 2012). Il semblerait aussi que les TZD, par un mécanisme indépendant de PPAR $\gamma$  stabilisent la protéine PRDM16 et augmentent son niveau d'expression dans les adipocytes (Ohno et al., 2012)

Des études récentes ont identifiés KLF11 (Krüppel - like factor 11) comme un médiateur important du brunissement des adipocytes humains induit par les TZD. L'expression de KLF11 est directement induite la rosiglitazone, il forme un complexe avec PPAR $\gamma$  pour favoriser la formation de "superenhancers". Ces superenhancers gardent dans un état activé l'expression des gènes brunes même après le retrait de la rosiglitazone. Ainsi, KLF11 agit comme un lien moléculaire direct entre l'activation génique induite par la rosiglitazone et la stabilisation du phénotype brune (Loft et al., 2015; Yamamoto et al., 2010).

PPAR $\alpha$  est bien connu pour sa fonction dans le contrôle de la biogenèse mitochondriale et de la  $\beta$ -oxydation, notamment dans les adipocytes bruns où il est exprimé à des niveaux beaucoup plus élevés que dans les adipocytes blancs. PPAR $\alpha$  active directement l'expression d'UCP1, PRDM16 et PGC1 $\alpha$ . Un traitement avec des agonistes de PPAR $\alpha$  stimule le brunissement du TA blanc murin et humain (Barbera et al., 2001; Hondares et al., 2011b; Rachid et al., 2015; Wang et al., 2013a).

PPAR $\beta/\delta$  est exprimé dans le TA brun et blanc. Il est clair que PPAR $\beta/\delta$  joue un rôle essentiel dans la régulation de l'oxydation des AG et de la thermogenèse dans le TA brun : En effet, PPAR $\beta/\delta$  induit l'expression des gènes de l'oxydation des acides gras, de la phosphorylation oxydative et de la thermogenèse dans le TA brun (Pan et al., 2009). Ces animaux ont un meilleur profil lipidique sanguin, une adiposité réduite et sont résistants à l'obésité induite par l'alimentation (Wang et al., 2003b). Inversement, la suppression de PPAR $\beta/\delta$  dans le TA brun donne des souris intolérante au froid par un défaut d'expression des gènes de la  $\beta$ -oxydation et des gènes thermogéniques (Wallberg-Henriksson and Zierath, 2009; Wang et al., 2003b)

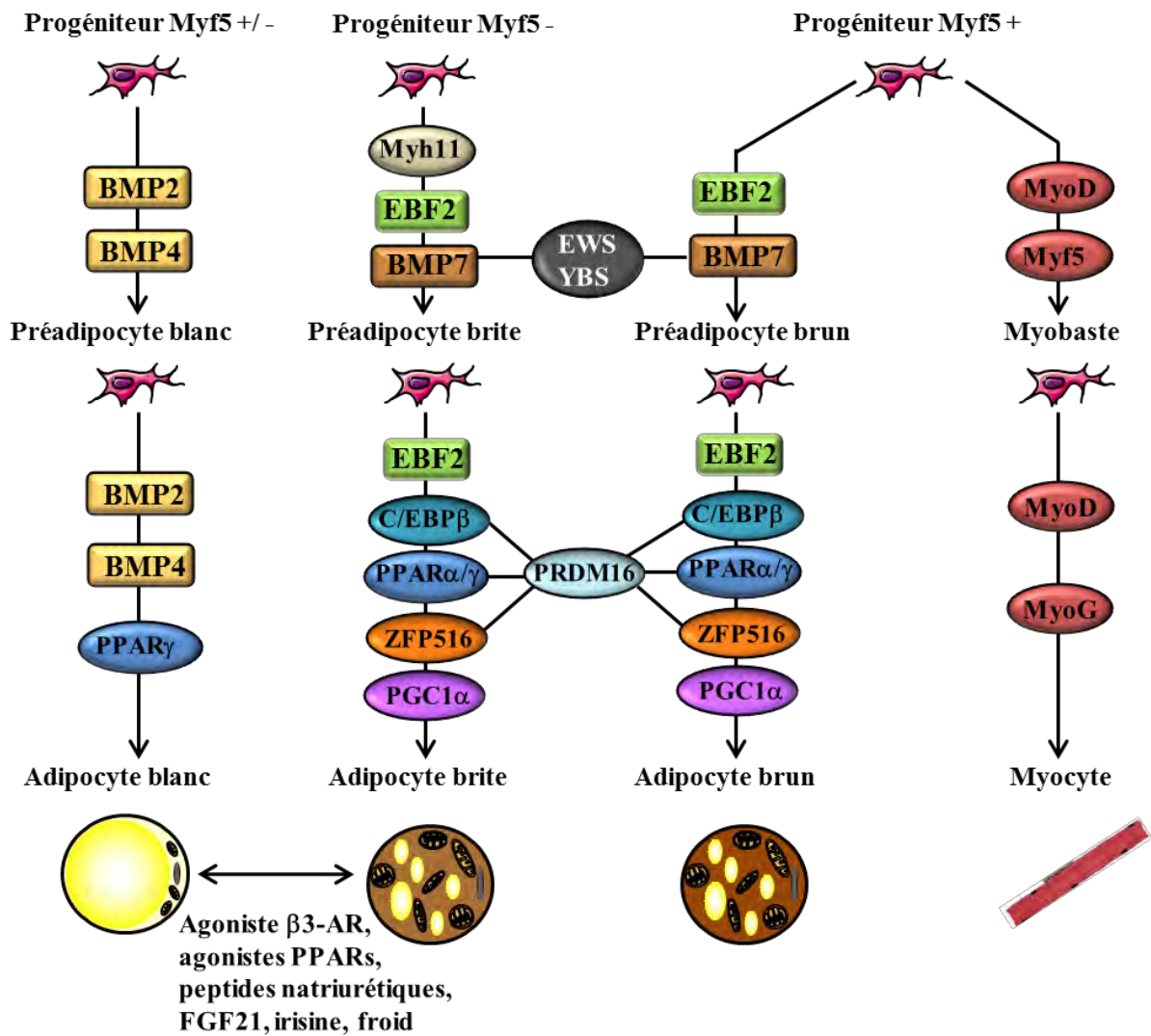
### ***ZFP516***

La protéine à doigt de zinc 516 (ZFP516) est un facteur de transcription nouvellement identifié qui joue un rôle critique à la fois dans la différenciation et l'activation des cellules adipeuses brunes et beiges. ZFP516 se lie à un site, non caractérisé auparavant, du promoteur proximal d'UCP1 (Dempersmier et al., 2015).

Ce facteur est exprimé à des niveaux plus élevés dans le TA brun que dans le TA blanc. Son expression est induite par le froid ou un traitement  $\beta$ -adrénergique dans le tissu adipeux de souris. La surexpression de ZFP516 chez des souris transgéniques conduit à un brunissement drastique du TA inguinal avec une augmentation de plus de 80% de la consommation d'oxygène de ce tissu. Des études de culture cellulaire ont suggéré que ZFP516 est nécessaire pour l'adipogenèse générale ainsi que pour l'élaboration du programme brun. Il est enrichi dans les adipocytes par rapport aux précurseurs et son ablation provoque un défaut de développement du TA brun avec des niveaux d'UCP1 faibles. En outre, l'expression ectopique de ZFP516 est suffisante pour convertir des myoblastes C2C12 en adipocytes bruns (Dempersmier et al., 2015). De plus, ZFP516 se lie directement à PRDM16, suggérant que PRDM16 est un co-activateur de ZFP516 qui se révèle peu à peu comme un régulateur central du développement.

**FOXC2**

FOXC2, un facteur de transcription, favorise le développement du TA brun et des adipocytes bruns. En particulier, l'expression transgénique de FOXC2 dans le TA blanc induit sa brunisation, avec une expression accrue des gènes thermogéniques (comme UCP1) et des gènes mitochondriaux (PGC1 $\alpha$ ). Les souris transgéniques surexprimant FOXC2 sont maigres, sensibles à l'insuline et résistantes à l'obésité (Cederberg et al., 2001; Kim et al., 2005; Lidell et al., 2011). FOXC2 exerce ses effets par la sensibilisation des cellules à la voie l'AMPc-PKA. Cela se produit en induisant directement l'expression de la sous-unité régulatrice RI $\alpha$  de la PKA (Dahle et al., 2002), augmentant ainsi la sensibilité des adipocytes aux catécholamines. Fait intéressant, FOXC2 active également l'expression de l'angiopoïétine-2 pour stimuler la vascularisation dans le tissu adipeux, nécessaire au développement du TA brun (Xue et al., 2008).



*Figure 27 : Les différents facteurs contrôlant l'adipogenèse brune, brite et blanche*

*Les adipocytes bruns et les myocytes ont un précurseur commun Myf5 positif. L'expression d'EBF2 (Early B-Cell Factor-2), du BMP7 (Bone morphogenetic protein 7 bone factor 7) puis de PRDM16 (PR Domain Containing 16) et de PPAR $\gamma$  détermine le devenir du précurseur vers le lignage des adipocytes bruns. L'expression de MyoD et de la myogénine détermine celui des myocytes. Même si les adipocytes brites proviennent d'un précurseur Myf5-négatif, les facteurs qui régulent leur différenciation sont les mêmes que ceux des adipocytes bruns. Les adipocytes blancs proviennent de plusieurs précurseurs soit Myf5-positifs, soit Myf5-négatifs. Le BMP2 et BMP4, avec d'autres facteurs, dirigent le devenir du précurseur vers le lignage d'adipocytes blancs.*

**c. Facteurs circulant impliqués dans le recrutement et de l'activation des adipocytes bruns/brites**

***L'irisine***

L'irisine est une hormone qui a été récemment identifiée chez la souris et chez l'humain. C'est la forme clivée et sécrétée de la protéine membranaire FNDC5 (fibronectin type III domain containing 5) qui est exprimée dans le muscle sous le contrôle de PGC1 $\alpha$  en réponse à l'exercice. Une augmentation des niveaux circulants d'irisine est associée à une augmentation de 10 à 20 fois de l'expression d'UCP1 dans le TA blanc sous-cutané (Bostrom et al., 2012). Toutefois, la présence physiologique de l'irisine chez l'Homme est controversée, plusieurs études remettant en question son existence chez l'Homme (Albrecht et al., 2015). En effet, le gène codant pour FNDC5 chez l'Homme présente un codon d'initiation de la traduction atypique, un ATA, à la place de l'ATG. D'après ces auteurs, l'irisine humaine ne serait, de ce fait, quasiment pas produite et les effets bénéfiques de l'irisine chez le rongeur ne seraient donc pas transposables à l'Homme (Raschke et al., 2013). De plus, certaines études ne trouvent pas une augmentation de l'expression de FNDC5 et du niveau circulant d'irisine chez l'Homme après un exercice d'endurance ou de résistance (Pekkala et al., 2013). Cependant, un article a récemment démontré que l'irisine chez l'Homme existe et qu'elle est augmentée par l'exercice. La quantification par spectrométrie de masse du niveau plasmatique d'irisine montre que le niveau circulant d'irisine chez les personnes sédentaires est d'environ 3,6 ng/ml, et ce niveau monte à 4,3 ng/ml après plusieurs semaines d'exercices physiques (Jedrychowski et al., 2015). Enfin, il a été montré chez l'Homme que l'exposition au froid augmente les niveaux d'irisine circulante et que l'irisine va stimuler la thermogénèse du TA brun (Lee et al., 2014a).

***Le FGF21***

Le FGF21 (Facteur de croissance des fibroblastes 21) est une hormone principalement produit par le foie et dans une moindre mesure par le TA blanc et brun. L'administration systémique de FGF21 humain recombinant chez des souris a de nombreux effets bénéfiques sur le métabolisme comme une diminution des niveaux de glucose sanguin, une amélioration de la

sensibilité à l'insuline et de la dyslipidémie (Coskun et al., 2008; Xu et al., 2009). Chez le rongeur nouveau-né, la libération hépatique de FGF21 en réponse aux acides gras du lait augmente l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la thermogénèse du TA brun dont UCP1 (Hondares et al., 2010). En réponse au froid ou un traitement avec des agonistes adrénergiques, l'expression et la sécrétion de FGF21 par le TA brun sont augmentées chez le rongeur (Chartoumpakis et al., 2011; Hondares et al., 2011a). Par ailleurs, les souris déficientes pour le gène codant la protéine FGF21 exposées au froid ont une chute plus importante de la température corporelle, validant l'implication de FGF21 dans la thermorégulation (Fisher et al., 2012). Le FGF21 stimule aussi le brunissement du TA blanc (Fisher et al., 2012). Enfin, chez l'Homme, le FGF21 est augmenté lors d'une exposition modérée au froid et les niveaux plasmatiques de FGF21 sont positivement corrélés avec l'activité du TA brun lors d'exposition aiguë ou chronique au froid (Hanssen et al., 2015; Lee et al., 2013).

### *Les prostaglandines*

Les prostaglandines sont des médiateurs biologiques importants dérivés des acides gras. Elles sont synthétisées par les cyclooxygénase (COX) à partir de l'acide arachidonique. L'expression transgénique de COX2 dans le tissu adipeux ou le traitement par la prostaglandine E2 stimulent l'expression d'UCP1 dans le TA blanc mais pas dans le TA brun. Inversement, l'ablation de COX2 ou l'inhibition pharmacologique de l'activité COX altèrent l'apparition d'adipocytes brites dans le TA blanc (Madsen et al., 2010; Vegiopoulos et al., 2010). Néanmoins il semblerait qu'un excès chronique d'acide arachidonique inhibe la formation des adipocytes brites au sein du tissu adipeux blanc par la formation et le relargage des prostaglandines E2 et F2 $\alpha$  chez la souris (Pisani et al., 2014).

### *La meteorine-like*

L'exposition au froid ou l'exercice induisent la sécrétion de Meteorin-like (MTRNL) par le muscle ou le TA blanc. Ce peptide déclenche la production des cytokines l'IL4 et IL13 par des éosinophiles du tissu adipeux blanc et la polarisation des macrophages en type M2 par l'activation de la voie STAT6. STAT6 entraîne l'expression de PPAR $\gamma$  et PPAR $\beta/\delta$  ainsi que la différenciation des macrophages de type M2. La libération locale de catécholamines par les macrophages M2 augmente l'expression d'UCP1 et la brunisation du TA blanc. Des modèles de souris dépourvues d'IL4/13, du récepteur à IL4, de STAT6, ou d'éosinophiles montrent ces chez animaux une incapacité à maintenir leur température lors d'une exposition au froid. (Qiu et al., 2014; Rao et al., 2014).



## 5. Le métabolisme des adipocytes bruns/brites

### a. Clairance des acides gras et du glucose sanguin

L'énergie nécessaire pour la thermogénèse sans frisson peut provenir des triglycérides stockés dans le cytoplasme des adipocytes bruns, et aussi du glucose et des lipides de la circulation sanguine. En utilisant des analogues du glucose ( $^{18}\text{F}$ FDG) et des acides gras ( $^{18}\text{F}$ THA), il a été montré que le TA brun humain et murin les capte tous deux en grandes quantités lors d'une exposition au froid. Le TA brun apparait donc de plus en plus comme un organe majeur pour la régulation de l'homéostasie des acides gras et du glucose.

#### *Acides gras*

La présence d'acides gras libres dans le cytosol de ces cellules est probablement faible malgré l'activité intense de lipolyse, car pour la majorité d'entre eux va être transportés vers les mitochondries pour y être oxydées. (Cannon and Nedergaard, 2004). L'activation du TA brun par une exposition au froid entraîne une forte absorption des acides gras de la circulation chez l'Homme et chez la souris (Blondin et al., 2015; Khedoe et al., 2015; Labbe et al., 2015; Ouellet et al., 2012). En effet, l'augmentation de l'activité du TA brun induite par l'exposition au froid accélère la clairance plasmatique des lipoprotéines riches en triglycérides (TRL) et des lipides dans le sang. Ce processus est tributaire de l'activité de la LPL et du récepteur transmembranaire CD36. De plus, l'absorption des TRL par le TA brun avant et après exposition au froid est la même chez des souris maigres ou obèses, indiquant que l'absorption des TRL dans le TA brun est indépendante des niveaux d'insuline et de la résistance à l'insuline (Bartelt et al., 2011). L'augmentation de l'expression de la lipoprotéine lipase et des transporteurs d'acide gras CD36, FATP1 et FABP3/4 sont systématiques lors d'une acclimatation au froid et d'un traitement aux agonistes PPAR $\gamma$  (Labbe et al., 2015; Laplante et al., 2007; Yamamoto et al., 2011). La délétion de FATP1 chez des souris entraîne une intolérance au froid due à un défaut d'absorption basale des acides gras qui reste inchangée suite à une exposition au froid, malgré des niveaux d'acides gras libres sanguins élevés (Wu et al., 2006a).

#### *Glucose*

La détection classique de l'activité du TA brun *in vivo* repose sur sa capacité à absorber de grandes quantités de glucose en réponse à la stimulation sympathique ou au froid (Blondin et al., 2014; Mirbolooki et al., 2011). Les deux transporteurs du glucose GLUT1 et GLUT4 sont exprimés par les adipocytes bruns, le rapport GLUT4/GLUT1 augmentant au cours de la

différenciation (Dallner et al., 2006). L'absorption du glucose par le TA brun est stimulée par le système nerveux sympathique et l'insuline. La stimulation  $\beta_3$ -adrénergiques induit l'expression de GLUT1 par l'AMPC et son adressage à la membrane plasmique par l'intermédiaire de mTORC2 dans les adipocytes bruns murins (Olsen et al., 2014). De même le brunissement s'accompagne d'une augmentation de l'absorption du glucose et de l'expression de GLUT1 *in vitro* et *in vivo* (Mossenbock et al., 2014). Le rôle de GLUT4 est plus controversé. Une exposition au froid à court terme ne change pas le niveau de la protéine GLUT4 mais l'augmente si l'exposition est prolongée (Olichon-Berthe et al., 1992; Shimizu et al., 1993; Wang and Wahl, 2014). La stimulation  $\beta_3$ -adrénergique diminue ou augmente l'expression de GLUT4 en fonction des auteurs (Dallner et al., 2006; Gasparetti et al., 2005).

L'insuline stimule l'absorption du glucose dans les adipocytes bruns qui est médiée par IRS1 et 2 qui favorise l'expression du gène GLUT4 et sa translocation (Fasshauer et al., 2000; Valverde et al., 2003). L'insuline potentialise également l'absorption du glucose dans le TA brun en réponse au froid (Vallerand et al., 1987). Néanmoins, l'activation du TA brun par l'insuline ou le froid sont différentes. L'insuline stimule l'absorption du glucose dans les adipocytes bruns sans aucun changement du flux sanguin au niveau du TA brun, alors que le froid augmente à la fois l'absorption du glucose et le flux sanguin dans le TA brun (Orava et al., 2011).

En plus de son action sur le transport du glucose, l'insuline est nécessaire pour le maintien de la capacité thermogénique du TA brun puisqu'elle stimule l'expression du gène UCP1 par la voie PI3k/AKT (Kozak et al., 1992; Valverde et al., 2003). La carence en insuline ou la perturbation du signal insulinique diminuent la capacité thermogénique du TA brun (Boucher et al., 2012; Shibata et al., 1987). Enfin, l'insuline favorise aussi la thermogénèse via des mécanismes centraux par exemple, par l'inhibition des neurones sensibles à la chaleur dans l'hypothalamus (Sanchez-Alavez et al., 2010).

### ***Consommation respective des acides gras et du glucose chez l'Homme***

La quantité de glucose captée par le TA brun chez l'Homme varie d'une étude à l'autre en raison de la différence des protocoles d'exposition au froid. Néanmoins, deux études distinctes avec quasiment le même protocole d'exposition au froid (3h vs 2h30 à 18°C) montrent une absorption identique du glucose par le TA brun :  $12 \pm 8 \mu\text{mol}/\text{min}$  et  $10,8 \pm 4,5 \mu\text{mol}/\text{min}$  respectivement chez l'Homme, soit environ 1% du turnover du glucose circulant (Blondin et al., 2015; Ouellet et al., 2012). Lors d'une acclimatation au froid (2h/j à 10°C

pendant 4 semaines), cette absorption du glucose chez l'homme monte jusqu'à  $26,2 \pm 11,8$   $\mu\text{mol}/\text{min}$  (Blondin et al., 2014). Néanmoins, la quantité de glucose absorbée par le TA brun,  $12 \pm 8$   $\mu\text{mol}/\text{min}$ , est très faible par rapport à celle captée par les muscles squelettiques,  $674 \pm 124$   $\mu\text{mol}/\text{min}$  (Blondin et al., 2015). Ainsi, bien que l'absorption totale de glucose par le TA brun soit importante étant donné le faible volume du tissu, sa contribution à la clairance systémique du glucose est faible par rapport à celle des muscles squelettiques.

Peu d'études ont déterminé la quantité d'acides gras captée par le TA brun chez l'Homme ; elle varie entre 0,3 et 4,4  $\mu\text{mol}/\text{min}$  lors d'une exposition au froid (2h30 à 18°C), soit 0,04% à 0,44 % du turnover des acides gras. Ces valeurs sont négligeables par rapport à la quantité d'acides gras intracellulaires (356 mmol d'acides gras estimées pour 28g de TA brun) susceptibles d'être mobilisés sur la même période (Labbe et al., 2015; Ouellet et al., 2012).

#### **b. Cycle de lipolyse/ré-estérification**

L'augmentation du transport du glucose est des acides gras et aussi accompagné d'une augmentation de la synthèse de glycérol et de la lipogénèse (Festuccia et al., 2009; Labbe et al., 2015). Cette estérification des acides gras est nécessaire pour restaurer la quantité de TG intracellulaires qui diminue lors d'une activation de la thermogénèse (Portet et al., 1976). On peut donc penser qu'une grande partie des acides gras circulants sont directement dirigés vers la synthèse de TG. En parallèle, dans les adipocytes bruns et blancs, il a été montré qu'une part importante des acides gras produits par la lipolyse est ré-estérifiée au sein de l'adipocyte (30 à 90% à l'état basal et 10 à 20% à l'état stimulé) (Flachs et al., 2013). De ce fait, la quantité d'acides gras libérés et disponibles pour la mitochondrie résulte d'un équilibre entre deux voies opposées : la lipolyse et la ré-estérification, qui sont étroitement liées dans leur régulation. En effet, des souris ayant une lipolyse diminuée (déficiency en LHS) ont aussi une diminution de la (ré-) estérification des acides gras empêchant un stockage excessif d'acides gras au sein du tissu adipeux (Zimmermann et al., 2003).

Ce cycle de lipolyse/ré-estérification nécessite la production constante de glycérol 3-phosphate (G3P) pour la synthèse des triglycérides. Dans le TA brun, la production de G3P par les trois voies de synthèse est augmentée lors d'une acclimatation au froid ou en réponse à des agonistes de PPAR $\gamma$  (Festuccia et al., 2003a; Festuccia et al., 2003b; Moura et al., 2005). Le transporteur du glycérol, l'aquaporine 7 (AQP7) et la glycérol kinase (GK) sont fortement exprimés dans les adipocytes bruns. Contrairement aux adipocytes blancs, c'est la voie majoritaire de production du G3P. AQP7 fonctionne comme un pore bidirectionnel pour le transport du

glycérol, favorisant son absorption et empêchant l'export du glycérol pour permettre des niveaux suffisants de glycérol pour la synthèse des TG. (Hara-Chikuma et al., 2005; Kishida et al., 2001). L'augmentation de l'expression de la GK et d'AQP7 par les agonistes de PPAR $\alpha$  et  $\gamma$ , l'acclimatation au froid et le brunissement du tissu adipeux blanc favorisent la création du cycle lipolyse/ré-estérification (Guan et al., 2002; Kawashita et al., 2002; Kiskinis et al., 2014; Mazzucotelli et al., 2007) (Figure 28).

La production de glycérol par la voie de la glycéronéogenèse est aussi une source significative de G3P pour les adipocytes bruns. En effet l'expression de la PCK1 est supérieure de celle dans le tissu adipeux blanc, et l'incorporation du glucose dans le glycérol et l'activité de la PCK1 sont augmentées dans les adipocytes bruns par les agonistes PPAR $\gamma$  ou par une exposition au froid (Festuccia et al., 2009; Moura et al., 2005; Tordjman et al., 2003). Ainsi, on peut émettre l'hypothèse que les grandes quantités de glucose capté jouent un rôle critique dans la thermogénèse du TA brun car nécessaires à la formation du G3P requis pour la synthèse des TG (Brito et al., 1999).

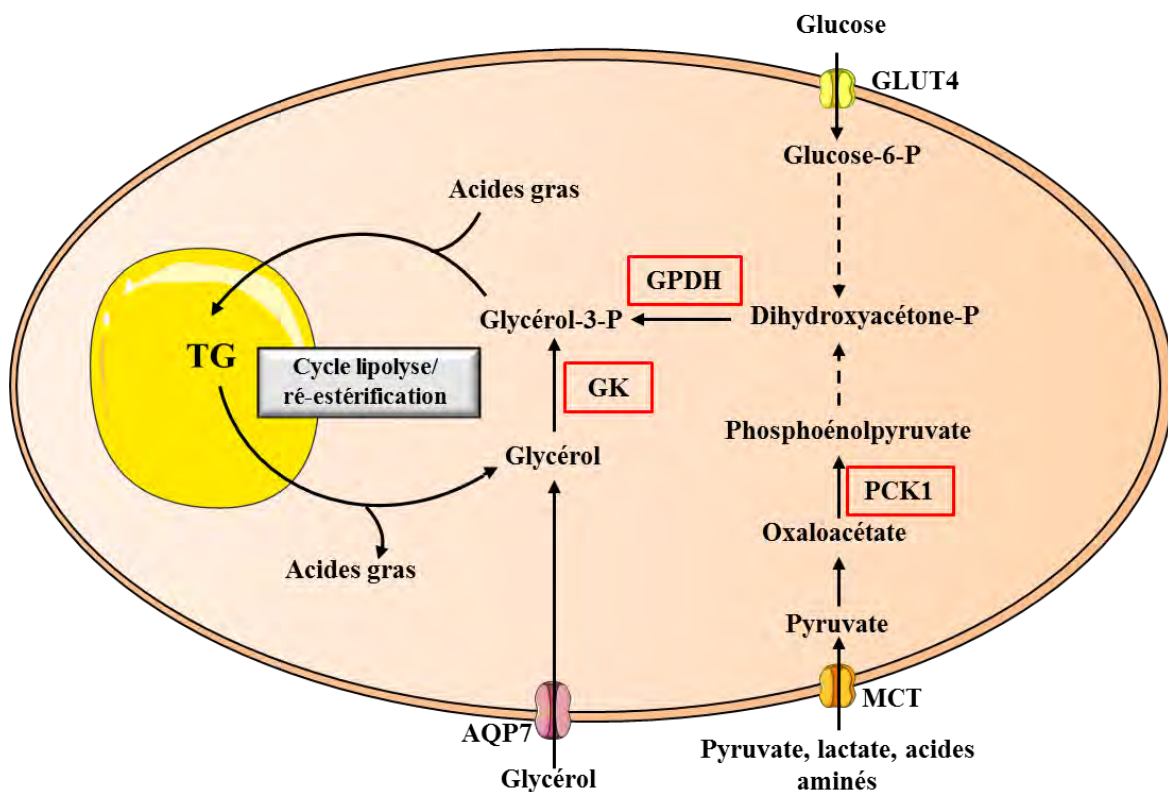


Figure 28 : Les différentes origines du glycérol-3-phosphate

Le glycérol-3-phosphate peut être issu de trois voies différentes: la voie impliquant la glycérol kinase (GK), la voie impliquant la glycolyse via la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (GPDH), ou la voie impliquant la glycéronéogenèse via la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PCK1). Ces trois voies fournissent le glycérol-3-phosphate nécessaire au à l'estérification des AG en TG. AQP7 : Aquaporine 7, GLUT4 : Transporteur de glucose de type 4, MCT : transporteur des monocarboxylates.

En l'absence de stimulation le cycle lipolyse/ré-estérification libère peu d'acides gras libres. Par exemple, chez le rat, seulement 0,2% des AG hydrolysés à partir des TG endogènes dans les adipocytes blancs sont oxydés tandis que le reste est libéré ou ré-estérifié (Wang et al., 2003a). L'injection d'un agoniste  $\beta$ -adrénergique ou l'exposition au froid chez les souris augmente l'activité de ce cycle, ce qui augmente les quantités d'acides gras disponibles pour la production d'énergie nécessaire à la thermogenèse sans frisson (Brooks et al., 1983). Le cycle lipolyse/ré-estérification est un cycle futile car il nécessite l'hydrolyse d'ATP pour ré-estérifier les 3 molécules d'AG. Ce cycle est de plus lié au contrôle du statut énergétique de la cellule, en particulier via le ratio AMP/ATP cytosolique. En effet, dans le TA brun, la forte activité de ce cycle diminue le ratio ATP/AMP et active l'AMPK qui va alors induire la biogenèse et la  $\beta$ -oxydation mitochondriale (Gauthier et al., 2008).

### c. L'oxydation des acides gras

Le contenu enzymatique et le nombre élevé de mitochondries donne au TA brun une forte capacité à oxyder les AG. Les AG intracellulaires sont indispensables à la thermogenèse, à la fois comme principale source d'énergie et comme activateurs de la protéine UCP1. La  $\beta$ -oxydation des AG permet la libération d'acétyl-CoA qui sera utilisé par le cycle de Krebs pour produire les équivalents réduits qui serviront à la production d'ATP dans la chaîne respiratoire.

Aussi bien chez l'Homme que chez la souris, une exposition aiguë ou une acclimatation au froid induit une augmentation des capacités oxydatives des adipocytes bruns, par augmentation de la disponibilité intracellulaire en AG et par induction de l'activité du transporteur mitochondrial des AG et des gènes de la  $\beta$ -oxydation (Blondin et al., 2015; Cannon and Nedergaard, 2004; Ouellet et al., 2012). Dans ces conditions, le TA brun devient le principal organe consommateur d'oxygène. Dans des adipocytes isolés, les TG intracellulaires contribuent à hauteur de 80 à 97% à la respiration des adipocyte bruns (Li et al., 2014). Ceci a été confirmé par des expériences *in vivo* où les capacités oxydative du TA brun ont été mesurées par suivi de l'oxydation du  $^{11}\text{C}$ -acétate lors d'une inhibition intracellulaire de la lipolyse du TA brun. La chute drastique de la thermogenèse induite par le froid qui en résulte permet d'estimer à environ 74% la contribution des acides gras intracellulaires à la thermogenèse induite par le froid (Labbe et al., 2015).

### ***Réaction de bêta-oxydation***

L'oxydation des acides gras se fait en deux phases métaboliques majeures : la première concerne le transport mitochondrial des acides gras à longue chaîne, la deuxième concerne la  $\beta$ -oxydation intra-mitochondriale.

Les acides gras sont transférés à l'intérieur de la mitochondrie par la navette carnitine-palmitoyl transférase (CPT). Le transfert des acides gras à chaîne longue (12 à 20 atomes de carbone) débute, dans le cytoplasme, par l'activation en acyl-CoA, catalysée par l'acyl-CoA synthétase. Le transfert dans la mitochondrie met en jeu l'action concertée de l'acylcarnitine, de la carnitine-palmitoyl transférase 1 (CPT1), de l'acylcarnitine translocase, (CACT) et de la carnitine-palmitoyl transférase 2 (CPT2). Le groupement acyl des acides gras activés est transféré à une carnitine par la CPT1. L'acylcarnitine peut alors pénétrer dans l'espace intermembranaire mitochondrial puis traverse la membrane mitochondriale interne par la CACT, un système antiport acylcarnitine/ carnitine en échange de carnitine libre. Dans la matrice, l'acylcarnitine sous l'action de la CPT2 redonne de l'acyl-CoA et une carnitine. Les acides gras à chaîne moyenne (6 à 10 atomes de carbone) et à chaîne courte (2 à 4 atomes de carbone) pénètrent dans la mitochondrie par simple diffusion. (Figure 29).

Les acides gras sont oxydés dans la matrice mitochondriale par plusieurs rondes d'un cycle enzymatique qui à chaque étape elle va produire une molécule d'acétyl-CoA, un FADH<sub>2</sub>, un NADH et un acyl-CoA (à n-2 atomes de carbone). Les réactions sont les suivantes (hélice de Lynnen):

1. la déshydrogénation par une acyl-CoA déshydrogénase dont le cofacteur est la flavine adénine dinucléotide (FAD), issu de la vitamine B (riboflavine), et fait intervenir un système de transport d'électrons (ETF). Il existe plusieurs isoenzymes. La SCAD assure l'oxydation des AG à chaîne courte, la MCAD, celle des AG à chaîne moyenne et la VLCAD, celle des AG à chaîne longue ;
2. l'hydratation de la double liaison par une énoyl-CoA hydratase ;
3. la déshydrogénation par la 3-hydroxy-acylCoA déshydrogénase dont il existe aussi deux isoenzymes spécifiques des chaînes longues et courtes (LCHAD et SCHAD) ;
4. le clivage par la 3-cétothiolase avec libération d'acétyl CoA.

La principale régulation de la bêta-oxydation est réalisée au niveau du transport des acides gras dans la mitochondrie. CPT1 est inhibé allostériquement par le malonyl-CoA, un intermédiaire

de la lipogenèse de novo (Faye et al., 2005). Les acétyl-CoA formés vont alimenter le cycle de Krebs afin d'assurer le fonctionnement de la chaîne respiratoire par la production de coenzymes réduits à savoir le NADH, H<sup>+</sup> et le FADH<sub>2</sub>.

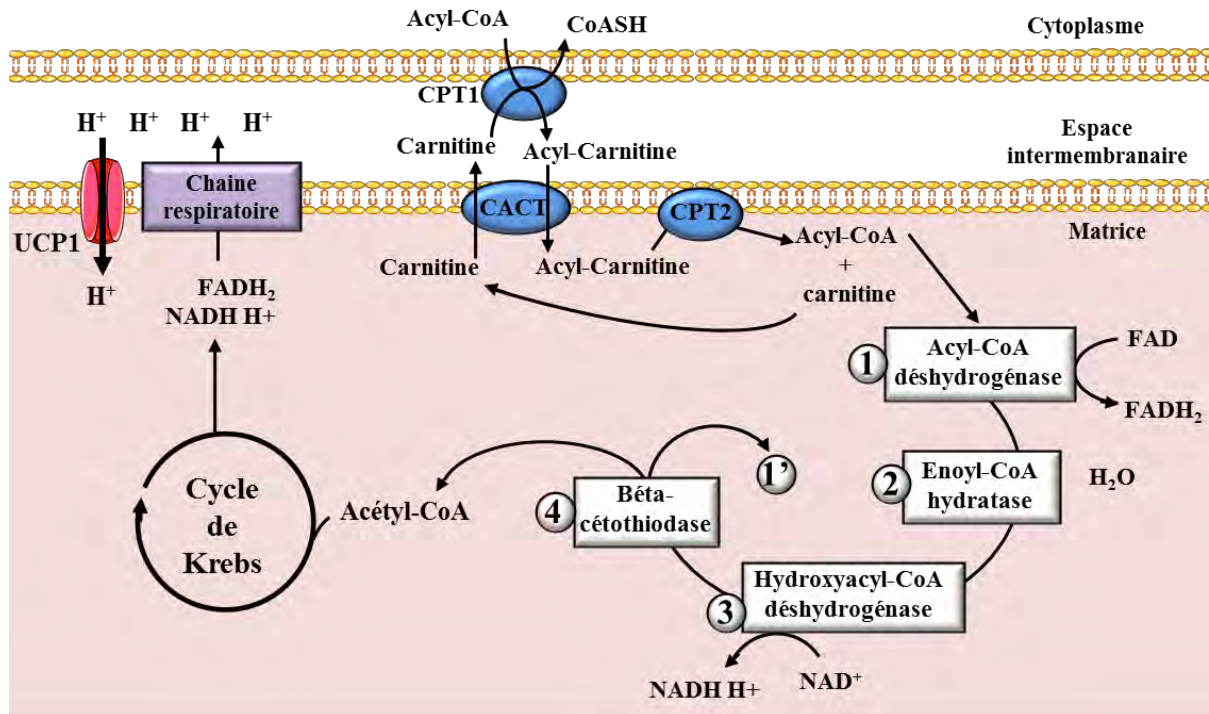


Figure 29 : La bêta-oxydation des acides gras

Les acyl-CoA traversent la membrane de la mitochondrie à l'aide des carnitine palmitoyl transférases 1 et 2 (CPT1 et CPT2) puis ils sont pris en charge dans la bêta-oxydation et le cycle de Krebs pour donner des FADH<sub>2</sub> (Flavine adénine dinucléotide H<sub>2</sub>) et des NADH, H<sup>+</sup> (Nicotinamide adénine dinucléotide H, H<sup>+</sup>) nécessaires au fonctionnement de la chaîne respiratoire. CACT ou SLC25A20 : carnitine/acylcarnitine translocase.

## 6. Le tissu adipeux brun et la lutte contre l'obésité

Augmenter la dépense énergétique a toujours été considéré comme une stratégie efficace pour traiter les maladies liées à l'obésité. De par sa capacité à capter les acides gras et le glucose circulants et à dissiper l'énergie sous forme de chaleur, le recrutement ou l'activation du TA brun chez l'Homme apparaît comme une cible thérapeutique idéale pour la prévention et le traitement de l'obésité et les maladies métaboliques associées.

### a. Données chez la souris

La grande majorité des études physiologiques ont été effectuée chez les rongeurs. Des études chez la souris ont clairement montré que le TA brun joue un rôle important dans la balance énergétique et l'homéostasie du glucose et des acides gras.

Le concept du TA brun comme source de thermogénèse induite par l'alimentation a été initié par des études de suralimentation chez les rats, puis conforté par les études de dénervation ou ablation du TA brun par la toxine diphtérique A. Ces études observent une augmentation du poids et une résistance à l'insuline chez les souris avec un TA brun inactif (Dulloo and Miller, 1984; Lowell et al., 1993; Rothwell and Stock, 1979). La protection du TA brun contre l'obésité a ensuite été mise en évidence chez des souris dont le gène codant UCP1 a été invalidé. Ces souris développent une obésité sous un régime alimentaire normal ou riche en graisse (Feldmann et al., 2009). Cet effet obésogène de l'ablation d'UCP1 est en contradiction avec les observations initiales sur les souris invalidées pour UCP1 qui ne développaient pas d'obésité car ces souris étaient élevées à température ambiante (en dessous de la thermoneutralité), et devaient donc dépenser un surplus d'énergie pour compenser la perte de chaleur (Enerback et al., 1997).

Des approches de transplantation de TA brun chez la souris ont mis en évidence une amélioration des paramètres métaboliques tels que la tolérance au glucose, la sensibilité à l'insuline, la diminution de la masse grasse et même une réversion de l'insulino-résistance dans des modèles de souris obèse et diabétiques. Les effets bénéfiques d'une telle transplantation seraient dus à la sécrétion d'IL6 et d'IGF1 (Gunawardana and Piston, 2015; Villarroya and Giralt, 2015).

Il apparaît donc qu'augmenter l'activité du TA brun ou le nombre d'adipocytes bruns ou brites par manipulation génétique de souris ou par intervention pharmacologique peut aider à lutter contre l'obésité et la résistance à l'insuline. L'importance des adipocytes brites n'est pas à négliger, leur contribution dans la lutte contre l'obésité est importante. Notamment, dans certains cas, le brunissement du TA blanc et les effets anti-obésogène se produisent sans preuve de l'augmentation de la fonction du TA brun (Bostrom et al., 2012; Kopecky et al., 1995; Seale et al., 2011). Contrairement au TA brun interscapulaire, la capacité des rongeurs à recruter des adipocytes brites par l'exposition au froid ou stimulation adrénérgique varie considérablement entre les différentes souches de souris; cette capacité est plus faible dans les souches sujettes à l'obésité et à la résistance à l'insuline (Collins et al., 1997; Collins et al., 1994).

Le tableau 6 donne un aperçu de l'implication du TA brun et brite dans le métabolisme des rongeurs. L'ensemble de ces études démontrent l'importance du TA brun sur le métabolisme et le développement de l'obésité. C'est pourquoi le TA brun représente une cible thérapeutique potentielle pour le traitement des maladies métaboliques chez l'Homme.



L'importance du tissu adipeux brun et des adipocytes briles dans le métabolisme des rongeurs	Références
L'ablation du TA brun entraîne une obésité et une résistance à l'insuline.	Dulloo et al., 1984 Lowell et al., 1993
Les adipocytes thermogéniques capables d'augmenter la dépense énergétique sont situés dans le TA brun et dans le TA blanc après une stimulation avec un agoniste $\beta$ 3-adrénergique.	Hims-Hagen et al., 2000 Wilson-Fritch et al., 2004 Petrovic et al., 2010
Le recrutement des adipocytes briles dans le TA blanc est associé à une diminution de l'obésité.	Collins et al., 1994 Collins et al., 1997
L'expansion du TA brun chez des souris génétiquement modifiées entraîne une résistance à l'obésité et à l'hypertriglycéridémie.	Cederberg et al., 2001 Kim et al., 2005
La perte des adipocytes briles chez des souris génétiquement modifiées entraîne une résistance à l'insuline et une stéatose hépatique.	Cohen et al., 2014
Les souris invalidées pour UCP1 deviennent obèses à thermoneutralité.	Feldmann et al., 2009

Tableau 6 : Implication du tissu adipeux brun et des adipocytes briles dans le métabolisme des rongeurs d'après (Lidell et al., 2014)

#### **b. Présence du TA brun chez l'homme**

Dès 2009, une plus grande prévalence du TA brun chez la femme que chez l'homme ainsi qu'une corrélation inverse entre l'IMC et la quantité de TA brun avaient été décrites (Cypess et al., 2009). Depuis, des études rétrospectives ont confirmé l'association entre la prévalence et l'activité du TA brun détecté par 18F-FDG PET/CT et l'âge, le sexe, la température extérieure, l'IMC, l'obésité et l'état diabétique (Lee et al., 2010; Park et al., 2010; Persichetti et al., 2013). Des températures extérieures froides et l'hiver sont associés à une meilleure détection du TA brun, tandis que l'âge, le sexe, l'IMC, l'obésité et l'état diabétique sont associés à une détection inférieure du TA brun chez l'homme (Cypess et al., 2009; Perkins et al., 2013; Saito et al., 2009; Zhang et al., 2013) (Tableau 7).

A thermoneutralité, la prévalence du TA brun est d'environ 7% alors qu'une exposition au froid peut faire monter la prévalence de TA brun détectable jusqu'à 100% de la population étudiées (Halpern et al., 2014). Le volume de TA brun estimé par PET varie de 30 à 80 g, soit environ 0,05% de la masse totale du corps (chez la souris, le TA brun correspond à 3% de la masse corporelle) (Ouellet et al., 2012; Virtanen et al., 2009). On estime qu'environ 50 g de TA brun actif pourrait augmenter la dépense énergétique de 125 kcal/jour chez l'Homme (Rothwell and Stock, 1979; Virtanen et al., 2009). Plusieurs études ont examiné l'effet de l'exposition au

froid sur la dépense énergétique et ont constaté que la présence du TA brun augmente la dépense d'énergie de 5% à 77% (Orava et al., 2011; Ouellet et al., 2012; Yoneshiro et al., 2011). De telles différences sont dues à l'absence de conditions normalisées lors de l'inclusion des patients (âge, température ambiante, régime alimentaire sont variables). Une augmentation parallèle de l'activité du TA brun et de la dépense énergétique a été observée en réponse à une exposition aiguë au froid chez les sujets ayant une faible activité du TA brun (Yoneshiro et al., 2013). De plus, chez les obèses, la perte de poids par intervention chirurgicale restaure l'activité du TA brun (Vijgen et al., 2012). Ainsi, une activation constante à long terme de l'activité du TA brun pourrait contribuer à maintenir la perte de poids obtenue par des interventions pharmacologiques et/ou du mode de vie.

Comme dit précédemment, une activation du TA brun par le froid augmente de manière significative l'utilisation du glucose et des acides gras dans le TA brun. L'acclimatation au froid augmente la thermogenèse induite par l'alimentation et favorise l'homéostasie énergétique et la sensibilité à l'insuline (Chondronikola et al., 2014; Lee et al., 2014b; Vosselman et al., 2013). Ces résultats confirment le rôle physiologique du TA brun et supportent également la notion qu'il peut être un tissu antidiabétique chez l'homme.

L'augmentation de la thermogenèse induite par le froid s'accompagne d'une augmentation de la capacité d'oxydation des acides gras intracellulaires et d'une diminution de la masse grasse (Blondin et al., 2014; Ouellet et al., 2011; Yoneshiro et al., 2013). Plusieurs études ont démontré une association entre l'activité du TA brun et les profils lipidiques sanguins même lorsque l'âge, le sexe et l'IMC ont été pris en compte. Les sujets avec un TA détectable ont des niveaux d'HbA1c, de cholestérol total et de cholestérol LDL dans le sang significativement plus faible (Matsushita et al., 2014; Ozguven et al., 2015). En plus de l'amélioration du profil lipidique sanguin, des données récentes montrent une diminution des taux de transaminases sériques ALAT et ASAT (Alanine Amino Transférase et Aspartate Amino Transférase) deux indicateurs des lésions hépatiques, chez les sujets avec un TA brun détectable. Par conséquent les sujets avec un TA brun actif ont un risque plus faible de développer un stéatose hépatique non alcoolique et l'activation du TA brun pourrait être une cible potentielle pour prévenir et traiter la dyslipidémie et NAFLD (Ozguven et al., 2015).

Type d'étude	Méthodes	Résultats principaux
Lee et al., 2010	Etude rétrospective sur 2934 FDG-PET/CT à thermoneutralité	Présence de TA brun dans 8,5% de tous les scans. Détection du TA brun inversement corrélée à l'âge, à l'IMC et au niveau du glucose sanguin. TA brun plus abondant chez la femme par rapport à l'homme.
Ouellet et al., 2011	Etude rétrospective sur 4842 FDG-PET/CT à thermoneutralité	Présence de TA brun dans 6,8% de tous les scans. Détection du TA brun inversement corrélée à l'âge et au diabète de type 2. TA brun plus abondant chez la femme par rapport à l'homme.
Persichetti et al., 2013	Etude rétrospective sur 6454 FDG-PET/CT à thermoneutralité	Détection du TA brun inversement corrélée à l'âge, à l'IMC et au diabète de type 2.
Park et al., 2010	Etude rétrospective sur 5115 FDG-PET/CT à thermoneutralité	Faible présence de TA brun dans 1% de tous les scans. Détection du TA brun inversement corrélée à l'âge et à l'IMC. TA brun plus abondant chez la femme par rapport à l'homme et présence d'une saisonnalité.
Orava et al., 2011	Etude prospective sur 27 volontaires exposés pendant 2h à 17°C. Mesure du FDG-PET/CT.	L'exposition au froid augmente de 12 fois l'absorption du glucose par le TA brun. L'insuline induit de 5 fois l'absorption du glucose par le TA brun. Corrélation positive entre la dépense énergétique et la perfusion du TA brun.
Ouellet et al., 2012	Etude prospective sur 6 volontaires exposés pendant 2h30 à 18°C. Mesure du FDG et du [ <sup>11</sup> C] acétate-PET/CT.	L'exposition au froid augmente l'absorption du glucose et des acides gras par le TA brun. Diminution du contenu en triglycérides du TA brun après la thermogénèse induite par le froid, indiquant une consommation des lipides intracellulaires.
Vijgen et al., 2012	Etude prospective sur 10 volontaires avant et après chirurgie bariatrique. Mesure du FDG-PET/CT après une exposition de 2h à un froid léger.	Présence d'un TA brun détectable chez 2 patients sur 10 avant la chirurgie. Après la chirurgie, le TA brun est détectable chez 5 patients sur 10. Augmentation de l'activité du TA brun après la perte de poids chez les personnes ayant un TA brun détectable.
Orava et al., 2013	Etude prospective sur 27 volontaires minces et 36 volontaires obèses exposés pendant 2h à 17°C mesure du FDG-PET/CT	L'absorption du glucose par le TA brun pendant l'exposition au froid est plus forte chez les personnes minces par rapport aux obèses. Les femmes ont une plus forte absorption du glucose par rapport aux hommes.
Yoneshiro et al., 2013	Etude prospective sur 51 volontaires exposés au froid pendant 6 semaines (2h par jour à 17°C). Mesure du FDG-PET/CT.	Diminution de la masse grasse et augmentation de l'activité du TA brun après les 6 semaines d'exposition au froid.
Blondin et al., 2014	Etude prospective sur 6 volontaires exposés au froid pendant 4 semaines (2h par jour à 10°C). Mesure du FDG et du [ <sup>11</sup> C] acétate-PET/CT.	Augmentation de 45% du volume du TA brun. Augmentation de 2,2 fois des capacités oxydatives et de 37% de l'absorption du glucose par le TA brun après l'acclimation au froid.
Blondin et al., 2015	Etude prospective sur 12 volontaires exposés au froid pendant 3h à 18°C. Mesure du FDG, du [ <sup>13</sup> U] palmitate et du [ <sup>11</sup> C] acétate-PET/CT.	Augmentation de 1,4 fois de l'activité lipolytique et de 2,1 fois du métabolisme oxydatif durant l'exposition au froid. Le glucose circulant est beaucoup plus capté par les muscles que par le TA brun.

Tableau 7 : Principales études rétrospectives et prospectives évaluant la présence du TA brun et son action sur le métabolisme du glucose et des acides gras chez l'Homme d'après (Celi et al., 2015)

Bien que la preuve d'un effet thérapeutique chez l'Homme soit toujours manquante, la stimulation, même d'une petite quantité du TA brun pourrait avoir de nombreux effets bénéfiques sur les métabolismes glucidique et lipidique. Néanmoins, du fait que la quantité de TA brun recrutée chez l'Homme est probablement le principal facteur limitant, les mécanismes qui pourraient accroître de manière optimale la quantité et la capacité thermogénique du TA brun et le brunissement du TA blanc doivent être élucidés afin d'optimiser son succès thérapeutique

**c. Potentiel thérapeutique de l'activation du TA brun chez l'Homme**

L'exploitation de l'activation du TA brun comme une stratégie pharmacologique pour la perte de poids est séduisante. De très nombreux composés sont capables de stimuler le TA brun chez la souris *in vivo* et *in vitro*. Ici nous allons nous intéresser à ceux ayant fait l'objet d'essais cliniques chez l'Homme. Les autres composés capables d'induire le recrutement des adipocytes blancs et/ou l'activation du TA brun chez l'animal sont regroupés dans les revues suivantes (Kajimura et al., 2015; Merlin et al., 2015).

***Exposition au froid***

Comme l'activité du TA brun présente une saisonnalité, la stratégie d'une exposition au froid pour activer la thermogénèse est logique. Dès 1961, il a été montré qu'une exposition au froid à long terme (8h/j pendant 31j à 12°C) induit une diminution des frissons (Davis, 1961a; Davis, 1961b). Des sujets en bonne santé participant à une étude de 4 mois, ont été exposés séquentiellement pendant 1 mois à 24°C, suivi d'un mois à 19°C, un troisième mois à 24°C, et un dernier mois à 30°C durant leur sommeil (environ 10h/j). Par rapport au premier mois, le volume et l'activité du TA brun a presque doublé après le mois de l'exposition au froid, et est devenu négligeable après le mois à 30°C. Il faut noter que l'intervention a entraîné une augmentation de la sensibilité à l'insuline post-prandiale ainsi qu'une augmentation de l'expression de leptine et d'adiponectine exclusivement au cours de l'exposition au froid (Lee et al., 2014b). Une étude récente a démontré une augmentation de l'activité du TA brun après 10 jours d'exposition au froid (2 à 6 heures/j à 16°C) et après une plus longue période (2 h à 17°C/jour, pendant 6 semaines) associée à une réduction de la masse grasse uniquement lors de la longue exposition (van der Lans et al., 2013; Yoneshiro et al., 2013). Similairement, la diminution de la température ambiante de 24°C à 19°C conduit à une augmentation de la dépense énergétique de 5% et de l'activité du TA brun de 10% (Chen et al., 2013).

Ces données indiquent que la plasticité de l'activité du TA brun et les effets métaboliques bénéfiques qui s'ensuivent, par variations de la température, peuvent être exploités pour augmenter la dépense énergétique.

### *Isoprénaline et éphédrine*

L'utilisation d'agents sympathomimétiques comme activateurs du TA brun n'est pas un concept nouveau. Dès 1979, il a été suggéré que le TA brun pourrait être ciblé thérapeutiquement par des agents sympathomimétiques (Desautels and Himms-Hagen, 1979). Des études ont montré qu'une dose orale unique de 1 mg/kg d'éphédrine (amine sympathomimétique) donne lieu à aucune activation du TA brun chez l'Homme (Astrup et al., 1985a; Astrup et al., 1985b). Récemment, trois études ont mesuré l'effet de la stimulation adrénergique sur l'activité du TA brun chez l'Homme adulte. L'administration de 1mg/kg d'éphédrine par voie intramusculaire à des sujets jeunes et sains n'a pas entraîné d'activation du TA brun, alors qu'une exposition au froid a activé le TA brun chez tous les sujets (Cypess et al., 2012). Des résultats similaires ont été obtenus avec l'administration intraveineuse d'isoprénaline (agoniste  $\beta$ -adrénergique) (Vosselman et al., 2012).

Toutefois, l'utilisation de doses plus élevées d'éphédrine (2,5 mg/kg par voie orale) entraîne une activation du TA brun dans six des neuf sujets minces, mais pas chez les sujets obèses d'âge correspondant (Carey et al., 2013). Le niveau d'activité du TA brun reste encore 4 fois inférieur à celui observé lors de l'exposition au froid. Il est probable que les concentrations de noradrénaline à la surface cellulaire des adipocytes bruns lors de l'exposition au froid soient plus élevées que le niveau atteint par les sympathomimétiques utilisés dans ces études. Cependant, le frein majeur à l'utilisation de ces médicaments est leurs effets sur la sphère cardiovasculaire (Shekelle et al., 2003). En effet, les trois études ont observé une augmentation de la pression artérielle et la fréquence cardiaque.

### *Agonistes $\beta_3$ -adrénergiques*

Chez l'Homme, l'expression du récepteur  $\beta_3$ -AR est négligeable dans les adipocytes blancs mais pas dans les adipocytes bruns (Krief et al., 1993; Tavernier et al., 1996). Comme indiqué précédemment, l'activation du  $\beta_3$ -AR favorise l'expression d'UCP1 et la thermogénèse adaptative. Par conséquent, des agonistes du  $\beta_3$ -AR ont été recherchés pour le traitement de l'obésité. La première génération d'agonistes du  $\beta_3$ -AR était insuffisamment sélective, et ceux de la deuxième génération, bien plus sélectifs, ont démontré une pauvre biodisponibilité et pharmacocinétique (Arch, 2008).

Par exemple, l'agoniste du  $\beta_3$ -AR BRL-35135 améliore la tolérance au glucose et augmente la sensibilité à l'insuline de patients obèses diabétiques. Cependant, il augmente aussi le rythme cardiaque et provoque des tremblements (Cawthorne et al., 1992). Le traitement avec 1500mg/j pendant 8 semaines de CL316,243 augmente l'oxydation des acides gras et la sensibilité à l'insuline mais ne modifie pas la dépense énergétique (Weyer et al., 1998). De même, un traitement avec autre agoniste du  $\beta_3$ -AR, le L-796568 (28j avec 375 mg/j) n'a montré aucun effet sur la dépense énergétique malgré une diminution des TG plasmatiques (Larsen et al., 2002). Le mirabegron, un médicament actuellement en essai clinique de phase III pour le traitement de la vessie hyperactive, est le seul agoniste  $\beta_3$ -AR à induire une activation du TA brun et de la dépense énergétique. Cependant, aucune perte de poids n'a été rapportée (Cypess et al., 2015). D'autres études sont nécessaires pour confirmer l'action du mirabegron sur l'activité du TA brun. Ces faibles effets des agonistes du  $\beta_3$ -AR chez l'Homme par rapport aux effets obtenus chez l'animal sont sûrement liés à la faible expression du récepteur dans le TA blanc chez l'Homme par rapport à la souris (Langin et al., 1991).

### *Capsinoïdes et berbérine*

Une autre voie pour activer TA brun via le système nerveux sympathique est l'ingestion de certains composants alimentaires. Les capsaïcinoïdes comprenant la capsaïcine, le dihydrocapsaïcine et la nordihydrocapsaïcine, sont des composés actifs trouvés dans le piment responsables de la sensation de chaleur et de piquant. Les capsinoïdes (analogues de la capsaïcine) sont connus pour augmenter l'activité du TA brun chez les rongeurs (Kawabata et al., 2009). Chez l'Homme, une préparation de capsinoïdes augmente la dépense énergétique seulement chez les sujets ayant un TA brun détectable, sans induire d'effets secondaires indésirables (Ludy and Mattes, 2011; Saito and Yoneshiro, 2013; Yoneshiro et al., 2012). Le mécanisme proposé est que les capsinoïdes activent le récepteur TRPV1 situé dans le tractus digestif supérieur, conduisant à une augmentation de l'activité sympathique vers le TA brun (Yoneshiro and Saito, 2013). Une méta-analyse de 17 études a indiqué que des doses élevées de capsaïcine peuvent augmenter la dépense énergétique et l'oxydation des graisses d'une manière dose-dépendante, mais l'ampleur des effets est faible (Ludy et al., 2012). Néanmoins, les effets à long terme de ces composés bioactifs sur la perte de poids via le TA brun restent à être étudiés.

La berbérine est un alcaloïde produit par certains végétaux. Chez l'Homme et chez l'animal, plusieurs études ont montré que la berbérine induit une perte de poids, améliore les

troubles du métabolisme tels que la résistance à l'insuline et l'hyperlipidémie et inhibe la gluconéogenèse dans le foie. Elle est utilisée dans certains pays comme antidiabétique (Pang et al., 2015). Récemment, il a été montré que la berbérine induit le brunissement du TA blanc et augmente l'activité du TA brun chez la souris db / db obèse. Ceci entraîne une augmentation de la dépense énergétique et une résistance à l'obésité (Zhang et al., 2014b). D'autres études sont nécessaires pour déterminer si l'effet antidiabétique de la berbérine chez l'Homme passe par ces effets sur le TA brun.

### *L'exercice et l'irisine*

Stimuler la libération d'irisine lors d'un exercice physique pour augmenter les dépenses énergétiques par le brunissement du TA blanc apparaît comme une stratégie possible dans la lutte contre l'obésité. Malgré la controverse sur l'existence de l'irisine chez l'Homme, de nombreuses études ont été menées pour explorer l'effet de l'exercice sur le niveau circulant d'irisine chez l'Homme et l'impact de l'irisine sur l'obésité. En dépit de ces nombreuses études, l'effet de l'exercice sur le niveau circulant d'irisine chez l'Homme n'avait pas été clairement démontré jusqu'à récemment (Kurdiouva et al., 2014; Moraes et al., 2013; Pekkala et al., 2013). Désormais, il a été rapporté que l'irisine circule à un niveau comparable à celui d'autres hormones et que son niveau est augmenté par l'exercice chez l'Homme (Jedrychowski et al., 2015). Le rôle protecteur suggéré de l'irisine dans le développement de l'obésité reste débattu. En fonction des auteurs, des corrélations positives ou négatives entre les niveaux d'irisine et l'IMC, le diabète de type 2 et l'homéostasie glucidique ont été établies (Choi et al., 2013; Moreno-Navarrete et al., 2013; Sanchis-Gomar et al., 2014).

L'hypothèse que la thermogenèse frissonnante serait le mécanisme principal de la sécrétion d'irisine a été testé dans un groupe de volontaires sains subissant un refroidissement progressif. L'exposition maximale au froid a entraîné une augmentation significative des niveaux d'irisine qui sont corrélés avec l'intensité des frissons musculaires. Ces données montrent que la thermogenèse frissonnante pourrait favoriser la thermogenèse adaptative par la production d'irisine (Lee et al., 2014a).

On peut conclure qu'à l'heure actuelle, l'exposition au froid semble la méthode la plus efficace pour stimuler le TA brun chez l'Homme. D'autres études restent donc à être menées pour mieux connaître son fonctionnement afin d'ouvrir de nouvelles stratégies pharmacologiques pour stimuler la capacité thermogénique du TA brun. Mieux comprendre la conversion des adipocytes blancs en adipocytes bruns chez l'Homme est une piste à étudier.





---

## **OBJECTIFS**

---

Il est maintenant reconnu qu'il existe trois types distincts d'adipocytes : les adipocytes blancs, bruns et brites. Les adipocytes blancs sont spécialisés dans le stockage de l'énergie, alors que les adipocytes bruns et brites la dissipent sous forme de chaleur. Chez la souris, le phénomène d'apparition des adipocytes brites dans les dépôts de tissu adipeux blanc est bien décrit. Ce « brunissement » est protecteur contre l'insulino-résistance induite par l'obésité, tandis que bloquer l'apparition des adipocytes brites favorise l'obésité et la résistance à l'insuline. Il existe deux origines possibles des adipocytes brites, soit une trans-différenciation d'adipocytes blancs matures, soit une différenciation *de novo* d'un pool spécifique de précurseurs. Chez l'Homme, la présence d'un TA brun métaboliquement actif est inversement corrélée à l'IMC, à l'obésité et au diabète de type 2. De nombreuses études ont permis l'identification de composés capables d'induire l'apparition des adipocytes brites ou d'augmenter l'activité du TA brun. Cependant, très peu d'attention a été portée aux modifications du métabolisme intracellulaire lors de la conversion des adipocytes blancs en adipocytes brites, notamment chez l'Homme.

Précédemment, il a été montré que plusieurs membres de la famille des PPARs sont impliqués dans le brunissement du TA blanc. La rosiglitazone, un agoniste de PPAR $\gamma$ , est capable d'induire la conversion des adipocytes blancs humains en adipocytes brites exprimant fortement UCP1. Les agonistes de PPAR $\alpha$  sont aussi capables d'induire l'expression d'UCP1 dans les adipocytes bruns chez la souris, ainsi que la mitochondriogenèse et les capacités oxydatives dans les adipocytes blancs humains et murins.

C'est pourquoi, l'objectif de ce travail a été d'identifier les changements moléculaires et métaboliques associés à la conversion d'adipocytes blancs humains en adipocytes brites après un traitement par des agonistes des récepteurs nucléaires PPAR $\gamma$  ou PPAR $\alpha$ .

- Le premier objectif de cette thèse a été de déterminer *in vitro* si un agoniste de PPAR $\alpha$  est capable d'induire la conversion des adipocytes blancs humains en adipocytes brites avec la même efficacité qu'un agoniste de PPAR $\gamma$ .
- Le deuxième objectif a été d'étudier les adaptations métaboliques et mitochondriales lors de cette conversion, puis de mettre en évidence les mécanismes moléculaires contrôlant ces changements métaboliques.

---

## **RÉSULTATS**

---



## **ARTICLE 1**

### **Metabolic adaptations during white-to-brite conversion of human fat cells following PPAR $\gamma$ and $\alpha$ activation**

V. Barquissau<sup>1,2\*</sup>, D. Beuzelin<sup>1,2\*</sup>, D. Pisani<sup>5,6,7</sup>, G. Béranger<sup>5,6,7</sup>, A. Mairal<sup>1,2</sup>, A. Montagner<sup>2,4</sup>, B. Roussel<sup>1,2</sup>, G. Tavernier<sup>1,2</sup>, M.-A. Marques<sup>1,2</sup>, N. Viguerie<sup>1,2</sup>, H. Guillou<sup>2,4</sup>, E.-Z. Amri<sup>5,6,7</sup>, D. Langin<sup>1,2,3§</sup>

\* Co-first authors

<sup>1</sup>INSERM, UMR 1048, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, Toulouse, France

<sup>2</sup>University of Toulouse, Paul Sabatier University, France

<sup>3</sup>Toulouse University Hospitals, Laboratory of Clinical Biochemistry, Toulouse, France

<sup>4</sup>INRA, UMR 1331, TOXALIM, Toulouse, France

<sup>5</sup>University of Nice Sophia Antipolis, Nice, France

<sup>6</sup>CNRS, iBV, UMR 7277, Nice, France

<sup>7</sup>INSERM, iBV, U 1091, Nice, France

Pour cette étude, nous avons utilisé les cellules hMADS3 (Human Multipotent Adipose-Derived Stem cells). Cette lignée, issue du TA blanc pré-pubien d'un donneur mâle de 4 mois, présente plusieurs avantages (Rodriguez et al., 2004). Les cellules hMADS sont capables de s'auto-renouveler, de conserver un caryotype normal entre les passages et ne sont pas tumorigènes. Ces cellules possèdent également des potentiels de différenciation vers divers lignages : musculaire (Rodriguez et al., 2005), chondrogénique (Roux et al., 2013), endothélial (Shoji et al., 2010), ostéogénique et adipocytaire (Elabd et al., 2007).

Pendant l'adipogenèse, les cellules hMADS expriment les principaux marqueurs moléculaires des adipocytes blancs (expression précoce des C/EBPs, expression tardive de PPAR $\gamma$ , aP2, LPL, FAT/CD36). En plus, elles sécrètent également la leptine et l'adiponectine à des taux similaires à ceux d'adipocytes humains matures isolés. Elles possèdent une réponse lipolytique à la stimulation  $\beta$ -adrénergique et aux peptides natriurétiques comparables aux adipocytes blancs (Bezaire et al., 2009b; Bordicchia et al., 2012; Rodriguez et al., 2004). Ainsi, les cellules hMADS sont capables de se différencier en adipocytes blancs matures, mais restent multiloculaires.

De plus, il a été montré que les hMADS préalablement différenciées en adipocytes blancs sont capables de se convertir en adipocytes présentant les caractéristiques d'adipocytes bruns en réponse à certains stimuli, notamment la rosiglitazone (Elabd et al., 2009). Ces adipocytes brunis expriment UCP1 et présentent une consommation basale d'oxygène augmentée. Par conséquent, les cellules hMADS sont un modèle cellulaire approprié pour étudier les mécanismes impliqués dans la conversion des adipocytes blancs humains en adipocytes bruns.

Dans cet article, nous avons d'abord regardé si dans les cellules hMADS, PPAR $\alpha$  a la même capacité que PPAR $\gamma$  à induire la conversion des adipocytes blancs humains en adipocytes bruns. Les doses des agonistes, 300nM pour le GW7647 et 100nM pour la rosiglitazone, ont été choisies pour être spécifiques de chaque sous-type de PPAR (Brown et al., 2001; Seimandi et al., 2005). Puis, nous avons étudié les conséquences de cette conversion sur les principales voies du métabolisme énergétique.



# White-to-brite conversion in human adipocytes promotes metabolic reprogramming towards fatty acid anabolic and catabolic pathways

V. Barquissau<sup>1,2,8</sup>, D. Beuzelin<sup>1,2,8</sup>, D.F. Pisani<sup>3,4,5</sup>, G.E. Beranger<sup>3,4,5</sup>, A. Mairal<sup>1,2</sup>, A. Montagner<sup>2,6</sup>, B. Roussel<sup>1,2</sup>, G. Tavernier<sup>1,2</sup>, M.-A. Marques<sup>1,2</sup>, C. Moro<sup>1,2</sup>, H. Guillou<sup>2,6</sup>, E.-Z. Amri<sup>3,4,5</sup>, D. Langin<sup>1,2,7,\*</sup>

## ABSTRACT

**Objective:** Fat depots with thermogenic activity have been identified in humans. In mice, the appearance of thermogenic adipocytes within white adipose depots (so-called brown-in-white *i.e.*, brite or beige adipocytes) protects from obesity and insulin resistance. Brite adipocytes may originate from direct conversion of white adipocytes. The purpose of this work was to characterize the metabolism of human brite adipocytes.

**Methods:** Human multipotent adipose-derived stem cells were differentiated into white adipocytes and then treated with peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) $\gamma$  or PPAR $\alpha$  agonists between day 14 and day 18. Gene expression profiling was determined using DNA microarrays and RT-qPCR. Variations of mRNA levels were confirmed in differentiated human preadipocytes from primary cultures. Fatty acid and glucose metabolism was investigated using radiolabelled tracers, Western blot analyses and assessment of oxygen consumption. Pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4) knockdown was achieved using siRNA. *In vivo*, wild type and PPAR $\alpha$ -null mice were treated with a  $\beta_3$ -adrenergic receptor agonist (CL316,243) to induce appearance of brite adipocytes in white fat depot. Determination of mRNA and protein levels was performed on inguinal white adipose tissue.

**Results:** PPAR agonists promote a conversion of white adipocytes into cells displaying a brite molecular pattern. This conversion is associated with transcriptional changes leading to major metabolic adaptations. Fatty acid anabolism *i.e.*, fatty acid esterification into triglycerides, and catabolism *i.e.*, lipolysis and fatty acid oxidation, are increased. Glucose utilization is redirected from oxidation towards glycerol-3-phosphate production for triglyceride synthesis. This metabolic shift is dependent on the activation of PDK4 through inactivation of the pyruvate dehydrogenase complex. *In vivo*, PDK4 expression is markedly induced in wild-type mice in response to CL316,243, while this increase is blunted in PPAR $\alpha$ -null mice displaying an impaired brite response.

**Conclusions:** Conversion of human white fat cells into brite adipocytes results in a major metabolic reprogramming inducing fatty acid anabolic and catabolic pathways. PDK4 redirects glucose from oxidation towards triglyceride synthesis and favors the use of fatty acids as energy source for uncoupling mitochondria.

© 2016 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/4.0/>).

**Keywords** Brite/beige adipocyte; Peroxisome proliferator-activated receptor; Fatty acid metabolism; Glycerol metabolism; Pyruvate dehydrogenase kinase 4

## 1. INTRODUCTION

Obesity results from energy imbalance. When energy intake chronically exceeds energy expenditure, white adipose tissue (WAT) dramatically expands to store the excess of energy as fat. Brown adipose tissue (BAT) is responsible for the maintenance of body core temperature leading to energy expenditure. This thermogenic function of BAT relies on the activity of uncoupling protein 1 (UCP1), which dissociates substrate oxidation from ATP production [1]. In addition to its thermoregulatory function, UCP1 regulates whole-body energy

homeostasis as its ablation leads to obesity in mice housed at thermoneutrality [2]. Adult humans possess active BAT [3–5]. BAT activity is negatively associated with adiposity, insulin resistance and aging. Therefore, therapeutics aimed at increasing BAT recruitment and activity appear conceivable strategies to fight obesity and its metabolic complications [6].

Classical brown adipocytes are multilocular, UCP1-positive and thermogenically-competent cells residing in anatomically defined BAT depots. Following cold-exposure [7–9] or treatments with  $\beta_3$ -adrenergic receptor agonists [10–12], brown-like fat cells are detected in mouse

<sup>1</sup>INSERM, UMR 1048, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, Toulouse, France <sup>2</sup>University of Toulouse, Paul Sabatier University, France <sup>3</sup>University of Nice Sophia Antipolis, Nice, France <sup>4</sup>CNRS, iBV, UMR 7277, Nice, France <sup>5</sup>INSERM, iBV, U 1091, Nice, France <sup>6</sup>INRA, UMR 1331, TOXALIM, Toulouse, France <sup>7</sup>Toulouse University Hospitals, Laboratory of Clinical Biochemistry, Toulouse, France

<sup>8</sup>V. Barquissau and D. Beuzelin contributed equally to this work.

\*Corresponding author. UMR 1048, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, CHU Rangueil, 1 avenue Jean Poulhès, BP 84225, 31432 Toulouse Cedex 4, France. Tel.: +33 5 61 32 56 28; fax: +33 5 61 32 56 23. E-mail: [dominique.langin@inserm.fr](mailto:dominique.langin@inserm.fr) (D. Langin).

Received March 3, 2016 • Accepted March 13, 2016 • Available online 18 March 2016

<http://dx.doi.org/10.1016/j.molmet.2016.03.002>

subcutaneous inguinal WAT depot [13,14] where they are interspersed within unilocular UCP1-negative white adipocytes [15]. In mice, browning of WAT is associated with protection against high-fat diet-induced obesity and insulin resistance [16,17]. Brown-like adipocytes in WAT depots have been named brite (brown-in-white) or beige adipocytes. Two origins for brite adipocytes have been proposed. Brite fat cells may originate from *de novo* differentiation of precursor cells [18,19] or arise from direct conversion of mature white fat cells [7,20,21].

In humans, brite adipocytes have been observed in white fat depots [22,23]. Morphological and histological data revealing cells with an intermediate phenotype suggest that conversion of white into brite adipocytes likely occurs [22]. However, most studies investigating human brown/brite adipogenesis focused on differentiation of precursors into mature brown-like adipocytes [24–28]. Despite the therapeutic interest in the transformation of energy-storing into energy-dissipating adipocytes, data on fat and glucose metabolism during conversion from human white to brite fat cells are scarce. Notably, it is not established whether browning of white fat cells promotes both fatty acid and glucose utilization and how these changes are related to other metabolic pathways. Treatment with rosiglitazone, a PPAR $\gamma$ -specific agonist, of human multipotent adipose-derived stem (hMADS) cells previously differentiated into white adipocytes drives gene expression of brown/brite fat markers through the formation of PPAR $\gamma$  super-enhancers [29–31]. Long-term exposure to PPAR $\alpha$  agonist induces a thermogenic programme in murine subcutaneous WAT [32,33]. Furthermore, the two nuclear receptors are known positive regulators of UCP1 expression in mouse brown adipocytes [34,35].

In the present work, conversion of white hMADS adipocytes into brite fat cells was induced with selective PPAR $\gamma$  and PPAR $\alpha$  agonists to investigate fat and glucose metabolism. *In vivo*, subcutaneous WAT of wild type and PPAR $\alpha$ -null mice were analyzed following chronic  $\beta_3$ -adrenergic treatment.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. hMADS adipocytes

hMADS cells, established from the prepubic fat pad of a 4-month-old male (hMADS-3), were used between passages 16 and 25. hMADS cells were cultured and differentiated into white adipocytes as previously described [36]. At day 14, 100 nM of the PPAR $\gamma$  agonist, rosiglitazone (Rosi), or 300 nM of the PPAR $\alpha$  agonist, GW7647 (GW), were added to the differentiation medium for 4 additional days (Figure S1A). Agonists were selected for being specific of each human PPAR subtype [37,38]. Human fibroblast growth factor 2, insulin, triiodothyronine, transferrin, 3-isobutyl-1-methylxanthine, GW and dexamethasone were from Sigma; L-glutamine, penicillin, and streptomycin from Invitrogen; HEPES, low glucose Dulbecco's modified Eagle medium and Ham's F-12 medium from Lonza; Rosi from Alexis Biochemicals.

#### 2.1.1. Triglyceride content

Lipid accumulation was visualized by Oil Red O staining of 10% formalin-fixed differentiated cells. Colorimetric quantitation of triglyceride content was performed using the triglyceride reagent commercial kit (Sigma). Values were normalized to protein concentration in cell lysates.

#### 2.1.2. mRNA expression in hMADS cells

hMADS cells were harvested in RLT- $\beta$ -mercaptoethanol 1% from the RNA extraction kit (Qiagen). Total RNA was extracted using RNeasy mini kit (Qiagen) and quantified by Nanodrop spectrophotometer (ThermoFischer Scientific). RNA (500 ng–1  $\mu$ g) was reverse transcribed with the High capacity cDNA reverse transcription kit (Applied

Biosystems) and qPCR was performed on a StepOnePlus thermocycler (ThermoFischer Scientific) using Fast SYBR green or Taqman fast advanced master mixes (Life Technologies). SYBR Green primers (Eurogentec) and Taqman probes (Life Technologies) are listed in Tables S1 and S2. LRP10 was used as housekeeping gene.

#### 2.1.3. DNA microarray

Total RNA from control and Rosi- or GW-treated cells ( $n = 4$  for each condition) was extracted using a TRI-Reagent kit (Euromedex). RNA quality was checked by capillary electrophoresis (Experion, Bio-Rad). Microarray experiments were performed using Agilent 4  $\times$  44k v2 oligonucleotide arrays as previously described [39]. Microarray data have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus and are accessible through GEO Series accession number GSE71293. Significant microarray analysis (SAM) was performed to determine differentially expressed genes in Rosi- or GW-treated cells compared to control cells at day 18. Biological pathways and processes were analyzed using DAVID database v6.7 with Benjamini correction of  $p$  values [40].

#### 2.1.4. Western blot

Cells were lysed in RIPA buffer (Sigma) containing cocktail of protease and phosphatase inhibitors (Sigma). Equal amounts of solubilized proteins were loaded on 4–20% gradient SDS-PAGE gels (Bio-Rad), blotted onto nitrocellulose membranes and incubated with the following primary antibodies: HSL (#4107), ATGL (#2138) and GAPDH (#2118) were purchased from CST Ozyme; total PDHE1 $\alpha$  (#Ab110334), phospho-Ser293 PDHE1 $\alpha$  (#Ab177461), UCP1 (#Ab10983) and GLUT1 (#Ab40084) from Abcam; PLIN5 (#GP31) and PLIN 1 (#GP29) from PROGEN; PDK4 (#H00005166-A02) from Abnova and PCK1 (#AP8093b) from Abgent. Anti-rabbit or anti-mouse IgG coupled to horseradish peroxidase were used as secondary antibodies. Immunoreactive proteins were determined by chemiluminescence (Clarity, Bio-Rad) with a ChemiDoc MP System (Bio-Rad) and quantification was performed using Image Lab software (Bio-Rad).

#### 2.1.5. Substrate oxidation

Oleic acid oxidation and incorporation into triglycerides were assessed as described in Ref. [41]. To determine pyruvate oxidation, insulin was removed from culture medium the day before assay. Cells were incubated for 3 h in 1 ml Krebs–Ringer Buffer (125 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl $_2$ , 1.25 mM KH $_2$ PO $_4$ , 1.25 mM MgSO $_4$ , 25 mM NaHCO $_3$ ) supplemented with 2% BSA, 10 mM HEPES, 2 mM glucose, 1 mM pyruvate and 0.5  $\mu$ Ci [1- $^{14}$ C]-pyruvic acid (PerkinElmer) with or without 100 nM insulin. Medium was then acidified with 1 M sulfuric acid in closed vials containing a central well filled with benzethonium hydroxide. After 3 h incubation, trapped  $^{14}$ CO $_2$  was measured by liquid scintillation counting. Specific activity was measured and used to determine the quantity of oxidized pyruvate equivalent. Cells were washed with PBS and scraped in STED buffer (0.25 M sucrose, 10 mM Tris–HCl, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, pH 7.4). Results were normalized to protein content determined with Bio-Rad protein assay using BSA as standard.

#### 2.1.6. Oxygen consumption

hMADS cells were seeded in 24 multi-well plates (Seahorse Bioscience) and differentiated as described above. Oxygen consumption rates (OCR) of 18 day-differentiated cells were determined using an XF24 Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience). Basal OCR was calculated by subtraction of rotenone- and antimycin A-induced OCR (1  $\mu$ M of each inhibitor) to the unstimulated OCR value. Analyses were also carried out in



the presence of 50  $\mu\text{M}$  etomoxir, a carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1) inhibitor. Maximal respiration was determined using FCCP (1  $\mu\text{M}$ ). Oleate- and pyruvate-driven OCR were measured after addition of 200  $\mu\text{M}$  oleate and 5 mM pyruvate, respectively.

### 2.1.7. Lipolysis and re-esterification flux

Lipolysis was carried out as previously described [42]. Briefly, after an overnight loading period, lipolysis of [9,10- $^3\text{H}$ ]-oleic acid (PerkinElmer) was initiated by 1  $\mu\text{M}$  of  $\beta$ -adrenergic receptor agonist isoproterenol with or without 10  $\mu\text{M}$  triacsin C, an acyl-CoA synthetase inhibitor, to avoid fatty acid re-esterification. [9,10- $^3\text{H}$ ]-oleic acid and glycerol released in the medium were measured respectively by liquid scintillation counting and commercially available kit (Sigma). The results were normalized to total protein content of cell extracts.

Glyceroneogenesis was measured by the incorporation of [1- $^{14}\text{C}$ ]-pyruvic acid (PerkinElmer) into glycerol. Neutral lipids were extracted after pyruvic acid oxidation by adding 5 volumes chloroform:methanol (2:1) on cell lysate. After centrifugation, the organic phase was dried and hydrolyzed in 1 ml 0.25 N NaOH in chloroform:methanol (1:1) for 1 h at 37  $^{\circ}\text{C}$ . The solution was neutralized with 500  $\mu\text{l}$  0.5 N HCl in methanol. Fatty acids and glycerol were separated by adding 1.7 ml chloroform, 860  $\mu\text{l}$  water and 1 ml chloroform:methanol (2:1). Incorporation of  $^{14}\text{C}$ -carbon into glycerol was measured in the upper phase by liquid scintillation counting.

Glycerol kinase activity was assessed by the incorporation of [U- $^{14}\text{C}$ ]-glycerol (PerkinElmer) into triglycerides. Briefly, hMADS cells were incubated for 3 h in differentiation medium without glucose and pyruvate to avoid glyceroneogenesis. Then, fresh glucose/pyruvate-free differentiation medium supplemented with 0.3% BSA, 100  $\mu\text{M}$  glycerol and 1  $\mu\text{Ci}$  [U- $^{14}\text{C}$ ]-glycerol was added. After 2 h, the cells were washed with PBS and scraped with STED buffer for protein normalization. Neutral lipids were extracted and separated by thin layer chromatography to measure glycerol incorporation into triglycerides.

### 2.1.8. Pyruvate concentration

The day before the assay, insulin was removed from the culture medium. Cells were washed with PBS and incubated in glucose/pyruvate-free differentiation medium supplemented with 7.8 mM glucose. After 3 h, pyruvate released in the medium was measured using commercially available kit (BioAssay Systems). Cells were scraped in RIPA buffer for protein normalization.

### 2.1.9. Glucose uptake and *de novo* lipogenesis

Glucose uptake was measured using [1,2- $^3\text{H}$ ]-2-deoxy-D-glucose as previously described [43]. *De novo* lipogenesis was determined by [1- $^{14}\text{C}$ ]-acetic acid incorporation into triglycerides. The day before the assay, insulin was removed from the culture medium. Cells were incubated for 3 h in Krebs–Ringer buffer (*cf.* Section 2.1.5) supplemented with 2% BSA, 10 mM HEPES, 2 mM glucose, 5 mM acetate and 2  $\mu\text{Ci}$  [1- $^{14}\text{C}$ ]-acetic acid (PerkinElmer), in the presence or absence of 100 nM insulin. Cells were scraped in STED buffer and neutral lipids were separated by thin layer chromatography.

### 2.1.10. RNA interference

mRNA knockdown was achieved using small interfering RNA (siRNA). Briefly, on day 7 of differentiation, hMADS cells were detached from culture dishes with trypsin/EDTA (Invitrogen) and counted. One hundred picomol of a pool of either 4 siRNAs targeting PDK4 or 4 non-targeted control siRNAs (ThermoFischer Scientific) were delivered into adipocytes by a microporator (Invitrogen), with the following parameters: 1,100 V, 20 ms, 1 pulse. The targeted sequences were: siControl pool 1:

5'-UGGUUUACAUGUCGACUAA-3'; siControl pool 2: 5'-UGGUUUACAUGUUGUGUGA-3'; siControl pool 3: 5'-UGGUUUACAUGUUUCUGA-3'; siControl pool 4, 5'-UGGUUUACAUGUUUCCUA-3'; siPDK4 pool 1: 5'-GACCCGCUCUUAGUUUAUA-3'; siPDK4 pool 2: 5'-CAACGCCUGUGAUGGAUA-3'; siPDK4 pool 3: 5'-CGACAAGAAUUGCCUGUGA-3'; siPDK4 pool 4: 5'-GAGCAUUUCUCGCGCUACA-3'.

### 2.2. Human primary adipocytes

Human subcutaneous abdominal adipose tissue was collected from abdominoplasty of healthy patients for stromavascular fraction isolation according to the procedure previously described [29]. Stromavascular fraction cells were plated and maintained in DMEM containing 10% FCS until confluence. Differentiation of primary cultures was performed according to the protocol described for hMADS cells.

### 2.3. *In vivo* mouse studies

Mouse studies were performed in accordance with French and European animal care facility guidelines. A first cohort of 21 week-old PPAR $\alpha$ -null male mice on C57BL/6J genetic background and their wild-type (WT) counterparts were acclimated at thermoneutral temperature (30  $\pm$  1  $^{\circ}\text{C}$ ) for 4 weeks, on a 12/12 h light/dark cycle with *ad libitum* water and food. Mice were treated for 10 days with the  $\beta_3$ -adrenergic receptor agonist CL316,243 (0.1 mg/kg/d) (Sigma) or vehicle (DMSO) by daily intraperitoneal injections. A second cohort of 10 week-old mice was housed at standard room temperature (21  $\pm$  1  $^{\circ}\text{C}$ ). Mice were treated for 7 days with CL316,243 (1 mg/kg) or vehicle by daily intraperitoneal injections. After an overnight fast, mice were killed by cervical dislocation, and tissues were rapidly sampled and frozen in liquid nitrogen before being stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.3.1. mRNA expression

Inguinal WAT or interscapular BAT samples were homogenized in Qiazol buffer (Qiagen) using Precellys homogenizer (Ozyme). Total RNA samples were processed as described in Section 2.1.2. SYBR Green primers (Eurogentec) and Taqman probes (Life Technologies) are listed in Tables S1 and S2.

#### 2.3.2. Western blot

Tissues were powdered in liquid nitrogen and homogenized in RIPA buffer (Sigma) containing cocktail of protease and phosphatase inhibitors (Sigma). Western blotting was then performed as described in Section 2.1.4. Proteins of interest were normalized to total blotted proteins by using stain-free gels (Bio-Rad).

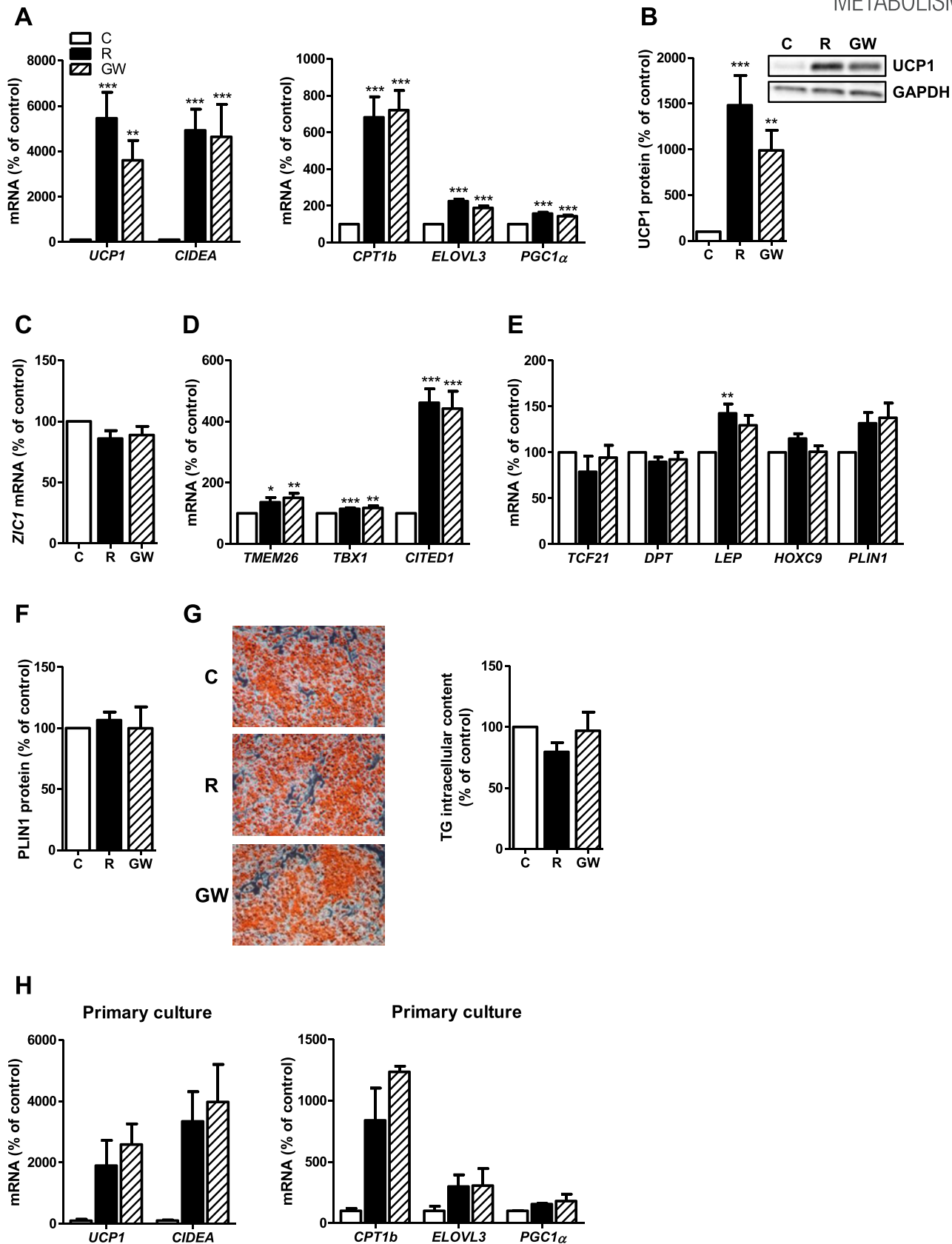
### 2.4. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism (GraphPad Software v.5.0). Paired or unpaired one-way ANOVA were performed and followed by Tukey's *post hoc* test to determine differences between groups. Two-way ANOVA, followed by Bonferroni's *post hoc* test, was applied when appropriate. Data are presented as percent of control cells or percent of WT untreated-mice,  $\pm$ SEM, unless otherwise described in legend. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

## 3. RESULTS

### 3.1. PPAR $\gamma$ and PPAR $\alpha$ agonists promote browning of human white adipocytes

Treatments with PPAR $\gamma$  (Rosi) or PPAR $\alpha$  (GW) agonists added for 4 days on differentiated white adipocytes (Figure S1A) increased UCP1 mRNA and protein levels (15- and 11-fold increase, respectively) (Figure 1A,B), as well as expression of genes classically elevated in



**Figure 1: PPAR $\gamma$  and PPAR $\alpha$  agonists promote browning of human white adipocytes.** (A) Gene expression levels of thermogenic genes. (B) UCP1 protein content. Gene expression levels of (C) brown-, (D) brite- and (E) white-specific markers. (F) PLIN1 protein content. (G) Pictures representative of Oil Red O staining in each condition at day 18. Intracellular triglyceride (TG) content quantified by enzymatic assay. (H) mRNA levels of thermogenic genes in human adipocytes differentiated in primary culture. Data represent mean  $\pm$  SEM expressed as percentage of control ( $n = 6-12$ ) for hMADS cells and ( $n = 2-4$ ) for primary adipocytes. Open bars: control cells (C), full bars: rosiglitazone-treated cells (R), hatched bars: GW7647-treated cells (GW). \*:  $p < 0.05$  for R or GW vs. C; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ .

**Table 1** — Significantly enriched biological processes among genes upregulated by rosiglitazone and GW7647.

Biological processes	Upregulated by rosiglitazone	Upregulated by GW7647
	p Value	p Value
GO:0006631_Fatty acid metabolic process	6.76E-08	2.16E-11
GO:0006635_Fatty acid beta-oxidation	6.76E-05	1.96E-11
GO:0008610_Lipid biosynthetic process	7.55E-05	8.26E-06
GO:0009062_Fatty acid catabolic process	2.16E-04	7.59E-10
GO:0019395_Fatty acid oxidation	3.08E-04	2.00E-09
GO:0034440_Lipid oxidation	3.08E-04	2.00E-09
GO:0019216_Regulation of lipid metabolic process	9.86E-04	6.76E-04
GO:0030258_Lipid modification	1.14E-03	3.38E-07
GO:0044242_Cellular lipid catabolic process	2.07E-03	1.51E-07
GO:0016042_Lipid catabolic process	2.49E-02	2.66E-04
GO:0051181_Cofactor transport	2.51E-02	1.37E-02
GO:0006767_Water-soluble vitamin metabolic process	3.07E-02	3.16E-02
GO:0050873_Brown fat cell differentiation	3.63E-02	2.24E-02
GO:0005996_Monosaccharide metabolic process	3.78E-02	5.76E-03
GO:0019318_Hexose metabolic process	3.83E-02	3.75E-03
GO:0010876_Lipid localization	3.97E-02	3.38E-02
GO:0019217_Regulation of fatty acid metabolic process	4.87E-02	1.80E-02

p Values are adjusted by Benjamini correction.

brown and brite fat cells (*CIDEA*, *CPT1b*, *ELOVL3*, *PGC1 $\alpha$* ) (Figure 1A). We next determined whether PPAR agonist-treated adipocytes expressed brown- and brite-specific markers. Brown markers were not (*MPZL* and *LHX8*) expressed or were weakly (*ZIC1*) expressed and not regulated by treatments (Figure 1C and data not shown). By contrast, expression of brite adipocyte markers *TMEM26*, *TBX1* and *CITED1* was increased (Figure 1D). Altogether, these data indicate that upon PPAR $\gamma$  or PPAR $\alpha$  activation, hMADS white adipocytes display a molecular pattern of brite fat cells.

Gene expression levels of the white adipocyte markers *TCF21*, *DPT*, *LEP*, *HOXC9* and *PLIN1* were barely, or not at all, regulated by PPAR agonists (Figure 1E). Accordingly, protein level of *PLIN1* was not modified by treatments (Figure 1F). Triglyceride content of differentiated adipocytes was not altered (Figure 1G). The two PPAR agonists induced down-regulation of PPAR $\gamma$  mRNA level with no effect on other members of the PPAR family (Figure S1B).

The results were confirmed in primary human differentiated pre-adipocytes. In Rosi- and GW-treated primary adipocytes, mRNA expression of *UCP1* and of several other thermogenic genes was upregulated (Figure 1H), while white and adipogenic markers were not changed (Figure S1C). mRNA levels of the brite markers *TBX1* and *CITED1* increased as observed in treated hMADS cells (Figure S1D).

### 3.2. PPAR $\gamma$ and PPAR $\alpha$ agonists drive similar transcriptional response and mitochondrial adaptation in white adipocytes

DNA microarrays were used to investigate the whole transcriptional effects of PPAR $\gamma$  and PPAR $\alpha$  agonists on hMADS cells. SAM analysis of 12891 transcripts using false discovery rate of 5% revealed that, compared to untreated white adipocytes, 265 and 210 genes were significantly up- and down-regulated by Rosi, respectively, and 470 and 209 genes were significantly up- and down-regulated by GW, respectively (data not shown).

Among the 215 genes upregulated by the two treatments, 96 and 57 were induced by more than 3-fold by Rosi and GW, respectively. On the contrary, genes upregulated specifically by Rosi or GW displayed weak fold induction, suggesting major overlap in the regulation of gene expression by PPAR $\gamma$  and PPAR $\alpha$  agonists in adipocytes. Consistent with these findings, several lipid metabolism-related biological processes were found to be regulated by both Rosi and GW (Table 1). RT-qPCR confirmed that expression of genes involved in fatty acid uptake, activation and esterification was increased in brite fat cells (Figure S2A). Gene ontology analysis also revealed that both fatty acid anabolism and catabolism were activated during briteening (Table 1 and Table S3) as confirmed by RT-qPCR data of major genes driving triglyceride synthesis and fatty acid oxidation (Figure 1A and Figure S2B,C). A few genes showed down-regulated expression. Fold changes were markedly lower than upregulated genes: only 14 out of 210 and 4 out of 209 genes were decreased by more than 3-fold by Rosi and GW, respectively.

Collectively, these results show that the two agonists have a profound effect on fatty acid anabolic and catabolic pathways.

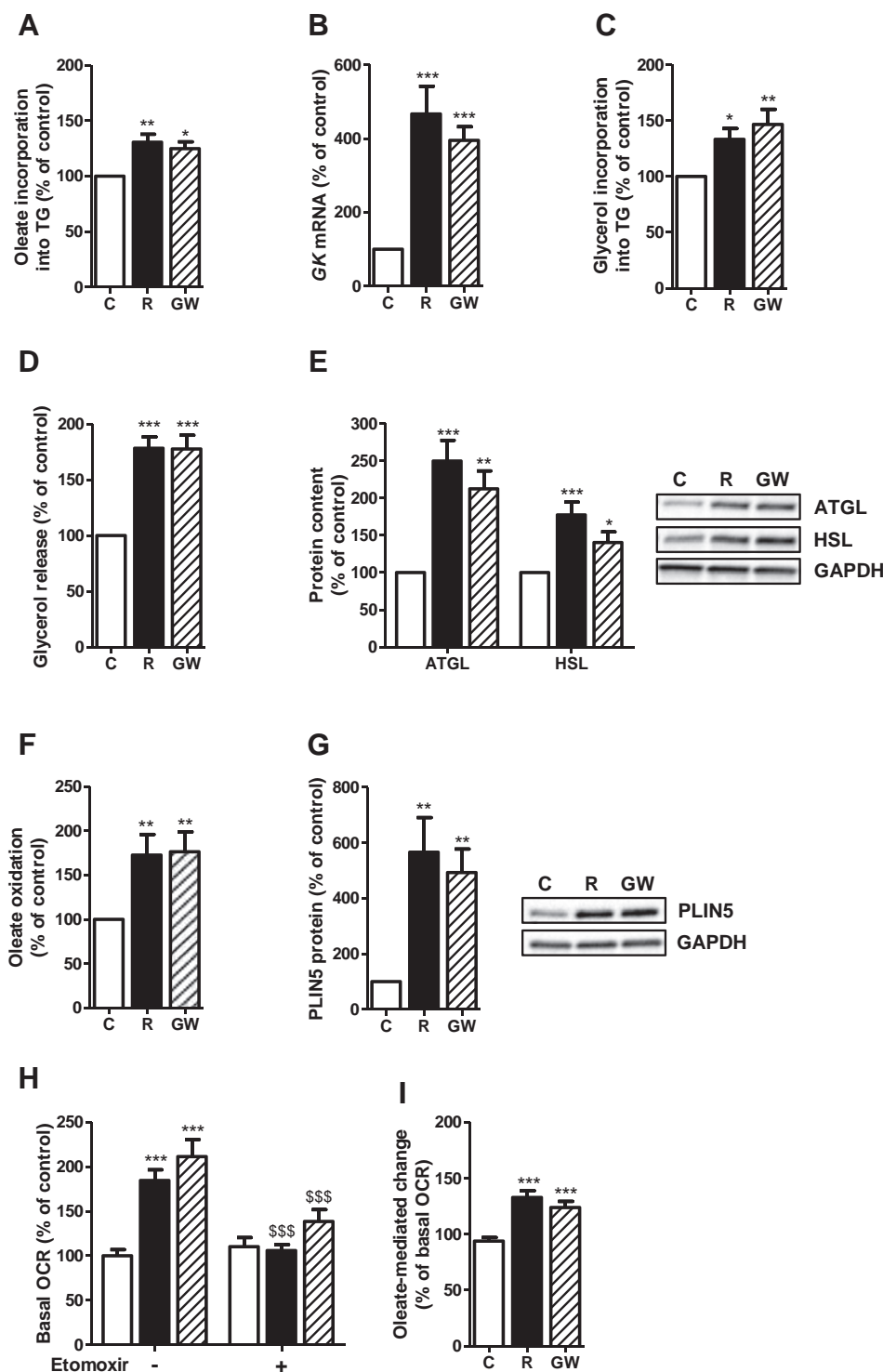
Besides fatty acid metabolism, DNA microarrays showed upregulation of a number of mitochondrial genes by Rosi and GW. RT-qPCR measurements confirmed the upregulation of several subunits of the mitochondrial electron transport chain (Figure S2D). This was associated with slightly higher mitochondrial biogenesis assessed by mitochondrial DNA content (Figure S2E) and a sharp increase in maximal oxygen consumption in brite adipocytes (Figure S2F). Given the weak induction of mitochondrial biogenesis compared to the boosted mitochondrial respiration, our results suggest major metabolic adaptations associated with briteening.

### 3.3. Briteening of white adipocytes induces anabolic and catabolic pathways of fat metabolism

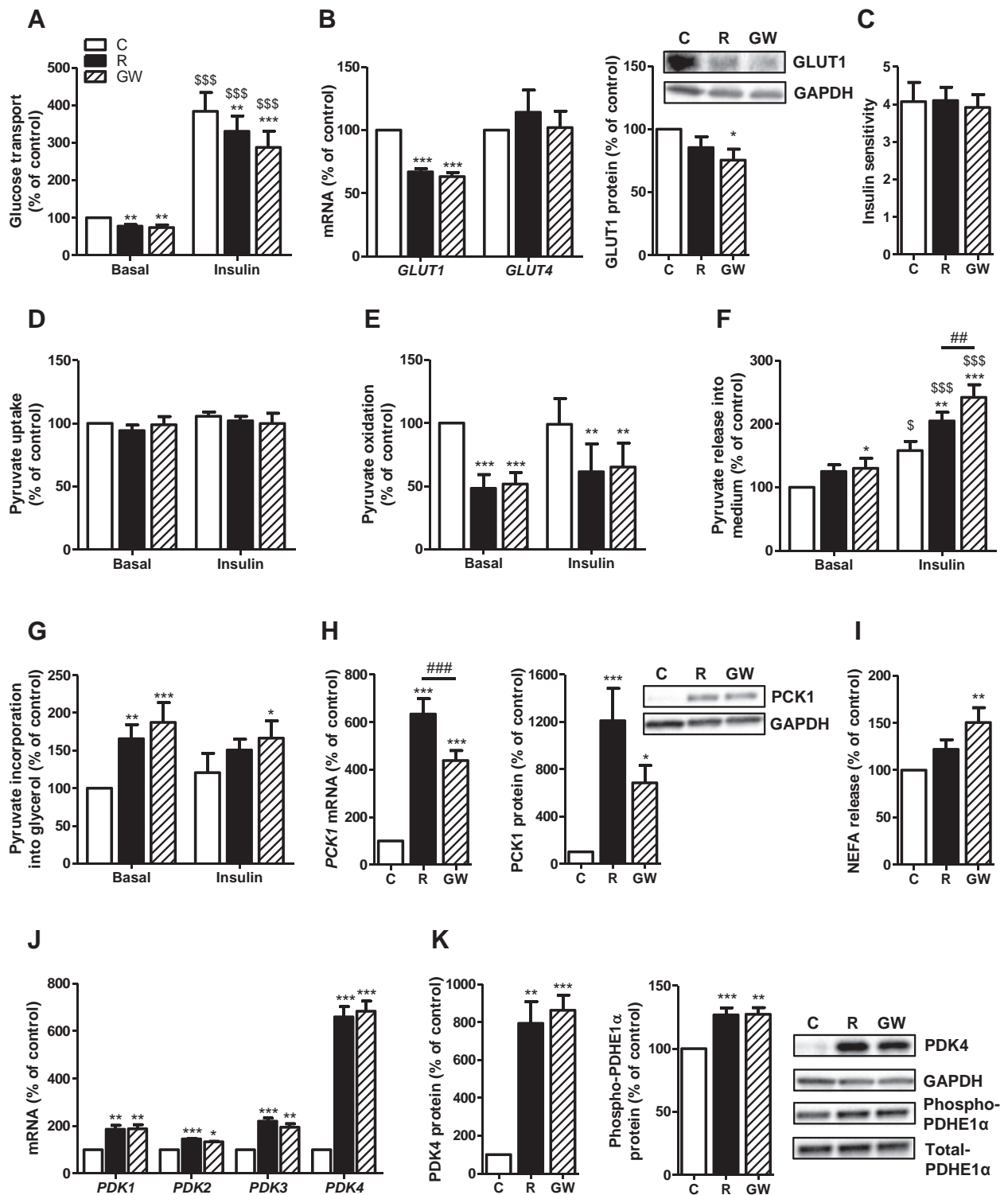
Briteening of hMADS adipocytes was associated with increased oleate incorporation into triglycerides as suggested by gene upregulation (Figure 2A, Figure S2A and Table S3). Newly activated fatty acids require glycerol-3-phosphate as a backbone for esterification. Glycerol kinase, an enzyme with higher expression in BAT than in WAT, showed strong induction in response to the treatments (Figure 2B). Accordingly, glycerol incorporation into triglycerides was enhanced (Figure 2C).

Increased fat synthesis was associated with enhanced triglyceride breakdown. The lipolytic capacity assessed by glycerol release into the medium in response to isoproterenol, a pan  $\beta$ -adrenergic receptor agonist, was enhanced (Figure 2D), along with increase of mRNA and protein expression of the two main lipases: ATGL and HSL (Figure 2E and Figure S3A). Gene expression of AQP7, a transporter facilitating glycerol efflux, was also upregulated (Figure S3B).

In line with the induction of numerous genes involved in fatty acid mitochondrial transport and oxidation (Table S3), briteening sharply increased oleate oxidation (Figure 2F). mRNA and protein levels of *PLIN5*, a lipid droplet binding protein involved in fatty acid oxidation, were strongly enhanced (Figure 2G and Figure S2C). Oxygen consumption in brite adipocytes was higher than in white fat cells (Figure 2H). After addition of etomoxir, a carnitine palmitoyltransferase 1 inhibitor, the oxygen consumption of brite adipocytes was blunted to the level of white adipocytes (Figure 2H), indicating that, in contrast to white fat cells, the higher metabolic rate of brite fat cells is linked to fatty acid oxidation. In agreement with these results, oleate addition increased OCR only in brite adipocytes (Figure 2I), further demonstrating the elevated capacity of brite fat cells to oxidize fatty acids.



**Figure 2: Britening of white adipocytes induces anabolic and catabolic pathways of fat metabolism.** Fatty acid metabolism was investigated in 18 day-differentiated hMADS cells treated or not with rosiglitazone or GW7647 for the last 4 days. (A) Fatty acid (oleate) incorporation into triglycerides (TG). (B) Gene expression level of glycerol kinase (*GK*). (C) Glycerol incorporation into triglycerides. (D) Glycerol release after stimulation by the  $\beta$ -adrenergic agonist, isoproterenol. (E) ATGL and HSL protein content. (F) Fatty acid (oleate) oxidation. (G) PLIN5 protein content. (H) Basal mitochondrial oxygen consumption rates (OCR) in the presence or not of 50  $\mu$ M etomoxir. (I) OCR measured after addition of 200  $\mu$ M oleate. Data represent mean  $\pm$  SEM expressed as percentage of control ( $n = 7-12$ ). Open bars: control cells (C), full bars: rosiglitazone-treated cells (R), hatched bars: GW7647-treated cells (GW). \*:  $p < 0.05$  for R or GW vs. C; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ . \$\$\$:  $p < 0.001$  for etomoxir vs. basal condition.



**Figure 3: Britening of white adipocytes promotes a shift of glucose metabolism from oxidation towards glycerol production.** Glucose metabolism was investigated in 18 day-differentiated hMADS cells treated or not with rosiglitazone or GW7647 for the last 4 days. (A) Glucose transport in the presence or not of 100 nM insulin. (B) Gene expression levels of the glucose transporters *GLUT1* and *GLUT4* and GLUT1 protein level. (C) Insulin sensitivity estimated by the insulin stimulated-to-basal glucose uptake ratio. (D) Pyruvate uptake, (E) pyruvate oxidation and (F) pyruvate release into the medium in the presence or not of 100 nM insulin. (G) Glyceroneogenesis assessed by incorporation of pyruvic acid into the glycerol moiety of neutral lipids. (H) PCK1 mRNA and protein levels. (I) Lipolysis measured by oleic acid release into the medium after stimulation by the  $\beta$ -adrenergic agonist, isoproterenol. (J) Gene expression levels of the four *PDK* isoforms. (K) PDK4 and Ser293-phosphorylated PDHE1 $\alpha$  protein levels. Data represent mean  $\pm$  SEM expressed as percentage of control (n = 6–12). Open bars: control cells (C), full bars: rosiglitazone-treated cells (R), hatched bars: GW7647-treated cells (GW). \*: p < 0.05 for R or GW vs. C; \*\*: p < 0.01; \*\*\*: p < 0.001. \$: p < 0.05 for insulin vs. unstimulated condition; \$\$\$: p < 0.001. ##: p < 0.01 for R vs. GW; ###: p < 0.001.



Taken together, these data show that briteening of white adipocytes is associated with major adaptations in fatty acid metabolism, promoting both triglyceride synthesis and hydrolysis and driving fatty acid fluxes towards mitochondrial oxidation.

### 3.4. Briteening of white adipocytes promotes a shift of glucose metabolism from oxidation towards glycerol production

Basal and insulin-stimulated glucose uptakes were decreased in brite adipocytes (Figure 3A). This was consistent with decreased mRNA and protein levels of the glucose transporter GLUT1 (Figure 3B). *GLUT1* expression was strongly correlated with basal glucose transport (Figure S4A). Insulin sensitivity evaluated by the insulin stimulated-to-basal glucose uptake ratio was preserved (Figure 3C) as was gene expression level of the insulin-responsive glucose transporter *GLUT4* (Figure 3B).

To directly assess glucose oxidation without the confounding effect of changes in glucose uptake and glycolysis, we used radiolabelled pyruvate, the end-product of glycolysis. Pyruvate uptake was not modified by the treatments (Figure 3D). Briteening decreased pyruvate oxidation by up to 50% in basal and insulin-stimulated conditions (Figure 3E). Pyruvate flux was redirected towards other pathways in brite adipocytes as shown by higher pyruvate release into the medium (Figure 3F) and by activation of glyceroneogenesis leading to increased incorporation of pyruvate into the glycerol backbone of neutral lipids (Figure 3G). This glycerol-3-phosphate synthesis pathway is highly dependent on phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (PCK1) activity, which mRNA and protein levels were sharply increased in response to Rosi and GW (Figure 3H). Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 gene expression was also upregulated in brite adipocytes (Figure S4B). The newly formed glycerol-3-phosphate allowed fatty acid re-esterification, which is demonstrated by the moderate release of fatty acids compared to glycerol following  $\beta$ -adrenergic receptor agonist stimulation (Figures 2D and 3I). To directly assess glucose carbon incorporation into fatty acids *i.e.*, *de novo* lipogenesis, radiolabelled acetate was used. The change in brite adipocytes was marginal as was the changes in cognate gene expression (Figure S4C,D).

These results point at intracellular pyruvate as a central node in brite adipocyte glucose metabolism. One of the top-ranking genes upregulated by the two treatments in the DNA microarray analyses and confirmed by RT-qPCR (Figure 3J) was pyruvate dehydrogenase kinase 4 (*PDK4*), which phosphorylates the pyruvate dehydrogenase complex (PDH). *PDK4* protein level was strongly upregulated, leading to higher PDH phosphorylation on the E1 $\alpha$  subunit in brite adipocytes (Figure 3K). *PDK1*, 2 and 3 were more modestly upregulated during briteening (Figure 3J). In human primary adipocytes, PPAR agonists also upregulated *PDK4* gene expression (Figure S4E).

Altogether, our observations show that, in human brite adipocytes, glucose metabolism switches from oxidation towards glycerol-3-phosphate production, favoring triglyceride synthesis. Moreover, the strong induction of *PDK4*, through phosphorylation of the PDH complex, invokes a shift in fuel selection favoring oxidation of fatty acids instead of glucose.

### 3.5. PDK4 knockdown prevents induction of fatty acid oxidation in brite adipocytes

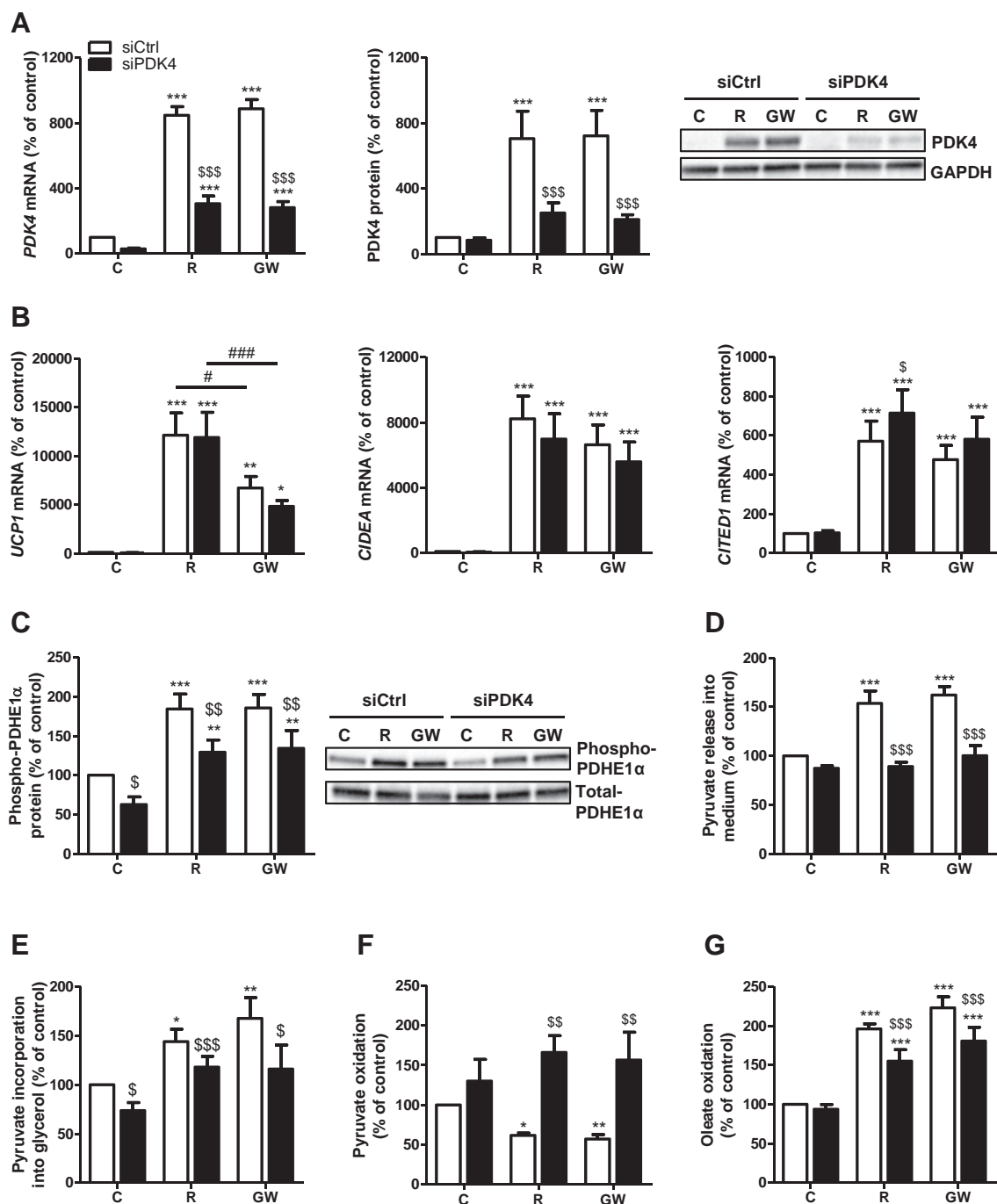
To directly address the role of *PDK4* in the metabolic remodeling associated with briteening of hMADS cells, siRNA-mediated knockdown was validated at mRNA and protein levels (Figure 4A). There was no alteration in the expression of *UCP1*, brown and brite markers and of other *PDK* isoforms (Figure 4B and Figure S5A,B). Decreased *PDK4* expression resulted in lower PDH phosphorylation (Figure 4C).

Consequently, pyruvate release from brite adipocytes was decreased to the levels observed in white adipocytes (Figure 4D) and briteening-induced glyceroneogenesis was partially inhibited (Figure 4E). Concomitantly, *PDK4* knockdown restored pyruvate oxidation in brite fat cells (Figure 4F). Consistent with higher pyruvate oxidation, pyruvate-driven OCR raised by up to 50% over basal in white and *PDK4* siRNA-treated brite adipocytes while brite adipocytes did not respond to pyruvate addition (Figure S5C). Contrary to pyruvate oxidation, *PDK4* siRNA treatment blunted fatty oxidation in brite adipocytes (Figure 4G). Basal OCR in brite adipocytes, which is highly dependent on fatty acid oxidation (Figure 2H,I), returned to white fat cell level upon *PDK4* knockdown (Figure S5D), similarly to what was observed when fatty acid oxidation was prevented by etomoxir (Figure 2H). However, fatty acid oxidation remained higher in *PDK4* siRNA-treated brite compared to white adipocytes (Figure 4G), suggesting that other mechanisms such as increased expression of fatty acid metabolism genes (Figure S5A and Table S3) were involved. Fatty acid esterification was not altered by *PDK4* knockdown (Figure S5E), demonstrating that *PDK4* specifically regulates the oxidative metabolism of fatty acids. Collectively, these results suggest that *PDK4* has a major role, independently of the briteening process *per se*, in regulating the preference for fatty acids over glucose for mitochondrial oxidation of brite fat cells.

### 3.6. PPAR $\alpha$ deficiency disrupts WAT briteening-induced *PDK4* expression *in vivo*

Data in human adipocytes indicated that *PDK4* induction was responsible for major metabolic adaptations during briteening. To confirm these *in vitro* results, we aimed at investigating *PDK4* regulation *in vivo*. As PPAR $\gamma$  but not PPAR $\alpha$  deficiency in WAT provokes lipodystrophy, PPAR $\alpha$ -null mice were used. Inguinal WAT was investigated as it is a fat depot prone to briteening compared to other fat pads.

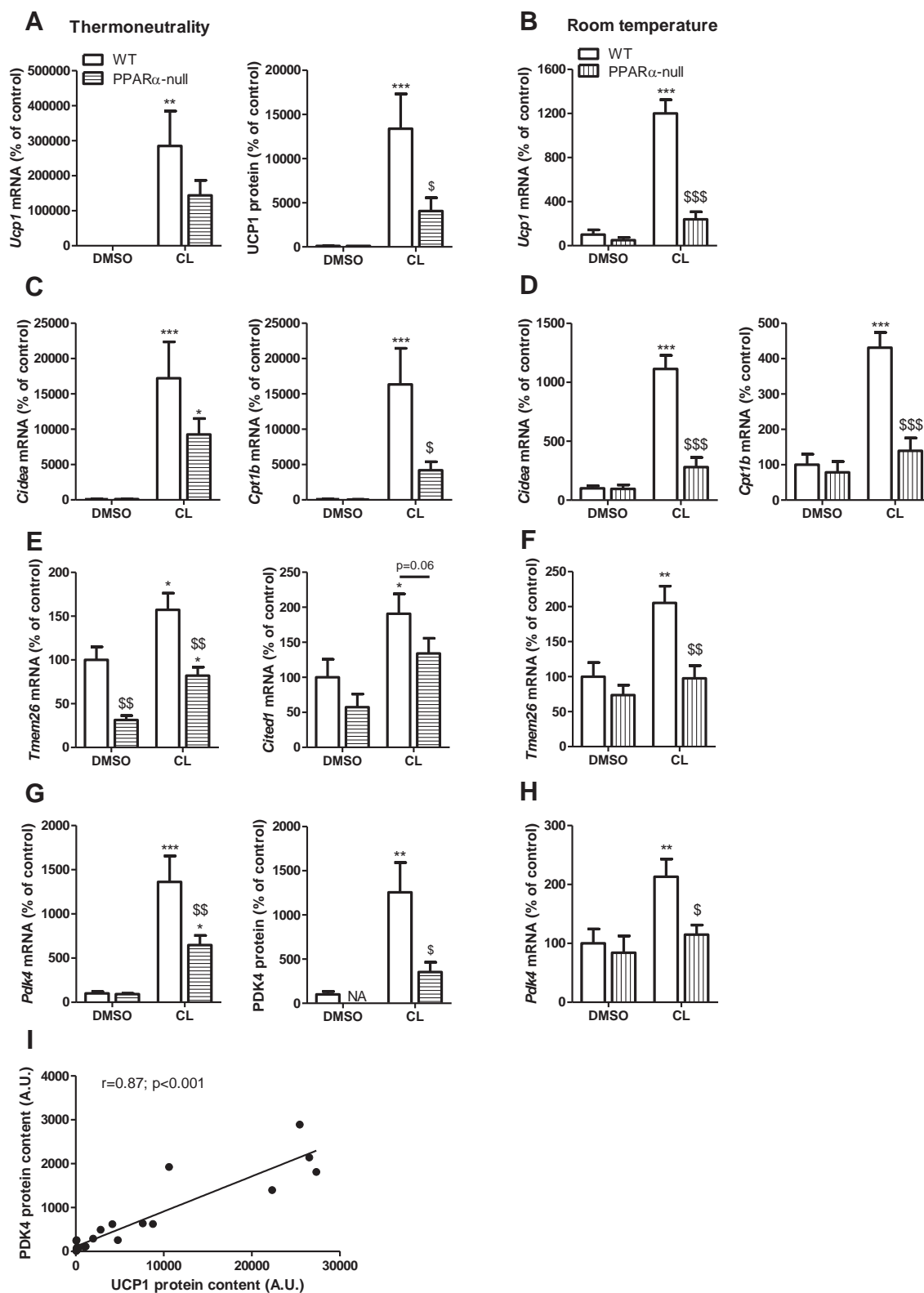
Two cohorts of mice were investigated. WT and PPAR $\alpha$ -null mice at 21 weeks of age acclimated at thermoneutrality were treated with the  $\beta_3$ -adrenergic agonist CL316,243. Acclimation to thermoneutrality is essential to avoid the confounding effects due to activation of brown and brite fat depots at conventional housing temperature. Body weight and inguinal fat pad weight were higher in PPAR $\alpha$ -null mice compared to age-matched WT mice (Figure S6A). As the difference in adiposity between genotypes may influence briteening in inguinal fat pad and obesity in PPAR $\alpha$ -null mice develops with aging [44], CL treatment was applied to younger mice housed at standard temperature. As expected, there was no difference in body and inguinal fat pad weights between 11 week-old WT and PPAR $\alpha$ -null mice (Figure S6B). *Ppar $\alpha$*  mRNA was, respectively, undetectable and expressed at low level in inguinal WAT of vehicle-treated PPAR $\alpha$ -null and WT mice and was induced upon chronic  $\beta_3$ -adrenergic stimulation only in WT mice (Figure S6C,D). *UCP1* mRNA and protein were barely detectable in WAT of vehicle-treated WT and PPAR $\alpha$ -null mice. Upon CL316,243 treatment, *UCP1* expression in WAT was sharply induced in WT mice while this increase was markedly blunted in PPAR $\alpha$ -null mice (Figure 5A,B). PPAR $\alpha$  deficiency did not impair white adipogenesis as shown by similar expression of *Ppar $\gamma$*  and *Dpt*, a white adipocyte specific marker [35], in both WT and PPAR $\alpha$ -null mice (Figure S6E). Inguinal WAT mRNA levels of the classical markers of thermogenic cells, *Cidea* and *Cpt1b*, were barely detectable in vehicle-treated mice and sharply increased upon  $\beta_3$ -adrenergic agonist treatment in WT mice, while this induction was impaired in PPAR $\alpha$ -null mice as thermogenic genes (Figure 5C,D). Classical brite adipocyte markers such as *Cited1* and *Tmem26* displayed the same pattern (Figure 5E,F). Noteworthy, the expression of these genes was induced by CL316,243 in interscapular BAT of both WT and PPAR $\alpha$ -null mice (Figure S6F), suggesting a



**Figure 4: PDK4 knockdown prevents induction of fatty acid oxidation in brite adipocytes.** Britening-associated changes were explored in 18 day-differentiated hMADS cells transfected with either a control- or PDK4-targeting siRNA and treated or not with rosiglitazone or GW7647 for the last 4 days. (A) PDK4 mRNA and protein levels. (B) Gene expression levels of *UCP1*, *CIDEA* and *CITED1*. (C) Ser293-phosphorylated PDHE1 $\alpha$  protein levels. (D) Pyruvate release into the medium. (E) Glycero-neogenesis assessed by incorporation of pyruvic acid into the glycerol moiety of neutral lipids. (F) Pyruvate oxidation. (G) Fatty acid (oleate) oxidation. Data represent mean  $\pm$  SEM expressed as percentage of control (n = 6–11). Open bars: siCtrl-treated cells, full bars: siPDK4-treated cells. \*: p < 0.05 for R or GW vs. C; \*\*: p < 0.01; \*\*\*: p < 0.001. \$: p < 0.05 for siPDK4 vs. siCtrl; \$\$: p < 0.01; \$\$\$: p < 0.001. #: p < 0.05 for R vs. GW; ###: p < 0.001.

specific role of PPAR $\alpha$  in brite fat cells compared to brown fat cells upon chronic  $\beta_3$ -adrenergic stimulation. PDK4 expression was up-regulated in inguinal WAT at mRNA and protein levels during CL316,243 treatment in WT mice, while this induction was severely blunted in PPAR $\alpha$ -null mice (Figure 5G,H). Supporting the induction of PDK4 as a

major feature of britening, PDK4 expression was strongly correlated with UCP1 expression at both protein and mRNA levels in inguinal WAT (Figure 5I and Figure S6G).



**Figure 5: PPAR $\alpha$  deficiency disrupts WAT browning-induced PDK4 expression *in vivo*.** (A, C, E, G and I) WT and PPAR $\alpha$ -null male mice housed at thermoneutrality were treated with CL316,243 (CL, 0.1 mg/kg/d) or vehicle (DMSO) for 10 days. (B, D, F and H) WT and PPAR $\alpha$ -null male mice housed at standard temperature were treated with CL316,243 (CL, 1 mg/kg/d) or vehicle (DMSO) for 7 days. Analyses were performed on the inguinal white adipose tissue depot. (A, B) UCP1 mRNA and protein levels. (C–F) Gene expression levels of *Cidea*, *Cpt1b*, *Cited1* and *Tmem26*. (G, H) PDK4 mRNA and protein levels. (I) Spearman correlation between UCP1 and PDK4 protein content (n = 23). Data represent mean  $\pm$  SEM expressed as percentage of vehicle-treated WT mice (n = 7–9 mice per group). Open bars: wild-type mice, hatched bars: PPAR $\alpha$ -null mice. NA: not available. \*: p < 0.05 for CL vs. DMSO; \*\*: p < 0.01; \*\*\*: p < 0.001. \$: p < 0.05 for PPAR $\alpha$ -null vs. wild type; \$\$: p < 0.01; \$\$\$: p < 0.001.



#### 4. DISCUSSION

Understanding the role of brown and brite adipocytes in humans may result in strategies aimed at dissipating the energy surplus and improving metabolism in obesity and related disorders. Little is known about the metabolic adaptations during white-to-brite adipocyte conversion. Herein, we investigated the molecular and metabolic changes following chronic PPAR $\gamma$  or PPAR $\alpha$  activation of human mature white adipocytes. Our results robustly show that PPAR agonists are able to promote white-to-brite conversion as shown by a sharp induction of UCP1 as well as numerous thermogenic genes and brite adipocyte markers. DNA microarray experiments reveal that these agonists drive profound changes in energy metabolism. Britening promotes higher mitochondrial oxygen consumption which is associated with enhanced fatty acid anabolism and catabolism whereas glucose oxidation is diminished. Instead, glucose utilization is redirected towards glyceroneogenesis and favors triglyceride synthesis. The shift from glucose to fatty acid as preferential energy substrate is partly mediated by the metabolic switch PDK4. *In vivo*, PPAR $\alpha$ -null mice display altered UCP1 and PDK4 induction in inguinal WAT in response to  $\beta_3$ -adrenergic agonist-induced britening.

The brown identity of a fat cell relies on its capacity to sustain thermogenesis *i.e.*, to possess high mitochondrial oxidative capacities associated with activation of the *bona fide* uncoupling protein, UCP1. Here, we report that human mature white adipocytes can acquire these brown fat cell properties upon PPAR $\gamma$  or PPAR $\alpha$  activation. In addition to the upregulation of genes that characterize both brown and brite adipocytes compared to white fat cells, other markers have been identified in mouse studies to distinguish the brite from the brown cell type. Defining the molecular signature of human UCP1-positive adipocytes using murine brite-specific genes led to conflicting results reporting either classical brown [45–47] or brite [19,27,48] profiles, which may depend on the depth in the adipose depot considered [49]. These data were inferred from gene expression measurements in fat biopsies or in precursor cells differentiated *in vitro* in either white or brown/brite adipocytes. The profile of human mature white adipocytes converted into brown/brite cells has not been explored so far although this mechanism contributes *in vivo* to a great extent to the appearance of brite adipocytes in the mouse inguinal WAT depot [20,21]. Here, we provide evidence that human mature white adipocytes are capable of switching towards a brite phenotype since higher expression of brite markers is observed while classical brown genes are not regulated or poorly expressed.

PPAR $\gamma$  and PPAR $\alpha$  have well established roles in driving adipogenesis/triglyceride storage and fatty acid oxidation, respectively, in fat cells [50]. PPAR $\gamma$  role in brown fat cell differentiation has been extensively studied. The contribution of PPAR $\alpha$ , besides the regulation of fat utilization genes, is more elusive. Our data suggest that, in human white fat cells, PPAR $\gamma$  and PPAR $\alpha$  agonists have the same britening efficiency, as demonstrated by the wide overlap of regulated genes and by the absence of noticeable difference between the two treatments in any of the parameters investigated. The requirement of PPAR $\alpha$  for WAT britening is confirmed in PPAR $\alpha$ -null mice which display a disrupted induction of thermogenic and brite markers in the inguinal fat depot upon  $\beta_3$ -adrenergic agonist treatment. Our results support the findings that direct [32,33] or indirect [51,52] PPAR $\alpha$  activation in murine WAT and cultured white adipocytes promotes britening. Contrasting with WAT, we show that BAT response to CL316,243 treatment is similar in WT and PPAR $\alpha$ -null mice, which stresses that PPAR $\alpha$  is dispensable for activation of BAT as previously suggested [53]. These mechanistic differences between WAT britening and BAT activation further highlight

the need for suitable human cell models of white-to-brite conversion such as hMADS cells [54].

Classical detection of BAT activity *in vivo* relies on its capacity to take up high amounts of glucose in response to sympathetic stimulation. Unexpectedly, our data report a slight but significant lower basal glucose uptake in human brite adipocytes associated with a down-regulation of GLUT1 mRNA and protein levels. GLUT1 expression and basal glucose transport are highly correlated, further supporting the importance of GLUT1 in basal glucose uptake of hMADS adipocytes. In response to insulin, the magnitude of glucose uptake increase is the same in white and brite adipocytes, showing that insulin sensitivity is preserved. Differentiation of WAT precursor cells into brown-like fat cells has been associated with increased or decreased basal glucose uptake and GLUT1 expression, suggesting that browning and glucose uptake are not necessarily linked [55,56].

Britening of human white adipocytes is associated with an inhibition of carbohydrate oxidation and an upregulation of PDK4. These findings are consistent with the recent report by Loft et al. revealing that knockdown of the transcription factor KLF11 in hMADS adipocytes simultaneously impairs PPAR $\gamma$ -mediated browning and PDK4 upregulation [30]. Our *in vivo* data show that britening of WAT triggers sharp PDK4 mRNA and protein upregulation. Conversely, impaired britening in CL316,243-treated PPAR $\alpha$ -null mice is associated with lower PDK4 induction. PDK4 activity inhibits glucose-derived substrate oxidation through phosphorylation-mediated inactivation of the PDH complex. Consequently, PDH activity is blunted [57], making glucose available for energy substrate replenishment rather than for oxidation [58,59]. Pyruvate is redirected towards glyceroneogenesis to provide glycerol-3-phosphate backbone for fatty acid esterification [60]. Accordingly, glyceroneogenesis, the main glycerol-producing pathway in adipocytes [61], and its essential enzyme PCK1 are strongly induced during britening of human adipocytes. Concurrently, other glycerol-3-phosphate-producing pathways are activated *i.e.*, glycerol-3-phosphate dehydrogenase and glycerol kinase pathways. Interestingly, while PPAR $\alpha$  in liver controls glycerol uptake and conversion into glucose [62], our results show that britening of white adipocytes is associated with activation of glucose-derived glycerol production and release. This suggests a PPAR $\alpha$ -controlled *in vivo* metabolic crosstalk between adipose tissue and liver. PPAR $\alpha$  may control the britening of white adipocytes leading to enhanced glycerol release, which in turn can be used by the liver as a neoglucogenic substrate, another PPAR $\alpha$ -activated pathway. Additionally, we find that fatty acid esterification, lipolysis and fatty acid oxidation are simultaneously enhanced after britening both at the molecular and functional levels. The stimulation of both fatty acid esterification and degradation activates a futile triglyceride/fatty acid cycle contributing to intracellular fatty acid use and leading to a fine tuning of metabolic fluxes [61,63,64]. This mechanism may prevent an excessive release of fatty acids from fat depots known to promote lipotoxicity and insulin resistance. Importantly, these combined metabolic adaptations occur in the absence of changes in triglyceride content, and thus may not aggravate obesity at the whole-organism level.

As glucose is spared to supply replenishing pathways with britening, fatty acids become the favorite substrate for mitochondrial oxidation. This is demonstrated by higher fatty acid oxidation in brite adipocytes, whose induction is inhibited when glucose availability for oxidation is restored after PDK4 knockdown. It is noteworthy that the higher basal oxygen consumption in brite adipocytes returns to control value when fatty acid oxidation is prevented by etomoxir, further supporting the affinity of brite cells for fatty acids as mitochondrial substrates. These results are in agreement with *in vivo* findings showing that mice

treated with a  $\beta_3$ -adrenergic agonist exhibit higher whole-body fatty acid oxidation and lower respiratory quotient, indicative of a metabolic switch towards fat oxidation [65]. Furthermore, mice treated with niacin in order to block lipolysis show an altered thermogenic response, suggesting that fatty acids are the main energy source for thermogenesis in activated rodent BAT [59]. Consistent with mice data, clinical studies report a rapid decrease of BAT triglyceride content in cold-exposed patients, further pointing to fatty acids as the major energy substrates supplying thermogenic cells [66,67]. As it seems that cold-induced fatty acid oxidative metabolism in BAT is not impaired in type 2 diabetic patients [68], increasing the thermogenic capacity by white-to-brite adipocyte conversion appears as a valuable strategy.

## 5. CONCLUSION

Collectively, our results demonstrate for the first time that human mature white adipocytes can be converted into brite cells expressing thermogenic markers and displaying a wide metabolic reprogramming. We identified PDK4 as a crucial mediator redirecting glucose towards triglyceride synthesis, thereby favoring fatty acid use as energy substrate for uncoupling mitochondria. Human brite adipocytes are endowed with higher capacity for intra-adipose fatty acid oxidation and thus could be targeted to diminish fatty acid plasma level and their storage into ectopic insulin-sensitive tissues, in order to prevent obesity-associated insulin resistance and type 2 diabetes.

## ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge Frédéric Martins and Jean-José Maoret (Get-TQ transcriptomics facility) from the Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases (I2MC, Toulouse). We also thank Arnaud Polizzi (UMR1331 ToxAlim, Toulouse) for excellent technical assistance and Colette Bétoulières (UMR1331 ToxAlim, Toulouse) for mouse breeding and care. The authors also acknowledge the Cytomed Platform from IRCAN (Nice).

D.L. is a member of Institut Universitaire de France.

This work was supported by Inserm, CNRS, EU FP7 project DIABAT (HEALTH-F2-2011-278373), French Agence Nationale de la Recherche (ANR-10-BLAN-1105 miRBAT and ANR-12-BSV1-0025Obelip) and Région Midi-Pyrénées.

## CONFLICT OF INTEREST

None declared.

## APPENDIX A. SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmet.2016.03.002>.

## 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] 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. *The New England Journal of Medicine* 360:1509–1517.
- [4] 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. *The New England Journal of Medicine* 360:1500–1508.
- [5] Virtanen, K.A., Lidell, M.E., Orava, J., Heglind, M., Westergren, R., Niemi, T., et al., 2009. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *The New England Journal of Medicine* 360:1518–1525.
- [6] Schrauwen, P., van Marken Lichtenbelt, W.D., Spiegelman, B.M., 2015. The future of brown adipose tissues in the treatment of type 2 diabetes. *Diabetologia* 58:1704–1707.
- [7] Barbatelli, G., Murano, I., Madsen, L., Hao, Q., Jimenez, M., Kristiansen, K., et al., 2010. The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte trans-differentiation. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 298:E1244–E1253.
- [8] Cousin, B., Cinti, S., Morrioni, M., Raimbault, S., Ricquier, D., Penicaud, L., et al., 1992. Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: molecular and morphological characterization. *Journal of Cell Science* 103(Pt 4):931–942.
- [9] Young, P., Arch, J.R., Ashwell, M., 1984. Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse. *FEBS Letters* 167:10–14.
- [10] Guerra, C., Koza, R.A., Yamashita, H., Walsh, K., Kozak, L.P., 1998. Emergence of brown adipocytes in white fat in mice is under genetic control. Effects on body weight and adiposity. *Journal of Clinical Investigation* 102:412–420.
- [11] Himms-Hagen, J., Melnyk, A., Zingaretti, M.C., Ceresi, E., Barbatelli, G., Cinti, S., 2000. Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 279:C670–C681.
- [12] Nagase, I., Yoshida, T., Kumamoto, K., Umekawa, T., Sakane, N., Nikami, H., et al., 1996. Expression of uncoupling protein in skeletal muscle and white fat of obese mice treated with thermogenic beta 3-adrenergic agonist. *Journal of Clinical Investigation* 97:2898–2904.
- [13] Rosell, M., Kafrou, M., Frontini, A., Okolo, A., Chan, Y.W., Nikolopoulou, E., et al., 2014. Brown and white adipose tissues: intrinsic differences in gene expression and response to cold exposure in mice. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 306:E945–E964.
- [14] Walden, T.B., Hansen, I.R., Timmons, J.A., Cannon, B., Nedergaard, J., 2012. Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, “brite,” and white adipose tissues. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 302:E19–E31.
- [15] Frontini, A., Cinti, S., 2010. Distribution and development of brown adipocytes in the murine and human adipose organ. *Cell Metabolism* 11:253–256.
- [16] Cohen, P., Levy, J.D., Zhang, Y., Frontini, A., Kolodin, D.P., Svensson, K.J., et al., 2014. Ablation of PRDM16 and beige adipose causes metabolic dysfunction and a subcutaneous to visceral fat switch. *Cell* 156:304–316.
- [17] Seale, P., Conroe, H.M., Estall, J., Kajimura, S., Frontini, A., Ishibashi, J., et al., 2011. Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *Journal of Clinical Investigation* 121:96–105.
- [18] 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.
- [19] Wu, J., Bostrom, P., Sparks, L.M., Ye, L., Choi, J.H., Giang, A.H., et al., 2012. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* 150:366–376.
- [20] Lee, Y.H., Petkova, A.P., Konkar, A.A., Granneman, J.G., 2015. Cellular origins of cold-induced brown adipocytes in adult mice. *FASEB Journal* 29:286–299.
- [21] Rosenwald, M., Perdikari, A., Rulicke, T., Wolfrum, C., 2013. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nature Cell Biology* 15:659–667.
- [22] Frontini, A., Vitali, A., Perugini, J., Murano, I., Romiti, C., Ricquier, D., et al., 2013. White-to-brown transdifferentiation of omental adipocytes in patients

- affected by pheochromocytoma. *Biochimica et Biophysica Acta* 1831:950–959.
- [23] Sidossis, L.S., Porter, C., Saraf, M.K., Borsheim, E., Radhakrishnan, R.S., Chao, T., et al., 2015. Browning of subcutaneous white adipose tissue in humans after severe adrenergic stress. *Cell Metabolism* 22:219–227.
- [24] Ahfeldt, T., Schinzel, R.T., Lee, Y.K., Hendrickson, D., Kaplan, A., Lum, D.H., et al., 2012. Programming human pluripotent stem cells into white and brown adipocytes. *Nature Cell Biology* 14:209–219.
- [25] Boulet, N., Esteve, D., Bouloumie, A., Galitzky, J., 2013. Cellular heterogeneity in superficial and deep subcutaneous adipose tissues in overweight patients. *Journal of Physiology and Biochemistry* 69:575–583.
- [26] Lee, J.Y., Hashizaki, H., Goto, T., Sakamoto, T., Takahashi, N., Kawada, T., 2011. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  enhances fatty acid oxidation in human adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 407:818–822.
- [27] Shinoda, K., Luijten, I.H., Hasegawa, Y., Hong, H., Sonne, S.B., Kim, M., et al., 2015. Genetic and functional characterization of clonally derived adult human brown adipocytes. *Nature Medicine* 21:389–394.
- [28] Xue, R., Lynes, M.D., Dreyfuss, J.M., Shamsi, F., Schulz, T.J., Zhang, H., et al., 2015. Clonal analyses and gene profiling identify genetic biomarkers of the thermogenic potential of human brown and white preadipocytes. *Nature Medicine* 21:760–768.
- [29] 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.
- [30] Loft, A., Fors, I., Siersbaek, M.S., Schmidt, S.F., Larsen, A.S., Madsen, J.G., et al., 2015. Browning of human adipocytes requires KLF11 and reprogramming of PPAR $\gamma$  superenhancers. *Genes & Development* 29:7–22.
- [31] Pisani, D.F., Djedaini, M., Beranger, G.E., Elabd, C., Scheidele, M., Ailhaud, G., et al., 2011. Differentiation of human adipose-derived stem cells into “brite” (brown-in-white) adipocytes. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)* 2:87.
- [32] Hondares, E., Rosell, M., Diaz-Delfin, J., Olmos, Y., Monsalve, M., Iglesias, R., et al., 2011. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) induces PPAR $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) gene expression and contributes to thermogenic activation of brown fat: involvement of PRDM16. *Journal of Biological Chemistry* 286:43112–43122.
- [33] Rachid, T.L., Penna-de-Carvalho, A., Bringham, I., Aguilu, M.B., Mandarim-de-Lacerda, C.A., Souza-Mello, V., 2015. Fenofibrate (PPAR $\alpha$  agonist) induces beige cell formation in subcutaneous white adipose tissue from diet-induced male obese mice. *Molecular and Cellular Endocrinology* 402:86–94.
- [34] Hondares, E., Mora, O., Yubero, P., Rodriguez de la Concepcion, M., Iglesias, R., Giralt, M., et al., 2006. Thiazolidinediones and rexinoids induce peroxisome proliferator-activated receptor-coactivator (PGC)-1 $\alpha$  gene transcription: an autoregulatory loop controls PGC-1 $\alpha$  expression in adipocytes via peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivation. *Endocrinology* 147:2829–2838.
- [35] Petrovic, N., Walden, T.B., Shabalina, I.G., Timmons, J.A., Cannon, B., Nedergaard, J., 2010. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) 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.
- [36] Pisani, D.F., Ghandour, R.A., Beranger, G.E., Le Faouder, P., Chambard, J.C., Giroud, M., et al., 2014. The omega6-fatty acid, arachidonic acid, regulates the conversion of white to brite adipocyte through a prostaglandin/calcium mediated pathway. *Molecular Metabolism* 3:834–847.
- [37] Brown, P.J., Stuart, L.W., Hurley, K.P., Lewis, M.C., Winegar, D.A., Wilson, J.G., et al., 2001. Identification of a subtype selective human PPAR- $\alpha$  agonist through parallel-array synthesis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 11:1225–1227.
- [38] Seimandi, M., Lemaire, G., Pillon, A., Perrin, A., Carlván, I., Voegel, J.J., et al., 2005. Differential responses of PPAR $\alpha$ , PPAR $\delta$ , and PPAR $\gamma$  reporter cell lines to selective PPAR synthetic ligands. *Analytical Biochemistry* 344:8–15.
- [39] Klimcakova, E., Roussel, B., Marquez-Quinones, A., Kovacova, Z., Kovacikova, M., Combes, M., et al., 2011. Worsening of obesity and metabolic status yields similar molecular adaptations in human subcutaneous and visceral adipose tissue: decreased metabolism and increased immune response. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 96:E73–E82.
- [40] Huang da, W., Sherman, B.T., Lempicki, R.A., 2009. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols* 4:44–57.
- [41] Ribet, C., Montastier, E., Valle, C., Bezaire, V., Mazzucotelli, A., Mairal, A., et al., 2010. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  control of lipid and glucose metabolism in human white adipocytes. *Endocrinology* 151:123–133.
- [42] Bezaire, V., Mairal, A., Ribet, C., Lefort, C., Grousse, A., Jocken, J., et al., 2009. Contribution of adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase to lipolysis in hMADS adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 284:18282–18291.
- [43] Grousse, A., Tavernier, G., Valle, C., Moro, C., Mejhert, N., Dinel, A.L., et al., 2013. Partial inhibition of adipose tissue lipolysis improves glucose metabolism and insulin sensitivity without alteration of fat mass. *PLOS Biology* 11:e1001485.
- [44] Montagner, A., Polizzi, A., Fouche, E., Ducheix, S., Lippi, Y., Lasserre, F., et al., 2016. Liver PPAR $\alpha$  is crucial for whole-body fatty acid homeostasis and is protective against NAFLD. *Gut*.
- [45] Cypess, A.M., White, A.P., Vernochet, C., Schulz, T.J., Xue, R., Sass, C.A., et al., 2013. Anatomical localization, gene expression profiling and functional characterization of adult human neck brown fat. *Nature Medicine* 19:635–639.
- [46] Jespersen, N.Z., Larsen, T.J., Pejls, L., Dagaard, S., Homoe, P., Loft, A., et al., 2013. A classical brown adipose tissue mRNA signature partly overlaps with brite in the supraclavicular region of adult humans. *Cell Metabolism* 17:798–805.
- [47] Lidell, M.E., Betz, M.J., Dahlqvist Leinhard, O., Heglund, M., Elander, L., Slawik, M., et al., 2013. Evidence for two types of brown adipose tissue in humans. *Nature Medicine* 19:631–634.
- [48] Sharp, L.Z., Shinoda, K., Ohno, H., Scheel, D.W., Tomoda, E., Ruiz, L., et al., 2012. Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells. *PLOS One* 7:e49452.
- [49] Nedergaard, J., Cannon, B., 2013. How brown is brown fat? It depends where you look. *Nature Medicine* 19:540–541.
- [50] Christodoulides, C., Vidal-Puig, A., 2010. PPARs and adipocyte function. *Molecular and Cellular Endocrinology* 318:61–68.
- [51] Bostrom, P., Wu, J., Jedrychowski, M.P., Korde, A., Ye, L., Lo, J.C., et al., 2012. A PGC1- $\alpha$ -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* 481:463–468.
- [52] Roberts, L.D., Bostrom, P., O’Sullivan, J.F., Schinzel, R.T., Lewis, G.D., Dejam, A., et al., 2014. beta-Aminoisobutyric acid induces browning of white fat and hepatic beta-oxidation and is inversely correlated with cardiometabolic risk factors. *Cell Metabolism* 19:96–108.
- [53] Kersten, S., Seydoux, J., Peters, J.M., Gonzalez, F.J., Desvergne, B., Wahli, W., 1999. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  mediates the adaptive response to fasting. *Journal of Clinical Investigation* 103:1489–1498.
- [54] Beranger, G.E., Karbiener, M., Barquissau, V., Pisani, D.F., Scheidele, M., Langin, D., et al., 2013. In vitro brown and “brite”/“beige” adipogenesis: human cellular models and molecular aspects. *Biochimica et Biophysica Acta* 1831:905–914.

- [55] Gburcik, V., Cleasby, M.E., Timmons, J.A., 2013. Loss of neuronatin promotes “browning” of primary mouse adipocytes while reducing Glut1-mediated glucose disposal. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 304:E885–E894.
- [56] Mossenbock, K., Vegiopoulos, A., Rose, A.J., Sijmonsma, T.P., Herzig, S., Schafmeier, T., 2014. Browning of white adipose tissue uncouples glucose uptake from insulin signaling. *PLOS One* 9:e110428.
- [57] Komatsu, M., Tong, Y., Li, Y., Nakajima, T., Li, G., Hu, R., et al., 2010. Multiple roles of PPARalpha in brown adipose tissue under constitutive and cold conditions. *Genes Cells* 15:91–100.
- [58] Hao, Q., Yadav, R., Basse, A.L., Petersen, S., Sonne, S.B., Rasmussen, S., et al., 2015. Transcriptome profiling of brown adipose tissue during cold exposure reveals extensive regulation of glucose metabolism. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 308:E380–E392.
- [59] Labbe, S.M., Caron, A., Bakan, I., Laplante, M., Carpentier, A.C., Lecomte, R., et al., 2015. In vivo measurement of energy substrate contribution to cold-induced brown adipose tissue thermogenesis. *FASEB Journal* 29:2046–2058.
- [60] Cadoudal, T., Distel, E., Durant, S., Fouque, F., Blouin, J.M., Collinet, M., et al., 2008. Pyruvate dehydrogenase kinase 4: regulation by thiazolidinediones and implication in glyceroneogenesis in adipose tissue. *Diabetes* 57:2272–2279.
- [61] Nye, C., Kim, J., Kalhan, S.C., Hanson, R.W., 2008. Reassessing triglyceride synthesis in adipose tissue. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 19:356–361.
- [62] Patsouris, D., Mandard, S., Voshol, P.J., Escher, P., Tan, N.S., Havekes, L.M., et al., 2004. PPARalpha governs glycerol metabolism. *Journal of Clinical Investigation* 114:94–103.
- [63] Guan, H.P., Li, Y., Jensen, M.V., Newgard, C.B., Steppan, C.M., Lazar, M.A., 2002. A futile metabolic cycle activated in adipocytes by antidiabetic agents. *Nature Medicine* 8:1122–1128.
- [64] Mazzucotelli, A., Viguierie, N., Tiraby, C., Annicotte, J.S., Mairal, A., Klimcakova, E., et al., 2007. The transcriptional coactivator peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)gamma coactivator-1 alpha and the nuclear receptor PPAR alpha control the expression of glycerol kinase and metabolism genes independently of PPAR gamma activation in human white adipocytes. *Diabetes* 56:2467–2475.
- [65] Berbee, J.F., Boon, M.R., Khedoe, P.P., Bartelt, A., Schlein, C., Worthmann, A., et al., 2015. Brown fat activation reduces hypercholesterolaemia and protects from atherosclerosis development. *Nature Communications* 6:6356.
- [66] Baba, S., Jacene, H.A., Engles, J.M., Honda, H., Wahl, R.L., 2010. CT Hounsfield units of brown adipose tissue increase with activation: preclinical and clinical studies. *Journal of Nuclear Medicine* 51:246–250.
- [67] Ouellet, V., Labbe, S.M., Blondin, D.P., Phoenix, S., Guerin, B., Haman, F., et al., 2012. Brown adipose tissue oxidative metabolism contributes to energy expenditure during acute cold exposure in humans. *Journal of Clinical Investigation* 122:545–552.
- [68] Blondin, D.P., Labbe, S.M., Noll, C., Kunach, M., Phoenix, S., Guerin, B., et al., 2015. Selective impairment of glucose but not fatty acid or oxidative metabolism in brown adipose tissue of subjects with type 2 diabetes. *Diabetes* 64: 2388–2397.

## Résultats complémentaires

### Résultats de l'analyse des puces à ADN

Le but du microarray est d'identifier les gènes dont l'expression est spécifiquement contrôlée par PPAR $\alpha$  ou PPAR $\gamma$ , ou par les deux à la fois. L'analyse statistique des résultats du microarray révèle que parmi l'ensemble des gènes significativement régulés par la rosiglitazone, 265 ont une expression augmentée et 210 ont une expression diminuée par rapport aux adipocytes blancs. En comparaison, le GW7647 induit la sur-expression de 470 gènes et la sous-expression de 209 gènes. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux gènes dont l'expression est soit augmentée, soit diminuée de plus de 3 fois par rapport aux adipocytes blancs. Parmi eux, 105 gènes pour la rosiglitazone et 64 pour le GW7647 ont une expression augmentée d'un facteur supérieur ou égal à 3. Seulement 14 pour la rosiglitazone et 4 pour le GW7647 ont une diminution de leur expression qui dépasse ce seuil. De plus, aucun gène n'est diminué de plus de 5 fois. (Figure 30).

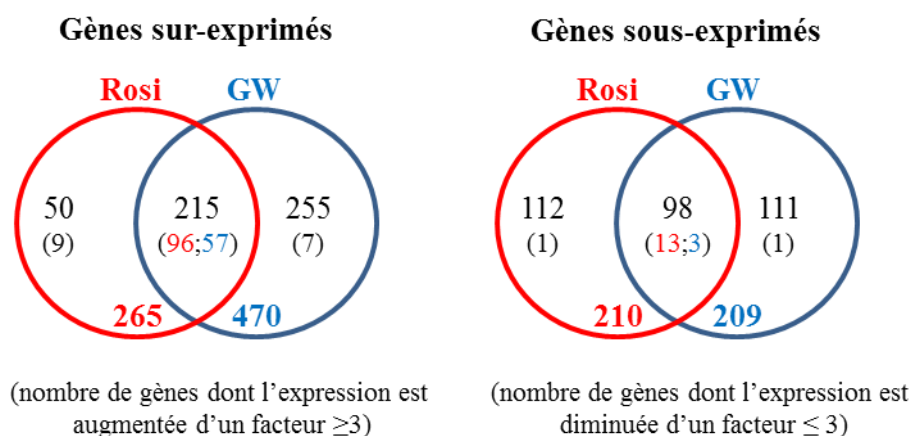


Figure 30 : Diagramme de Venn

Diagramme de Venn des gènes dont l'expression est significativement augmentée ou diminuée en réponse aux traitements par des agonistes de PPAR $\gamma$  (Rosiglitazone) ou PPAR $\alpha$  (GW7647) par rapport aux cellules non traitées. Le nombre de gènes dont l'expression est augmentée ou diminuée d'un facteur supérieur ou égal à 3 par les traitements est indiqué entre parenthèses.

La plupart des gènes dont l'expression est augmentée de plus de trois fois le sont par les deux traitements. Ces gènes font partie de ceux avec le niveau d'induction le plus fort, et pour certains, leur profil d'expression a été confirmé par qPCR. (Voir figure 1). Au contraire, les gènes dont l'expression est uniquement induite par l'un ou l'autre agoniste le sont généralement avec un faible niveau. Nous avons ensuite recherché, parmi la liste de gènes dont l'expression est augmentée, les processus biologiques enrichis en interrogeant la base de données DAVID.



La plupart des processus biologiques qui sont significativement enrichis sont communs aux deux traitements, et sont ceux avec les p-values les plus élevées. Dans ces processus biologiques surreprésentés, on trouve principalement le métabolisme des lipides, le métabolisme mitochondrial et le processus de différenciation des adipocytes bruns (cf. Table 1 de l'article).

<b>Processus biologiques représentés dans les gènes augmentés par la rosiglitazone (265 gènes)</b>	<b>Nombre de gènes</b>	<b>p value</b>
GO:0051188~processus de biosynthèse des cofacteurs	8	3,96E-02
GO:0046463~processus de biosynthèse des acylglycérols	4	4,67E-02
GO:0046460~processus de biosynthèse des lipides neutres	4	4,67E-02
GO:0006766~processus métabolique des vitamines	7	4,94E-02

<b>Processus biologiques représentés dans les gènes augmentés par le GW7647 (470 gènes)</b>	<b>Nombre de genes</b>	<b>p value</b>
GO:0055114~oxydation-réduction	53	2,79E-11
GO:0016054~processus catabolique des acides organiques	18	4,86E-07
GO:0046395~processus catabolique des acides carboxyliques	18	4,86E-07
GO:0006091~génération de précurseurs métaboliques et énergétiques	27	1,51E-05
GO:0051186~processus métabolique des cofacteurs	16	1,35E-02
GO:0006732~processus métabolique des coenzymes	14	1,34E-02
GO:0006006~processus métabolique du glucose	14	1,34E-02
GO:0016053~processus de biosynthèse des acides organiques	14	1,44E-02
GO:0046394~processus de biosynthèse des acides carboxyliques	14	1,44E-02
GO:0045017~processus de biosynthèse des glycérolipides	10	1,65E-02
GO:0007005~organisation mitochondriale	13	1,66E-02
GO:0046486~processus métabolique des glycérolipides	14	1,83E-02
GO:0006839~transport mitochondrial	9	2,44E-02
GO:0006695~processus de biosynthèse du cholestérol	6	3,05E-02
GO:0008203~processus métabolique du cholestérol	10	3,33E-02
GO:0019637~processus métabolique des organophosphates	15	3,37E-02
GO:0015838~transport de la bêtaïne	4	3,29E-02
GO:0015879~transport de la carnitine	4	3,29E-02
GO:0032365~transport intracellulaire des lipides	4	3,29E-02
GO:0010565~régulation des processus métaboliques des cétones	8	3,24E-02
GO:0006090~processus métabolique du pyruvate	7	3,47E-02
GO:0046320~régulation de l'oxydation des acides gras	6	3,32E-02

Tableau 8 : Processus biologiques enrichis d'après la base de données DAVID : analyse 1  
 Processus biologiques enrichis dans les hMADS traitées à la rosiglitazone ou au GW7647 établis à partir de la liste de gènes dont l'expression est augmentée par un traitement à la rosiglitazone ou au GW7647. Les processus communs aux deux traitements se trouvent dans la table 1 de l'article.

Etant donné que le GW7647 induit l'expression d'un plus grand nombre de gènes que la rosiglitazone, il est cohérent de trouver un plus grand nombre de processus biologiques surreprésentés. Cependant, il est important de mentionner que les analyses statistiques peuvent

conduire à des différences importantes du nombre de gènes significativement régulés, qui sont fonction de la structure de l'ensemble des données (variance) et des outils de normalisation utilisés. L'interprétation des résultats pour les gènes dont l'expression est faiblement augmentée ou diminuée doit être effectuée avec précaution. C'est le cas ici pour les gènes spécifiquement régulés par un seul agoniste. Parmi ceux qui ne sont pas communs avec la rosiglitazone, on trouve le métabolisme du glucose, du pyruvate et du glycérol et plusieurs processus liés à la biogenèse et à la fonction mitochondriales. Seuls 4 processus biologiques régulés par la rosiglitazone ne sont pas commun avec ceux du GW7647 (Tableau 8). Ces processus sont cohérents avec les fonctions connues de PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$  sur l'expression des gènes des métabolismes glucidique et lipidique.

Ensuite, nous avons refait les mêmes analyses avec la base de données DAVID sur la liste de gènes dont l'expression est diminuée (Tableau 9).

<b>Processus biologiques représentés dans les gènes augmentés par la rosiglitazone (210 gènes)</b>	<b>Nombre de gènes</b>	<b>p value</b>
GO:0042127~régulation de la prolifération cellulaire	26	7,45E-03
GO:0051235~maintien de la localisation	8	1,06E-02
GO:0030198~organisation de la matrice extracellulaire	9	1,73E-02
GO:0008285~régulation négative de la prolifération cellulaire	17	1,75E-02
GO:0010033~réponse aux substances organiques	23	2,74E-02
GO:0030036~organisation du cytosquelette d'actine	12	3,11E-02
GO:0030029~processus des filaments d'actines	12	4,66E-02
GO:0001568~développement des vaisseaux sanguins	12	4,67E-02

*Tableau 9: Processus biologiques enrichis d'après la base de données DAVID : analyse 2  
Processus biologiques enrichis dans les hMADS traitées à la Rosiglitazone établis à partir de la liste de gènes dont l'expression est diminuée par un traitement à la rosiglitazone.*

Parmi la liste des gènes diminués par un traitement à la rosiglitazone, les voies de régulation du cycle cellulaire et de l'organisation du cytosquelette d'actine sont significativement enrichies. Bien que l'activation de PPAR $\alpha$  diminue le même nombre de gènes que celle de PPAR $\gamma$ , la base de données DAVID ne met en évidence aucun processus biologique surreprésenté. Au vu de ces résultats, et étant donné le faible nombre de gènes sous-exprimés par rapport aux gènes sur-exprimés, nous nous sommes par la suite uniquement intéressés à l'expression des gènes et au métabolisme qui sont induits par les agonistes de PPAR $\gamma$  et de PPAR $\alpha$ .

***Production de lactate et de pyruvate à partir du glucose lors du brunissement des adipocytes blancs.***

Pour valider l'inhibition de l'activité de la PDH par la PDK4, nous avons mesuré la libération dans le milieu de culture des deux produits finaux de la glycolyse, le pyruvate et le lactate. Leurs concentrations ont été mesurées après une ou trois heures d'incubation dans un milieu exempt de pyruvate et lactate, supplémenté en glucose avec plus ou moins 100nM d'insuline. Nous avons choisi ces deux durées car elles correspondent à celles des expériences de transport du glucose et d'oxydation du pyruvate, respectivement. Sans surprise, l'ajout d'insuline multiplie par trois la quantité de lactate libérée dans le milieu de culture (Newby et al., 1988) (Figure 31). Entre une et trois heures d'incubation, les concentrations de lactate en conditions basales ou stimulées à l'insuline ont doublé. La concentration moyenne en lactate au bout d'une heure d'incubation est de 0,48 $\mu$ mol/mg de protéines en condition basale et de 1,6 $\mu$ mol/mg de protéines lors de la stimulation à l'insuline. Au bout de 3 heures, le niveau basal passe à 0,87  $\mu$ mol/mg de protéines, et 2,8 $\mu$ mol/mg de protéines lors de la stimulation à l'insuline. Les agonistes de PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$  n'ont quasiment aucun effet sur les quantités de lactate libérées par les cellules puisqu'on n'observe qu'une légère augmentation en condition stimulée à l'insuline au bout de 3 heures d'incubation dans les cellules traitées à la rosiglitazone ou au GW7647.

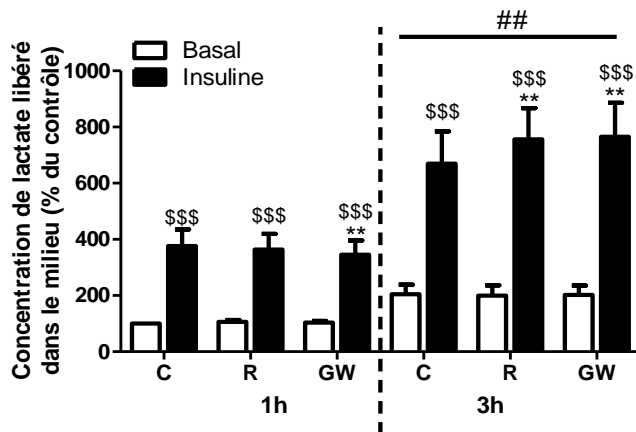


Figure 31 : Concentration de lactate dans le milieu après 1 ou 3 heures d'incubation  
 Concentration de lactate dans le milieu de culture après 1 ou 3 heures d'incubation dans un milieu de culture dépourvu de lactate et pyruvate et supplémenté avec 7,8mM de glucose. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la valeur des cellules contrôles non traitées  $\pm$  SEM. L'effet des traitements a été évalué par une ANOVA à deux voies. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \* C vs R/GW, \$ basale vs insuline, # 1heure vs 3heures,  $n=6$ .



Concernant le pyruvate, on observe aux deux durées d'incubation une augmentation significative de sa production dans les hMDAS traitées à la rosiglitazone et au GW7647 en présence d'insuline (Figure 32). La concentration moyenne en pyruvate est de 160 nmol/mg de protéines au bout d'une heure d'incubation et de 267 nmol/mg de protéines après 3 heures, en condition basale. Cette concentration monte à 275 nmol/mg de protéines à une heure et 477nmol/mg de protéines à trois heures lors de la stimulation à l'insuline. Cette augmentation des quantités extracellulaires du pyruvate est en accord avec nos résultats sur l'inhibition de l'activité du complexe PDH. Celui-ci ne pouvant pas entrer dans le cycle de Krebs, il est alors sécrété ou dirigé vers d'autres voies métaboliques. (cf. Fig. 3E et 3G de l'article)

Après 1 heure d'incubation, l'insuline multiplie par 4 le transport du glucose par rapport aux conditions non stimulées, or la quantité de pyruvate libérée dans le milieu de culture n'est multipliée que par 1,6. Cela confirme que le pyruvate issu de la glycolyse est utilisé par d'autres voies métaboliques, notamment par la voie de la glycéronéogenèse qui est induite lors du brunissement des hMADS (cf. Fig. 3H de l'article). Le reste du pyruvate qui n'est pas utilisé pour la synthèse de glycérol-3-phosphate pourrait être exporté hors des cellules, ou converti en lactate par la LDH $\alpha$  qui est augmentée par les deux traitements (Figure 33).

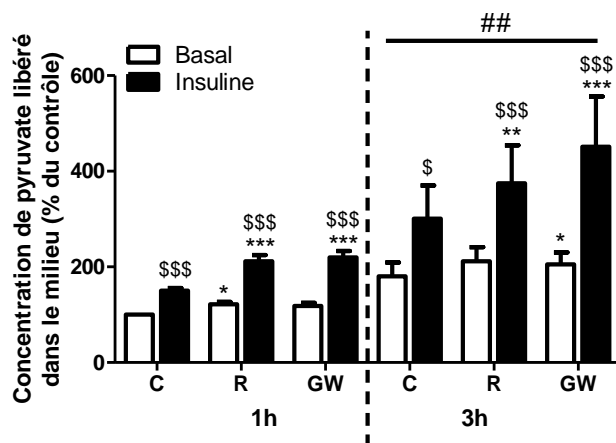


Figure 32 : Concentration de pyruvate dans le milieu après 1 ou 3 heures d'incubation  
 Concentration de pyruvate dans le milieu après 1 ou 3 heures d'incubation dans un milieu de culture dépourvu de lactate et pyruvate et supplémenté avec 7,8mM de glucose. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la valeur des cellules contrôles non traitées  $\pm$  SEM. L'effet des traitements a été évalué par une ANOVA à deux voies. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \* C vs R/GW, \$ basale vs insuline, # 1heure vs 3heures,  $n=6$ .

Enfin, nous avons vérifié que l'augmentation des concentrations extracellulaires de pyruvate et de lactate n'était pas due à une modification de l'expression de leurs transporteurs membranaires. Pour cela, nous avons mesuré l'expression génique du transporteur responsable

de leur export MCT4 par qPCR, qui n'est pas modifiée par les agonistes de PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$  (Figure 33).

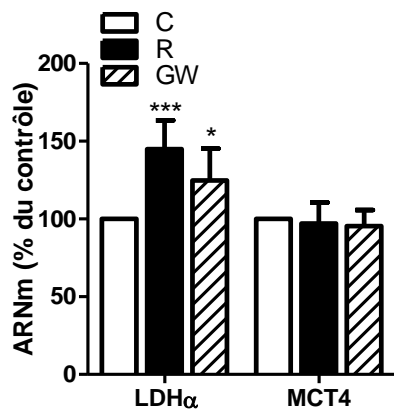


Figure 33 : Expression génique de la LDH $\alpha$  et MCT4.

Expression génique de la lactate déshydrogénase et du transporteur membranaire responsable de l'efflux du pyruvate et du lactate. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la valeur des cellules contrôles non traitées  $\pm$  SEM. L'effet des traitements a été évalué par une ANOVA à une voie. \* $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ,  $n=6$ .

Un article récent décrit le lactate comme étant capable d'induire le brunissement du TA blanc, une augmentation de l'expression d'UCP1 et des gènes mitochondriaux impliqués dans l'oxydation des acides gras. Les effets du lactate sur UCP1 passent par une activation du facteur de transcription PPAR $\gamma$  et une induction des transporteurs de lactate MCT (Carriere et al., 2014). Nous avons donc mesuré l'expression des gènes responsables de l'entrée du lactate dans la cellule, MCT1 et MCT2 (Figure 34).

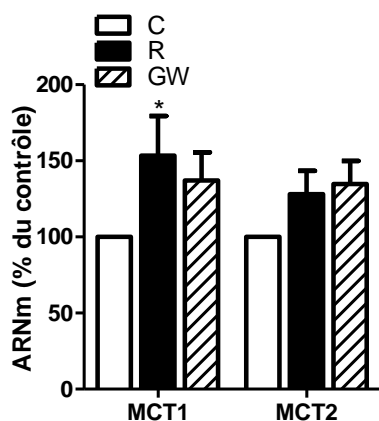


Figure 34 : Expression génique de MCT1 et MCT2.

Expression génique mesurée par qPCR des transporteurs membranaires responsables de l'entrée du pyruvate et du lactate. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la valeur des cellules contrôles non traitées  $\pm$  SEM. L'effet des traitements a été évalué par une ANOVA à une voie. \* $p < 0,05$ ,  $n=6$ .

Nos résultats montrent que le brunissement s'accompagne d'une tendance à l'augmentation de l'expression des transporteurs du lactate. L'absence de variation de la concentration en lactate dans le milieu de culture pourrait donc être liée à un recaptage de celui-ci, qui pourrait alors participer au brunissement par le mécanisme décrit ci-dessus (Carriere et al., 2014). Cependant, les concentrations que nous trouvons sont nettement inférieures à celles utilisées dans l'article pour induire le brunissement. Ainsi, les effets que nous observons sur l'expression génique dans les hMADS brunies sont probablement faiblement liés aux effets du lactate.

### *Expériences de compétition de substrat*

La flexibilité métabolique est la capacité de l'organisme à ajuster la consommation des substrats énergétiques en fonction de leur disponibilité, c'est à dire de basculer de l'oxydation des lipides à jeun à l'oxydation des glucides à l'état nourri, et vice versa. Dans les expériences précédentes, nous avons mesuré l'oxydation du pyruvate et de l'oléate en l'absence d'acides gras ou de glucose, respectivement.

Nous avons voulu savoir dans quelle mesure les cellules hMADS converties en adipocytes brites sont capables de changer de substrat lorsque les conditions nutritionnelles changent, notamment si elles continuent d'utiliser préférentiellement les acides gras même en présence de glucose dans le milieu. Pour cela, nous avons mesuré l'oxydation d'oléate en présence de concentrations croissantes de glucose de (0,1mM à 25mM) dans le milieu. Pour rappel, les cellules hMADS sont cultivées et différenciées dans un milieu contenant 7,8mM de glucose.

En l'absence de glucose ou avec de très faibles quantités de glucose dans le milieu (0,1mM), l'oxydation de l'oléate est doublée dans les hMADS traitées avec les agonistes de PPAR $\gamma$  et PPAR $\alpha$  par rapport aux adipocytes blancs. L'effet suppressif du glucose sur l'oxydation de l'oléate apparaît à 0,25mM de glucose. Avec les concentrations croissantes en glucose, on observe une diminution progressive de l'oxydation de l'oléate, à la fois dans les cellules contrôles et dans les cellules traitées avec les agonistes. Avec 25mM de glucose, l'oxydation de l'oléate est divisée par deux par rapport aux conditions sans glucose. Cependant, même à cette concentration de glucose et comme pour toutes les autres concentrations, l'oxydation de l'oléate n'est pas complètement inhibée et reste supérieure dans les adipocytes brites par rapport aux adipocytes blancs (Figure 35).

Donc, les cellules hMADs sont capables d'adapter leur métabolisme en fonction des différents substrats à leur disposition. Néanmoins, les cellules converties en adipocytes brites continuent

d'utiliser les acides gras comme source principale d'énergie même en présence de glucose. Ces résultats vont dans le sens du contrôle de l'activité de la PDH par la PDK4. En effet, l'activité des PDKs est inhibée lors d'une hausse des concentrations des produits finaux de la glycolyse, comme le pyruvate. Or PDK4, contrairement aux autres PDKs, est relativement insensible à cette répression par le pyruvate et peut donc diminuer l'activité de la PDH malgré des concentrations élevées en glucose. Ainsi, la forte augmentation de la protéine PDK4 par les agonistes de PPAR $\gamma$  et PPAR $\alpha$  semble être un mécanisme clé de la préférence des adipocytes brites pour les acides gras.

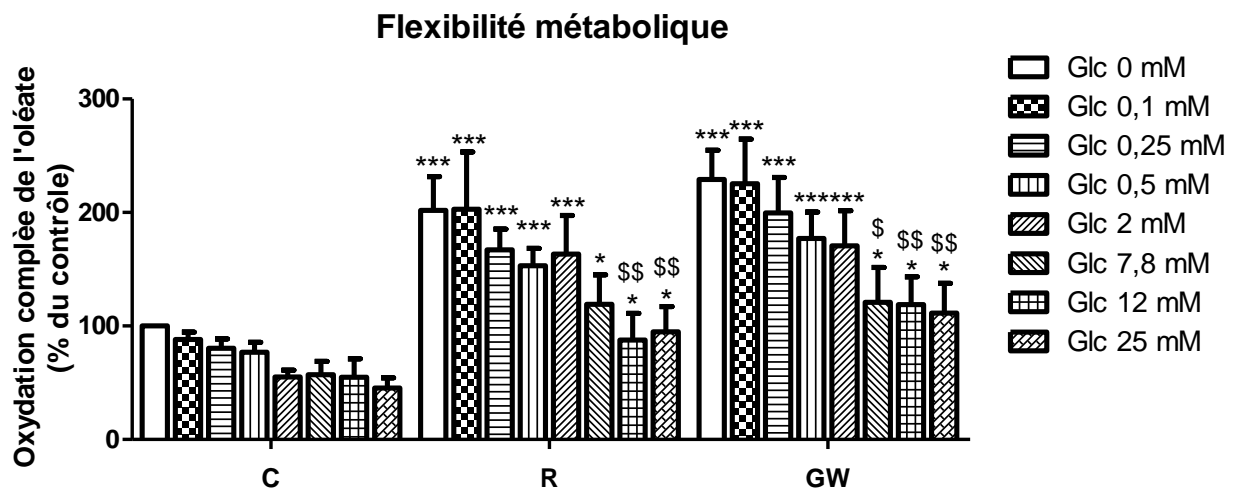


Figure 35 : Expérience de compétition de substrats.

L'oxydation de l'acide oléique est mesurée en présence de quantités croissantes de glucose de 0mM à 25mM. La mesure de l'oxydation pour une concentration de glucose donnée est réalisée indépendamment des autres. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la valeur des cellules contrôles à 0mM de glucose  $\pm$  SEM. L'effet des traitements a été évalué par une ANOVA à deux voies. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ , \* C vs R/GW, \$ 0mM de glucose vs X mM de glucose,  $n=7$ .

### Conséquences métaboliques de la perte de PDK4 dans les adipocytes brites

Pour vérifier le rôle de PDK4 dans ces changements métaboliques au profit de l'utilisation des acides gras, nous avons inhibé son expression par une méthode d'ARN interférent (siPDK4). Le siPDK4 entraîne une diminution de 70% de l'expression du messageur et de la protéine PDK4 (cf. Fig. 4A de l'article). Tout d'abord, nous avons examiné si la perte de PDK4 avait une répercussion sur les niveaux d'expression des gènes du brunissement (cf. Fig. 4B et S5B de l'article) et des autres PDKs. Le siDK4 n'affecte pas l'expression des gènes du brunissement, ni l'expression des autres PDKs

Au niveau du métabolisme, le siPDK4 restaure l'oxydation du pyruvate dans les cellules traitées avec les agonistes de PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$  (cf. Fig. 4C de l'article). En conséquence, les quantités

de lactate et de pyruvate libérées par les cellules brites et le routage du pyruvate vers la production de glycérol-3-phosphate sont diminuées (cf. Fig. 4D de l'article et Figure 36). En parallèle, l'augmentation de l'oxydation des acides gras dans les cellules brites est fortement compromise par le siPDK4. Ainsi, la perte de PDK4 restaure l'utilisation du glucose comme source d'énergie dans les cellules brites au niveau des cellules blanches.

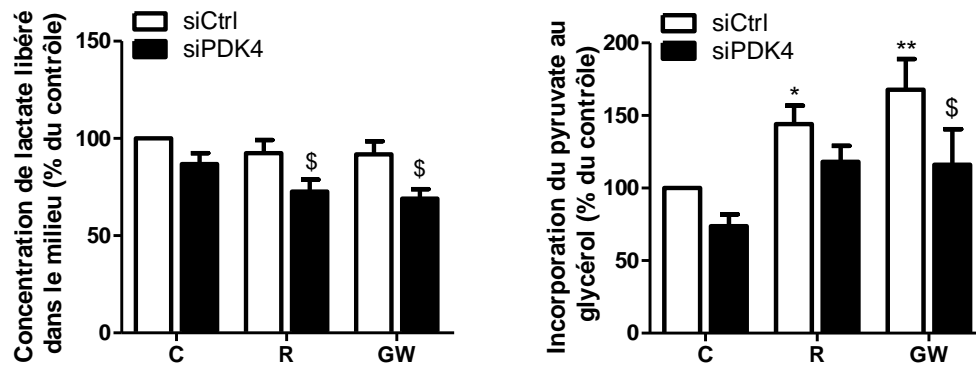


Figure 36 : Effets du siPDK4 sur le devenir du glucose.

(A) Concentration de lactate dans le milieu de culture après 3 heures d'incubation dans un milieu de culture dépourvu de lactate et pyruvate et supplémenté avec 7,8mM de glucose. (B) Incorporation du pyruvate dans le glycérol. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la valeur des cellules contrôles non traitées  $\pm$  SEM. L'effet des traitements a été évalué par une ANOVA à deux voies. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \* C vs R/GW, \$ siCtrl vs siPDK4,  $n=6$ .



## **ARTICLE 2**

### **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>

\$ Co-first

<sup>1</sup>University of Nice Sophia Antipolis, Nice, France.

<sup>2</sup>CNRS, iBV, UMR7277, Nice, France.

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

<sup>4</sup>Inserm, UMR1048, Obesity Research Laboratory, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, Toulouse, France.

<sup>5</sup>University of Toulouse, UMR1048, Paul Sabatier University, Toulouse, France.

<sup>6</sup>Centre Commun de Microscopie Appliquée, Microscopy and Imaging platform Côte d'Azur, Nice, France

<sup>7</sup>Department of Experimental and Clinical Medicine, University of Ancona (Politecnica Delle Marche), Italy

<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.

La mitochondrie est un organe essentiel des cellules eucaryotes. C'est le lieu de production de l'ATP et de la thermogénèse. Contrairement aux adipocytes blancs contenant peu de mitochondries, les adipocytes bruns sont très riches en mitochondries et expriment la protéine découplante UCP1 (Liesa and Shirihai, 2013). La conversion des adipocytes blancs en adipocytes bruns nécessite donc une biogénèse et un remodelage des fonctions mitochondriales. Dans ces adipocytes, la hausse de l'expression et de l'activité d'UCP1 est suivie d'une augmentation de l'activité mitochondriale et de la consommation d'oxygène afin de maintenir un niveau d'ATP suffisant malgré le fort découplage (Nedergaard et al., 2001; Shabalina et al., 2013).

Dans le premier article, nous nous étions concentrés sur les adaptations métaboliques lors de la conversion des adipocytes blancs en adipocytes bruns par les agonistes de PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$ . Or, ces deux agonistes augmentent l'expression de PGC1 $\alpha$ , le co-activateur clé de la mitochondriogénèse chez les mammifères. PGC1 $\alpha$  augmente l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans la respiration mitochondriale, l'expression des gènes de l'oxydation et la protéine découplante UCP1 (Mazzucotelli et al., 2007; Tiraby et al., 2003).

Dans cet article, nous avons donc étudié les changements de phénotype et de morphologie des mitochondries lors de la conversion des adipocytes blancs en adipocytes bruns. Nous avons repris le même modèle cellulaire (hMADS) et le même protocole brunissement que pour le premier article.



# **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>

\$ Co-first

<sup>1</sup>University of Nice Sophia Antipolis, Nice, France.

<sup>2</sup>CNRS, iBV, UMR7277, Nice, France.

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

<sup>4</sup>Inserm, UMR1048, Obesity Research Laboratory, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, Toulouse, France.

<sup>5</sup>University of Toulouse, UMR1048, Paul Sabatier University, Toulouse, France.

<sup>6</sup>Centre Commun de Microscopie Appliquée, Microscopy and Imaging platform Côte d'Azur, Nice, France

<sup>7</sup>Department of Experimental and Clinical Medicine, University of Ancona (Politecnica Delle Marche), Italy

<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.

\*Corresponding authors: Ez-Zoubir Amri, Institut de Biologie Valrose, Univ. Nice Sophia Antipolis, 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 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.

## Introduction.

Overweight and obesity are a consequence of energy imbalance leading to increased white fat mass. In this regard, promising targets for the treatment of human obesity are brown adipocytes [3, 7]. Upon stimulated conditions, these cells show high metabolic activity in both rodent and adult humans [1, 2, 4-6]. These thermogenically competent adipocytes constitute the brown adipose tissue (BAT), and are commonly named 'brite/beige' when occurring in white fat depots [8, 9]. The brown adipocytes found in human [10-13] display a molecular signature of either classical brown or brite/beige fat cells depending on their anatomical location [14-17].

Given the high amount of white adipose tissue (WAT) in humans, there is growing clinical interest in understanding how brite adipocytes develop within WAT, especially since their emergence in this tissue has been associated with a protection against obesity and metabolic dysfunctions in several rodent models [18-21]. These brite adipocytes stem either from progenitors or for a large proportion by direct conversion of mature white adipocytes [22-24]. This mechanism of conversion highlights the plasticity of adipocytes to adapt to specific physiological situation [25, 26]. In addition to classic thermogenic stimuli [27], brite adipocytes appear after long-term exposure to synthetic ligands of PPAR $\gamma$ , key activator of both white and brown adipocyte differentiation [28, 29]. This is conserved in humans, as "human Multipotent Adipose-Derived Stem" (hMADS) cells are able to convert into functional brite cells after rosiglitazone treatment [30-32], like *in vivo* rodent situation [22, 33]. As a unique *in vitro* human cell model, hMADS cells have allowed the characterization of various important mechanisms triggering white to brite adipocyte conversion. Mechanistically, it has been demonstrated that PPAR $\gamma$  ligands induce brown/brite-selective genes by directly activating PPAR $\gamma$  and a class of super-enhancers sustaining transactivation activity of PPAR $\gamma$  [34]. PGC1- $\alpha$  is another key protein associated with the browning process as it is involved in mitochondrial biogenesis and lipid oxidation. Fenofibrate activation of PPAR $\alpha$ , the key regulator of PGC1- $\alpha$ , induces brite adipocyte recruitment in white adipose tissue of mice [35], and long term exposure to GW7647, a PPAR $\alpha$  agonist, induces UCP1 expression during differentiation in hMADS cells [36].

Compared to white adipocytes, brown/brite adipocytes possess a high mitochondrial content and specifically express uncoupling protein 1 (UCP1), which allows a leak of protons and the uncoupling of the respiratory chain [37, 38]. This phenomenon results in a high oxidative capacity and a high level of energy expenditure leading to thermogenesis. Conversely, white adipocytes contain less mitochondria but their function is essential for adipocyte differentiation and function [39]. Mitochondria are dynamic organelles displaying morphological changes, such as mitochondriogenesis and fusion/fission events, which represent an adaptation to the needs of the cell [40]. The increased mass of mitochondria, important for brown adipocyte function, involves a coordinated interaction between the nuclear and mitochondrial genomes. One of the major controllers of this mitochondriogenesis is the mitochondrial transcription factor A (TFAM), associated to several other key components such as the mitochondrial endonuclease ENOG. However, mitochondria are continuously undergoing fusion and fission events. On one hand, conditions requiring high mitochondrial ATP synthesis are associated with mitochondrial elongation [40, 41]. On the other hand, bioenergetics stress induces mitochondrial fragmentation which may lead to apoptosis [40, 42]. However, mitochondrial fission may not be deleterious per se in brown adipocytes. Indeed, adrenergic stimulation of rodent brown adipocytes induces a deep change in mitochondrial architecture with a high rate of fragmentation [43, 44]. This mechanism favors enhanced mitochondrial uncoupling and energy expenditure capacity. Altogether these observations point out importance of mitochondrial biogenesis and dynamics in the function of brite and brown adipocytes.

The *in vivo* discrepancies between mice and humans regarding the amount and location of brite fat cells as well as the difficulty to routinely obtain human fresh samples, underline the need of human cell studies in order to decipher the mechanisms regulating brite adipocyte formation and activity [45]. Here, we characterized the mitochondrial properties during the conversion of human white to brite adipocytes using hMADS cell model. We found that human brite adipocyte mitochondria had enhanced capacity with a sustained fission process driven by DRP1.

## **Material and Methods.**

**Reagents.** Culture media and buffer solutions were purchased from Lonza Verviers (Verviers, Belgium), fetal bovine serum, insulin and trypsin from Invitrogen (Cergy Pontoise, France), hFGF2 from Peprotech (Neuilly sur Seine, France). Rosiglitazone was purchased from Cayman (Bertin Pharma, Montigny le bretonneux, France). FCCP, oligomycin, rotenone, antimycin-A, mdivi-1 and others culture reagents were from Sigma-Aldrich Chimie (Saint-Quentin Fallavier, France).

**hMADS cell culture.** The establishment and characterization of hMADS cells have been described [30, 46-48]. In the experiments reported herein, hMADS-3 cells deriving from the prepubic fat pad of a 4-month-old male were used. Cells were used between passages 14 and 25, 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 µg/ml penicillin, and 50 µg/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'sF12 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 isobutyl-methylxanthine removed) and 100 nM rosiglitazone were added. At day 9 rosiglitazone was withdrawn to enable white adipocyte differentiation. Rosiglitazone (100 nM) or GW7647 (300 nM) were added between days 14 and 18 to promote white to brite adipocyte conversion. Media were changed every other day and all cells were used at day 18.

**Western blot analysis.** Cells were lysed in TNET lysis buffer (25 mM Tris-Cl (pH 7.4), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.5% Nonidet P40, 1x protease inhibitor cocktail and 1x Phosphostop mix (Roche Diagnostics, Meylan, France)). Protein concentration was evaluated by BCA assay (PIERCE, Thermo Scientific, France) and blotted using SDS-PAGE basic protocol. Primary antibody incubation was performed overnight at 4°C (anti-UCP1, Calbiochem, #662045, dilution 1:750; and anti-β-tubulin,

Sigma #T5201, dilution 1:2000; anti-DRP1, Cell Signaling #5391, dilution 1:1000; anti-phosphoDRP1(ser616), Cell Signaling #4494, dilution 1:1000). Primary antibodies were detected with HRP-conjugated anti-rabbit or anti-mouse immunoglobulins (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). Detection was performed using Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore, Molsheim, France). OD band intensities were evaluated using PCBas Software and  $\beta$ -tubulin was used as loading reference.

For mitochondrial complex quantitation, equal amounts of cell proteins were separated using gradient SDS-PAGE (10-20%) and blotted onto nitrocellulose membranes. Saturated membranes were incubated overnight with a 1:1000 dilution of total OXPHOS human western blot antibody cocktail (#MS601, Mitosciences) followed by a 60 min incubation with HRP-conjugated anti-mouse immunoglobulins (#7076S, Cell Signaling Technology, dilution 1:10000). Chemiluminescence obtained after addition of Clarity ECL western blotting substrate (BioRad, Marnes-la-Coquette, France) was detected using a ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad) and quantified with Image Lab 5.0 software (Bio-Rad).

***Immunofluorescence analysis.*** Cells were fixed with PAF 4% for 10 min, permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 10 min, and then sequentially incubated with primary antibody overnight at 4°C in a humidified chamber (anti-UCP1, Calbiochem, #662045, dilution 1:100; anti-TIMM23, BD Biosciences #611222, dilution 1:500) and with the relevant secondary antibody coupled with Alexa 488 or Alexa 594 (Invitrogen, dilution 1:500) for 30min at RT. PBS wash was performed twice between all steps. Cells were finally mounted in Mowiol and visualized with an Axiovert microscope (Carl Zeiss, Le Pecq, France) under oil immersion and pictures were captured and treated with AxioVision software (Carl Zeiss).

***Isolation and analysis of RNA.*** These procedures were carried out according to MIQE recommendations [49]. Total RNA was extracted using TRI-Reagent kit (Euromedex, Souffelweyersheim, France) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was conducted as described previously [31]. Primer sequences are listed in Supplementary Table 1. The

expression of selected genes was normalized to that of TATA-box binding protein (TBP) and 36B4 housekeeping genes and then quantified using the comparative- $\Delta$ Ct method.

**DNA microarray analysis.** Total RNA from control and rosiglitazone- or GW7647-treated cells (n=4 for each condition) was extracted using a TRI-Reagent kit (Euromedex) and RNA quality was checked by capillary electrophoresis (Experion, Bio-Rad). Microarray experiments were performed using Agilent 4x44k v2 oligonucleotide arrays as previously described [50], which lead to the analysis of 12891 unique transcripts. Microarray data have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus and are accessible through GEO Series accession number GSE71293.

**Cytochrome c oxidase activity measurements.** Cells were disrupted using ULTRA TURRAX T25 in 10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA and 0.25 M sucrose containing protease inhibitors. Cell lysate was centrifuged at 750 g for 10 min, the supernatant was then centrifuged at 10 000 g for 20 min. The pellet corresponding to mitochondrial-enriched fraction was used to determine Cytochrome c Oxidase activity according to manufacturer's instructions (Cytochrome c Oxidase Assay kit, Sigma).

**Oxygen consumption analysis.** For respiration analysis, hMADS cells were seeded in 24 multi-well plate (Seahorse) and differentiated as described previously [34]. Oxygen consumption rate (OCR) of 18 day-old differentiated cells was determined using an XF24 Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience). Uncoupled and maximal OCR were determined using oligomycin (1.2  $\mu$ M) and FCCP (1  $\mu$ M). Rotenone and Antimycin-A (1  $\mu$ M each) were used to inhibit Complex I- and Complex III-dependent respiration respectively. All mitochondrial respiration parameters were calculated as described previously [51].

**Electron microscopy.** hMADS adipocytes were fixed in 1.6% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer. They were rinsed with cacodylate buffer, then post-fixed in osmium tetroxide (1%) and reduced with potassium ferricyanide for 1 h. After a water wash, cells

were dehydrated with several incubations of increasing amounts of ethanol and embedded in Epon resin. Eighty-nanometer sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate and then observed in an electron microscope (JEOL JEM 1400) operating at 100 kV.

***Statistical analysis.*** Data are expressed as mean values  $\pm$  SEM and were analyzed using InStat3 software (GraphPad Software, CA, USA). Data were analyzed by one-way ANOVA followed by a Student-Newman-Keuls post-test, or Student's t-test to assess any statistical differences between experimental groups. Differences were considered statistically significant when  $p < 0.05$ .



## Results.

### **Mitochondrial gene expression associated with hMADS brite adipocytes.**

hMADS cells are able to differentiate into white adipocytes and then to convert into functional brite adipocytes expressing the specific protein UCP1 (Figure 1A and B). This conversion can be induced by rosiglitazone or GW7647, specific agonists of PPAR $\gamma$  and PPAR $\alpha$  respectively. Four days of both treatments induced the conversion of 30 to 50% of white into brite adipocytes, evaluated by the number of UCP1+ adipocytes detected by immunostaining (Figure 1C).

In order to characterize mitochondrial dynamics associated with hMADS brite adipocyte conversion, we performed a global mRNA analysis comparing white and brite hMADS adipocytes. On the 1013 nuclear and mitochondrial genome-encoded genes of the human MitoCarta dataset [52], we found 791 genes expressed by hMADS adipocytes (Figure 2). Compared to control condition, *i.e.* white adipocytes, 72% and 57% of these genes were found upregulated and 20 and 33% down-regulated, respectively by rosiglitazone and GW7647 treatments. Clustering of these genes according to mitochondrial functions demonstrated that a global induction was found for respiratory chain complexes, mitochondrial genome processing, mitochondria division and carrier/transport activity (Figure 2). Interestingly, we found that several genes involved in mitochondrial fusion and fission were expressed by differentiated hMADS.

### **hMADS brite adipocytes display increased mitochondriogenesis and content in components of respiratory chain complexes.**

In addition to UCP1, hMADS brite adipocytes, upon PPAR $\gamma$  or PPAR $\alpha$  activation, expressed higher mRNA levels of classic brite/brown markers (CPT1M, CIDEA) (Figure 3A). TIMM23 and TOMM20, two ubiquitous mitochondrial translocators, display equivalent expressions in all conditions. Transcripts of components of respiratory chain complex IV encoded by nuclear (COX4, COX10) and mitochondrial (COX2) genome were increased in brite adipocytes, while ND1, ND4 (two components of complex I) expression did not differ (Figure 3A). Quantitation of respiratory chain complex proteins showed an increase in total component (Figure 3A, Supplementary figure 1), in

agreement with mRNA analysis (Figure 2). More specifically, complexes II, III and V protein contents were higher in brite adipocytes, while no significant difference was found for complexes I and IV (Figure 3B). Nevertheless, cytochrome c oxidase activity (complex IV) increased by 25% in brite adipocytes (Supplementary figure 2A).

Finally, despite the stable mRNA expression of the mitochondrial transcription factor TFAM (Figure 3A), hMADS brite adipocytes displayed a slight increase in mitochondrial DNA content, characteristic of mitochondriogenesis (Figure 3C). This was consistent with the higher expression of several genes involved in mitochondrial RNA and protein processing, particularly for ENDOG, a key endonuclease for mitochondrial genome replication (Figure 2).

### **Functional analysis of hMADS brite adipocyte mitochondria.**

Altogether, molecular modifications found in brite compared to white adipocytes suggested an increase in mitochondrial function capacity. In order to characterize the oxidative capacity of hMADS brite adipocyte mitochondria, we performed oxygen consumption analysis (Figure 4). hMADS brite adipocytes displayed a higher maximal mitochondrial respiration compared to the white ones, associated with an expected higher uncoupled respiration due to UCP1 activity (Figure 4). Interestingly, in the absence of any stimulation, brite adipocytes displayed increased basal respiration. This probably aimed to compensate proton leak due to basal UCP1 activity. In addition, a strong regulation of the oxidative phosphorylation system takes place in brite adipocytes as demonstrated by the higher reserve respiratory capacity shown as the spare respiratory capacity. It is noteworthy that brite adipocytes converted by GW7647 treatment displayed higher basal and maximal mitochondrial respiration compared to rosiglitazone-treated cells, which allowed a better spare respiratory capacity (Figure 4). As uncoupled respiration was not different between brite adipocytes, we assume that the increased oxidative capacity in GW7647 treated cells is due to better use of energy substrates.

Mitochondrial activity of hMADS brite adipocytes was inducible by  $\beta$ -adrenergic stimulation. Indeed, isoproterenol treatment, led to an increased cytochrome c oxidase activity and UCP1 protein levels (Supplementary Figure 2A and B). Concomitantly,

isoproterenol significantly enhanced oxygen consumption in brite but not in white adipocytes (Supplementary Figure 2C), showing the responsiveness of brite adipocyte mitochondria to classical  $\beta$ -adrenergic stimulation.

### **hMADS brite adipocytes display UCP1<sup>+</sup> round-shaped mitochondria.**

Mitochondria are able to modulate their morphology from a tubular (fused) to a round (fissioned) shape. These morphologic adaptations are involved in mitochondrial division and, in various situations, are correlated with changes in activity or with stress. A recent study performed in rodent brown adipocytes, showed that mitochondria acquired round form upon activation [43]. Based on the results of the microarray analysis demonstrating an increased expression of genes associated with fusion/fission events (Figure 2), we performed immunostaining experiments in hMADS adipocytes, in order to co-localize UCP1 (brite/brown adipocytes) and TIMM23 (expressed in both white and brite adipocyte). Spectacularly, UCP1-positive mitochondria displayed a fissioned state while tubular structures were observed in UCP1-negative mitochondria (Figure 5A). These observations were confirmed using cytochrome c as a mitochondrial marker (Figure 5B). Independently of UCP1 staining, analysis of more than 1000 mitochondria for each condition showed that up to  $80 \pm 10$  % of the mitochondria displayed a round morphology in brite adipocytes, while only  $20 \pm 5$  % were round-shaped in white adipocytes..

These mitochondria morphology changes have been further analysed by transmission electronic microscopy. As shown in figure 6, undifferentiated hMADS cells contained a majority of long tubular mitochondria, while hMADS white adipocytes displayed partially fragmented mitochondria. By contrast, brite adipocytes have round-shaped mitochondria, certainly due to sustained fission activity (Figure 6). Moreover, mitochondria of brite adipocytes displayed laminar cristae (i.e. arranged from side to side of the organelle) compared to the white ones, which were shorter and linear (Figure 6) [53].

### **hMADS brite adipocytes display a DRP1-dependant activity.**

Seeking for the mechanisms involved in fission process in brite adipocytes, we first analyzed mRNA expression of specific fission proteins such as FIS1 and DNMI1L (also known as DRP1) (Supplementary Figure 3). There was no significant induction of fission gene expression. We also found no significant variation in the expression at mRNA or protein levels of classical markers of the fusion process (Supplementary Figure 3). As DRP1 phosphorylation was recently shown to control fission of mitochondria during rodent brown fat cell differentiation [43], we assessed the phosphorylation of DRP1 on serine 616 (known to activate the human protein) during conversion of human white into brite adipocytes. Western blot experiments clearly showed an increase in phosphorylation of DRP1 in brite adipocytes compared to white fat cells (Figure 7A). To investigate the involvement of DRP1 activation in brite adipocytes activity, we treated the cells with a specific inhibitor of DRP1, mdivi-1, and analyzed the respiration activity (Figure 7B). hMADS brite adipocytes treated for 3 days with 20  $\mu$ M of mdivi-1 displayed lower basal and uncoupled respiration activities compared to untreated cells (Figure 7C). However, maximal mitochondrial respiration was unaffected. This observation resulted in increased spare respiratory capacity (Figure 7C) which is the consequence of the lower uncoupling activity associated with similar maximal respiration.

## Discussion.

Because of their role in the control of energy balance and metabolism, the presence of human brown and brite adipocytes has drawn considerable attention. *In vivo* and *in vitro* studies in rodents shed light on the mechanisms involved in differentiation, function and activation of these thermogenically competent adipocytes. In this work, we characterized the mitochondrial phenotype of human brite adipocytes using hMADS cells which recapitulate *in vitro* the conversion of white into brite adipocytes that has been shown *in vivo* in specific mouse white fat depots [22, 33].

The shift from white to brite adipocyte phenotype involves profound changes in mitochondrial metabolic state [38]. Expression and activation of UCP1 is followed by an increased mitochondrial activity in term of oxygen consumption, in order to maintain ATP synthesis while uncoupling. This increased activity in brite adipocytes is mainly due to an active mitochondriogenesis (characterized by a higher mitochondrial DNA content), to an enhanced quantity of respiratory chains (characterized by an increased maximal respiration and respiratory chain component protein levels) and to a modification in substrate preference towards  $\beta$ -oxidation (increased level of CPT-1M, increased complex II respiratory component and data not shown). Interestingly, the phenotypic modifications in brite adipocytes not only allow a compensation of ATP synthesis decrease due to UCP1 uncoupling, but they also render the cells sensitive to specific stimuli. This is clearly characterized by the enhanced spare respiratory capacity in brite adipocytes. This parameter illustrates the ability of substrate supply and electron transport to respond to an increase in energy demand[51]. By contrast to white adipocytes which display a very low spare respiratory capacity and thus a poor capacity to increase their mitochondrial activity, the brite adipocytes are able to sharply increase their oxygen consumption and mitochondrial activity to respond to specific stimulations in order to increase uncoupling and perform expected thermogenesis.

In addition to the increased mitochondrial content, previous studies have documented an association between mitochondrial fragmentation and energy expenditure [40, 42] that has been confirmed recently in mouse-derived brown

adipocytes [43]. In these cells, mitochondrial fragmentation enhanced mitochondrial uncoupling and energy expenditure and was triggered by DRP1 activity through its phosphorylation at Ser600. Herein, we demonstrated in human brite adipocytes that mitochondrial fragmentation was associated with UCP1 activity, as UCP1-positive mitochondria displayed preferentially a round shape while UCP1-negative mitochondria formed tubular elongated structures. This mitochondrial fragmentation was associated with an increased phosphorylation of DRP1 at Ser616, the equivalent to Ser600 in mouse. In human, DRP1 phosphorylation at Ser616 by CDK1/cyclin B increased fission activity, conversely to Ser617 phosphorylation by PKA which inhibited the process and promoted mitochondrial elongation [54]. Interestingly, in hMADS brite adipocytes as well as in mouse brown adipocytes, DRP1 activity regulated the UCP1 activity as DRP1 inhibition decreased specifically mitochondrial uncoupling and associated basal respiration. Of note, fission process did not modulate the total mitochondrial capacity in the cells, since DRP1 inhibition did not result in a decreased maximal respiration. Our work confirmed that mitochondrial fission in human may be considered as a physiological adaptation without association with deleterious mechanisms. In rodent, DRP1 phosphorylation is found only in BAT activated situation.  $\beta$ -adrenergic receptor activates PKA allowing concomitantly fission of mitochondria and activity of UCP1. In hMADS cells, the fission process seems to be independent to UCP1 activation as it was found even in unstimulated condition. This different result may highlight a new discrepancy between mouse and human, or due to the difference in approaches used (*in vitro*<sup>vs</sup>/*in vivo*).

As mitochondria morphology results from cycles of fission and fusion events [44], fragmented morphology might be due to decreased fusion events in addition to increased fission process. Contrasting with results reported in rodents [44], in the present human cell model the fragmented state of mitochondria was not accompanied by an inhibition of fusion events. Indeed, several key components involved in fusion phenomenon did not display any variation at RNA and protein levels (Supplementary figure 3).

We also showed that mitochondria fragmentation was accompanied by cristae morphological changes during white to brite adipocyte conversion. Indeed, cristae within

white adipocyte mitochondria were linear and short while brite adipocyte mitochondria cristae displayed a long, laminar and curved shape. Due to the link between cristae structure and ATP synthase dimerization, these changes in the curvature of the cristae might be related to a reduced coupled respiration in favor of uncoupled respiration [43, 55].

In conclusion, we demonstrated that deep mitochondrial modifications occurred along white to brite adipocytes conversion, and that the mitochondrial fission process described in mouse brown adipocytes was found in human brite adipocytes. Moreover, we demonstrated that this fission process was not only an enhancer of UCP1 activity but also a crucial mechanism allowing uncoupling function. Finally, our data demonstrating that the mitochondrial morphologic changes found in brite/brown adipocytes *in vivo* and *in vitro* occurred, not only after activator stimuli, but already in the final step of differentiation where the function of the thermogenic adipocytes took place.

**AUTHOR CONTRIBUTIONS.** The author(s) have made the following declarations about their contributions: Conceived and designed the experiments: DFP, DL, EZA. Performed the experiments: DFP, VB, JCC, DB, RAG, MG, AM, SP. Analyzed the data: DP, VB, JCC, SC, DL, EZA. Wrote the manuscript: DP, VB, DL, EZA.

**ACKNOWLEDGEMENTS.** The authors acknowledge the CCMA (Centre Commun de Microscopie Appliquée, Université de Nice Sophia Antipolis, Microscopy and Imaging platform Côte d'Azur, MICA) and the Cytomed Platform from IRCAN. This work was supported by CNRS, Inserm, EU FP7 project DIABAT (HEALTH-F2-2011-278373), French Agence Nationale de la Recherche (ANR-10-BLAN-1105 miRBAT). DL is member of Institut Universitaire de France.

**CONFLICT OF INTEREST.** The authors declare having no conflict of interest.

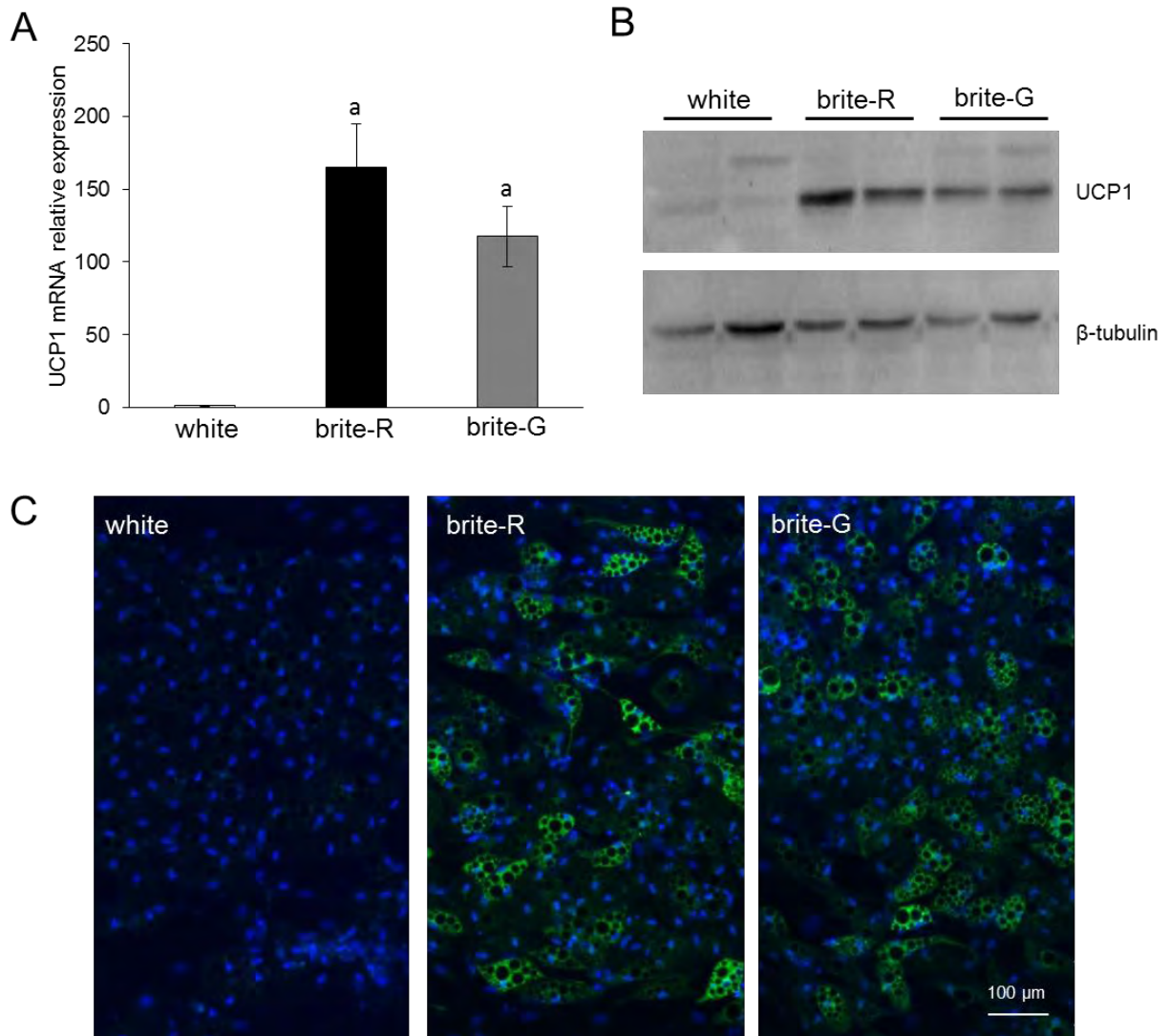


## Bibliography.

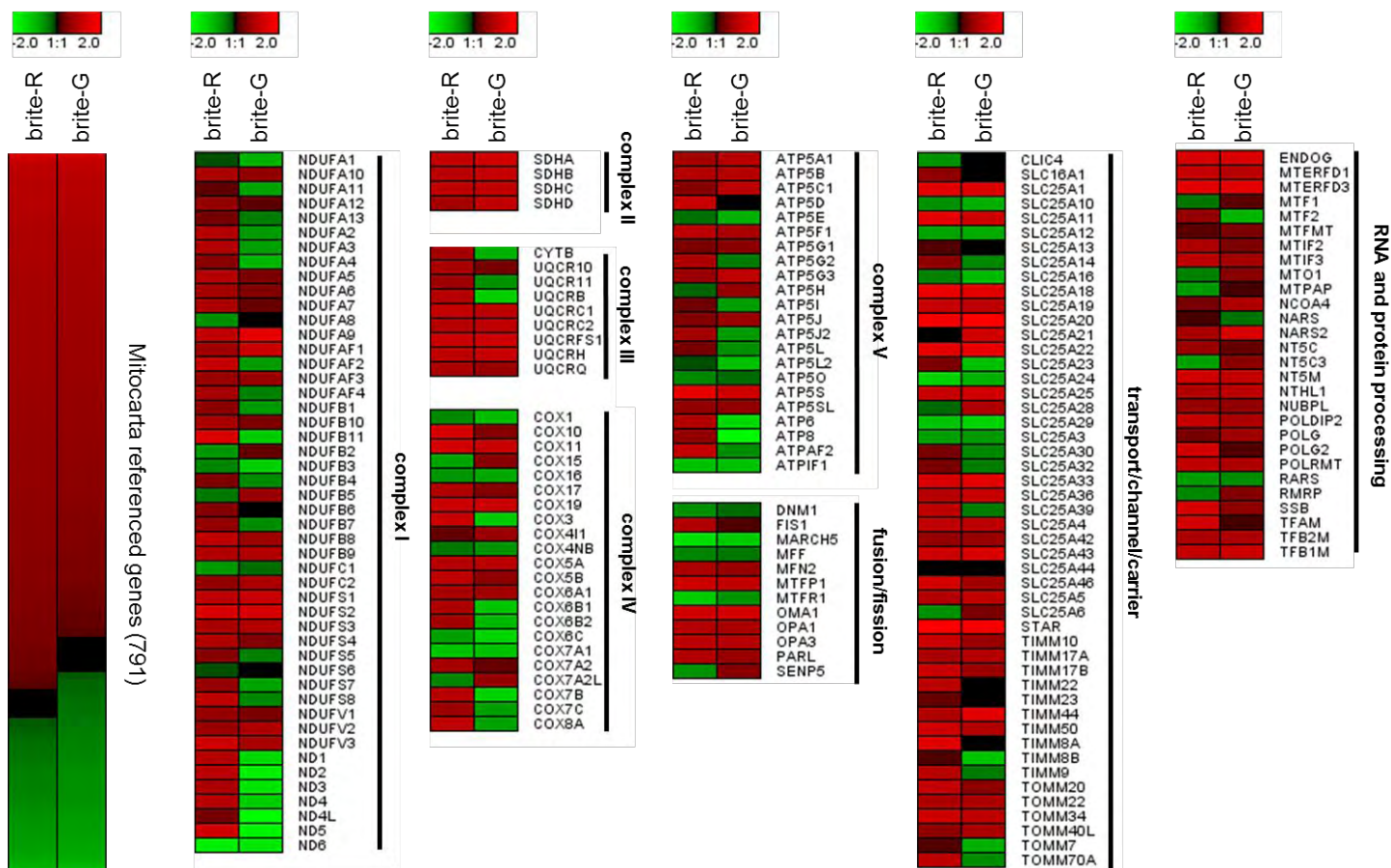
1. Chondronikola M, Volpi E, Borsheim E et al. Brown Adipose Tissue Improves Whole Body Glucose Homeostasis and Insulin Sensitivity in Humans. **Diabetes**. 2014.
2. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiol Rev**. 2004;84:277-359.
3. Kopecky J, Clarke G, Enerback S et al. Expression of the mitochondrial uncoupling protein gene from the aP2 gene promoter prevents genetic obesity. **J Clin Invest**. 1995;96:2914-2923.
4. Ouellet V, Labbe SM, Blondin DP et al. Brown adipose tissue oxidative metabolism contributes to energy expenditure during acute cold exposure in humans. **J Clin Invest**. 2012;122:545-552.
5. Yoneshiro T, Aita S, Matsushita M et al. Recruited brown adipose tissue as an antiobesity agent in humans. **J Clin Invest**. 2013;123:3404-3408.
6. Feldmann HM, Golozoubova V, Cannon B et al. UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. **Cell metabolism**. 2009;9:203-209.
7. 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;1801:372-376.
8. Enerback S. Human brown adipose tissue. **Cell metabolism**. 2010;11:248-252.
9. Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. **Nat Med**. 2013;19:1252-1263.
10. Cypess AM, Lehman S, Williams G et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. **N Engl J Med**. 2009;360:1509-1517.
11. van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommerig JW, Smulders NM et al. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. **N Engl J Med**. 2009;360:1500-1508.
12. Virtanen KA, Lidell ME, Orava J et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults. **N Engl J Med**. 2009;360:1518-1525.
13. Zingaretti MC, Crosta F, Vitali A et al. The presence of UCP1 demonstrates that metabolically active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue. **FASEB J**. 2009;23:3113-3120.
14. Cypess AM, White AP, Vernochet C et al. Anatomical localization, gene expression profiling and functional characterization of adult human neck brown fat. **Nat Med**. 2013;19:635-639.
15. Jespersen NZ, Larsen TJ, Peijs L et al. A classical brown adipose tissue mRNA signature partly overlaps with brite in the supraclavicular region of adult humans. **Cell metabolism**. 2013;17:798-805.
16. Sharp LZ, Shinoda K, Ohno H et al. Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells. **PLoS One**. 2012;7:e49452.
17. Wu J, Bostrom P, Sparks LM et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. **Cell**. 2012;150:366-376.
18. Cederberg A, Gronning LM, Ahren B et al. FOXC2 is a winged helix gene that counteracts obesity, hypertriglyceridemia, and diet-induced insulin resistance. **Cell**. 2001;106:563-573.
19. Cohen P, Levy JD, Zhang Y et al. Ablation of PRDM16 and Beige Adipose Causes Metabolic Dysfunction and a Subcutaneous to Visceral Fat Switch. **Cell**. 2014;156:304-316.
20. Leonardsson G, Steel JH, Christian M et al. Nuclear receptor corepressor RIP140 regulates fat accumulation. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2004;101:8437-8442.
21. Seale P, Conroe HM, Estall J et al. Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. **J Clin Invest**. 2011;121:96-105.
22. Rosenwald M, Perdikari A, Rulicke T et al. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. **Nat Cell Biol**. 2013;15:659-667.

23. Lee YH, Petkova AP, Konkar AA et al. Cellular origins of cold-induced brown adipocytes in adult mice. **FASEB J**. 2015;29:286-299.
24. Wang QA, Tao C, Gupta RK et al. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. **Nat Med**. 2013;19:1338-1344.
25. Lee YH, Mottillo EP, Granneman JG. Adipose tissue plasticity from WAT to BAT and in between. **Biochim Biophys Acta**. 2014;1842:358-369.
26. Cinti S. Transdifferentiation properties of adipocytes in the adipose organ. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. 2009;297:E977-986.
27. Vitali A, Murano I, Zingaretti MC et al. The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes. **J Lipid Res**. 2012;53:619-629.
28. Imai T, Takakuwa R, Marchand S et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is required in mature white and brown adipocytes for their survival in the mouse. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2004;101:4543-4547.
29. Petrovic N, Walden TB, Shabalina IG et al. 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;285:7153-7164.
30. Elabd C, Chiellini C, Carmona M et al. Human multipotent adipose-derived stem cells differentiate into functional brown adipocytes. **Stem Cells**. 2009;27:2753-2760.
31. Pisani DF, Djedaini M, Beranger GE et al. Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells into "Brite" (Brown-in-White) Adipocytes. **Front Endocrinol (Lausanne)**. 2011;2:87.
32. Pisani DF, Ghandour RA, Beranger GE 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;3:834-847.
33. Barbatelli G, Murano I, Madsen L 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:E1244-1253.
34. Loft A, Forss I, Siersbaek MS et al. Browning of human adipocytes requires KLF11 and reprogramming of PPARgamma superenhancers. **Genes Dev**. 2015;29:7-22.
35. Rachid TL, Penna-de-Carvalho A, Brighenti I et al. PPAR-alpha agonist elicits metabolically active brown adipocytes and weight loss in diet-induced obese mice. **Cell Biochem Funct**. 2015;33:249-256.
36. Lee JY, Hashizaki H, Goto T et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha enhances fatty acid oxidation in human adipocytes. **Biochem Biophys Res Commun**. 2011;407:818-822.
37. Nedergaard J, Golozoubova V, Matthias A et al. UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. **Biochim Biophys Acta**. 2001;1504:82-106.
38. Shabalina IG, Petrovic N, de Jong JM et al. UCP1 in brite/beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic. **Cell reports**. 2013;5:1196-1203.
39. Vernochet C, Mourier A, Bezy O et al. Adipose-specific deletion of TFAM increases mitochondrial oxidation and protects mice against obesity and insulin resistance. **Cell metabolism**. 2012;16:765-776.
40. Liesa M, Shrihail OS. Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. **Cell metabolism**. 2013;17:491-506.
41. Gomes LC, Di Benedetto G, Scorrano L. During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. **Nat Cell Biol**. 2011;13:589-598.

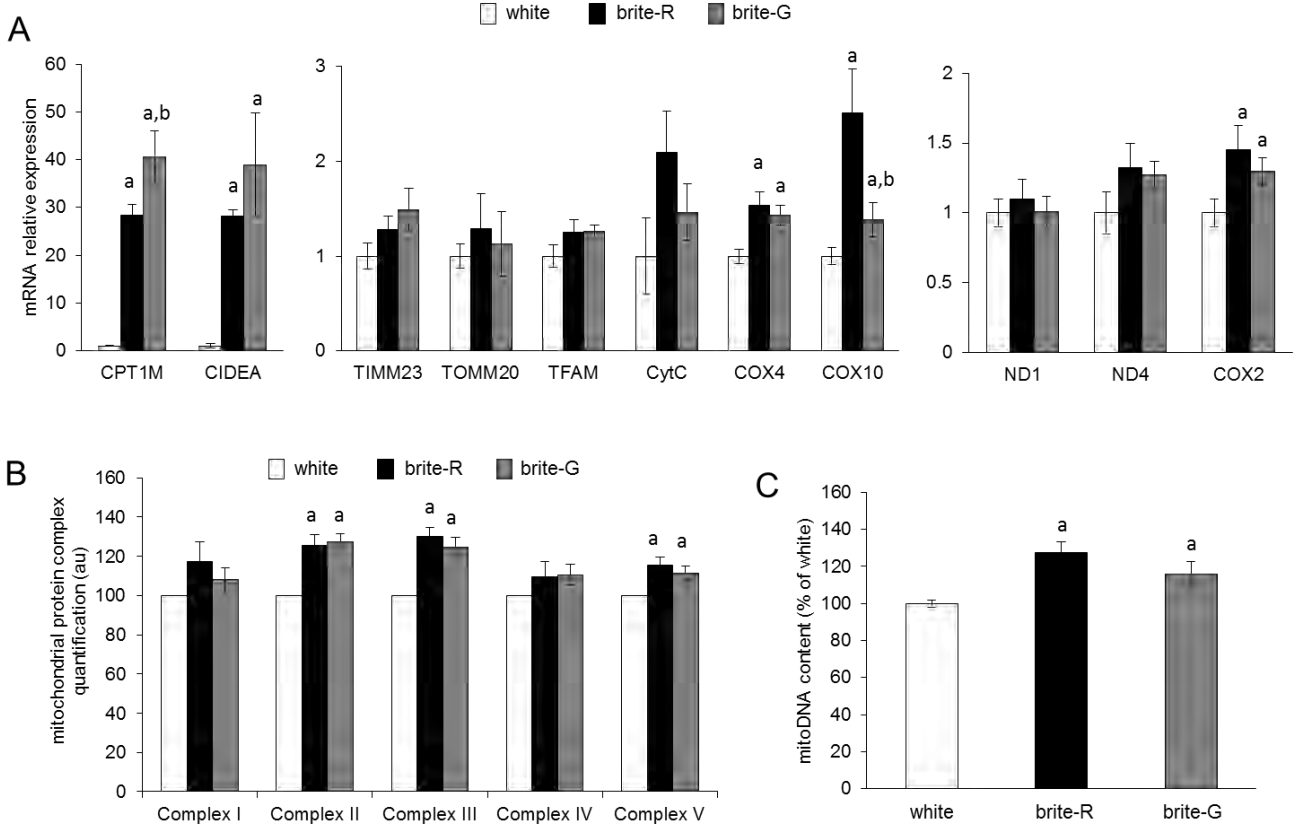
42. Molina AJ, Wikstrom JD, Stiles L et al. Mitochondrial networking protects beta-cells from nutrient-induced apoptosis. **Diabetes**. 2009;58:2303-2315.
43. Wikstrom JD, Mahdavian K, Liesa M et al. Hormone-induced mitochondrial fission is utilized by brown adipocytes as an amplification pathway for energy expenditure. **EMBO J**. 2014;33:418-436.
44. Twig G, Shirihai OS. The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy. **Antioxid Redox Signal**. 2011;14:1939-1951.
45. Beranger GE, Karbiener M, Barquissau V et al. In vitro brown and "brite"/"beige" adipogenesis: human cellular models and molecular aspects. **Biochim Biophys Acta**. 2013;1831:905-914.
46. Rodriguez AM, Elabd C, Delteil F et al. Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue. **Biochem Biophys Res Commun**. 2004;315:255-263.
47. Rodriguez AM, Pisani D, Dechesne CA et al. Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. **J Exp Med**. 2005;201:1397-1405.
48. Zaragosi LE, Ailhaud G, Dani C. Autocrine fibroblast growth factor 2 signaling is critical for self-renewal of human multipotent adipose-derived stem cells. **Stem Cells**. 2006;24:2412-2419.
49. Bustin SA, Benes V, Garson JA et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clin Chem**. 2009;55:611-622.
50. Besse-Patin A, Montastier E, Vinel C et al. Effect of endurance training on skeletal muscle myokine expression in obese men: identification of apelin as a novel myokine. **Int J Obes (Lond)**. 2013.
51. Brand MD, Nicholls DG. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. **Biochem J**. 2011;435:297-312.
52. Pagliarini DJ, Calvo SE, Chang B et al. A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. **Cell**. 2008;134:112-123.
53. Frontini A, Cinti S. Distribution and development of brown adipocytes in the murine and human adipose organ. **Cell metabolism**. 2010;11:253-256.
54. Knott AB, Bossy-Wetzel E. Impairing the mitochondrial fission and fusion balance: a new mechanism of neurodegeneration. **Ann N Y Acad Sci**. 2008;1147:283-292.
55. Paumard P, Vaillier J, Couлары B et al. The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. **EMBO J**. 2002;21:221-230.



**Figure 1.** Characterization of white to brite adipocyte conversion. hMADS cells were differentiated in white or brite adipocytes using rosiglitazone (brite-R) or GW7647 (brite-G). Adipocytes were analyzed for UCP1 expression at mRNA level by RT-qPCR (A) and protein level by Western blot (B) and immunostaining (C).  $\beta$ -tubulin was used as loading control and DAPI to counterstain nuclei. Histogram displayed mean  $\pm$  sem of 3 independent experiments. a =  $p < 0.05$  vs/ white.

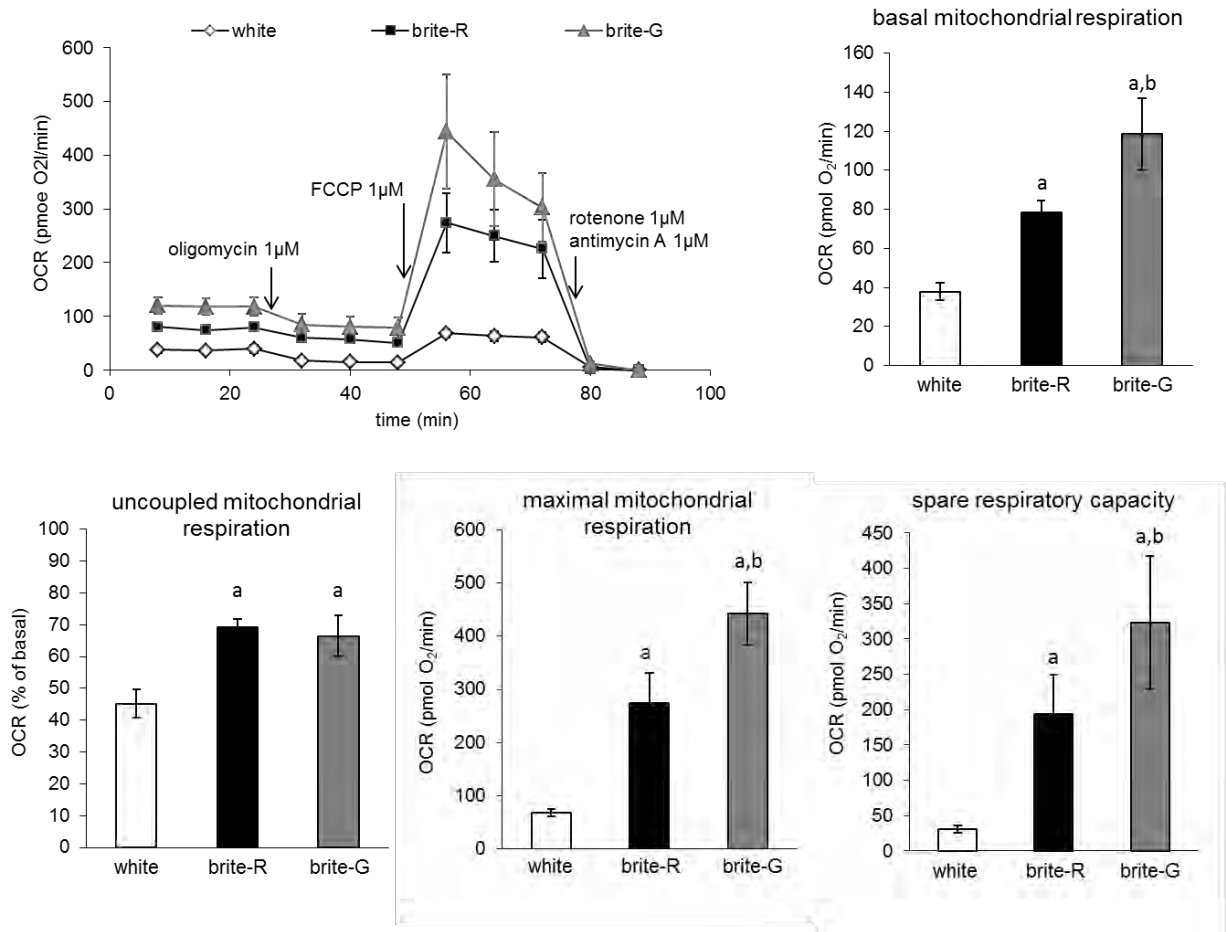


**Figure 2.** Heat map of mitochondrial associated genes modulated during white to brite adipocyte conversion. Data shown were extracted from a DNA microarray analysis of hMADS cells that were maintained as white adipocytes or converted into brite adipocytes through the activation of PPAR $\gamma$  (rosiglitazone, brite-R) or PPAR $\alpha$  (GW7647, brite-G).



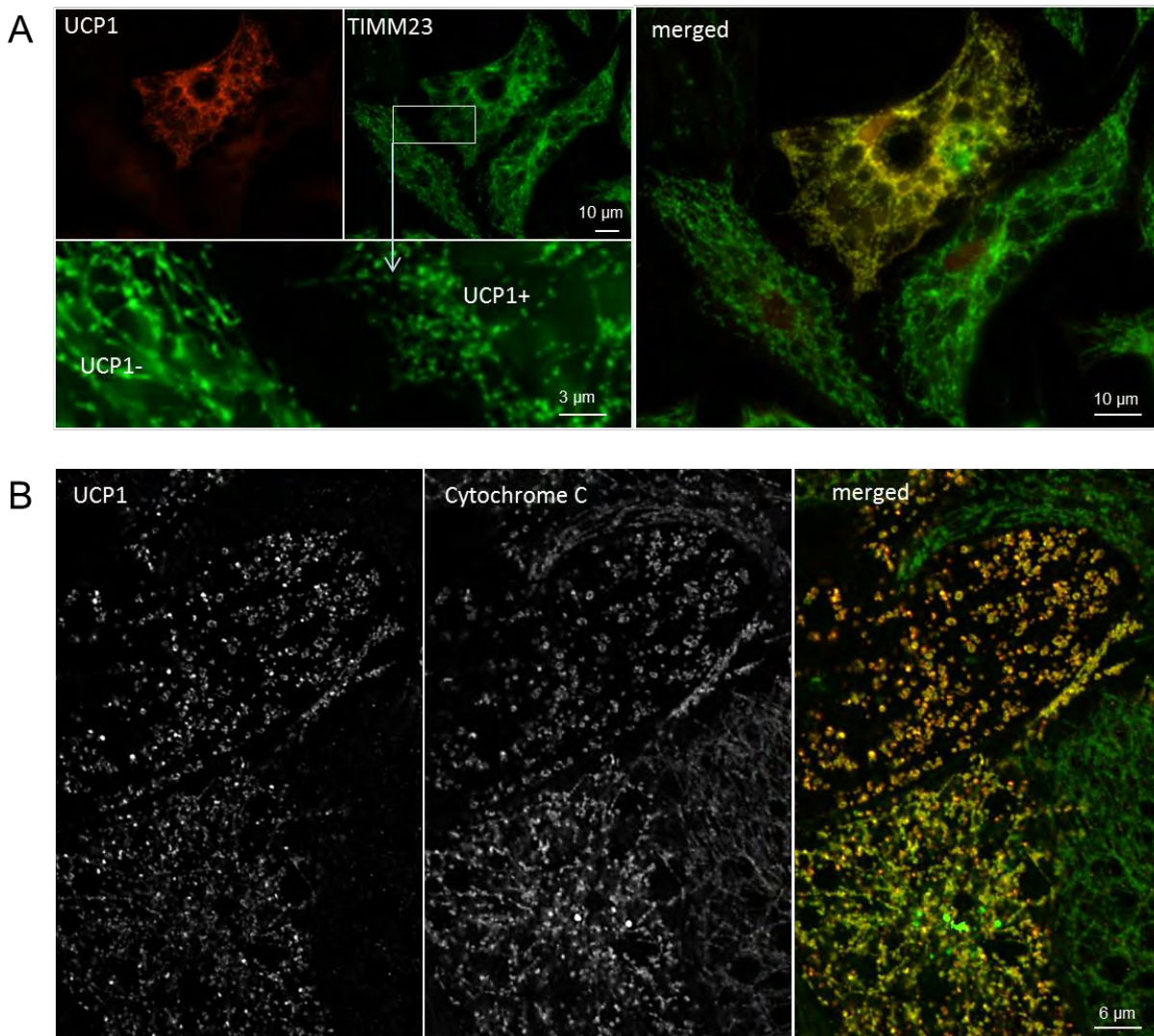
**Figure 3. Mitochondrial marker expression and DNA content.** hMADS cells were differentiated in white or in brite adipocytes using rosiglitazone (brite-R) or GW7647 (brite-G). A) Mitochondrial marker gene expression was evaluated by RT-qPCR. B) Respiratory chain complex expression was analyzed by western blot using a specific antibody for one component of each complex (I to V). C) Mitochondrial DNA content was evaluated by qPCR. Histograms display mean  $\pm$  sem of at least 3 independent experiments. a =  $p < 0.05$  vs/ white; b =  $p < 0.05$  vs/ brite-R.

**Figure 4.**



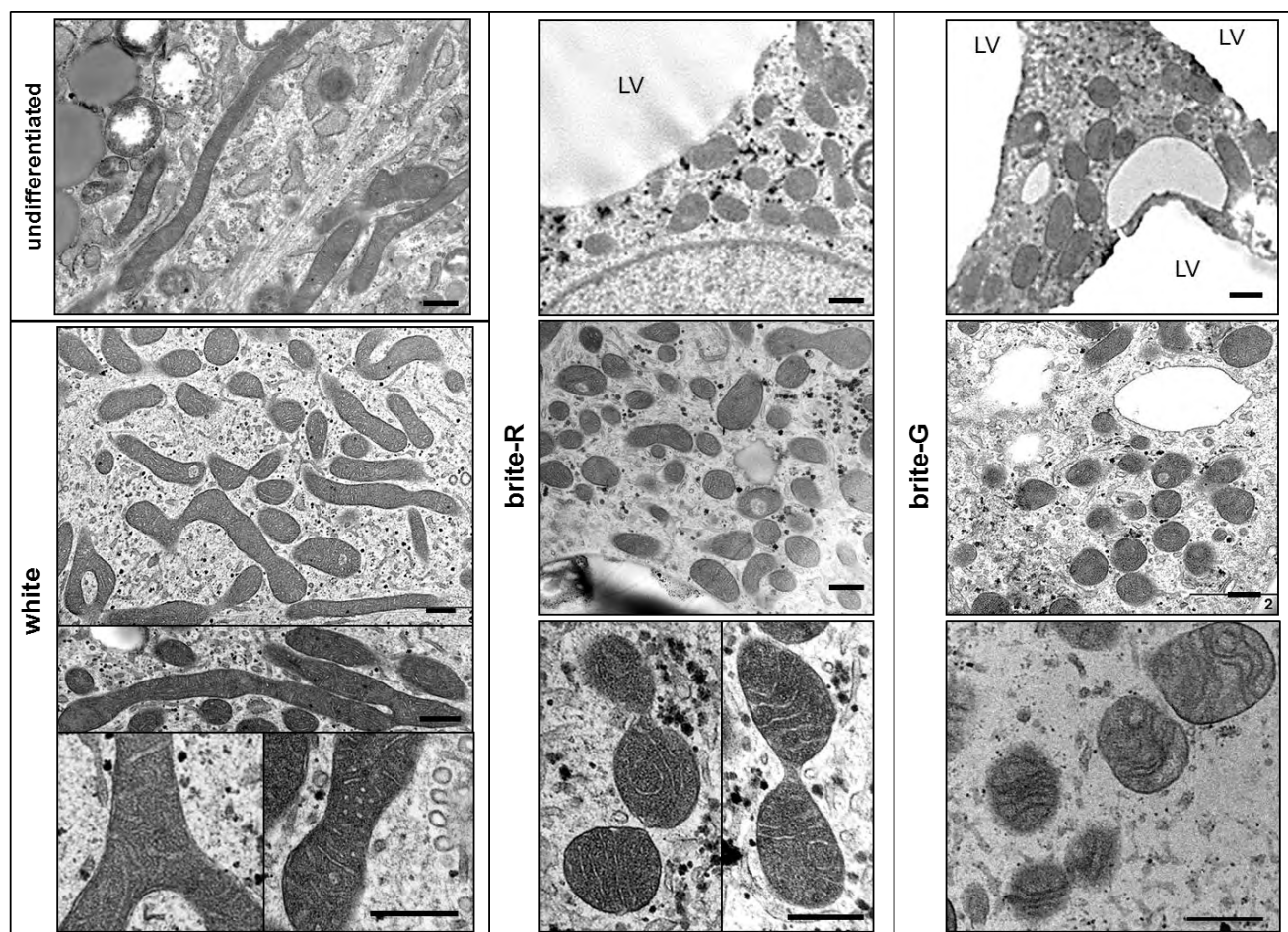
**Figure 4. Mitochondrial activity in white and brite adipocytes.** hMADS cells were differentiated in white or in brite adipocytes using rosiglitazone (brite-R) or GW7647 (brite-G) and then analyzed with a Seahorse XF24 machine to evaluate mitochondrial oxygen consumption. Histogram displayed mean  $\pm$  sem of 3 experiments containing 7 independent wells each. a =  $p < 0.05$  vs/ white; b =  $p < 0.05$  vs/ brite-R.





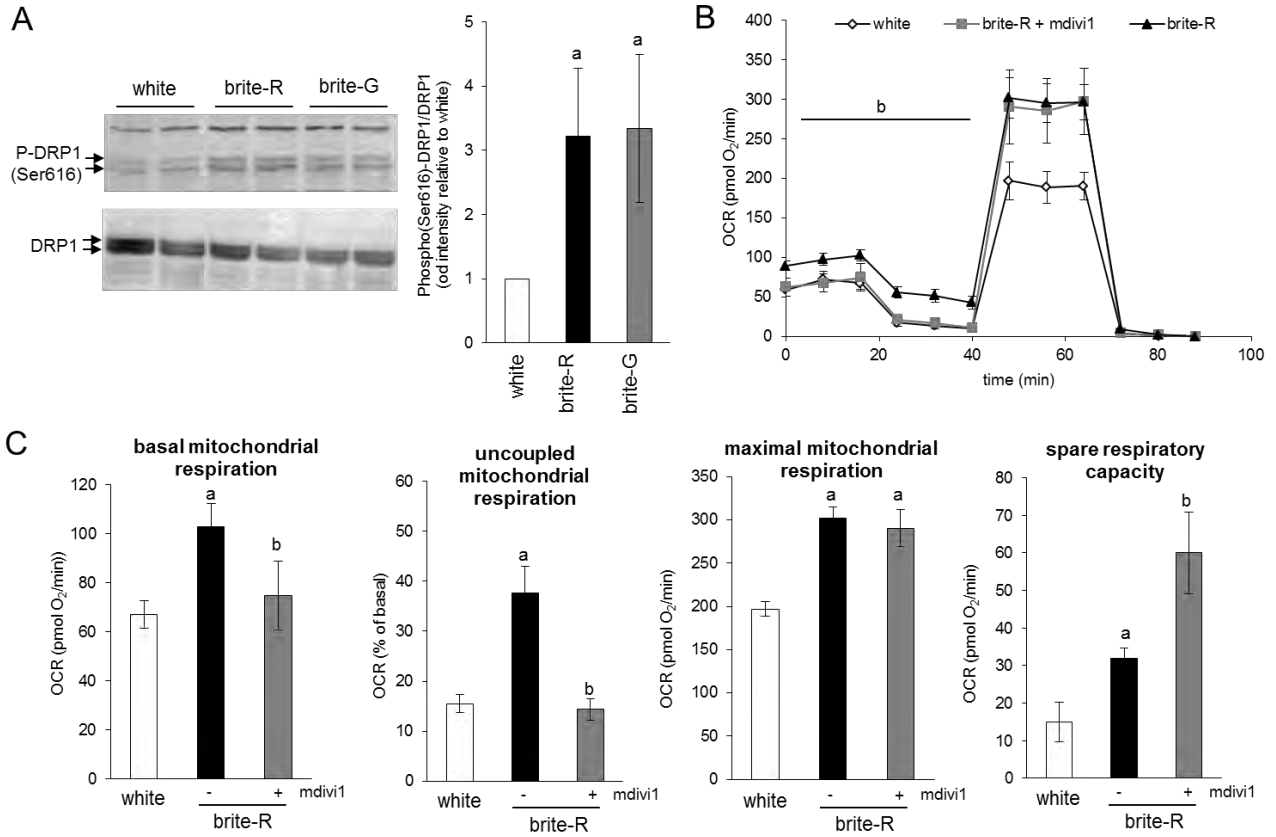
**Figure 5.** Characterization of UCP1+ mitochondria fissioned morphology. hMADS cells were differentiated in brite adipocytes and then analyzed by immunostaining using a rabbit polyclonal antibody against UCP1 (red) and a monoclonal mouse against the mitochondria ubiquitous protein TIMM23 (green, panel A) or Cytochrome C (green, panel B).



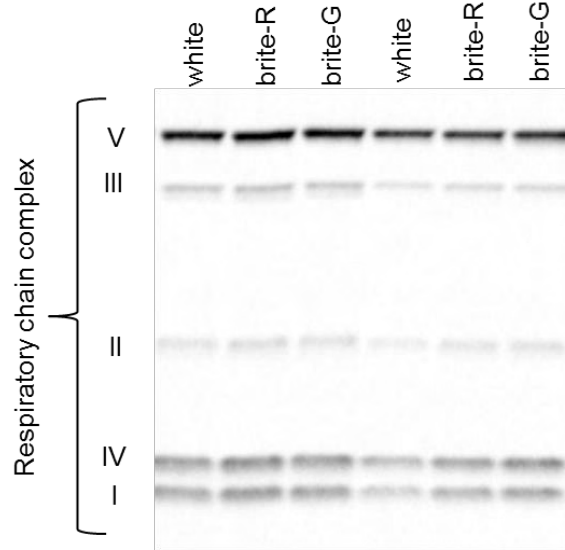
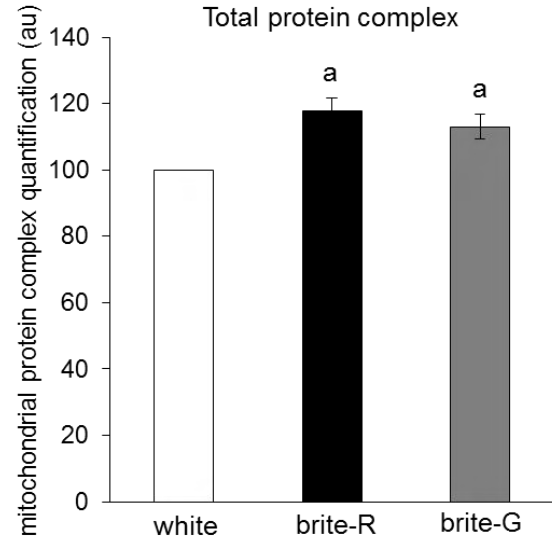


**Figure 6.** Electron microscopy analysis of white and brite adipocyte mitochondria. Undifferentiated, white- and brite-differentiated (either by rosiglitazone, "brite-R", or by GW7647, "brite-G") hMADS cells were analyzed by electron microscopy. Scale bar = 1  $\mu\text{m}$ . LV: lipid vacuole.

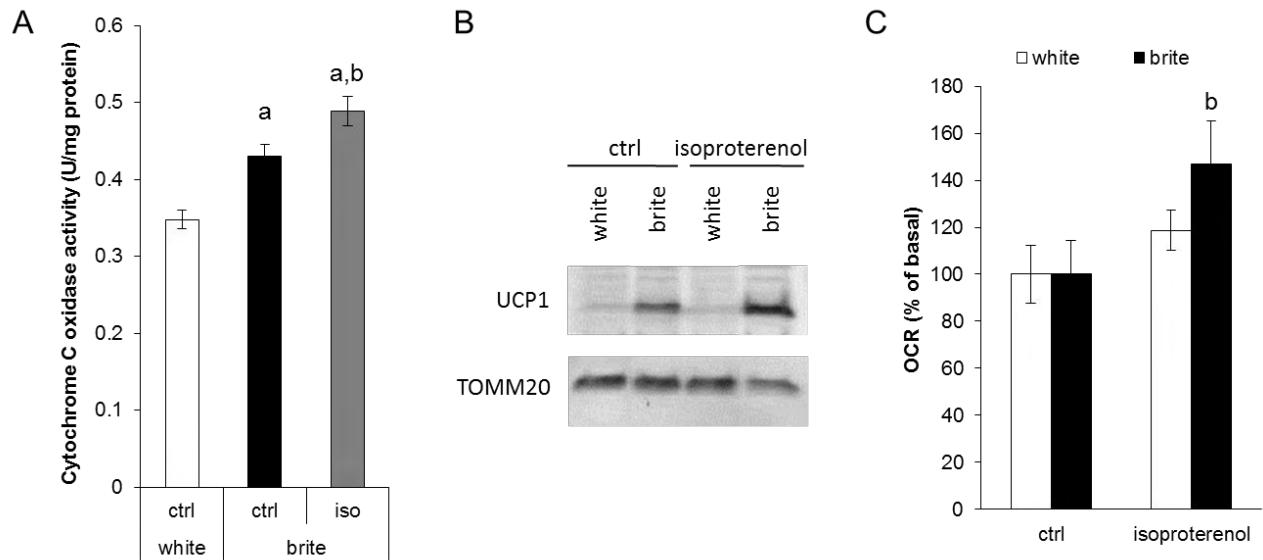
Figure 7.



**Figure 7. DRP1 activity triggered brite mitochondrial activity.** hMADS cells were differentiated in white or in brite adipocytes using rosiglitazone (brite-R) or GW7647 (brite-G). A) DRP1 phosphorylation was evaluated by western blot (left panel) and quantified as phosphoDRP-Ser616/total DRP1 ratio (right panel). B, C) hMADS cells were differentiated in brite adipocytes using rosiglitazone (brite-R), treated or not with mdivi1 (20  $\mu$ M for the last 3 days) and then analyzed with a Seahorse XF24 device to evaluate mitochondrial oxygen consumption. Histogram displayed mean  $\pm$  sem of 3 experiments, each containing 7 independent samples. a =  $p < 0.05$  vs/ white; b =  $p < 0.05$  vs/ brite-R.

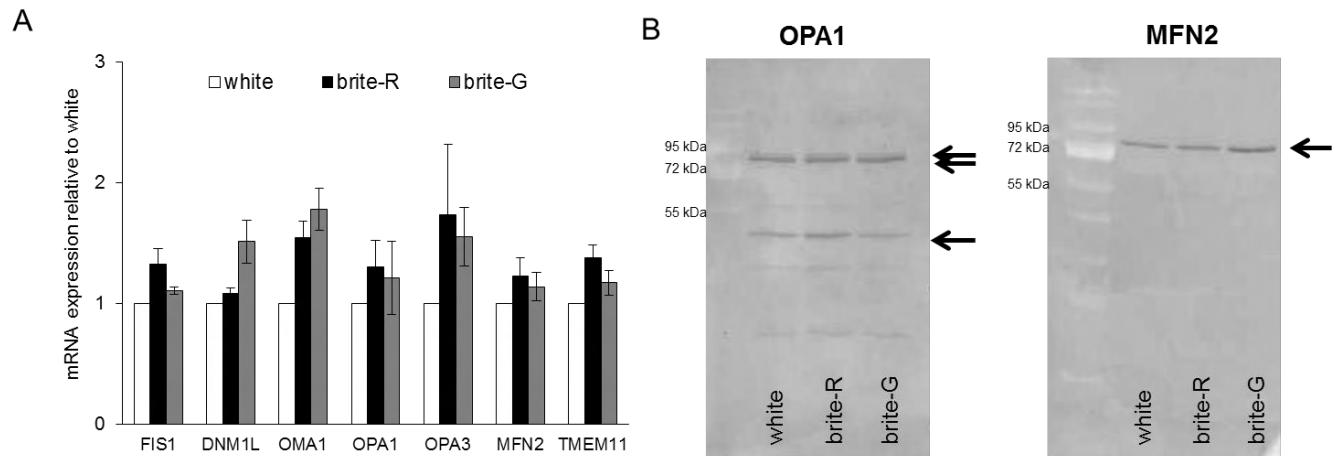
**A****B**

**Supplementary Figure 1. Respiratory chain complex quantification.** hMADS cells were differentiated in white or brite adipocytes using rosiglitazone (brite-R) or GW7647 (brite-G) and harvested for protein extraction. A) Representative western-blot of mitochondrial complexes (I to V). B) Quantification of total amount of respiratory chain complexes. Values represent mean  $\pm$  sem of at least 3 independent experiments. a =  $p < 0.05$  vs/white.



**Supplementary Figure 2. hMADS brite adipocytes are sensitive to  $\beta$ -adrenergic stimuli.**

A, B) hMADS cells were differentiated in white or in brite adipocytes using rosiglitazone (brite-R) and treated during the last 16h with 1  $\mu$ M isoproterenol. Mitochondria were purified and used to determine cytochrome c oxidase activity or for protein extraction in order to assess UCP1 level. TOMM20 was used as loading control. C) hMADS cells were differentiated in white or brite adipocytes using rosiglitazone (brite-R) and used to evaluate oxygen consumption under isoproterenol treatment. Histogram displayed mean  $\pm$  sem of 3 experiments (A) or 7 independent samples (C). a =  $p < 0.05$  vs/ white ctrl; b =  $p < 0.05$  vs/ brite ctrl.



**Supplementary Figure 3. Fusion and fission mitochondrial gene and protein expression.** hMADS cells were differentiated in white or in brite adipocytes using rosiglitazone (brite-R) or GW7647 (brite-G) and harvested for RNA or protein extraction. A) RT-qPCR analysis of various key genes. B) Western blot analysis of OPA1 and MFN2 protein. Histogram displays mean  $\pm$  sem of 3 experiments (A).



---

## **DISCUSSION - PERSPECTIVES**

---





L'épidémie actuelle d'obésité et de diabète de type 2 est un sérieux défi pour les communautés scientifiques et médicales. Les conséquences physiopathologiques de l'obésité sont multiples, affectant la qualité de vie, le risque d'apparition de nombreuses pathologies et la mortalité. Les stratégies pour perdre du poids basées sur un régime, l'exercice physique ou des modifications du comportement ne fonctionnent seulement que sur une minorité d'individus très motivés. La chirurgie bariatrique est efficace, mais lourde. Elle n'est utilisée que dans les cas d'obésité massive. Le développement de nouvelles approches thérapeutiques est donc nécessaire. L'une d'entre elles est centrée sur le recrutement et l'activation des adipocytes bruns et brites, capables de dissiper l'énergie sous forme de chaleur et par conséquent d'augmenter les dépenses énergétiques. C'est dans ce contexte que ce projet de thèse a été élaboré.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse démontrent pour la première fois que les adipocytes blancs matures humains peuvent être convertis, par les agonistes PPAR $\gamma$  et PPAR $\alpha$ , en adipocytes brites. Le métabolisme énergétique et mitochondrial est alors modifié pour permettre la thermogénèse.

#### Rôle clé de PDK4 dans les adipocytes brites

Ces travaux thèse ont permis d'identifier la pyruvate déshydrogénase kinase 4 (PDK4) comme un médiateur essentiel de ces changements métaboliques. L'analyse de son expression génique et protéique montre que PDK4 est l'un des gènes les plus fortement induits par les agonistes de PPAR $\gamma$  et PPAR $\alpha$ . PDK4 est connu pour être fortement exprimé dans le tissu adipeux brun et son expression augmente fortement lors de la brunisation du TA blanc et en réponse aux agonistes de PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$  (Forner et al., 2009; Kiskinis et al., 2014; Park et al., 2014). Dans le TA brun, il a été démontré que l'activation de la lipolyse par les agonistes  $\beta$ -adrénergiques fournit des ligands endogènes pour les PPARs, qui activent à leur tour l'expression de PDK4, qui contient un élément de réponse aux PPARs dans son promoteur (Degenhardt et al., 2007; Holness et al., 2012). En effet, l'induction de la PDK4 par les agonistes  $\beta$ -adrénergiques est diminuée lorsque la lipolyse est inhibée soit pharmacologiquement ou chez des animaux dépourvus des gènes HSL ou ATGL (Mottillo et al., 2012).

PDK4 régule le complexe pyruvate déshydrogénase (PDH). La phosphorylation par PDK4 conduit à l'inactivation du complexe, tandis que la déphosphorylation par les pyruvate déshydrogénase phosphatases (PDP) l'active (Patel and Korotchkina, 2006). La PDH est un complexe multienzymatique ubiquitaire situé au centre d'un carrefour métabolique (Zhang et al., 2014a). Elle catalyse la décarboxylation irréversible du pyruvate en acétyl-CoA dans la mitochondrie (Patel and Roche, 1990), liant ainsi la glycolyse au cycle de Krebs. Cela positionne la PDH comme l'une des enzymes majeures responsables de la flexibilité métabolique. En effet, elle est responsable du choix entre glucose ou acide gras comme source principale d'énergie. L'activation de la PDH favorise l'utilisation du glucose comme principale source d'énergie et l'acétyl-CoA formé peut aussi servir comme précurseur à la lipogenèse de novo et inhiber la  $\beta$ -oxydation par la synthèse de malonyl-CoA (Randle, 1995; Randle, 1998). Au contraire, l'inhibition de la PDH contraint la cellule à utiliser les acides gras comme substrat énergétique. C'est pourquoi son activité est très finement régulée afin de maintenir une homéostasie énergétique optimale selon les conditions nutritionnelles et physiologiques.

Dans les adipocytes brites, l'inhibition de la PDH empêche l'oxydation du pyruvate et par conséquent la production d'acétyl-CoA pour le cycle de Krebs. Le pyruvate est alors réorienté vers la voie de la synthèse de glycérol-3-phosphate afin de fournir le squelette carboné pour la synthèse de TG. Dans des adipocytes blancs humains et murins, l'augmentation de la PDK4 lors d'un traitement à la rosiglitazone favorise aussi ce routage du glucose vers la voie de la glycéronéogenèse (Cadoudal et al., 2008). A l'inverse, lorsqu'on inhibe l'expression de la PDK4 par des ARN interférents, cela diminue l'incorporation du pyruvate dans le glycérol et augmente son oxydation par la PDH. Ainsi, la PDK4 contrôle le devenir du glucose dans les adipocytes brites. L'inhibition de la PDH par la PDK4, lors de la conversion des adipocytes, permet de basculer vers un métabolisme centré sur l'utilisation des acides gras comme substrat énergétique. En effet, parmi les gènes dont l'expression est induite par PPAR $\gamma$  et PPAR $\alpha$ , la base de données DAVID indique qu'un très grand nombre de ces gènes sont impliqués dans le métabolisme lipidique, en accord avec les rôles connus de PPAR $\gamma$  et PPAR $\alpha$  dans la différenciation des adipocytes et le métabolisme lipidique.

Enfin, l'expérience de compétition de substrats démontre que même si l'oxydation des acides gras diminue lorsqu'on augmente les quantités de glucose dans le milieu, les adipocytes brites continuent à utiliser les acides gras comme source principale d'énergie. Nous obtenons les mêmes résultats avec l'inhibition de l'expression de PDK4. Par conséquent, l'inhibition de

l'activité de la PDH par la PDK4 n'est pas le seul mécanisme impliqué dans les changements métaboliques associés au brunissement. Une explication possible est que les autres PDKs, et notamment PDK1, dont l'expression dans les hMADS est également activée au cours du brunissement, maintiennent l'inhibition de la PDH. Il est connu que l'acétyl-CoA et le NADH, deux produits de la réaction de la  $\beta$ -oxydation, exercent un rétrocontrôle négatif direct sur l'activité catalytique de la PDH quand leur concentration dans la matrice mitochondriale est suffisante (Behal et al., 1993). En effet, la hausse intra-mitochondriale des ratios de NADH/NAD<sup>+</sup> et d'acétyl-CoA/CoA est détectée par les groupes lipoyls de la PDH qui sont alors réduits et acétylés (Roche et al., 2003). Or, la réduction et l'acétylation de ces groupes lipoyls stimulent fortement l'activité des PDKs (Roche et al., 2003). Par conséquent, il est probable que malgré l'invalidation de l'expression de PDK4, les autres PDKs maintiennent le complexe PDH inactivé (Bao et al., 2004). Il serait donc intéressant de faire une double inhibition de l'expression de PDK4 et PDK1 dans les cellules hMADS brunies pour voir si l'inhibition de la PDH est l'unique point clé du changement métabolique au profit de l'utilisation des acides gras.

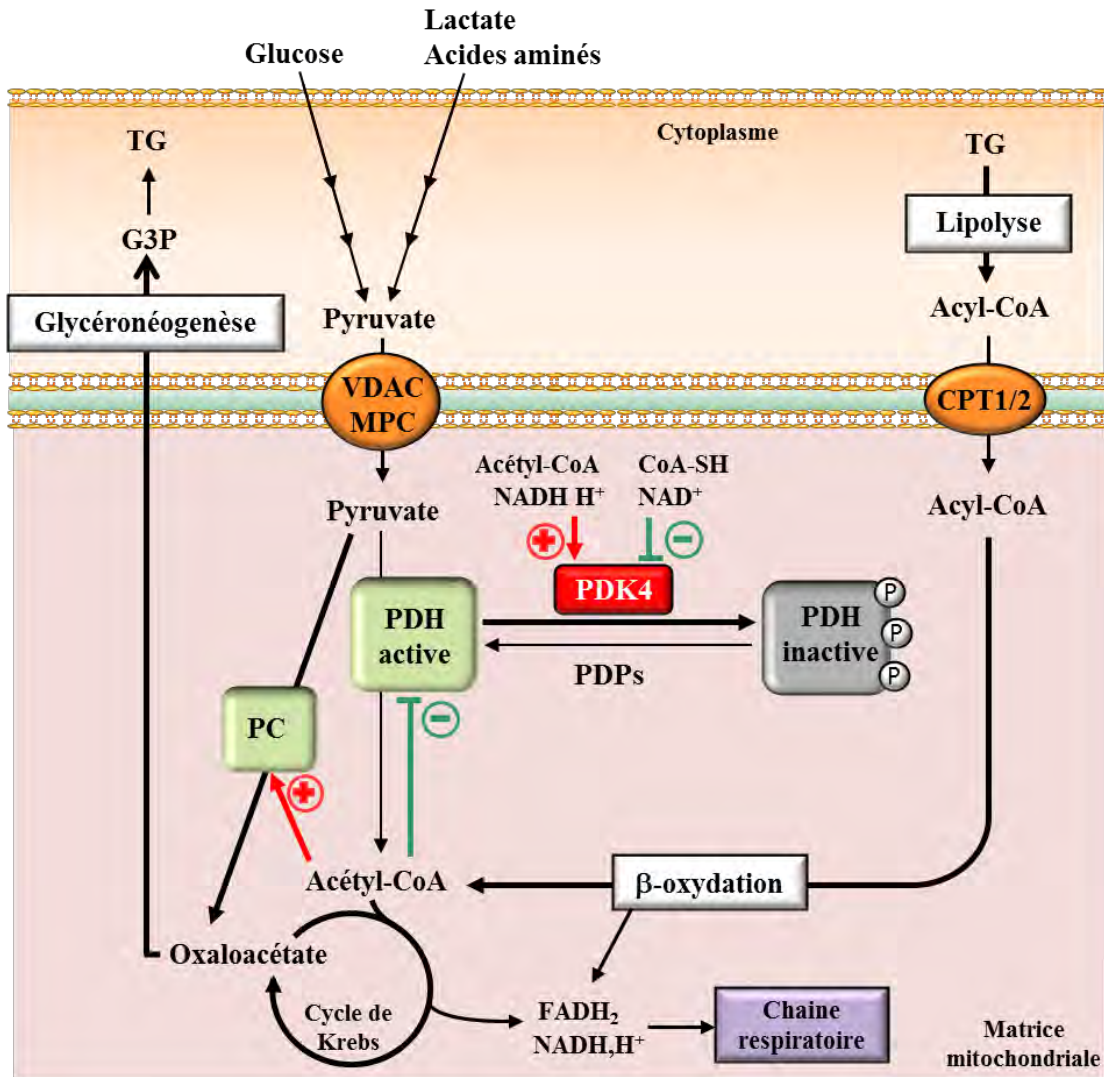


Figure 37 : Représentation schématique de la régulation du métabolisme énergétique par le complexe pyruvate déshydrogénase (PDH).

Le pyruvate provenant soit du glucose, soit du lactate ou soit des acides aminés, pénètre dans les mitochondries par l'intermédiaire du canal anionique voltage-dépendant (VDAC) et des transporteurs mitochondriaux du pyruvate (MPC). Il est ensuite transformé soit en oxaloacétate par la pyruvate carboxylase (PC), soit en acétyl-CoA par la PDH. L'acétyl-CoA entre alors dans le cycle de Krebs qui produit des  $\text{FADH}_2$  et des  $\text{NADH H}^+$  nécessaires au fonctionnement de la chaîne respiratoire. La régulation du complexe PDH s'effectue par un mécanisme de phosphorylation/déphosphorylation catalysé par les PDH phosphatases (PDPs) qui activent le complexe, et par les PDH kinases (PDKs) qui l'inactivent. Les principaux facteurs de régulations des PDKs sont les produits de la réaction (acétyl-CoA et  $\text{NADH H}^+$ ) comme représentés ci-dessus. L'acétyl-CoA régule aussi le complexe PDH par rétroaction négative et augmente l'activité de la PC. Dans les cellules hMADS converties en adipocytes brites, la PDH est phosphorylé par la PDK4 diminuant ainsi la décarboxylation oxydative du pyruvate en acétyl-CoA, qui est alors fourni par la  $\beta$ -oxydation les acides gras issus de la lipolyse. Le pyruvate est lui dirigé vers la voie de synthèse du glycérol-3-phosphate (G3P), un élément essentiel pour la synthèse des triglycérides (TG). CoA-SH : coenzyme A, CPT : Carnitine palmitoyltransferase,  $\text{FADH}_2$  : Flavine adénine dinucléotide  $\text{H}_2$ ,  $\text{NADH H}^+$  : Nicotinamide adénine dinucléotide  $\text{H}$ ,  $\text{H}^+$ .

### Les PPARs et le brunissement *in vitro*

L'augmentation des voies anaboliques et cataboliques des acides gras que nous observons dans les cellules brunies est cohérente avec les données de la littérature. Chez l'Homme, des mesures de PET-CT montrent qu'une exposition au froid entraîne une augmentation de 1,4 fois de l'activité lipolytique en parallèle d'une augmentation de 2,1 fois du métabolisme oxydatif (Blondin et al., 2015). Les auteurs montrent que le glucose circulant capté par le TA brun n'est pas associé au métabolisme oxydatif du TA brun, mais est inversement corrélé au contenu en triglycéride. Au contraire, une corrélation positive entre le métabolisme oxydatif et les concentrations en acides gras circulants a été établie. De plus, la mesure des capacités oxydatives du TA brun chez l'Homme, confirme que les triglycérides intracellulaires sont la source d'énergie principale pour la thermogénèse (Blondin et al., 2014). Ces résultats concordent avec les données chez l'animal, qui montrent que la lipolyse et l'oxydation des acides gras sont induites lors du brunissement du TA blanc ou dans le TA brun (Labbe et al., 2015). Au contraire, toute altération de la voie de la lipolyse ou de la  $\beta$ -oxydation entraîne une perte des capacités thermogéniques du TA brun, ce qui souligne l'importance de l'activation de ces voies au cours du brunissement. En effet, nous montrons que la consommation d'oxygène plus élevée dans les adipocytes bruns revient au niveau des adipocytes blancs lorsque l'oxydation des acides gras est bloquée par l'étomoxir. De plus, une inhibition intracellulaire de la lipolyse du TA brun entraîne une chute drastique de la thermogénèse induite par le froid (Labbe et al., 2015).

Le résultat étonnant de notre étude est la diminution du transport du glucose dans les adipocytes brunis qui pourrait être liée à la moindre expression de GLUT1. En effet, il a été montré *in vitro* et *in vivo* que le brunissement augmente le transport du glucose chez l'animal (Mossenbock et al., 2014; Olsen et al., 2014; Xue et al., 2015). On peut émettre deux hypothèses pour expliquer ce phénomène. La première, est qu'il peut s'agir d'une différence entre l'Homme et l'animal. Une étude précédente réalisée dans le laboratoire avait montré que PPAR $\alpha$ , et dans une moindre mesure PPAR $\gamma$ , diminuent le transport du glucose stimulé par l'insuline dans les adipocytes blancs humains (Ribet et al., 2010). La deuxième hypothèse, est qu'il est possible qu'une stimulation adrénérgique soit nécessaire pour induire l'augmentation du transport du glucose dans nos cellules. Cette hypothèse est renforcée par nos résultats sur les souris traitées avec un agoniste  $\beta_3$ -adrénérgique qui ont une expression augmentée de GLUT1 dans le TA blanc.

Refaire les mesures du transport du glucose en présence d'un agoniste  $\beta$ -adrénergique permettrait d'éclaircir ce point.

Dans nos études, nous avons utilisé des agonistes ciblant uniquement soit PPAR $\gamma$  soit PPAR $\alpha$ . L'analyse des puces à ADN montre un large chevauchement des gènes régulés, et aucune différence notable n'a été observée parmi tous les paramètres examinés. Bien que les doses des agonistes aient été choisies pour être spécifiques de chaque sous-type de PPAR, on ne peut pas complètement exclure que cela soit suffisant pour induire l'activation de l'autre isotype. On sait aussi que les deux agonistes activent l'expression de nombreux gènes cibles communs. C'est notamment le cas de PGC1 $\alpha$ , le co-activateur central de la mitochondriogenèse et d'UCP1 (Hondares et al., 2006; Tiraby and Langin, 2005). Les deux isotypes sont aussi capables d'interagir avec les mêmes facteurs de transcription, comme PRDM16, pour induire le programme thermogénique (Hondares et al., 2011b; Ohno et al., 2012). Ces différents mécanismes peuvent expliquer les effets similaires entre la rosiglitazone et le GW7647 dans les hMADS.

Récemment, une nouvelle classe de molécules a été développée pour activer simultanément deux isotypes de PPARs. Ces doubles agonistes sont essentiellement dirigés vers le couple PPAR $\alpha$ /PPAR $\gamma$ , dans le but de combiner les effets de la diminution des triglycérides et de l'élévation des HDL des agonistes de PPAR $\alpha$  avec l'effet de l'amélioration de la sensibilité à l'insuline des agonistes de PPAR $\gamma$ . C'est ainsi qu'est née la famille des glitazars (Balakumar et al., 2007). Il serait intéressant de tester si le saroglitazar, un double agoniste PPAR $\alpha$ / $\gamma$  actuellement utilisé en Inde contre le diabète de type 2, possède la même capacité à convertir les cellules hMADS en adipocytes brites (Shetty et al., 2015). De plus, comparer le métabolisme des adipocytes convertis par un simple agoniste avec celui des adipocytes convertis par un double agoniste, permettrait d'identifier d'éventuelles différences, notamment au niveau du transport du glucose.

PPAR $\beta$ / $\delta$  est aussi exprimé dans le TA brun. Il est impliqué dans la régulation des gènes thermogéniques et de la  $\beta$ -oxydation (Wang et al., 2003b). Par conséquent, il est fort probable que les agonistes de PPAR $\beta$ / $\delta$  soient aussi capables de convertir les adipocytes blancs en adipocytes brites. Enfin, il serait intéressant d'étudier le bézafibrate, qui est le seul pan-agoniste actuellement sur le marché, utilisé contre l'hypercholestérolémie et l'hyperglycémie. Il active les trois isotypes PPARs à des doses comparables à d'autres fibrates (Tenenbaum and Fisman, 2012; Tenenbaum et al., 2005).

### Les PPARs et le brunissement *in vivo*

Le but de l'étude des animaux invalidés pour le gène PPAR $\alpha$  était de valider le rôle de PPAR $\alpha$  dans le brunissement *in vivo*. C'est pourquoi nous nous sommes concentrés uniquement sur la morphologie des adipocytes et l'expression génique et protéique des gènes du brunissement. Aucun paramètre métabolique (tolérance au glucose ou à l'insuline) n'a été mesuré. Les résultats obtenus valident le rôle de PPAR $\alpha$  dans le brunissement du TA blanc. L'induction de l'expression génique et protéique d'UCP1 et PDK4, ainsi que d'autres marqueurs adipocytaires bruns/brites, par l'agoniste  $\beta$ 3-adrénergique CL316,243 est fortement diminuée dans les souris invalidées pour PPAR $\alpha$  par rapport aux souris témoins dans le TA blanc inguinal. Par contre, dans le TA brun, l'absence de PPAR $\alpha$  n'a pas de conséquence sur l'expression des marqueurs spécifiques des adipocytes bruns et brites. La seule exception est PDK4, dont l'expression est diminuée dans les souris invalidées pour PPAR $\alpha$  par rapport aux souris témoins. Cette diminution est observée que les souris soient traitées ou non au CL316,243. Ces résultats concordent avec un article, qui montre que l'inhibition de l'expression de PPAR $\alpha$  dans des adipocytes bruns de souris, par des ARN interférents ou par un antagoniste, réduit l'induction de l'expression de PDK4 par un agoniste  $\beta$ -adrénergique (Mottillo et al., 2012). Une autre étude sur des souris invalidées pour le gène PPAR $\alpha$ , a mis en évidence une activité de la PDH plus faible par rapport aux souris témoins. Cependant, aucune modification de l'expression de PDK4 n'est observée entre les souris invalidées pour PPAR $\alpha$  et les souris témoins (Komatsu et al., 2010). Cette différence avec nos résultats est peut-être due au fonds génétique des souris (Sv/129 vs C57bl/6), ou au fait que ces souris n'aient pas été placées à thermoneutralité.

Cette étude sur le rôle de PPAR $\alpha$  dans le brunissement *in vivo* comprenait à l'origine deux traitements supplémentaires : un agoniste de PPAR $\alpha$ , le WY14,643 (WY : 40mg/kg/j) et le double traitement WY14643 et CL316,243. Généralement, le WY est incorporé à la nourriture ; le CL316,243 est, lui, administré par une injection intrapéritonéale. Afin d'éviter de trop stresser les animaux, nous avons décidé de délivrer les deux molécules par voie intrapéritonéale, étant donné que cette méthode d'administration avait déjà été utilisée et publiée par d'autres équipes (Fu et al., 2003; Karimian Azari et al., 2013).

Il est connu que le WY induit une hépatomégalie du foie des souris sauvages, alors que le poids du foie des souris dépourvues du gène de PPAR $\alpha$  ne change pas (Desvergne and Wahli, 1999;

Woods et al., 2007). A notre grande surprise, le poids du foie des souris sauvages (en mg et en pourcentage du poids total de la souris) n'est pas modifié par le traitement à l'agoniste de PPAR $\alpha$ . Les foies des souris traitées au CL314,243 invalidées pour PPAR $\alpha$  sont plus lourds que ceux des souris sauvages. Ceci est logique, étant donné que les acides gras libérés par le tissu adipeux ne sont pas oxydés et vont donc s'accumuler. Cependant, aucune différence dans le poids du foie n'est observée entre les souris sauvages et dépourvues de PPAR $\alpha$  ayant reçu le double traitement. Ces résultats sont troublants et nous amènent à penser que le traitement avec le WY14643 n'a pas fonctionné. Pour confirmer cela, nous avons mesuré l'expression d'UCP1 dans le TA brun et le TA blanc inguinal. Aussi bien dans le TA brun et le TA blanc, l'expression d'UCP1 chez les souris traitées au WY est au même niveau que celles des souris non traitées. De plus, il n'y a aucune différence entre les génotypes. Similairement, dans les deux tissus étudiés, le double traitement WY+CL entraîne exactement les mêmes résultats qu'avec les souris traitées avec seulement au CL314,243. Il faudrait vérifier l'expression de gènes cibles connues de PPAR $\alpha$  dans le foie pour confirmer que, pour une raison inconnue le traitement avec l'agoniste de PPAR $\alpha$  n'a pas fonctionné. En effet, il est possible que PPAR $\alpha$  soit nécessaire mais pas suffisant pour induire le brunissement du TA blanc.

Il faudrait donc refaire cette expérience, idéalement avec des souris invalidées spécifiquement pour le gène de PPAR $\alpha$  dans le tissu adipeux et avec une administration de l'agoniste de PPAR $\alpha$  via l'alimentation. Il faudra porter une attention particulière aux souris recevant le double traitement WY+CL, car durant l'expérience, sur les 9 animaux invalidés pour le gène de PPAR $\alpha$  soumis au double traitement, 4 sont morts sans que l'on puisse en déterminer la cause. Il a été précédemment montré que le traitement au CL316,243 chez les souris témoins induit une inflammation transitoire du TA blanc mais que cette inflammation persiste chez les souris invalidées pour le gène PPAR $\alpha$  (Li et al., 2005). Contrairement à notre étude, ces souris n'étaient pas à thermoneutralité. On peut supposer que l'inflammation du TA blanc provoquée par le double traitement soit en partie responsable de la mort des souris invalidées pour le gène PPAR $\alpha$ . Il serait intéressant de tester chez ces souris, un traitement supplémentaire avec la rosiglitazone pour voir si l'absence de PPAR $\alpha$  affecte le brunissement par un agoniste de PPAR $\gamma$ .

Si les résultats *in vitro* montreraient que les doubles et pan-agonistes seraient capables d'induire le brunissement des adipocytes blancs, on pourrait émettre l'hypothèse qu'une partie des effets bénéfiques de ces traitements sur le diabète de type 2 et les maladies



cardiovasculaires, pourrait être due à ce mécanisme. Peu d'études se sont intéressées aux effets de doubles et pan-agonistes sur le brunissement du TA blanc. Il a été montré que le bézafibrate induit l'oxydation des acides gras dans des adipocytes primaires de rats issus de l'épididyme, et qu'un traitement de 5 à 15 jours au bézafibrate augmente légèrement l'expression d'UCP1 dans le TA blanc épидидymal mais pas dans le TA brun (Cabrero et al., 2001; Cabrero et al., 1999; Vazquez et al., 2001).

Il serait donc intéressant de traiter des souris sauvages ou invalidées pour le gène UCP1 avec ces différents agonistes. Une étude approfondie de ces animaux (mesure de la dépense énergétique, du profil lipidique, de la tolérance au glucose et à l'insuline, de l'expression des gènes thermogéniques...) permettrait de savoir si l'amélioration du profil métabolique observée lors de ces traitements, passe par l'activation de la thermogénèse. De plus, on pourrait aussi effectuer les mêmes expériences sur des souris spécifiquement invalidées pour le gène PRDM16 dans le tissu adipeux (Cohen et al., 2014). Comme la délétion de PRDM16 se fait après l'étape clé de séparation entre les lignages musculaire et adipocytaire brun, les souris invalidées pour PRDM16 ont un TA brun quasiment intact alors que le développement des adipocytes bruns est inhibé. Cela permettrait de dissocier les effets observés venant du TA brun de ceux du brunissement du TA blanc.

### La fission des mitochondries

La dynamique mitochondriale est essentielle pour maintenir une fonction mitochondriale optimale selon les conditions nutritionnelles et les besoins physiologiques. La fusion mitochondriale est particulièrement importante pour optimiser la fonction mitochondriale et contrecarre l'accumulation de mutations au cours du vieillissement. La fusion permet la diffusion des métabolites, des enzymes et des complexes mitochondriaux dans l'ensemble des mitochondries. La fission joue un rôle important dans l'élimination des mitochondries endommagées par autophagie (Youle and van der Bliek, 2012). Les changements dans l'architecture mitochondriale représentent une adaptation des mitochondries selon les besoins énergétiques de la cellule (Liesa and Shirihai, 2013). Dans le muscle et les cellules  $\beta$ -pancréatiques, la restriction calorique et l'exercice qui nécessitent la synthèse et le maintien des niveaux d'ATP cellulaires conduisent à la fusion des mitochondries (Gomes and Scorrano, 2011). A l'inverse, la surnutrition et les faibles besoins en ATP induisent la fission des mitochondries (Archer, 2013; Molina et al., 2009).

Dans cette étude, nous avons montré que la conversion des adipocytes blancs en adipocytes bruns par les agonistes de PPAR $\gamma$  et de PPAR $\alpha$  s'accompagne d'une mitochondriogenèse et d'une augmentation de la respiration basale et découplée. En plus, la production de chaleur par les adipocytes bruns implique une fission préalable des mitochondries.

Ce résultat soulève plusieurs questions. Par exemple, peut-on faire une corrélation entre le niveau de fission mitochondriale et la capacité des différents dépôts adipeux à brunir ? Conserve-t-on une fission mitochondriale dans des adipocytes sans UCP1 ? Pour ce faire, on pourrait exposer des souris sauvages ou invalidées pour le gène UCP1, au froid ou les traiter avec un agoniste  $\beta$ -adrénergique. L'étude du niveau de phosphorylation de DRP1 et de la morphologie des mitochondries des différents dépôts adipeux et organes permettrait de répondre à ces questions. Il serait aussi intéressant de faire un suivi de la morphologie des mitochondries dans les adipocytes bruns et blancs lors d'une longue acclimatation au froid. Il est possible que cette fission des mitochondries ne soit que temporaire, pour peut-être activer rapidement le découplage et la thermogenèse, et qu'après plusieurs jours/semaines d'adaptation au froid, certaines mitochondries (re)fusionnent, tout en gardant une activité thermogénique.

La fission est médiée par la protéine DRP1 (Dynamamin related protein 1), son activation entraîne sa translocation du cytosol vers les mitochondries. L'activité DRP1 est régulée par la phosphorylation de deux sérines : la phosphorylation de la sérine 616 augmente son activité, alors que la phosphorylation de la sérine 637 la diminue (Palmer et al., 2011). Dans les cellules hMADS traitées avec la rosiglitazone et le GW7647, nous avons une augmentation de la phosphorylation de la sérine 616 de DRP1. Contrairement à des données chez la souris, où la fission des mitochondries par DRP1 dans les adipocytes bruns nécessite l'activation de la protéine kinase A par un agoniste  $\beta$ -adrénergique, les cellules hMADS brunies se « fissionnent » sans stimulation préalable (Wikstrom et al., 2014).

Cette différence peut être due à l'utilisation de modèles d'étude distincts, notre étude est réalisée sur des cellules humaines *in vitro* tandis que leur étude s'est faite sur des souris *in vivo*. Il est aussi probable que les agonistes de PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$  induisent la phosphorylation de DRP1 par un mécanisme distinct de celui de la protéine kinase A. Par exemple, la CDK1/cycline B (cycline B1- kinase cycline-dépendante) ou la CaMKI $\alpha$  (Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase I $\alpha$ ) phosphorylent toutes deux DRP1 et activent la fission mitochondriale (Palmer et al., 2011). Il faudrait reprendre les résultats des puces à ADN et voir si, parmi la liste des gènes

positivement et négativement régulés, figurent des protéines connues pour réguler DRP1. On pourrait aussi refaire ces expériences dans d'autres lignées d'adipocytes humains. Cela permettrait de confirmer les résultats obtenus, et de savoir si la fission des mitochondries en l'absence de stimulation est une particularité des cellules hMADS. Une autre approche serait d'exposer au froid des souris sauvages ou invalidées pour les gènes PPAR $\gamma$  ou PPAR $\alpha$  dans le tissu adipeux. Ceci nous permettrait de vérifier si l'expression de PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$  est indispensable à la fission des mitochondries.

Les peptides natriurétiques et l'activation de la voie de la protéine kinase G pourraient également être impliqués dans la fission mitochondriale. En effet, les peptides natriurétiques favorisent le brunissement du TA blanc et la thermogénèse du TA brun en augmentant la biogénèse mitochondriale et la consommation d'oxygène (Bordicchia et al., 2012; Mitschke et al., 2013; Souza et al., 2011). Nous disposons au laboratoire de souris invalidées pour le récepteur aux peptides natriurétiques NPR1. La comparaison de la morphologie des mitochondries et de la phosphorylation de DRP1 entre les souris invalidées pour NPR1 et les souris témoins après une exposition au froid pourrait donner un début de réponse.

#### Etude chez l'Homme

L'idéal serait de pouvoir mesurer par PET-CT les capacités oxydatives et l'absorption du glucose et des acides gras par le TA brun sur des sujets sains ou traités avec des fibrates ou des thiazolidinediones, et d'âge, de sexe et d'IMC comparables. A température ambiante, il n'est pas certain que l'on puisse détecter une différence entre ces groupes, car la présence d'un TA brun détectable est alors très faible. Par contre, après une exposition au froid on peut espérer voir une différence. Si les agonistes de PPAR $\gamma$  et PPAR $\alpha$  favorisent bien le brunissement du TA blanc, les capacités oxydatives et la quantité de glucose et d'acides gras captés par ce tissu devraient être augmentées chez les patients traités, par rapport aux non traités. Enfin, des biopsies du TA sous-cutané et du cou permettraient de valider définitivement la relation entre la morphologie des mitochondries et l'activité thermogénique des adipocytes.

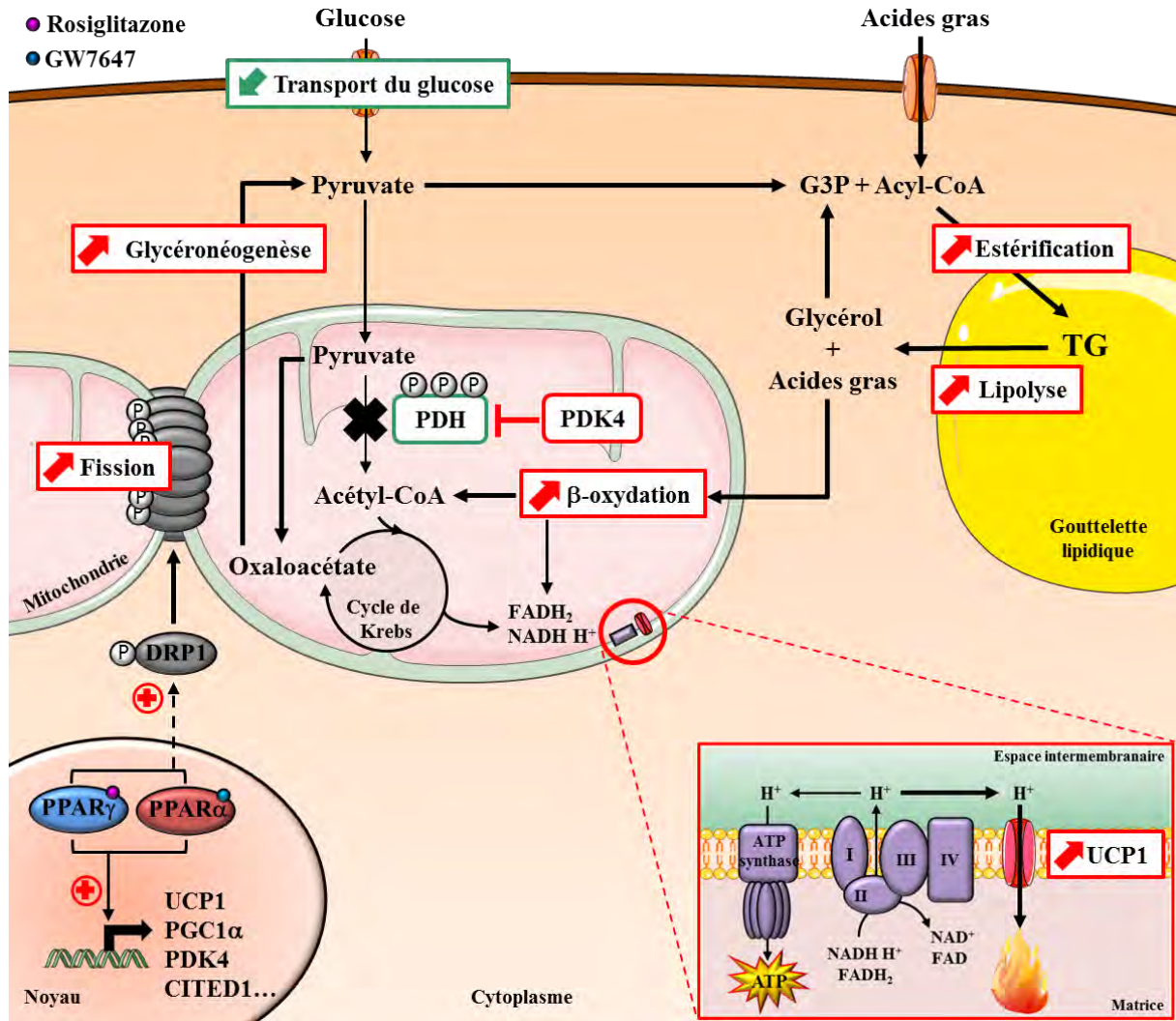


Figure 38 : Conséquences morphologiques et métaboliques de la conversion d'adipocytes blancs humains en adipocytes bruns par les agonistes de PPAR $\gamma$  et de PPAR $\alpha$ .

Le traitement d'adipocytes blancs par les agonistes de PPAR $\gamma$  (Rosiglitazone) et de PPAR $\alpha$  (GW7647) induit la conversion des adipocytes blancs en adipocytes bruns comme le montre la forte augmentation de l'expression de nombreux gènes marqueurs des adipocytes bruns et bruns. Cette brunisation entraîne des modifications de l'architecture mitochondriale et du métabolisme énergétique. Au niveau mitochondrial, les deux agonistes entraînent une augmentation de la biogenèse, de l'activité ainsi qu'une fission mitochondriale. Ce processus de fission, via l'augmentation de la phosphorylation de DRP1, est un mécanisme essentiel pour induire l'activité de découplage de la protéine UCP1 et la thermogénèse. En parallèle, cette conversion des adipocytes blancs en adipocytes bruns induit de profonds changements métaboliques. Les différentes voies anaboliques (estérfication) et cataboliques (lipolyse et  $\beta$ -oxydation) des acides gras sont induites par les deux agonistes. A l'inverse, le transport du glucose et l'oxydation du pyruvate sont tous deux diminués dans les adipocytes bruns. L'inhibition du complexe pyruvate déshydrogénase (PDH) par la pyruvate déshydrogénase kinase 4 (PDK4), réduit l'entrée du pyruvate dans le cycle de Krebs qui est alors redirigé vers la voie de la glycéroneogenèse, afin de fournir le glycérol-3-phosphate (G3P) nécessaire à la synthèse des triglycérides (TG). Ainsi, l'ensemble du métabolisme des adipocytes bruns est réorganisé vers l'utilisation des acides gras intracellulaire comme substrats énergétiques pour la thermogénèse mitochondriale. DRP1 : Dynamin related protein 1, FADH $_2$  : Flavine adénine dinucléotide H $_2$ , NADH H $^+$  : Nicotinamide adénine dinucléotide H, H $^+$ .

---

## **CONCLUSION**

---

En conclusion, ces résultats démontrent que les adipocytes blancs matures humains peuvent être convertis, par les agonistes de PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$ , en adipocytes bruns. Cette conversion entraîne une refonte complète du métabolisme vers l'utilisation des acides gras comme substrat préférentiel. Nous avons identifié PDK4 comme un médiateur essentiel de ces changements métaboliques. Il dirige le glucose vers la voie de la glycéronéogenèse nécessaire au bon fonctionnement du cycle futile lipolyse/ré-estérification. De plus, la conversion des adipocytes blancs en adipocytes bruns par les agonistes de PPAR $\alpha$  et de PPAR $\gamma$  provoque une biogenèse mitochondriale, le remodelage de la structure et des fonctions des mitochondries, nécessaires au découplage mitochondrial. Ainsi la conversion des adipocytes blancs en adipocytes bruns chez l'Homme peut être envisagée comme une nouvelle stratégie thérapeutique dans la lutte contre l'obésité. Néanmoins, seulement recruter ou activer les adipocytes thermogéniques bruns et bruns est probablement insuffisant pour favoriser une perte de poids importante. L'activation de la thermogénèse doit être intégrée dans une stratégie globale, en complément d'autres méthodes (alimentation, activité physique) pour lutter contre les conséquences métaboliques de l'obésité.

---

## **BIBLIOGRAPHIE**

---





## A

- A, I.J., E. Jeannin, W. Wahli, and B. Desvergne. 1997. Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element. *J Biol Chem.* 272:20108-20117.
- A, I.J., N.S. Tan, L. Gelman, S. Kersten, J. Seydoux, J. Xu, D. Metzger, L. Canaple, P. Chambon, W. Wahli, and B. Desvergne. 2004. In vivo activation of PPAR target genes by RXR homodimers. *The EMBO journal.* 23:2083-2091.
- Abreu-Vieira, G., C.E. Hagberg, K.L. Spalding, B. Cannon, and J. Nedergaard. 2015. Adrenergically stimulated blood flow in brown adipose tissue is not dependent on thermogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 308:E822-829.
- Adam, J.A., P.P. Menheere, F.M. van Dielen, P.B. Soeters, W.A. Buurman, and J.W. Greve. 2002. Decreased plasma orexin-A levels in obese individuals. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 26:274-276.
- Aherne, W., and D. Hull. 1966. Brown adipose tissue and heat production in the newborn infant. *J Pathol Bacteriol.* 91:223-234.
- Ahmadian, M., J.M. Suh, N. Hah, C. Liddle, A.R. Atkins, M. Downes, and R.M. Evans. 2013. PPARgamma signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med.* 19:557-566.
- Akerblad, P., U. Lind, D. Liberg, K. Bamberg, and M. Sigvardsson. 2002. Early B-cell factor (O/E-1) is a promoter of adipogenesis and involved in control of genes important for terminal adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol.* 22:8015-8025.
- Albrecht, E., F. Norheim, B. Thiede, T. Holen, T. Ohashi, L. Schering, S. Lee, J. Brenmoehl, S. Thomas, C.A. Drevon, H.P. Erickson, and S. Maak. 2015. Irisin - a myth rather than an exercise-inducible myokine. *Sci Rep.* 5:8889.
- Altintas, M.M., A. Azad, B. Nayer, G. Contreras, J. Zaias, C. Faul, J. Reiser, and A. Nayer. 2011. Mast cells, macrophages, and crown-like structures distinguish subcutaneous from visceral fat in mice. *J Lipid Res.* 52:480-488.
- Amin, R.H., S.T. Mathews, H.S. Camp, L. Ding, and T. Leff. 2010. Selective activation of PPARgamma in skeletal muscle induces endogenous production of adiponectin and protects mice from diet-induced insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 298:E28-37.
- Amri, E.Z., F. Bonino, G. Ailhaud, N.A. Abumrad, and P.A. Grimaldi. 1995. Cloning of a protein that mediates transcriptional effects of fatty acids in preadipocytes. Homology to peroxisome proliferator-activated receptors. *J Biol Chem.* 270:2367-2371.
- Annuzzi, G., F. Piscitelli, L. Di Marino, L. Patti, R. Giacco, G. Costabile, L. Bozzetto, G. Riccardi, R. Verde, S. Petrosino, A.A. Rivellese, and V. Di Marzo. 2010. Differential alterations of the concentrations of endocannabinoids and related lipids in the subcutaneous adipose tissue of obese diabetic patients. *Lipids Health Dis.* 9:43.
- Aoyama, T., J.M. Peters, N. Iritani, T. Nakajima, K. Furihata, T. Hashimoto, and F.J. Gonzalez. 1998. Altered constitutive expression of fatty acid-metabolizing enzymes in mice lacking the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha). *J Biol Chem.* 273:5678-5684.
- Aquila, H., T.A. Link, and M. Klingenberg. 1985. The uncoupling protein from brown fat mitochondria is related to the mitochondrial ADP/ATP carrier. Analysis of sequence homologies and of folding of the protein in the membrane. *The EMBO journal.* 4:2369-2376.

- Aranda, A., and A. Pascual. 2001. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev.* 81:1269-1304.
- Arch, J.R. 2008. The discovery of drugs for obesity, the metabolic effects of leptin and variable receptor pharmacology: perspectives from beta3-adrenoceptor agonists. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 378:225-240.
- Archer, S.L. 2013. Mitochondrial dynamics--mitochondrial fission and fusion in human diseases. *N Engl J Med.* 369:2236-2251.
- Arechaga, I., A. Ledesma, and E. Rial. 2001. The mitochondrial uncoupling protein UCP1: a gated pore. *IUBMB Life.* 52:165-173.
- Arita, Y., S. Kihara, N. Ouchi, M. Takahashi, K. Maeda, J. Miyagawa, K. Hotta, I. Shimomura, T. Nakamura, K. Miyaoka, H. Kuriyama, M. Nishida, S. Yamashita, K. Okubo, K. Matsubara, M. Muraguchi, Y. Ohmoto, T. Funahashi, and Y. Matsuzawa. 1999. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun.* 257:79-83.
- Arner, P., and D. Langin. 2014. Lipolysis in lipid turnover, cancer cachexia, and obesity-induced insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab.* 25:255-262.
- Asano, A., K. Kimura, and M. Saito. 1999. Cold-induced mRNA expression of angiogenic factors in rat brown adipose tissue. *J Vet Med Sci.* 61:403-409.
- Astrup, A. 1986. Thermogenesis in human brown adipose tissue and skeletal muscle induced by sympathomimetic stimulation. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh).* 278:1-32.
- Astrup, A., J. Bulow, J. Madsen, and N.J. Christensen. 1985a. Contribution of BAT and skeletal muscle to thermogenesis induced by ephedrine in man. *Am J Physiol.* 248:E507-515.
- Astrup, A., C. Lundsgaard, J. Madsen, and N.J. Christensen. 1985b. Enhanced thermogenic responsiveness during chronic ephedrine treatment in man. *Am J Clin Nutr.* 42:83-94.
- Atit, R., S.K. Sgaier, O.A. Mohamed, M.M. Taketo, D. Dufort, A.L. Joyner, L. Niswander, and R.A. Conlon. 2006. Beta-catenin activation is necessary and sufficient to specify the dorsal dermal fate in the mouse. *Dev Biol.* 296:164-176.

## B

- Baer, P.C. 2014. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: An update on their phenotype in vivo and in vitro. *World J Stem Cells.* 6:256-265.
- Balakumar, P., M. Rose, S.S. Ganti, P. Krishan, and M. Singh. 2007. PPAR dual agonists: are they opening Pandora's Box? *Pharmacol Res.* 56:91-98.
- Banerjee, S.S., M.W. Feinberg, M. Watanabe, S. Gray, R.L. Haspel, D.J. Denking, R. Kawahara, H. Hauner, and M.K. Jain. 2003. The Kruppel-like factor KLF2 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression and adipogenesis. *J Biol Chem.* 278:2581-2584.
- Banks, A.S., F.E. McAllister, J.P. Camporez, P.J. Zushin, M.J. Jurczak, D. Laznik-Bogoslavski, G.I. Shulman, S.P. Gygi, and B.M. Spiegelman. 2015. An ERK/Cdk5 axis controls the diabetogenic actions of PPARgamma. *Nature.* 517:391-395.
- Bao, H., S.A. Kasten, X. Yan, and T.E. Roche. 2004. Pyruvate dehydrogenase kinase isoform 2 activity limited and further inhibited by slowing down the rate of dissociation of ADP. *Biochemistry.* 43:13432-13441.
- Barbatelli, G., I. Murano, L. Madsen, Q. Hao, M. Jimenez, K. Kristiansen, J.P. Giacobino, R. De Matteis, and S. Cinti. 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:E1244-1253.

- Barbera, M.J., A. Schluter, N. Pedraza, R. Iglesias, F. Villarroya, and M. Giral. 2001. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activates transcription of the brown fat uncoupling protein-1 gene. A link between regulation of the thermogenic and lipid oxidation pathways in the brown fat cell. *J Biol Chem.* 276:1486-1493.
- Bartelt, A., O.T. Bruns, R. Reimer, H. Hohenberg, H. Ittrich, K. Peldschus, M.G. Kaul, U.I. Tromsdorf, H. Weller, C. Waurisch, A. Eychmuller, P.L. Gordts, F. Rinninger, K. Bruegelmann, B. Freund, P. Nielsen, M. Merkel, and J. Heeren. 2011. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat Med.* 17:200-205.
- Bartelt, A., and J. Heeren. 2014. Adipose tissue browning and metabolic health. *Nat Rev Endocrinol.* 10:24-36.
- Bartness, T.J., and C.K. Song. 2007. Brain-adipose tissue neural crosstalk. *Physiol Behav.* 91:343-351.
- Bartness, T.J., C.H. Vaughan, and C.K. Song. 2010. Sympathetic and sensory innervation of brown adipose tissue. *Int J Obes (Lond).* 34 Suppl 1:S36-42.
- Basen-Engquist, K., and M. Chang. 2011. Obesity and cancer risk: recent review and evidence. *Curr Oncol Rep.* 13:71-76.
- Behal, R.H., D.B. Buxton, J.G. Robertson, and M.S. Olson. 1993. Regulation of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex. *Annual review of nutrition.* 13:497-520.
- Berg, F., U. Gustafson, and L. Andersson. 2006. The uncoupling protein 1 gene (UCP1) is disrupted in the pig lineage: a genetic explanation for poor thermoregulation in piglets. *PLoS Genet.* 2:e129.
- Berger, J., and D.E. Moller. 2002. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med.* 53:409-435.
- Bergeron, R., J. Yao, J.W. Woods, E.I. Zycband, C. Liu, Z. Li, A. Adams, J.P. Berger, B.B. Zhang, D.E. Moller, and T.W. Doebber. 2006. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-alpha agonism prevents the onset of type 2 diabetes in Zucker diabetic fatty rats: A comparison with PPAR gamma agonism. *Endocrinology.* 147:4252-4262.
- Bergouignan, A., and S. Blanc. 2006. [The energetics of obesity]. *J Soc Biol.* 200:29-35.
- Bezaire, V., and D. Langin. 2009. Regulation of adipose tissue lipolysis revisited. *The Proceedings of the Nutrition Society.* 68:350-360.
- Bezaire, V., A. Mairal, R. Anesia, C. Lefort, and D. Langin. 2009a. Chronic TNFalpha and cAMP pre-treatment of human adipocytes alter HSL, ATGL and perilipin to regulate basal and stimulated lipolysis. *FEBS letters.* 583:3045-3049.
- Bezaire, V., A. Mairal, C. Ribet, C. Lefort, A. Gironse, J. Jocken, J. Laurencikiene, R. Anesia, A.M. Rodriguez, M. Ryden, B.M. Stenson, C. Dani, G. Ailhaud, P. Arner, and D. Langin. 2009b. Contribution of adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase to lipolysis in hMADS adipocytes. *J Biol Chem.* 284:18282-18291.
- Bezaire, V., E.L. Seifert, and M.E. Harper. 2007. Uncoupling protein-3: clues in an ongoing mitochondrial mystery. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 21:312-324.
- Bianco, A.C., and E.A. McAninch. 2013. The role of thyroid hormone and brown adipose tissue in energy homeostasis. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 1:250-258.
- Billon, N., P. Iannarelli, M.C. Monteiro, C. Glavieux-Pardanaud, W.D. Richardson, N. Kessar, C. Dani, and E. Dupin. 2007. The generation of adipocytes by the neural crest. *Development.* 134:2283-2292.
- Bishop-Bailey, D., and J. Bystrom. 2009. Emerging roles of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta in inflammation. *Pharmacol Ther.* 124:141-150.
- Bishop-Bailey, D., and J. Wray. 2003. Peroxisome proliferator-activated receptors: a critical review on endogenous pathways for ligand generation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 71:1-22.

- Blanquart, C., O. Barbier, J.C. Fruchart, B. Staels, and C. Glineur. 2002. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) turnover by the ubiquitin-proteasome system controls the ligand-induced expression level of its target genes. *J Biol Chem.* 277:37254-37259.
- Blondin, D.P., S.M. Labbe, S. Phoenix, B. Guerin, E.E. Turcotte, D. Richard, A.C. Carpentier, and F. Haman. 2015. Contributions of white and brown adipose tissues and skeletal muscles to acute cold-induced metabolic responses in healthy men. *The Journal of physiology.* 593:701-714.
- Blondin, D.P., S.M. Labbe, H.C. Tingelstad, C. Noll, M. Kunach, S. Phoenix, B. Guerin, E.E. Turcotte, A.C. Carpentier, D. Richard, and F. Haman. 2014. Increased brown adipose tissue oxidative capacity in cold-acclimated humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 99:E438-446.
- Boeszoermyeni, A., H.M. Nagy, H. Arthanari, C.J. Pillip, H. Lindermuth, R.E. Luna, G. Wagner, R. Zechner, K. Zangger, and M. Oberer. 2015. Structure of a CGI-58 Motif Provides the Molecular Basis of Lipid Droplet Anchoring. *J Biol Chem.*
- Bonet, M.L., P. Oliver, and A. Palou. 2013. Pharmacological and nutritional agents promoting browning of white adipose tissue. *Biochimica et biophysica acta.* 1831:969-985.
- Bordicchia, M., D. Liu, E.Z. Amri, G. Ailhaud, P. Dessi-Fulgheri, C. Zhang, N. Takahashi, R. Sarzani, and S. Collins. 2012. Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. *J Clin Invest.* 122:1022-1036.
- Bordone, L., M.C. Motta, F. Picard, A. Robinson, U.S. Jhala, J. Apfeld, T. McDonagh, M. Lemieux, M. McBurney, A. Szilvasi, E.J. Easlou, S.J. Lin, and L. Guarente. 2006. Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells. *PLoS Biol.* 4:e31.
- Bostrom, P., J. Wu, M.P. Jedrychowski, A. Korde, L. Ye, J.C. Lo, K.A. Rasbach, E.A. Bostrom, J.H. Choi, J.Z. Long, S. Kajimura, M.C. Zingaretti, B.F. Vind, H. Tu, S. Cinti, K. Hojlund, S.P. Gygi, and B.M. Spiegelman. 2012. A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature.* 481:463-468.
- Bouchard, C., L. Perusse, C. Leblanc, A. Tremblay, and G. Theriault. 1988. Inheritance of the amount and distribution of human body fat. *Int J Obes.* 12:205-215.
- Boucher, J., B. Masri, D. Daviaud, S. Gesta, C. Guigne, A. Mazzucotelli, I. Castan-Laurell, I. Tack, B. Knibiehler, C. Carpenne, Y. Audigier, J.S. Saulnier-Blache, and P. Valet. 2005. Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology.* 146:1764-1771.
- Boucher, J., M.A. Mori, K.Y. Lee, G. Smyth, C.W. Liew, Y. Macotela, M. Rourk, M. Blucher, S.J. Russell, and C.R. Kahn. 2012. Impaired thermogenesis and adipose tissue development in mice with fat-specific disruption of insulin and IGF-1 signalling. *Nat Commun.* 3:902.
- Bouillaud, F. 2009. UCP2, not a physiologically relevant uncoupler but a glucose sparing switch impacting ROS production and glucose sensing. *Biochimica et biophysica acta.* 1787:377-383.
- Bouillaud, F., D. Ricquier, J. Thibault, and J. Weissenbach. 1985. Molecular approach to thermogenesis in brown adipose tissue: cDNA cloning of the mitochondrial uncoupling protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82:445-448.
- Bowers, R.R., W.T. Festuccia, C.K. Song, H. Shi, R.H. Migliorini, and T.J. Bartness. 2004. Sympathetic innervation of white adipose tissue and its regulation of fat cell number. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 286:R1167-1175.

- Brand, M.D., J.A. Buckingham, T.C. Esteves, K. Green, A.J. Lambert, S. Miwa, M.P. Murphy, J.L. Pakay, D.A. Talbot, and K.S. Echtay. 2004. Mitochondrial superoxide and aging: uncoupling-protein activity and superoxide production. *Biochem Soc Symp*:203-213.
- Brand, M.D., and T.C. Esteves. 2005. Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metab.* 2:85-93.
- Breen, E.P., S.G. Gouin, A.F. Murphy, L.R. Haines, A.M. Jackson, T.W. Pearson, P.V. Murphy, and R.K. Porter. 2006. On the mechanism of mitochondrial uncoupling protein 1 function. *J Biol Chem.* 281:2114-2119.
- Brey, C.W., M.P. Nelder, T. Hailemariam, R. Gaugler, and S. Hashmi. 2009. Kruppel-like family of transcription factors: an emerging new frontier in fat biology. *Int J Biol Sci.* 5:622-636.
- Brito, M.N., N.A. Brito, S.R. Brito, M.A. Moura, N.H. Kawashita, I.C. Kettelhut, and R.H. Migliorini. 1999. Brown adipose tissue triacylglycerol synthesis in rats adapted to a high-protein, carbohydrate-free diet. *Am J Physiol.* 276:R1003-1009.
- Brooks, B.J., J.R. Arch, and E.A. Newsholme. 1983. Effect of some hormones on the rate of the triacylglycerol/fatty-acid substrate cycle in adipose tissue of the mouse in vivo. *Biosci Rep.* 3:263-267.
- Brown, G.C. 1992. Control of respiration and ATP synthesis in mammalian mitochondria and cells. *The Biochemical journal.* 284 ( Pt 1):1-13.
- Brown, P.J., L.W. Stuart, K.P. Hurley, M.C. Lewis, D.A. Winegar, J.G. Wilson, W.O. Wilkison, O.R. Ittoop, and T.M. Willson. 2001. Identification of a subtype selective human PPARalpha agonist through parallel-array synthesis. *Bioorg Med Chem Lett.* 11:1225-1227.
- Burns, K.A., and J.P. Vanden Heuvel. 2007. Modulation of PPAR activity via phosphorylation. *Biochimica et biophysica acta.* 1771:952-960.

## C

- Cabrero, A., M. Alegret, R.M. Sanchez, T. Adzet, J.C. Laguna, and M. Vazquez. 2001. Bezafibrate reduces mRNA levels of adipocyte markers and increases fatty acid oxidation in primary culture of adipocytes. *Diabetes.* 50:1883-1890.
- Cabrero, A., G. Llaverias, N. Roglans, M. Alegret, R. Sanchez, T. Adzet, J.C. Laguna, and M. Vazquez. 1999. Uncoupling protein-3 mRNA levels are increased in white adipose tissue and skeletal muscle of bezafibrate-treated rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 260:547-556.
- Cadoudal, T., J.M. Blouin, M. Collinet, F. Fouque, G.D. Tan, E. Loizon, E.G. Beale, K.N. Frayn, F. Karpe, H. Vidal, C. Benelli, and C. Forest. 2007. Acute and selective regulation of glyceroneogenesis and cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase in adipose tissue by thiazolidinediones in type 2 diabetes. *Diabetologia.* 50:666-675.
- Cadoudal, T., E. Distel, S. Durant, F. Fouque, J.M. Blouin, M. Collinet, S. Bortoli, C. Forest, and C. Benelli. 2008. Pyruvate dehydrogenase kinase 4: regulation by thiazolidinediones and implication in glyceroneogenesis in adipose tissue. *Diabetes.* 57:2272-2279.
- Cannon, B., and J. Nedergaard. 2004. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* 84:277-359.
- Cao, H. 2014. Adipocytokines in obesity and metabolic disease. *J Endocrinol.* 220:T47-59.

- Cao, H., K. Gerhold, J.R. Mayers, M.M. Wiest, S.M. Watkins, and G.S. Hotamisligil. 2008. Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. *Cell*. 134:933-944.
- Cao, J., H. Li, and L. Chen. 2015. Targeting drugs to APJ receptor: the prospect of treatment of hypertension and other cardiovascular diseases. *Curr Drug Targets*. 16:148-155.
- Cao, W., K.W. Daniel, J. Robidoux, P. Puigserver, A.V. Medvedev, X. Bai, L.M. Floering, B.M. Spiegelman, and S. Collins. 2004. p38 mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene. *Mol Cell Biol*. 24:3057-3067.
- Carey, A.L., M.F. Formosa, B. Van Every, D. Bertovic, N. Eikelis, G.W. Lambert, V. Kalff, S.J. Duffy, M.H. Cherk, and B.A. Kingwell. 2013. Ephedrine activates brown adipose tissue in lean but not obese humans. *Diabetologia*. 56:147-155.
- Carriere, A., Y. Jeanson, S. Berger-Muller, M. Andre, V. Chenouard, E. Arnaud, C. Barreau, R. Walther, A. Galinier, B. Wdziekonski, P. Villageois, K. Louche, P. Collas, C. Moro, C. Dani, F. Villarroja, and L. Casteilla. 2014. Browning of white adipose cells by intermediate metabolites: an adaptive mechanism to alleviate redox pressure. *Diabetes*. 63:3253-3265.
- Carroll, A.M., L.R. Haines, T.W. Pearson, P.G. Fallon, C.M. Walsh, C.M. Brennan, E.P. Breen, and R.K. Porter. 2005. Identification of a functioning mitochondrial uncoupling protein 1 in thymus. *J Biol Chem*. 280:15534-15543.
- Carvalho, S.D., A.C. Bianco, and J.E. Silva. 1996. Effects of hypothyroidism on brown adipose tissue adenylyl cyclase activity. *Endocrinology*. 137:5519-5529.
- Caspar-Bauguil, S., C.I. Kolditz, C. Lefort, I. Vila, E. Mouisel, D. Beuzelin, G. Tavernier, M.A. Marques, A. Zakaroff-Girard, C. Pecher, M. Houssier, L. Mir, S. Nicolas, C. Moro, and D. Langin. 2015. Fatty acids from fat cell lipolysis do not activate an inflammatory response but are stored as triacylglycerols in adipose tissue macrophages. *Diabetologia*. 58:2627-2636.
- Castan-Laurell, I., J. Boucher, C. Dray, D. Daviaud, C. Guigne, and P. Valet. 2005. Apelin, a novel adipokine over-produced in obesity: friend or foe? *Mol Cell Endocrinol*. 245:7-9.
- Castan-Laurell, I., C. Dray, C. Attane, T. Duparc, C. Knauf, and P. Valet. 2011. Apelin, diabetes, and obesity. *Endocrine*. 40:1-9.
- Cawthorn, W.P., and J.K. Sethi. 2008. TNF-alpha and adipocyte biology. *FEBS letters*. 582:117-131.
- Cawthorne, M.A., M.V. Sennitt, J.R. Arch, and S.A. Smith. 1992. BRL 35135, a potent and selective atypical beta-adrenoceptor agonist. *Am J Clin Nutr*. 55:252S-257S.
- Cederberg, A., L.M. Gronning, B. Ahren, K. Tasken, P. Carlsson, and S. Enerback. 2001. FOXC2 is a winged helix gene that counteracts obesity, hypertriglyceridemia, and diet-induced insulin resistance. *Cell*. 106:563-573.
- Celi, F.S., T.N. Le, and B. Ni. 2015. Physiology and relevance of human adaptive thermogenesis response. *Trends Endocrinol Metab*. 26:238-247.
- Chabowski, A., J. Gorski, J.J. Luiken, J.F. Glatz, and A. Bonen. 2007. Evidence for concerted action of FAT/CD36 and FABPpm to increase fatty acid transport across the plasma membrane. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 77:345-353.
- Champigny, O., B.R. Holloway, and D. Ricquier. 1992. Regulation of UCP gene expression in brown adipocytes differentiated in primary culture. Effects of a new beta-adrenoceptor agonist. *Mol Cell Endocrinol*. 86:73-82.
- Chandra, V., P. Huang, Y. Hamuro, S. Raghuram, Y. Wang, T.P. Burris, and F. Rastinejad. 2008. Structure of the intact PPAR-gamma-RXR- nuclear receptor complex on DNA. *Nature*. 456:350-356.

- Chang, C.H., L.A. McNamara, M.S. Wu, E.S. Muise, Y. Tan, H.B. Wood, P.T. Meinke, J.R. Thompson, T.W. Doebber, J.P. Berger, and M.E. McCann. 2008. A novel selective peroxisome proliferator-activator receptor-gamma modulator-SPPARgammaM5 improves insulin sensitivity with diminished adverse cardiovascular effects. *Eur J Pharmacol.* 584:192-201.
- Chartoumpekis, D.V., I.G. Habeos, P.G. Ziros, A.I. Psyrogiannis, V.E. Kyriazopoulou, and A.G. Papavassiliou. 2011. Brown adipose tissue responds to cold and adrenergic stimulation by induction of FGF21. *Mol Med.* 17:736-740.
- Chau, Y.Y., R. Bandiera, A. Serrels, O.M. Martinez-Estrada, W. Qing, M. Lee, J. Slight, A. Thornburn, R. Berry, S. McHaffie, R.H. Stimson, B.R. Walker, R.M. Chapuli, A. Schedl, and N. Hastie. 2014. Visceral and subcutaneous fat have different origins and evidence supports a mesothelial source. *Nat Cell Biol.* 16:367-375.
- Chechi, K., A.C. Carpentier, and D. Richard. 2013. Understanding the brown adipocyte as a contributor to energy homeostasis. *Trends Endocrinol Metab.* 24:408-420.
- Chen, D., H. Ma, H. Hong, S.S. Koh, S.M. Huang, B.T. Schurter, D.W. Aswad, and M.R. Stallcup. 1999. Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science.* 284:2174-2177.
- Chen, K.Y., R.J. Brychta, J.D. Linderman, S. Smith, A. Courville, W. Dieckmann, P. Herscovitch, C.M. Millo, A. Remaley, P. Lee, and F.S. Celi. 2013. Brown fat activation mediates cold-induced thermogenesis in adult humans in response to a mild decrease in ambient temperature. *J Clin Endocrinol Metab.* 98:E1218-1223.
- Chen, Z., J.I. Torrens, A. Anand, B.M. Spiegelman, and J.M. Friedman. 2005. Krox20 stimulates adipogenesis via C/EBPbeta-dependent and -independent mechanisms. *Cell Metab.* 1:93-106.
- Chi, X., S.K. Shetty, H.W. Shows, A.J. Hjelmaas, E.K. Malcolm, and B.S. Davies. 2015. Angiopoietin-like 4 Modifies the Interactions between Lipoprotein Lipase and Its Endothelial Cell Transporter GPIHBP1. *J Biol Chem.* 290:11865-11877.
- Chinetti, G., S. Lestavel, V. Bocher, A.T. Remaley, B. Neve, I.P. Torra, E. Teissier, A. Minnich, M. Jaye, N. Duverger, H.B. Brewer, J.C. Fruchart, V. Clavey, and B. Staels. 2001. PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat Med.* 7:53-58.
- Cho, N., and Y. Momose. 2008. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists as insulin sensitizers: from the discovery to recent progress. *Curr Top Med Chem.* 8:1483-1507.
- Choi, J.H., A.S. Banks, J.L. Estall, S. Kajimura, P. Bostrom, D. Laznik, J.L. Ruas, M.J. Chalmers, T.M. Kamenecka, M. Bluher, P.R. Griffin, and B.M. Spiegelman. 2010. Anti-diabetic drugs inhibit obesity-linked phosphorylation of PPARgamma by Cdk5. *Nature.* 466:451-456.
- Choi, J.H., A.S. Banks, T.M. Kamenecka, S.A. Busby, M.J. Chalmers, N. Kumar, D.S. Kuruvilla, Y. Shin, Y. He, J.B. Bruning, D.P. Marciano, M.D. Cameron, D. Laznik, M.J. Jurczak, S.C. Schurer, D. Vidovic, G.I. Shulman, B.M. Spiegelman, and P.R. Griffin. 2011. Antidiabetic actions of a non-agonist PPARgamma ligand blocking Cdk5-mediated phosphorylation. *Nature.* 477:477-481.
- Choi, J.H., S.S. Choi, E.S. Kim, M.P. Jedrychowski, Y.R. Yang, H.J. Jang, P.G. Suh, A.S. Banks, S.P. Gygi, and B.M. Spiegelman. 2014. Thr3 docks on phosphoserine 273 of PPARgamma and controls diabetic gene programming. *Genes Dev.* 28:2361-2369.
- Choi, Y.K., M.K. Kim, K.H. Bae, H.A. Seo, J.Y. Jeong, W.K. Lee, J.G. Kim, I.K. Lee, and K.G. Park. 2013. Serum irisin levels in new-onset type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 100:96-101.

- Chondronikola, M., E. Volpi, E. Borsheim, C. Porter, P. Annamalai, S. Enerback, M.E. Lidell, M.K. Saraf, S.M. Labbe, N.M. Hurren, C. Yfanti, T. Chao, C.R. Andersen, F. Cesani, H. Hawkins, and L.S. Sidossis. 2014. Brown adipose tissue improves whole-body glucose homeostasis and insulin sensitivity in humans. *Diabetes*. 63:4089-4099.
- Chow, W.H., G. Gridley, J.F. Fraumeni, Jr., and B. Jarvholm. 2000. Obesity, hypertension, and the risk of kidney cancer in men. *N Engl J Med*. 343:1305-1311.
- Christian, M., E. Kiskinis, D. Debevec, G. Leonardsson, R. White, and M.G. Parker. 2005. RIP140-targeted repression of gene expression in adipocytes. *Mol Cell Biol*. 25:9383-9391.
- Christiansen, T., B. Richelsen, and J.M. Bruun. 2005. Monocyte chemoattractant protein-1 is produced in isolated adipocytes, associated with adiposity and reduced after weight loss in morbid obese subjects. *Int J Obes (Lond)*. 29:146-150.
- Cinti, S. 2005. The adipose organ. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 73:9-15.
- Clapham, J.C. 2012. Central control of thermogenesis. *Neuropharmacology*. 63:111-123.
- Claussnitzer, M., S.N. Dankel, K.H. Kim, G. Quon, W. Meuleman, C. Haugen, V. Glunk, I.S. Sousa, J.L. Beaudry, V. Puviindran, N.A. Abdennur, J. Liu, P.A. Svensson, Y.H. Hsu, D.J. Drucker, G. Mellgren, C.C. Hui, H. Hauner, and M. Kellis. 2015. FTO Obesity Variant Circuitry and Adipocyte Browning in Humans. *N Engl J Med*. 373:895-907.
- Clement, K., N. Viguerie, C. Poitou, C. Carette, V. Pelloux, C.A. Curat, A. Sicard, S. Rome, A. Benis, J.D. Zucker, H. Vidal, M. Laville, G.S. Barsh, A. Basdevant, V. Stich, R. Cancello, and D. Langin. 2004. Weight loss regulates inflammation-related genes in white adipose tissue of obese subjects. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 18:1657-1669.
- Coburn, C.T., F.F. Knapp, Jr., M. Febbraio, A.L. Beets, R.L. Silverstein, and N.A. Abumrad. 2000. Defective uptake and utilization of long chain fatty acids in muscle and adipose tissues of CD36 knockout mice. *J Biol Chem*. 275:32523-32529.
- Cohen, G., Y. Riahi, O. Shamni, M. Guichardant, C. Chatgililoglu, C. Ferreri, N. Kaiser, and S. Sasson. 2011. Role of lipid peroxidation and PPAR-delta in amplifying glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes*. 60:2830-2842.
- Cohen, P., J.D. Levy, Y. Zhang, A. Frontini, D.P. Kolodin, K.J. Svensson, J.C. Lo, X. Zeng, L. Ye, M.J. Khandekar, J. Wu, S.C. Gunawardana, A.S. Banks, J.P. Camporez, M.J. Jurczak, S. Kajimura, D.W. Piston, D. Mathis, S. Cinti, G.I. Shulman, P. Seale, and B.M. Spiegelman. 2014. Ablation of PRDM16 and beige adipose causes metabolic dysfunction and a subcutaneous to visceral fat switch. *Cell*. 156:304-316.
- Coll, T., D. Alvarez-Guardia, E. Barroso, A.M. Gomez-Foix, X. Palomer, J.C. Laguna, and M. Vazquez-Carrera. 2010. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\delta$  by GW501516 prevents fatty acid-induced nuclear factor- $\kappa$ B activation and insulin resistance in skeletal muscle cells. *Endocrinology*. 151:1560-1569.
- Collins, S., K.W. Daniel, A.E. Petro, and R.S. Surwit. 1997. Strain-specific response to beta 3-adrenergic receptor agonist treatment of diet-induced obesity in mice. *Endocrinology*. 138:405-413.
- Collins, S., K.W. Daniel, E.M. Rohlfs, V. Ramkumar, I.L. Taylor, and T.W. Gettys. 1994. Impaired expression and functional activity of the beta 3- and beta 1-adrenergic receptors in adipose tissue of congenitally obese (C57BL/6J ob/ob) mice. *Mol Endocrinol*. 8:518-527.
- Coskun, T., H.A. Bina, M.A. Schneider, J.D. Dunbar, C.C. Hu, Y. Chen, D.E. Moller, and A. Kharitonov. 2008. Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. *Endocrinology*. 149:6018-6027.
- Coue, M., and C. Moro. 2015. Natriuretic peptide control of energy balance and glucose homeostasis. *Biochimie*.



- Couplan, E., M. del Mar Gonzalez-Barroso, M.C. Alves-Guerra, D. Ricquier, M. Goubern, and F. Bouillaud. 2002. No evidence for a basal, retinoic, or superoxide-induced uncoupling activity of the uncoupling protein 2 present in spleen or lung mitochondria. *J Biol Chem.* 277:26268-26275.
- Cousin, B., L. Casteilla, M. Lafontan, L. Ambid, D. Langin, M.F. Berthault, and L. Penicaud. 1993. Local sympathetic denervation of white adipose tissue in rats induces preadipocyte proliferation without noticeable changes in metabolism. *Endocrinology.* 133:2255-2262.
- Cowley, M.A., J.L. Smart, M. Rubinstein, M.G. Cerdan, S. Diano, T.L. Horvath, R.D. Cone, and M.J. Low. 2001. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature.* 411:480-484.
- Criscuolo, F., J. Mozo, C. Hurtaud, T. Nubel, and F. Bouillaud. 2006. UCP2, UCP3, avUCP, what do they do when proton transport is not stimulated? Possible relevance to pyruvate and glutamine metabolism. *Biochimica et biophysica acta.* 1757:1284-1291.
- Crossno, J.T., Jr., S.M. Majka, T. Grazia, R.G. Gill, and D.J. Klemm. 2006. Rosiglitazone promotes development of a novel adipocyte population from bone marrow-derived circulating progenitor cells. *J Clin Invest.* 116:3220-3228.
- Cunningham, S., P. Leslie, D. Hopwood, P. Illingworth, R.T. Jung, D.G. Nicholls, N. Peden, J. Rafael, and E. Rial. 1985. The characterization and energetic potential of brown adipose tissue in man. *Clin Sci (Lond).* 69:343-348.
- Cypess, A.M., Y.C. Chen, C. Sze, K. Wang, J. English, O. Chan, A.R. Holman, I. Tal, M.R. Palmer, G.M. Kolodny, and C.R. Kahn. 2012. Cold but not sympathomimetics activates human brown adipose tissue in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109:10001-10005.
- Cypess, A.M., S. Lehman, G. Williams, I. Tal, D. Rodman, A.B. Goldfine, F.C. Kuo, E.L. Palmer, Y.H. Tseng, A. Doria, G.M. Kolodny, and C.R. Kahn. 2009. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med.* 360:1509-1517.
- Cypess, A.M., L.S. Weiner, C. Roberts-Toler, E. Franquet Elia, S.H. Kessler, P.A. Kahn, J. English, K. Chatman, S.A. Trauger, A. Doria, and G.M. Kolodny. 2015. Activation of human brown adipose tissue by a beta3-adrenergic receptor agonist. *Cell Metab.* 21:33-38.
- Cypess, A.M., A.P. White, C. Vernochet, T.J. Schulz, R. Xue, C.A. Sass, T.L. Huang, C. Roberts-Toler, L.S. Weiner, C. Sze, A.T. Chacko, L.N. Deschamps, L.M. Herder, N. Truchan, A.L. Glasgow, A.R. Holman, A. Gavrilu, P.O. Hasselgren, M.A. Mori, M. Molla, and Y.H. Tseng. 2013. Anatomical localization, gene expression profiling and functional characterization of adult human neck brown fat. *Nat Med.* 19:635-639.

## D

- D'Adamo, M., L. Perego, M. Cardellini, M.A. Marini, S. Frontoni, F. Andreozzi, A. Sciacqua, D. Lauro, P. Sbraccia, M. Federici, M. Paganelli, A.E. Pontiroli, R. Lauro, F. Perticone, F. Folli, and G. Sesti. 2004. The -866A/A genotype in the promoter of the human uncoupling protein 2 gene is associated with insulin resistance and increased risk of type 2 diabetes. *Diabetes.* 53:1905-1910.
- Dahle, M.K., L.M. Gronning, A. Cederberg, H.K. Blomhoff, N. Miura, S. Enerback, K.A. Tasken, and K. Tasken. 2002. Mechanisms of FOXC2- and FOXD1-mediated regulation of the RI alpha subunit of cAMP-dependent protein kinase include release of transcriptional repression and activation by protein kinase B alpha and cAMP. *J Biol Chem.* 277:22902-22908.

- Dallner, O.S., E. Chernogubova, K.A. Brolinson, and T. Bengtsson. 2006. Beta3-adrenergic receptors stimulate glucose uptake in brown adipocytes by two mechanisms independently of glucose transporter 4 translocation. *Endocrinology*. 147:5730-5739.
- Damon, M., C.A. 2006. quel est le rôle des protéines découplantes mitochondriales chez les mammifères et les oiseaux? *INRA Productions Animales*. 19:287-304.
- Dark, J. 2005. Annual lipid cycles in hibernators: integration of physiology and behavior. *Annual review of nutrition*. 25:469-497.
- Dauncey, M.J. 1990. Activity and energy expenditure. *Can J Physiol Pharmacol*. 68:17-27.
- Daviaud, D., J. Boucher, S. Gesta, C. Dray, C. Guigne, D. Quilliot, A. Ayav, O. Ziegler, C. Carpenne, J.S. Saulnier-Blache, P. Valet, and I. Castan-Laurell. 2006. TNFalpha up-regulates apelin expression in human and mouse adipose tissue. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 20:1528-1530.
- Davies, S.S., A.V. Pontsler, G.K. Marathe, K.A. Harrison, R.C. Murphy, J.C. Hinshaw, G.D. Prestwich, A.S. Hilaire, S.M. Prescott, G.A. Zimmerman, and T.M. McIntyre. 2001. Oxidized alkyl phospholipids are specific, high affinity peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands and agonists. *J Biol Chem*. 276:16015-16023.
- Davis, T.R. 1961a. Chamber cold acclimatization in man. *J Appl Physiol*. 16:1011-1015.
- Davis, T.R. 1961b. Chamber cold acclimatization in man. *Rep US Army Med Res Lab*. 475:1-8.
- de Jesus, L.A., S.D. Carvalho, M.O. Ribeiro, M. Schneider, S.W. Kim, J.W. Harney, P.R. Larsen, and A.C. Bianco. 2001. The type 2 iodothyronine deiodinase is essential for adaptive thermogenesis in brown adipose tissue. *J Clin Invest*. 108:1379-1385.
- de Jong, J.M., O. Larsson, B. Cannon, and J. Nedergaard. 2015. A stringent validation of mouse adipose tissue identity markers. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 308:E1085-1105.
- De Souza, C.T., E.P. Araujo, L.F. Stoppiglia, J.R. Pauli, E. Ropelle, S.A. Rocco, R.M. Marin, K.G. Franchini, J.B. Carvalheira, M.J. Saad, A.C. Boschero, E.M. Carneiro, and L.A. Velloso. 2007. Inhibition of UCP2 expression reverses diet-induced diabetes mellitus by effects on both insulin secretion and action. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 21:1153-1163.
- Degenhardt, T., A. Saramaki, M. Malinen, M. Rieck, S. Vaisanen, A. Huotari, K.H. Herzig, R. Muller, and C. Carlberg. 2007. Three members of the human pyruvate dehydrogenase kinase gene family are direct targets of the peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta. *Journal of molecular biology*. 372:341-355.
- Delerive, P., C. Furman, E. Teissier, J. Fruchart, P. Duriez, and B. Staels. 2000. Oxidized phospholipids activate PPARalpha in a phospholipase A2-dependent manner. *FEBS letters*. 471:34-38.
- Dempersmier, J., A. Sambeat, O. Gulyaeva, S.M. Paul, C.S. Hudak, H.F. Raposo, H.Y. Kwan, C. Kang, R.H. Wong, and H.S. Sul. 2015. Cold-inducible Zfp516 activates UCP1 transcription to promote browning of white fat and development of brown fat. *Mol Cell*. 57:235-246.
- Dennis, A.P., and B.W. O'Malley. 2005. Rush hour at the promoter: how the ubiquitin-proteasome pathway polices the traffic flow of nuclear receptor-dependent transcription. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 93:139-151.
- DePaoli, A.M., L.S. Higgins, R.R. Henry, C. Mantzoros, F.L. Dunn, and I.N.T.S. Group. 2014. Can a selective PPARgamma modulator improve glycemic control in patients with type 2 diabetes with fewer side effects compared with pioglitazone? *Diabetes Care*. 37:1918-1923.

- Desautels, M., and J. Himms-Hagen. 1979. Roles of noradrenaline and protein synthesis in the cold-induced increase in purine nucleotide binding by rat brown adipose tissue mitochondria. *Can J Biochem.* 57:968-976.
- Desvergne, B., and W. Wahli. 1999. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev.* 20:649-688.
- Devchand, P.R., H. Keller, J.M. Peters, M. Vazquez, F.J. Gonzalez, and W. Wahli. 1996. The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature.* 384:39-43.
- Diezko, R., and G. Suske. 2013. Ligand binding reduces SUMOylation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation function 1 (AF1) domain. *PLoS One.* 8:e66947.
- Dilworth, F.J., and P. Chambon. 2001. Nuclear receptors coordinate the activities of chromatin remodeling complexes and coactivators to facilitate initiation of transcription. *Oncogene.* 20:3047-3054.
- Diraison, F., V. Yankah, D. Letexier, E. Dusserre, P. Jones, and M. Beylot. 2003. Differences in the regulation of adipose tissue and liver lipogenesis by carbohydrates in humans. *J Lipid Res.* 44:846-853.
- Divakaruni, A.S., D.M. Humphrey, and M.D. Brand. 2012. Fatty acids change the conformation of uncoupling protein 1 (UCP1). *J Biol Chem.* 287:36845-36853.
- Donhoffer, S., F. Sardy, and G. Szegvari. 1964. Brown Adipose Tissue and Thermoregulatory Heat Production in the Rat. *Nature.* 203:765-766.
- Dowell, P., J.E. Ishmael, D. Avram, V.J. Peterson, D.J. Nevrivy, and M. Leid. 1997. p300 functions as a coactivator for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J Biol Chem.* 272:33435-33443.
- Dray, C., C. Knauf, D. Daviaud, A. Waget, J. Boucher, M. Buleon, P.D. Cani, C. Attane, C. Guigne, C. Carpenne, R. Burcelin, I. Castan-Laurell, and P. Valet. 2008. Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Cell Metab.* 8:437-445.
- Dressel, U., T.L. Allen, J.B. Pippal, P.R. Rohde, P. Lau, and G.E. Muscat. 2003. The peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta agonist, GW501516, regulates the expression of genes involved in lipid catabolism and energy uncoupling in skeletal muscle cells. *Mol Endocrinol.* 17:2477-2493.
- Dreyer, C., G. Krey, H. Keller, F. Givel, G. Helftenbein, and W. Wahli. 1992. Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell.* 68:879-887.
- Dulloo, A.G., and D.S. Miller. 1984. Energy balance following sympathetic denervation of brown adipose tissue. *Can J Physiol Pharmacol.* 62:235-240.
- Dussault, I., and B.M. Forman. 2000. Prostaglandins and fatty acids regulate transcriptional signaling via the peroxisome proliferator activated receptor nuclear receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 62:1-13.

## E

- Echtay, K.S., J.L. Pakay, T.C. Esteves, and M.D. Brand. 2005. Hydroxynonenal and uncoupling proteins: a model for protection against oxidative damage. *Biofactors.* 24:119-130.
- Echtay, K.S., D. Roussel, J. St-Pierre, M.B. Jekabsons, S. Cadenas, J.A. Stuart, J.A. Harper, S.J. Roebuck, A. Morrison, S. Pickering, J.C. Clapham, and M.D. Brand. 2002. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature.* 415:96-99.

- Echtay, K.S., E. Winkler, and M. Klingenberg. 2000. Coenzyme Q is an obligatory cofactor for uncoupling protein function. *Nature*. 408:609-613.
- Ehrenborg, E., and A. Krook. 2009. Regulation of skeletal muscle physiology and metabolism by peroxisome proliferator-activated receptor delta. *Pharmacol Rev*. 61:373-393.
- El-Assaad, W., K. El-Kouhen, A.H. Mohammad, J. Yang, M. Morita, I. Gamache, O. Mamer, D. Avizonis, N. Hermance, S. Kersten, M.L. Tremblay, M.A. Kelliher, and J.G. Teodoro. 2015. Deletion of the gene encoding G0/G 1 switch protein 2 (G0s2) alleviates high-fat-diet-induced weight gain and insulin resistance, and promotes browning of white adipose tissue in mice. *Diabetologia*. 58:149-157.
- El-Jack, A.K., J.K. Hamm, P.F. Pilch, and S.R. Farmer. 1999. Reconstitution of insulin-sensitive glucose transport in fibroblasts requires expression of both PPARgamma and C/EBPalpha. *J Biol Chem*. 274:7946-7951.
- Elabd, C., C. Chiellini, M. Carmona, J. Galitzky, O. Cochet, R. Petersen, L. Penicaud, K. Kristiansen, A. Bouloumie, L. Casteilla, C. Dani, G. Ailhaud, and E.Z. Amri. 2009. Human multipotent adipose-derived stem cells differentiate into functional brown adipocytes. *Stem Cells*. 27:2753-2760.
- Elabd, C., C. Chiellini, A. Massoudi, O. Cochet, L.E. Zaragosi, C. Trojani, J.F. Michiels, P. Weiss, G. Carle, N. Rochet, C.A. Dechesne, G. Ailhaud, C. Dani, and E.Z. Amri. 2007. Human adipose tissue-derived multipotent stem cells differentiate in vitro and in vivo into osteocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 361:342-348.
- Elbrecht, A., Y. Chen, C.A. Cullinan, N. Hayes, M. Leibowitz, D.E. Moller, and J. Berger. 1996. Molecular cloning, expression and characterization of human peroxisome proliferator activated receptors gamma 1 and gamma 2. *Biochem Biophys Res Commun*. 224:431-437.
- Elsen, M., S. Raschke, N. Tennagels, U. Schwahn, T. Jelenik, M. Roden, T. Romacho, and J. Eckel. 2014. BMP4 and BMP7 induce the white-to-brown transition of primary human adipose stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 306:C431-440.
- Enerback, S. 2010. Human brown adipose tissue. *Cell Metab*. 11:248-252.
- Enerback, S., A. Jacobsson, E.M. Simpson, C. Guerra, H. Yamashita, M.E. Harper, and L.P. Kozak. 1997. Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature*. 387:90-94.
- Escher, P., O. Braissant, S. Basu-Modak, L. Michalik, W. Wahli, and B. Desvergne. 2001. Rat PPARs: quantitative analysis in adult rat tissues and regulation in fasting and refeeding. *Endocrinology*. 142:4195-4202.
- Esteves, T.C., K.S. Echtay, T. Jonassen, C.F. Clarke, and M.D. Brand. 2004. Ubiquinone is not required for proton conductance by uncoupling protein 1 in yeast mitochondria. *The Biochemical journal*. 379:309-315.

## F

- Fabbrini, E., F. Magkos, X. Su, N.A. Abumrad, N. Nejedly, C.C. Coughlin, A.L. Okunade, B.W. Patterson, and S. Klein. 2011. Insulin sensitivity is not associated with palmitoleate availability in obese humans. *J Lipid Res*. 52:808-812.
- Fain, J.N., C.W. Leffler, and S.W. Bahouth. 2000. Eicosanoids as endogenous regulators of leptin release and lipolysis by mouse adipose tissue in primary culture. *J Lipid Res*. 41:1689-1694.

- Fajas, L., J.C. Fruchart, and J. Auwerx. 1998. PPAR $\gamma$ 3 mRNA: a distinct PPAR $\gamma$  mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS letters*. 438:55-60.
- Farag, Y.M., and M.R. Gaballa. 2011. Diabetes: an overview of a rising epidemic. *Nephrol Dial Transplant*. 26:28-35.
- Farmer, S.R. 2006. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab*. 4:263-273.
- Farooqi, I.S., and S. O'Rahilly. 2000. Recent advances in the genetics of severe childhood obesity. *Arch Dis Child*. 83:31-34.
- Farooqi, I.S., and S. O'Rahilly. 2014. 20 years of leptin: human disorders of leptin action. *J Endocrinol*. 223:T63-70.
- Farooqi, I.S., T. Wangensteen, S. Collins, W. Kimber, G. Matarese, J.M. Keogh, E. Lank, B. Bottomley, J. Lopez-Fernandez, I. Ferraz-Amaro, M.T. Dattani, O. Ercan, A.G. Myhre, L. Retterstol, R. Stanhope, J.A. Edge, S. McKenzie, N. Lessan, M. Ghodsi, V. De Rosa, F. Perna, S. Fontana, I. Barroso, D.E. Undlien, and S. O'Rahilly. 2007. Clinical and molecular genetic spectrum of congenital deficiency of the leptin receptor. *N Engl J Med*. 356:237-247.
- Fasshauer, M., J. Klein, K. Ueki, K.M. Kriauciunas, M. Benito, M.F. White, and C.R. Kahn. 2000. Essential role of insulin receptor substrate-2 in insulin stimulation of Glut4 translocation and glucose uptake in brown adipocytes. *J Biol Chem*. 275:25494-25501.
- Faye, A., K. Borthwick, C. Esnous, N.T. Price, S. Gobin, V.N. Jackson, V.A. Zammit, J. Girard, and C. Prip-Buus. 2005. Demonstration of N- and C-terminal domain intramolecular interactions in rat liver carnitine palmitoyltransferase 1 that determine its degree of malonyl-CoA sensitivity. *The Biochemical journal*. 387:67-76.
- Fedorenko, A., P.V. Lishko, and Y. Kirichok. 2012. Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria. *Cell*. 151:400-413.
- Feige, J.N., L. Gelman, L. Michalik, B. Desvergne, and W. Wahli. 2006. From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. *Prog Lipid Res*. 45:120-159.
- Feige, J.N., L. Gelman, C. Tudor, Y. Engelborghs, W. Wahli, and B. Desvergne. 2005. Fluorescence imaging reveals the nuclear behavior of peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor heterodimers in the absence and presence of ligand. *J Biol Chem*. 280:17880-17890.
- Feldmann, H.M., V. Golozoubova, B. Cannon, and J. Nedergaard. 2009. UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. *Cell Metab*. 9:203-209.
- Festuccia, W.T., P.G. Blanchard, V. Turcotte, M. Laplante, M. Sariahmetoglu, D.N. Brindley, D. Richard, and Y. Deshaies. 2009. The PPAR $\gamma$  agonist rosiglitazone enhances rat brown adipose tissue lipogenesis from glucose without altering glucose uptake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 296:R1327-1335.
- Festuccia, W.T., R. Guerra-Sa, N.H. Kawashita, M.A. Garofalo, E.A. Evangelista, V. Rodrigues, I.C. Kettelhut, and R.H. Migliorini. 2003a. Expression of glycerokinase in brown adipose tissue is stimulated by the sympathetic nervous system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 284:R1536-1541.
- Festuccia, W.T., N.H. Kawashita, M.A. Garofalo, M.A. Moura, S.R. Brito, I.C. Kettelhut, and R.H. Migliorini. 2003b. Control of glyceroneogenic activity in rat brown adipose tissue. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 285:R177-182.
- Feuerer, M., L. Herrero, D. Cipolletta, A. Naaz, J. Wong, A. Nayer, J. Lee, A.B. Goldfine, C. Benoist, S. Shoelson, and D. Mathis. 2009. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med*. 15:930-939.

- Finck, B.N., C. Bernal-Mizrachi, D.H. Han, T. Coleman, N. Sambandam, L.L. LaRiviere, J.O. Holloszy, C.F. Semenkovich, and D.P. Kelly. 2005. A potential link between muscle peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  signaling and obesity-related diabetes. *Cell Metab.* 1:133-144.
- Fisher, F.M., S. Kleiner, N. Douris, E.C. Fox, R.J. Mepani, F. Verdeguer, J. Wu, A. Kharitonov, J.S. Flier, E. Maratos-Flier, and B.M. Spiegelman. 2012. FGF21 regulates PGC-1 $\alpha$  and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev.* 26:271-281.
- Flachs, P., M. Rossmeisl, O. Kuda, and J. Kopecky. 2013. Stimulation of mitochondrial oxidative capacity in white fat independent of UCP1: a key to lean phenotype. *Biochimica et biophysica acta.* 1831:986-1003.
- Flegal, K.M., B.K. Kit, H. Orpana, and B.I. Graubard. 2013. Association of all-cause mortality with overweight and obesity using standard body mass index categories: a systematic review and meta-analysis. *JAMA.* 309:71-82.
- Floyd, Z.E., and J.M. Stephens. 2003. STAT5A promotes adipogenesis in nonprecursor cells and associates with the glucocorticoid receptor during adipocyte differentiation. *Diabetes.* 52:308-314.
- Fontaine, K.R., D.T. Redden, C. Wang, A.O. Westfall, and D.B. Allison. 2003. Years of life lost due to obesity. *JAMA.* 289:187-193.
- Forest, C., J. Tordjman, M. Glorian, E. Duplus, G. Chauvet, J. Quette, E.G. Beale, and B. Antoine. 2003. Fatty acid recycling in adipocytes: a role for glyceroneogenesis and phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Biochem Soc Trans.* 31:1125-1129.
- Forman, B.M., J. Chen, and R.M. Evans. 1997. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors  $\alpha$  and  $\delta$ . *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:4312-4317.
- Forman, B.M., P. Tontonoz, J. Chen, R.P. Brun, B.M. Spiegelman, and R.M. Evans. 1995. 15-Deoxy- $\delta$ 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR  $\gamma$ . *Cell.* 83:803-812.
- Forner, F., C. Kumar, C.A. Lubber, T. Fromme, M. Klingenspor, and M. Mann. 2009. Proteome differences between brown and white fat mitochondria reveal specialized metabolic functions. *Cell Metab.* 10:324-335.
- Foster, D.O., and F. Depocas. 1980. Evidence against noradrenergic regulation of vasodilation in rat brown adipose tissue. *Can J Physiol Pharmacol.* 58:1418-1425.
- Foster, D.O., and M.L. Frydman. 1978. Nonshivering thermogenesis in the rat. II. Measurements of blood flow with microspheres point to brown adipose tissue as the dominant site of the calorogenesis induced by noradrenaline. *Can J Physiol Pharmacol.* 56:110-122.
- Foster, M.T., and T.J. Bartness. 2006. Sympathetic but not sensory denervation stimulates white adipocyte proliferation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 291:R1630-1637.
- Frigerio, F., T. Brun, C. Bartley, A. Usardi, D. Bosco, K. Ravnskjaer, S. Mandrup, and P. Maechler. 2010. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) protects against oleate-induced INS-1E beta cell dysfunction by preserving carbohydrate metabolism. *Diabetologia.* 53:331-340.
- Frontini, A., A. Vitali, J. Perugini, I. Murano, C. Romiti, D. Ricquier, M. Guerrieri, and S. Cinti. 2013. White-to-brown transdifferentiation of omental adipocytes in patients affected by pheochromocytoma. *Biochimica et biophysica acta.* 1831:950-959.
- Fu, J., S. Gaetani, F. Oveisi, J. Lo Verme, A. Serrano, F. Rodriguez De Fonseca, A. Rosengarth, H. Luecke, B. Di Giacomo, G. Tarzia, and D. Piomelli. 2003. Oleyethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR- $\alpha$ . *Nature.* 425:90-93.

- Fu, L., K. Isobe, Q. Zeng, K. Suzukawa, K. Takekoshi, and Y. Kawakami. 2007. beta-adrenoceptor agonists downregulate adiponectin, but upregulate adiponectin receptor 2 and tumor necrosis factor-alpha expression in adipocytes. *Eur J Pharmacol.* 569:155-162.
- Fu, M., T. Sun, A.L. Bookout, M. Downes, R.T. Yu, R.M. Evans, and D.J. Mangelsdorf. 2005. A Nuclear Receptor Atlas: 3T3-L1 adipogenesis. *Mol Endocrinol.* 19:2437-2450.
- Fujimoto, T., and R.G. Parton. 2011. Not just fat: the structure and function of the lipid droplet. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3.
- Fukumura, D., A. Ushiyama, D.G. Duda, L. Xu, J. Tam, V. Krishna, K. Chatterjee, I. Garkavtsev, and R.K. Jain. 2003. Paracrine regulation of angiogenesis and adipocyte differentiation during in vivo adipogenesis. *Circ Res.* 93:e88-97.

## G

- Gable, D.R., J.W. Stephens, J.A. Cooper, G.J. Miller, and S.E. Humphries. 2006. Variation in the UCP2-UCP3 gene cluster predicts the development of type 2 diabetes in healthy middle-aged men. *Diabetes.* 55:1504-1511.
- Galli, S.J., N. Borregaard, and T.A. Wynn. 2011. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat Immunol.* 12:1035-1044.
- Garlid, K.D., M. Jaburek, and P. Jezek. 1998. The mechanism of proton transport mediated by mitochondrial uncoupling proteins. *FEBS letters.* 438:10-14.
- Garruti, G., and D. Ricquier. 1992. Analysis of uncoupling protein and its mRNA in adipose tissue deposits of adult humans. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 16:383-390.
- Gasparetti, A.L., F. Alvarez-Rojas, E.P. de Araujo, A.E. Hirata, M.J. Saad, and L.A. Velloso. 2005. beta3-Adrenergic-dependent and -independent mechanisms participate in cold-induced modulation of insulin signal transduction in brown adipose tissue of rats. *Pflugers Arch.* 449:537-546.
- Gaudel, C., C. Schwartz, C. Giordano, N.A. Abumrad, and P.A. Grimaldi. 2008. Pharmacological activation of PPARbeta promotes rapid and calcineurin-dependent fiber remodeling and angiogenesis in mouse skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 295:E297-304.
- Gauthier, M.S., H. Miyoshi, S.C. Souza, J.M. Cacicedo, A.K. Saha, A.S. Greenberg, and N.B. Ruderman. 2008. AMP-activated protein kinase is activated as a consequence of lipolysis in the adipocyte: potential mechanism and physiological relevance. *J Biol Chem.* 283:16514-16524.
- Gavrilova, O., M. Haluzik, K. Matsusue, J.J. Cutson, L. Johnson, K.R. Dietz, C.J. Nicol, C. Vinson, F.J. Gonzalez, and M.L. Reitman. 2003. Liver peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass. *J Biol Chem.* 278:34268-34276.
- Gearing, K.L., M. Gottlicher, M. Teboul, E. Widmark, and J.A. Gustafsson. 1993. Interaction of the peroxisome-proliferator-activated receptor and retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:1440-1444.
- Geloan, A., A.J. Collet, G. Guay, and L.J. Bukowiecki. 1990. In vivo differentiation of brown adipocytes in adult mice: an electron microscopic study. *Am J Anat.* 188:366-372.
- Genini, D., and C.V. Catapano. 2006. Control of peroxisome proliferator-activated receptor fate by the ubiquitinproteasome system. *J Recept Signal Transduct Res.* 26:679-692.

- Gesta, S., Y.H. Tseng, and C.R. Kahn. 2007. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell*. 131:242-256.
- Gill, G. 2005. Something about SUMO inhibits transcription. *Curr Opin Genet Dev*. 15:536-541.
- Giordano, A., A. Frontini, M. Castellucci, and S. Cinti. 2004. Presence and distribution of cholinergic nerves in rat mediastinal brown adipose tissue. *J Histochem Cytochem*. 52:923-930.
- Giordano, A., C.K. Song, R.R. Bowers, J.C. Ehlen, A. Frontini, S. Cinti, and T.J. Bartness. 2006. White adipose tissue lacks significant vagal innervation and immunohistochemical evidence of parasympathetic innervation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 291:R1243-1255.
- Girousse, A., G. Tavernier, C. Valle, C. Moro, N. Mejhert, A.L. Dinel, M. Houssier, B. Roussel, A. Besse-Patin, M. Combes, L. Mir, L. Monbrun, V. Bezaire, B. Prunet-Marcassus, A. Waget, I. Vila, S. Caspar-Bauguil, K. Louche, M.A. Marques, A. Mairal, M.L. Renoud, J. Galitzky, C. Holm, E. Mouisel, C. Thalamas, N. Viguerie, T. Sulpice, R. Burcelin, P. Arner, and D. Langin. 2013. Partial inhibition of adipose tissue lipolysis improves glucose metabolism and insulin sensitivity without alteration of fat mass. *PLoS Biol*. 11:e1001485.
- Glass, C.K. 2006. Going nuclear in metabolic and cardiovascular disease. *J Clin Invest*. 116:556-560.
- Golay, A., and J. Ybarra. 2005. Link between obesity and type 2 diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 19:649-663.
- Gomes, L.C., and L. Scorrano. 2011. Mitochondrial elongation during autophagy: a stereotypical response to survive in difficult times. *Autophagy*. 7:1251-1253.
- Gong, D.W., S. Monemdjou, O. Gavrilova, L.R. Leon, B. Marcus-Samuels, C.J. Chou, C. Everett, L.P. Kozak, C. Li, C. Deng, M.E. Harper, and M.L. Reitman. 2000. Lack of obesity and normal response to fasting and thyroid hormone in mice lacking uncoupling protein-3. *J Biol Chem*. 275:16251-16257.
- Gortmaker, S.L., A. Must, J.M. Perrin, A.M. Sobol, and W.H. Dietz. 1993. Social and economic consequences of overweight in adolescence and young adulthood. *N Engl J Med*. 329:1008-1012.
- Goulbourne, C.N., P. Gin, A. Tatar, C. Nobumori, A. Hoenger, H. Jiang, C.R. Grovenor, O. Adeyo, J.D. Esko, I.J. Goldberg, K. Reue, P. Tontonoz, A. Bensadoun, A.P. Beigneux, S.G. Young, and L.G. Fong. 2014. The GPIHBP1-LPL complex is responsible for the margination of triglyceride-rich lipoproteins in capillaries. *Cell Metab*. 19:849-860.
- Graf, T. 2011. Historical origins of transdifferentiation and reprogramming. *Cell Stem Cell*. 9:504-516.
- Graham, T.L., C. Mookherjee, K.E. Suckling, C.N. Palmer, and L. Patel. 2005. The PPARdelta agonist GW0742X reduces atherosclerosis in LDLR(-/-) mice. *Atherosclerosis*. 181:29-37.
- Granneman, J.G., M. Burnazi, Z. Zhu, and L.A. Schwamb. 2003. White adipose tissue contributes to UCP1-independent thermogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 285:E1230-1236.
- Granneman, J.G., H.P. Moore, R.L. Granneman, A.S. Greenberg, M.S. Obin, and Z. Zhu. 2007. Analysis of lipolytic protein trafficking and interactions in adipocytes. *J Biol Chem*. 282:5726-5735.
- Gray, J.P., K.A. Burns, T.L. Leas, G.H. Perdew, and J.P. Vanden Heuvel. 2005. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha by protein kinase C. *Biochemistry*. 44:10313-10321.



- Gray, S.L., and A.J. Vidal-Puig. 2007. Adipose tissue expandability in the maintenance of metabolic homeostasis. *Nutr Rev.* 65:S7-12.
- Green, H., and M. Meuth. 1974. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell.* 3:127-133.
- Greenberg, J.A. 2013. Obesity and early mortality in the United States. *Obesity (Silver Spring).* 21:405-412.
- Greene, M.E., B. Blumberg, O.W. McBride, H.F. Yi, K. Kronquist, K. Kwan, L. Hsieh, G. Greene, and S.D. Nimer. 1995. Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. *Gene Expr.* 4:281-299.
- Gregoire, F.M. 2001. Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell. *Experimental biology and medicine.* 226:997-1002.
- Gregoire, F.M., C.M. Smas, and H.S. Sul. 1998. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev.* 78:783-809.
- Gremlich, S., C. Nolan, R. Roduit, R. Burcelin, M.L. Peyot, V. Delghingaro-Augusto, B. Desvergne, L. Michalik, M. Prentki, and W. Wahli. 2005. Pancreatic islet adaptation to fasting is dependent on peroxisome proliferator-activated receptor alpha transcriptional up-regulation of fatty acid oxidation. *Endocrinology.* 146:375-382.
- Grossman, S.R., M.E. Deato, C. Brignone, H.M. Chan, A.L. Kung, H. Tagami, Y. Nakatani, and D.M. Livingston. 2003. Polyubiquitination of p53 by a ubiquitin ligase activity of p300. *Science.* 300:342-344.
- Grygiel-Gorniak, B. 2014. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications--a review. *Nutr J.* 13:17.
- Guan, H.P., Y. Li, M.V. Jensen, C.B. Newgard, C.M. Stepan, and M.A. Lazar. 2002. A futile metabolic cycle activated in adipocytes by antidiabetic agents. *Nat Med.* 8:1122-1128.
- Gunawardana, S.C., and D.W. Piston. 2015. Insulin-independent reversal of type 1 diabetes in nonobese diabetic mice with brown adipose tissue transplant. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 308:E1043-1055.
- Guo, X., H. Li, H. Xu, V. Halim, W. Zhang, H. Wang, K.T. Ong, S.L. Woo, R.L. Walzem, D.G. Mashek, H. Dong, F. Lu, L. Wei, Y. Huo, and C. Wu. 2012. Palmitoleate induces hepatic steatosis but suppresses liver inflammatory response in mice. *PLoS One.* 7:e39286.
- Gupta, R.K., Z. Arany, P. Seale, R.J. Mepani, L. Ye, H.M. Conroe, Y.A. Roby, H. Kulaga, R.R. Reed, and B.M. Spiegelman. 2010. Transcriptional control of preadipocyte determination by Zfp423. *Nature.* 464:619-623.
- Gupta, R.K., R.J. Mepani, S. Kleiner, J.C. Lo, M.J. Khandekar, P. Cohen, A. Frontini, D.C. Bhowmick, L. Ye, S. Cinti, and B.M. Spiegelman. 2012. Zfp423 expression identifies committed preadipocytes and localizes to adipose endothelial and perivascular cells. *Cell Metab.* 15:230-239.

## H

- Haemmerle, G., T. Moustafa, G. Woelkart, S. Buttner, A. Schmidt, T. van de Weijer, M. Hesselink, D. Jaeger, P.C. Kienesberger, K. Zierler, R. Schreiber, T. Eichmann, D. Kolb, P. Kotzbeck, M. Schweiger, M. Kumari, S. Eder, G. Schoiswohl, N. Wongsiriroj, N.M. Pollak, F.P. Radner, K. Preiss-Landl, T. Kolbe, T. Rulicke, B. Pieske, M. Trauner, A. Lass, R. Zimmermann, G. Hoefler, S. Cinti, E.E. Kershaw, P. Schrauwen, F. Madeo,

- B. Mayer, and R. Zechner. 2011. ATGL-mediated fat catabolism regulates cardiac mitochondrial function via PPAR-alpha and PGC-1. *Nat Med.* 17:1076-1085.
- Hallberg, M., D.L. Morganstein, E. Kiskinis, K. Shah, A. Kralli, S.M. Dilworth, R. White, M.G. Parker, and M. Christian. 2008. A functional interaction between RIP140 and PGC-1alpha regulates the expression of the lipid droplet protein CIDEA. *Mol Cell Biol.* 28:6785-6795.
- Halpern, B., M.C. Mancini, and A. Halpern. 2014. Brown adipose tissue: what have we learned since its recent identification in human adults. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 58:889-899.
- Haman, F., D.P. Blondin, M.A. Imbeault, and A. Maneshi. 2010. Metabolic requirements of shivering humans. *Front Biosci (Schol Ed).* 2:1155-1168.
- Hammarstedt, A., S. Hedjazifar, L. Jenndahl, S. Gogg, J. Grunberg, B. Gustafson, E. Klimcakova, V. Stich, D. Langin, M. Laakso, and U. Smith. 2013. WISP2 regulates preadipocyte commitment and PPARgamma activation by BMP4. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110:2563-2568.
- Han, D., J. Nie, M.R. Bonner, S.E. McCann, P. Muti, M. Trevisan, F.A. Ramirez-Marrero, D. Vito, and J.L. Freudenheim. 2006. Lifetime adult weight gain, central adiposity, and the risk of pre- and postmenopausal breast cancer in the Western New York exposures and breast cancer study. *Int J Cancer.* 119:2931-2937.
- Hansen, J.B., C. Jorgensen, R.K. Petersen, P. Hallenborg, R. De Matteis, H.A. Boye, N. Petrovic, S. Enerback, J. Nedergaard, S. Cinti, H. te Riele, and K. Kristiansen. 2004. Retinoblastoma protein functions as a molecular switch determining white versus brown adipocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:4112-4117.
- Hanson, R.W., and L. Reshef. 2003. Glyceroneogenesis revisited. *Biochimie.* 85:1199-1205.
- Hanssen, M.J., E. Broeders, R.J. Samms, M.J. Vosselman, A.A. van der Lans, C.C. Cheng, A.C. Adams, W.D. van Marken Lichtenbelt, and P. Schrauwen. 2015. Serum FGF21 levels are associated with brown adipose tissue activity in humans. *Sci Rep.* 5:10275.
- Hansson, G.K. 2005. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 352:1685-1695.
- Hany, T.F., E. Gharehpapagh, E.M. Kamel, A. Buck, J. Himms-Hagen, and G.K. von Schulthess. 2002. Brown adipose tissue: a factor to consider in symmetrical tracer uptake in the neck and upper chest region. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 29:1393-1398.
- Hara-Chikuma, M., E. Sohara, T. Rai, M. Ikawa, M. Okabe, S. Sasaki, S. Uchida, and A.S. Verkman. 2005. Progressive adipocyte hypertrophy in aquaporin-7-deficient mice: adipocyte glycerol permeability as a novel regulator of fat accumulation. *J Biol Chem.* 280:15493-15496.
- Harman-Boehm, I., M. Bluher, H. Redel, N. Sion-Vardy, S. Ovadia, E. Avinoach, I. Shai, N. Kloting, M. Stumvoll, N. Bashan, and A. Rudich. 2007. Macrophage infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations: effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 92:2240-2247.
- Harms, M., and P. Seale. 2013. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med.* 19:1252-1263.
- Harms, M.J., J. Ishibashi, W. Wang, H.W. Lim, S. Goyama, T. Sato, M. Kurokawa, K.J. Won, and P. Seale. 2014. Prdm16 is required for the maintenance of brown adipocyte identity and function in adult mice. *Cell Metab.* 19:593-604.
- Harms, M.J., H.W. Lim, Y. Ho, S.N. Shapira, J. Ishibashi, S. Rajakumari, D.J. Steger, M.A. Lazar, K.J. Won, and P. Seale. 2015. PRDM16 binds MED1 and controls chromatin architecture to determine a brown fat transcriptional program. *Genes Dev.* 29:298-307.
- Hata, K., R. Nishimura, F. Ikeda, K. Yamashita, T. Matsubara, T. Nokubi, and T. Yoneda. 2003. Differential roles of Smad1 and p38 kinase in regulation of peroxisome proliferator-

- activating receptor gamma during bone morphogenetic protein 2-induced adipogenesis. *Mol Biol Cell*. 14:545-555.
- Hauser, S., G. Adelmant, P. Sarraf, H.M. Wright, E. Mueller, and B.M. Spiegelman. 2000. Degradation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma is linked to ligand-dependent activation. *J Biol Chem*. 275:18527-18533.
- Hayes, J.P., and T. Garland. 1995. The Evolution of Endothermy - Testing the Aerobic Capacity Model. *Evolution*. 49:836-847.
- Heaton, J.M. 1972. The distribution of brown adipose tissue in the human. *J Anat*. 112:35-39.
- Heckmann, B.L., X. Zhang, X. Xie, A. Saarinen, X. Lu, X. Yang, and J. Liu. 2014. Defective adipose lipolysis and altered global energy metabolism in mice with adipose overexpression of the lipolytic inhibitor G0/G1 switch gene 2 (G0S2). *J Biol Chem*. 289:1905-1916.
- Heery, D.M., E. Kalkhoven, S. Hoare, and M.G. Parker. 1997. A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature*. 387:733-736.
- Henry, C.J. 2000. Mechanisms of changes in basal metabolism during ageing. *Eur J Clin Nutr*. 54 Suppl 3:S77-91.
- Heppner, T.J., A.D. Bonev, D.M. Eckman, M.F. Gomez, G.V. Petkov, and M.T. Nelson. 2005. Novel PPARgamma agonists GI 262570, GW 7845, GW 1929, and pioglitazone decrease calcium channel function and myogenic tone in rat mesenteric arteries. *Pharmacology*. 73:15-22.
- Herman, M.A., O.D. Peroni, J. Villoria, M.R. Schon, N.A. Abumrad, M. Bluher, S. Klein, and B.B. Kahn. 2012. A novel ChREBP isoform in adipose tissue regulates systemic glucose metabolism. *Nature*. 484:333-338.
- Hess, R., W. Staubli, and W. Riess. 1965. Nature of the hepatomegaly effect produced by ethylchlorophenoxy-isobutyrate in the rat. *Nature*. 208:856-858.
- Hevener, A.L., W. He, Y. Barak, J. Le, G. Bandyopadhyay, P. Olson, J. Wilkes, R.M. Evans, and J. Olefsky. 2003. Muscle-specific Pparg deletion causes insulin resistance. *Nat Med*. 9:1491-1497.
- Higgins, L.S., and A.M. Depaoli. 2010. Selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) modulation as a strategy for safer therapeutic PPARgamma activation. *Am J Clin Nutr*. 91:267S-272S.
- Himms-Hagen, J., J. Cui, E. Danforth, Jr., D.J. Taatjes, S.S. Lang, B.L. Waters, and T.H. Claus. 1994. Effect of CL-316,243, a thermogenic beta 3-agonist, on energy balance and brown and white adipose tissues in rats. *Am J Physiol*. 266:R1371-1382.
- Himms-Hagen, J., J. Cui, and S. Lynn Sigurdson. 1990. Sympathetic and sensory nerves in control of growth of brown adipose tissue: Effects of denervation and of capsaicin. *Neurochem Int*. 17:271-279.
- Himms-Hagen, J., A. Melnyk, M.C. Zingaretti, E. Ceresi, G. Barbatelli, and S. Cinti. 2000. Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 279:C670-681.
- Hinney, A., A.L. Volckmar, and N. Knoll. 2013. Melanocortin-4 receptor in energy homeostasis and obesity pathogenesis. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 114:147-191.
- Hirose, H., T. Kawai, Y. Yamamoto, M. Taniyama, M. Tomita, K. Matsubara, Y. Okazaki, T. Ishii, Y. Oguma, I. Takei, and T. Saruta. 2002. Effects of pioglitazone on metabolic parameters, body fat distribution, and serum adiponectin levels in Japanese male patients with type 2 diabetes. *Metabolism*. 51:314-317.
- Hodson, L., and F. Karpe. 2013. Is there something special about palmitoleate? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 16:225-231.

- Hoffman, E.L., T. VonWald, and K. Hansen. 2015. The metabolic syndrome. *S D Med. Spec* No:24-28.
- Holder, J.L., Jr., N.F. Butte, and A.R. Zinn. 2000. Profound obesity associated with a balanced translocation that disrupts the SIM1 gene. *Hum Mol Genet.* 9:101-108.
- Holness, M.J., N.D. Smith, G.K. Greenwood, and M.C. Sugden. 2003. Acute (24 h) activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPARalpha) reverses high-fat feeding-induced insulin hypersecretion in vivo and in perfused pancreatic islets. *J Endocrinol.* 177:197-205.
- Holness, M.J., G. Zariwala, C.G. Walker, and M.C. Sugden. 2012. Adipocyte pyruvate dehydrogenase kinase 4 expression is associated with augmented PPARgamma upregulation in early-life programming of later obesity. *FEBS Open Bio.* 2:32-36.
- Holst, D., S. Luquet, V. Nogueira, K. Kristiansen, X. Leverve, and P.A. Grimaldi. 2003. Nutritional regulation and role of peroxisome proliferator-activated receptor delta in fatty acid catabolism in skeletal muscle. *Biochimica et biophysica acta.* 1633:43-50.
- Hondares, E., R. Iglesias, A. Giralt, F.J. Gonzalez, M. Giralt, T. Mampel, and F. Villarroya. 2011a. Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *J Biol Chem.* 286:12983-12990.
- Hondares, E., O. Mora, P. Yubero, M. Rodriguez de la Concepcion, R. Iglesias, M. Giralt, and F. Villarroya. 2006. Thiazolidinediones and rexinoids induce peroxisome proliferator-activated receptor-coactivator (PGC)-1alpha gene transcription: an autoregulatory loop controls PGC-1alpha expression in adipocytes via peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivation. *Endocrinology.* 147:2829-2838.
- Hondares, E., M. Rosell, J. Diaz-Delfin, Y. Olmos, M. Monsalve, R. Iglesias, F. Villarroya, and M. Giralt. 2011b. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) induces PPARgamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha) gene expression and contributes to thermogenic activation of brown fat: involvement of PRDM16. *J Biol Chem.* 286:43112-43122.
- Hondares, E., M. Rosell, F.J. Gonzalez, M. Giralt, R. Iglesias, and F. Villarroya. 2010. Hepatic FGF21 expression is induced at birth via PPARalpha in response to milk intake and contributes to thermogenic activation of neonatal brown fat. *Cell Metab.* 11:206-212.
- Horwitz, B.A., J.S. Hamilton, and K.S. Kott. 1985. GDP binding to hamster brown fat mitochondria is reduced during hibernation. *Am J Physiol.* 249:R689-693.
- Hostetler, H.A., A.B. Kier, and F. Schroeder. 2006. Very-long-chain and branched-chain fatty acyl-CoAs are high affinity ligands for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha). *Biochemistry.* 45:7669-7681.
- Hostetler, H.A., A.D. Petrescu, A.B. Kier, and F. Schroeder. 2005. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha interacts with high affinity and is conformationally responsive to endogenous ligands. *J Biol Chem.* 280:18667-18682.
- Hotamisligil, G.S., N.S. Shargill, and B.M. Spiegelman. 1993. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 259:87-91.
- Hu, X., and M.A. Lazar. 1999. The CoRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors. *Nature.* 402:93-96.
- Huang, H., T.J. Song, X. Li, L. Hu, Q. He, M. Liu, M.D. Lane, and Q.Q. Tang. 2009. BMP signaling pathway is required for commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:12670-12675.
- Huang, S.G. 2003. Binding of fatty acids to the uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria. *Archives of biochemistry and biophysics.* 412:142-146.
- Huttunen, P., J. Hirvonen, and V. Kinnula. 1981. The occurrence of brown adipose tissue in outdoor workers. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 46:339-345.

# I

- Iglesias, J., S. Barg, D. Vallois, S. Lahiri, C. Roger, A. Yessoufou, S. Pradevand, A. McDonald, C. Bonal, F. Reimann, F. Gribble, M.B. Debril, D. Metzger, P. Chambon, P. Herrera, G.A. Rutter, M. Prentki, B. Thorens, and W. Wahli. 2012. PPARbeta/delta affects pancreatic beta cell mass and insulin secretion in mice. *J Clin Invest.* 122:4105-4117.
- Inoue, I., K. Shino, S. Noji, T. Awata, and S. Katayama. 1998. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha) in primary cultures of human vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 246:370-374.
- Issemann, I., and S. Green. 1990. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature.* 347:645-650.

# J

- Jackson, R.S., J.W. Creemers, S. Ohagi, M.L. Raffin-Sanson, L. Sanders, C.T. Montague, J.C. Hutton, and S. O'Rahilly. 1997. Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat Genet.* 16:303-306.
- Jacobsson, A., M. Muhleisen, B. Cannon, and J. Nedergaard. 1994. The uncoupling protein thermogenin during acclimation: indications for pretranslational control. *Am J Physiol.* 267:R999-1007.
- Jedrychowski, M.P., C.D. Wrann, J.A. Paulo, K.K. Gerber, J. Szpyt, M.M. Robinson, K.S. Nair, S.P. Gygi, and B.M. Spiegelman. 2015. Detection and Quantitation of Circulating Human Irisin by Tandem Mass Spectrometry. *Cell Metab.* 22:734-740.
- Jensen, M.D. 2008. Role of body fat distribution and the metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 93:S57-63.
- Jequier, E., K. Acheson, and Y. Schutz. 1987. Assessment of energy expenditure and fuel utilization in man. *Annual review of nutrition.* 7:187-208.
- Jespersen, N.Z., T.J. Larsen, L. Peijs, S. Dagaard, P. Homoe, A. Loft, J. de Jong, N. Mathur, B. Cannon, J. Nedergaard, B.K. Pedersen, K. Moller, and C. Scheele. 2013. A classical brown adipose tissue mRNA signature partly overlaps with brite in the supraclavicular region of adult humans. *Cell Metab.* 17:798-805.
- Jimenez-Preitner, M., X. Berney, M. Uldry, A. Vitali, S. Cinti, J.G. Ledford, and B. Thorens. 2011. Plac8 is an inducer of C/EBPbeta required for brown fat differentiation, thermoregulation, and control of body weight. *Cell Metab.* 14:658-670.
- Jimenez, M.A., P. Akerblad, M. Sigvardsson, and E.D. Rosen. 2007. Critical role for Ebf1 and Ebf2 in the adipogenic transcriptional cascade. *Mol Cell Biol.* 27:743-757.
- Jocken, J.W., D. Langin, E. Smit, W.H. Saris, C. Valle, G.B. Hul, C. Holm, P. Arner, and E.E. Blaak. 2007. Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase protein expression is decreased in the obese insulin-resistant state. *J Clin Endocrinol Metab.* 92:2292-2299.
- Joe, A.W., L. Yi, Y. Even, A.W. Vogl, and F.M. Rossi. 2009. Depot-specific differences in adipogenic progenitor abundance and proliferative response to high-fat diet. *Stem Cells.* 27:2563-2570.

- Johnstone, A.M., S.D. Murison, J.S. Duncan, K.A. Rance, and J.R. Speakman. 2005. Factors influencing variation in basal metabolic rate include fat-free mass, fat mass, age, and circulating thyroxine but not sex, circulating leptin, or triiodothyronine. *Am J Clin Nutr.* 82:941-948.
- Jonas, B.A., and M.L. Privalsky. 2004. SMRT and N-CoR corepressors are regulated by distinct kinase signaling pathways. *J Biol Chem.* 279:54676-54686.
- Jones, P.L., and Y.B. Shi. 2003. N-CoR-HDAC corepressor complexes: roles in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors. *Curr Top Microbiol Immunol.* 274:237-268.
- Jordan, S.D., A.C. Konner, and J.C. Bruning. 2010. Sensing the fuels: glucose and lipid signaling in the CNS controlling energy homeostasis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS.* 67:3255-3273.
- Juge-Aubry, C., A. Pernin, T. Favez, A.G. Burger, W. Wahli, C.A. Meier, and B. Desvergne. 1997. DNA binding properties of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes on various natural peroxisome proliferator response elements. Importance of the 5'-flanking region. *J Biol Chem.* 272:25252-25259.
- Juge-Aubry, C.E., E. Henrichot, and C.A. Meier. 2005. Adipose tissue: a regulator of inflammation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 19:547-566.

## K

- Kadowaki, T., T. Yamauchi, N. Kubota, K. Hara, K. Ueki, and K. Tobe. 2006. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 116:1784-1792.
- Kadowaki, T., T. Yamauchi, M. Okada-Iwabu, and M. Iwabu. 2014. Adiponectin and its receptors: implications for obesity-associated diseases and longevity. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2:8-9.
- Kajimura, S., P. Seale, K. Kubota, E. Lunsford, J.V. Frangioni, S.P. Gygi, and B.M. Spiegelman. 2009. Initiation of myoblast to brown fat switch by a PRDM16-C/EBP-beta transcriptional complex. *Nature.* 460:1154-1158.
- Kajimura, S., P. Seale, T. Tomaru, H. Erdjument-Bromage, M.P. Cooper, J.L. Ruas, S. Chin, P. Tempst, M.A. Lazar, and B.M. Spiegelman. 2008. Regulation of the brown and white fat gene programs through a PRDM16/CtBP transcriptional complex. *Genes Dev.* 22:1397-1409.
- Kajimura, S., B.M. Spiegelman, and P. Seale. 2015. Brown and Beige Fat: Physiological Roles beyond Heat Generation. *Cell Metab.* 22:546-559.
- Kallwitz, E.R., A. McLachlan, and S.J. Cotler. 2008. Role of peroxisome proliferators-activated receptors in the pathogenesis and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 14:22-28.
- Kanda, H., S. Tateya, Y. Tamori, K. Kotani, K. Hiasa, R. Kitazawa, S. Kitazawa, H. Miyachi, S. Maeda, K. Egashira, and M. Kasuga. 2006. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest.* 116:1494-1505.
- Kang, K., S.M. Reilly, V. Karabacak, M.R. Gangl, K. Fitzgerald, B. Hatano, and C.H. Lee. 2008. Adipocyte-derived Th2 cytokines and myeloid PPARdelta regulate macrophage polarization and insulin sensitivity. *Cell Metab.* 7:485-495.
- Kanneganti, T.D., and V.D. Dixit. 2012. Immunological complications of obesity. *Nat Immunol.* 13:707-712.

- Karelis, A.D., M. Brochu, and R. Rabasa-Lhoret. 2004a. Can we identify metabolically healthy but obese individuals (MHO)? *Diabetes Metab.* 30:569-572.
- Karelis, A.D., D.H. St-Pierre, F. Conus, R. Rabasa-Lhoret, and E.T. Poehlman. 2004b. Metabolic and body composition factors in subgroups of obesity: what do we know? *J Clin Endocrinol Metab.* 89:2569-2575.
- Karimian Azari, E., C. Leitner, T. Jaggi, W. Langhans, and A. Mansouri. 2013. Possible role of intestinal fatty acid oxidation in the eating-inhibitory effect of the PPAR-alpha agonist Wy-14643 in high-fat diet fed rats. *PLoS One.* 8:e74869.
- Karlsson, M., J.A. Contreras, U. Hellman, H. Tornqvist, and C. Holm. 1997. cDNA cloning, tissue distribution, and identification of the catalytic triad of monoglyceride lipase. Evolutionary relationship to esterases, lysophospholipases, and haloperoxidases. *J Biol Chem.* 272:27218-27223.
- Kawabata, F., N. Inoue, Y. Masamoto, S. Matsumura, W. Kimura, M. Kadowaki, T. Higashi, M. Tominaga, K. Inoue, and T. Fushiki. 2009. Non-pungent capsaicin analogs (capsinoids) increase metabolic rate and enhance thermogenesis via gastrointestinal TRPV1 in mice. *Biosci Biotechnol Biochem.* 73:2690-2697.
- Kawashita, N.H., W.T. Festuccia, M.N. Brito, M.A. Moura, S.R. Brito, M.A. Garofalo, I.C. Kettelhut, and R.H. Migliorini. 2002. Glycerokinase activity in brown adipose tissue: a sympathetic regulation? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 282:R1185-1190.
- Kazantzis, M., and A. Stahl. 2012. Fatty acid transport proteins, implications in physiology and disease. *Biochimica et biophysica acta.* 1821:852-857.
- Kehrer, J.P., S.S. Biswal, E. La, P. Thuillier, K. Datta, S.M. Fischer, and J.P. Vanden Heuvel. 2001. Inhibition of peroxisome-proliferator-activated receptor (PPAR)alpha by MK886. *The Biochemical journal.* 356:899-906.
- Kelley, D.E., F.L. Thaete, F. Troost, T. Huwe, and B.H. Goodpaster. 2000. Subdivisions of subcutaneous abdominal adipose tissue and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 278:E941-948.
- Kershaw, E.E., and J.S. Flier. 2004. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 89:2548-2556.
- Kersten, S., J. Seydoux, J.M. Peters, F.J. Gonzalez, B. Desvergne, and W. Wahli. 1999. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest.* 103:1489-1498.
- Khedoe, P.P., G. Hoeke, S. Kooijman, W. Dijk, J.T. Buijs, S. Kersten, L.M. Havekes, P.S. Hiemstra, J.F. Berbee, M.R. Boon, and P.C. Rensen. 2015. Brown adipose tissue takes up plasma triglycerides mostly after lipolysis. *J Lipid Res.* 56:51-59.
- Kikuchi-Utsumi, K., B. Gao, H. Ohinata, M. Hashimoto, N. Yamamoto, and A. Kuroshima. 2002. Enhanced gene expression of endothelial nitric oxide synthase in brown adipose tissue during cold exposure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 282:R623-626.
- Kim, J.B., and B.M. Spiegelman. 1996. ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev.* 10:1096-1107.
- Kim, J.K., H.J. Kim, S.Y. Park, A. Cederberg, R. Westergren, D. Nilsson, T. Higashimori, Y.R. Cho, Z.X. Liu, J. Dong, G.W. Cline, S. Enerback, and G.I. Shulman. 2005. Adipocyte-specific overexpression of FOXC2 prevents diet-induced increases in intramuscular fatty acyl CoA and insulin resistance. *Diabetes.* 54:1657-1663.
- Kintscher, U., M. Hartge, K. Hess, A. Foryst-Ludwig, M. Clemenz, M. Wabitsch, P. Fischer-Posovszky, T.F. Barth, D. Dragun, T. Skurk, H. Hauner, M. Bluher, T. Unger, A.M. Wolf, U. Knippschild, V. Hombach, and N. Marx. 2008. T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 28:1304-1310.

- Kishida, K., I. Shimomura, H. Nishizawa, N. Maeda, H. Kuriyama, H. Kondo, M. Matsuda, H. Nagaretani, N. Ouchi, K. Hotta, S. Kihara, T. Kadowaki, T. Funahashi, and Y. Matsuzawa. 2001. Enhancement of the aquaporin adipose gene expression by a peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem.* 276:48572-48579.
- Kiskinis, E., L. Chatzeli, E. Curry, M. Kaforou, A. Frontini, S. Cinti, G. Montana, M.G. Parker, and M. Christian. 2014. RIP140 represses the "brown-in-white" adipocyte program including a futile cycle of triacylglycerol breakdown and synthesis. *Mol Endocrinol.* 28:344-356.
- Kitao, N., and M. Hashimoto. 2012. Increased thermogenic capacity of brown adipose tissue under low temperature and its contribution to arousal from hibernation in Syrian hamsters. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 302:R118-125.
- Kiwaki, K., C.M. Kotz, C. Wang, L. Lanningham-Foster, and J.A. Levine. 2004. Orexin A (hypocretin 1) injected into hypothalamic paraventricular nucleus and spontaneous physical activity in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 286:E551-559.
- Kliwer, S.A., B.M. Forman, B. Blumberg, E.S. Ong, U. Borgmeyer, D.J. Mangelsdorf, K. Umesono, and R.M. Evans. 1994. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:7355-7359.
- Kliwer, S.A., K. Umesono, D.J. Noonan, R.A. Heyman, and R.M. Evans. 1992. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature.* 358:771-774.
- Kliwer, S.A., H.E. Xu, M.H. Lambert, and T.M. Willson. 2001. Peroxisome proliferator-activated receptors: from genes to physiology. *Recent Prog Horm Res.* 56:239-263.
- Klingenberg, M., K.S. Echtay, M. Bienengraeber, E. Winkler, and S.G. Huang. 1999. Structure-function relationship in UCP1. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 23 Suppl 6:S24-29.
- Knight, B.L., A. Hebbachi, D. Hauton, A.M. Brown, D. Wiggins, D.D. Patel, and G.F. Gibbons. 2005. A role for PPARalpha in the control of SREBP activity and lipid synthesis in the liver. *The Biochemical journal.* 389:413-421.
- Knight, B.L., D.D. Patel, S.M. Humphreys, D. Wiggins, and G.F. Gibbons. 2003. Inhibition of cholesterol absorption associated with a PPAR alpha-dependent increase in ABC binding cassette transporter A1 in mice. *J Lipid Res.* 44:2049-2058.
- Knouff, C., and J. Auwerx. 2004. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma calls for activation in moderation: lessons from genetics and pharmacology. *Endocr Rev.* 25:899-918.
- Komatsu, M., Y. Tong, Y. Li, T. Nakajima, G. Li, R. Hu, E. Sugiyama, Y. Kamijo, N. Tanaka, A. Hara, and T. Aoyama. 2010. Multiple roles of PPARalpha in brown adipose tissue under constitutive and cold conditions. *Genes Cells.* 15:91-100.
- Kopecky, J., G. Clarke, S. Enerback, B. Spiegelman, and L.P. Kozak. 1995. Expression of the mitochondrial uncoupling protein gene from the aP2 gene promoter prevents genetic obesity. *J Clin Invest.* 96:2914-2923.
- Kopelman, P.G. 2000. Obesity as a medical problem. *Nature.* 404:635-643.
- Kornberg, R.D. 2005. Mediator and the mechanism of transcriptional activation. *Trends Biochem Sci.* 30:235-239.
- Kotz, C.M., J.A. Teske, and C.J. Billington. 2008. Neuroregulation of nonexercise activity thermogenesis and obesity resistance. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 294:R699-710.
- Kozak, U.C., W. Held, D. Kreutter, and L.P. Kozak. 1992. Adrenergic regulation of the mitochondrial uncoupling protein gene in brown fat tumor cells. *Mol Endocrinol.* 6:763-772.



- Kraakman, M.J., H.L. Kammoun, T.L. Allen, V. Deswaerte, D.C. Henstridge, E. Estevez, V.B. Matthews, B. Neill, D.A. White, A.J. Murphy, L. Peijs, C. Yang, S. Risis, C.R. Bruce, X.J. Du, A. Bobik, R.S. Lee-Young, B.A. Kingwell, A. Vasanthakumar, W. Shi, A. Kallies, G.I. Lancaster, S. Rose-John, and M.A. Febbraio. 2015. Blocking IL-6 trans-signaling prevents high-fat diet-induced adipose tissue macrophage recruitment but does not improve insulin resistance. *Cell Metab.* 21:403-416.
- Kralisch, S., U. Lossner, M. Bluher, R. Paschke, M. Stumvoll, and M. Fasshauer. 2007. Growth hormone induces apelin mRNA expression and secretion in mouse 3T3-L1 adipocytes. *Regul Pept.* 139:84-89.
- Kramer, D., R. Shapiro, A. Adler, E. Bush, and C.M. Rondinone. 2001. Insulin-sensitizing effect of rosiglitazone (BRL-49653) by regulation of glucose transporters in muscle and fat of Zucker rats. *Metabolism.* 50:1294-1300.
- Kramer, D.K., M. Ahlsen, J. Norrbom, E. Jansson, N. Hjeltne, T. Gustafsson, and A. Krook. 2006. Human skeletal muscle fibre type variations correlate with PPAR alpha, PPAR delta and PGC-1 alpha mRNA. *Acta Physiol (Oxf).* 188:207-216.
- Kramer, D.K., L. Al-Khalili, B. Guigas, Y. Leng, P.M. Garcia-Roves, and A. Krook. 2007. Role of AMP kinase and PPARdelta in the regulation of lipid and glucose metabolism in human skeletal muscle. *J Biol Chem.* 282:19313-19320.
- Krebs, E.E., B.C. Taylor, J.A. Cauley, K.L. Stone, P.J. Bowman, and K.E. Ensrud. 2006. Measures of adiposity and risk of breast cancer in older postmenopausal women. *J Am Geriatr Soc.* 54:63-69.
- Kreier, F., and R.M. Buijs. 2007. Evidence for parasympathetic innervation of white adipose tissue, clearing up some vagaries. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 293:R548-549; author reply R550-542, discussion R553-544.
- Kreier, F., Y.S. Kap, T.C. Mettenleiter, C. van Heijningen, J. van der Vliet, A. Kalsbeek, H.P. Sauerwein, E. Fliers, J.A. Romijn, and R.M. Buijs. 2006. Tracing from fat tissue, liver, and pancreas: a neuroanatomical framework for the role of the brain in type 2 diabetes. *Endocrinology.* 147:1140-1147.
- Krief, S., F. Lonnqvist, S. Raimbault, B. Baude, A. Van Spronsen, P. Arner, A.D. Strosberg, D. Ricquier, and L.J. Emorine. 1993. Tissue distribution of beta 3-adrenergic receptor mRNA in man. *J Clin Invest.* 91:344-349.
- Krude, H., H. Biebermann, D. Schnabel, M.Z. Tansek, P. Theunissen, P.E. Mullis, and A. Gruters. 2003. Obesity due to proopiomelanocortin deficiency: three new cases and treatment trials with thyroid hormone and ACTH4-10. *J Clin Endocrinol Metab.* 88:4633-4640.
- Kuo, L.E., J.B. Kitlinska, J.U. Tilan, L. Li, S.B. Baker, M.D. Johnson, E.W. Lee, M.S. Burnett, S.T. Fricke, R. Kvetnansky, H. Herzog, and Z. Zukowska. 2007. Neuropeptide Y acts directly in the periphery on fat tissue and mediates stress-induced obesity and metabolic syndrome. *Nat Med.* 13:803-811.
- Kurdiova, T., M. Balaz, M. Vician, D. Maderova, M. Vlcek, L. Valkovic, M. Srbecky, R. Imrich, O. Kyselovicova, V. Belan, I. Jelok, C. Wolfrum, I. Klimes, M. Krssak, E. Zemkova, D. Gasperikova, J. Ukropec, and B. Ukropcova. 2014. Effects of obesity, diabetes and exercise on Fndc5 gene expression and irisin release in human skeletal muscle and adipose tissue: in vivo and in vitro studies. *The Journal of physiology.* 592:1091-1107.
- Kursawe, R., S. Caprio, C. Giannini, D. Narayan, A. Lin, E. D'Adamo, M. Shaw, B. Pierpont, S.W. Cushman, and G.I. Shulman. 2013. Decreased transcription of ChREBP-alpha/beta isoforms in abdominal subcutaneous adipose tissue of obese adolescents with prediabetes or early type 2 diabetes: associations with insulin resistance and hyperglycemia. *Diabetes.* 62:837-844.

## L

- Labbe, S.M., A. Caron, I. Bakan, M. Laplante, A.C. Carpentier, R. Lecomte, and D. Richard. 2015. In vivo measurement of energy substrate contribution to cold-induced brown adipose tissue thermogenesis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 29:2046-2058.
- Lafontan, M., and J. Girard. 2008. Impact of visceral adipose tissue on liver metabolism. Part I: heterogeneity of adipose tissue and functional properties of visceral adipose tissue. *Diabetes Metab*. 34:317-327.
- Lafontan, M., and D. Langin. 2009. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog Lipid Res*. 48:275-297.
- Lahesmaa, M., J. Orava, C. Schalin-Jantti, M. Soinio, J.C. Hannukainen, T. Nojonen, A. Kirjavainen, H. Iida, N. Kudomi, S. Enerback, K.A. Virtanen, and P. Nuutila. 2014. Hyperthyroidism increases brown fat metabolism in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 99:E28-35.
- Lalloyer, F., B. Vandewalle, F. Percevault, G. Torpier, J. Kerr-Conte, M. Oosterveer, R. Paumelle, J.C. Fruchart, F. Kuipers, F. Pattou, C. Fievet, and B. Staels. 2006. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha improves pancreatic adaptation to insulin resistance in obese mice and reduces lipotoxicity in human islets. *Diabetes*. 55:1605-1613.
- Landsberg, L., M.E. Saville, and J.B. Young. 1984. Sympathoadrenal system and regulation of thermogenesis. *Am J Physiol*. 247:E181-189.
- Langin, D. 2006. Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome. *Pharmacol Res*. 53:482-491.
- Langin, D., M.P. Portillo, J.S. Saulnier-Blache, and M. Lafontan. 1991. Coexistence of three beta-adrenoceptor subtypes in white fat cells of various mammalian species. *Eur J Pharmacol*. 199:291-301.
- Lanni, A., M. Moreno, A. Lombardi, and F. Goglia. 2003. Thyroid hormone and uncoupling proteins. *FEBS letters*. 543:5-10.
- Laplante, M., W.T. Festuccia, G. Soucy, Y. Gelinas, J. Lalonde, and Y. Deshaies. 2007. Involvement of adipose tissues in the early hypolipidemic action of PPARgamma agonism in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 292:R1408-1417.
- Larose, M., A.M. Cassard-Doulcier, C. Fleury, F. Serra, O. Champigny, F. Bouillaud, and D. Ricquier. 1996. Essential cis-acting elements in rat uncoupling protein gene are in an enhancer containing a complex retinoic acid response domain. *J Biol Chem*. 271:31533-31542.
- Larsen, T.M., S. Toubro, M.A. van Baak, K.M. Gottesdiener, P. Larson, W.H. Saris, and A. Astrup. 2002. Effect of a 28-d treatment with L-796568, a novel beta(3)-adrenergic receptor agonist, on energy expenditure and body composition in obese men. *Am J Clin Nutr*. 76:780-788.
- Lazennec, G., L. Canaple, D. Saugy, and W. Wahli. 2000. Activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) by their ligands and protein kinase A activators. *Mol Endocrinol*. 14:1962-1975.
- Leal Vde, O., and D. Mafra. 2013. Adipokines in obesity. *Clin Chim Acta*. 419:87-94.
- Lean, M.E. 1989. Brown adipose tissue in humans. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 48:243-256.

- Lean, M.E., T.S. Han, and J.C. Seidell. 1998. Impairment of health and quality of life in people with large waist circumference. *Lancet*. 351:853-856.
- Lean, M.E., W.P. James, G. Jennings, and P. Trayhurn. 1986. Brown adipose tissue uncoupling protein content in human infants, children and adults. *Clin Sci (Lond)*. 71:291-297.
- Leblanc, J., and M. Pouliot. 1964. Importance of Noradrenaline in Cold Adaptation. *Am J Physiol*. 207:853-856.
- Lee, B.C., and J. Lee. 2014. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. *Biochimica et biophysica acta*. 1842:446-462.
- Lee, C.H., P. Olson, A. Hevener, I. Mehl, L.W. Chong, J.M. Olefsky, F.J. Gonzalez, J. Ham, H. Kang, J.M. Peters, and R.M. Evans. 2006. PPARdelta regulates glucose metabolism and insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:3444-3449.
- Lee, P., R.J. Brychta, J. Linderman, S. Smith, K.Y. Chen, and F.S. Celi. 2013. Mild cold exposure modulates fibroblast growth factor 21 (FGF21) diurnal rhythm in humans: relationship between FGF21 levels, lipolysis, and cold-induced thermogenesis. *J Clin Endocrinol Metab*. 98:E98-102.
- Lee, P., J.R. Greenfield, K.K. Ho, and M.J. Fulham. 2010. A critical appraisal of the prevalence and metabolic significance of brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 299:E601-606.
- Lee, P., J.D. Linderman, S. Smith, R.J. Brychta, J. Wang, C. Idelson, R.M. Perron, C.D. Werner, G.Q. Phan, U.S. Kammula, E. Kebebew, K. Pacak, K.Y. Chen, and F.S. Celi. 2014a. Irisin and FGF21 are cold-induced endocrine activators of brown fat function in humans. *Cell Metab*. 19:302-309.
- Lee, P., S. Smith, J. Linderman, A.B. Courville, R.J. Brychta, W. Dieckmann, C.D. Werner, K.Y. Chen, and F.S. Celi. 2014b. Temperature-acclimated brown adipose tissue modulates insulin sensitivity in humans. *Diabetes*. 63:3686-3698.
- Lee, Y.H., A.P. Petkova, A.A. Konkar, and J.G. Granneman. 2015. Cellular origins of cold-induced brown adipocytes in adult mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 29:286-299.
- Lee, Y.H., A.P. Petkova, E.P. Mottillo, and J.G. Granneman. 2012. In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by beta3-adrenoceptor activation and high-fat feeding. *Cell Metab*. 15:480-491.
- Lefebvre, P., G. Chinetti, J.C. Fruchart, and B. Staels. 2006. Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis. *J Clin Invest*. 116:571-580.
- Lehmann, J.M., L.B. Moore, T.A. Smith-Oliver, W.O. Wilkison, T.M. Willson, and S.A. Kliewer. 1995. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem*. 270:12953-12956.
- Lehr, L., K. Canola, B. Leger, and J.P. Giacobino. 2009. Differentiation and characterization in primary culture of white adipose tissue brown adipocyte-like cells. *Int J Obes (Lond)*. 33:680-686.
- Lehrke, M., and M.A. Lazar. 2005. The many faces of PPARgamma. *Cell*. 123:993-999.
- Leibowitz, M.D., C. Fievet, N. Hennuyer, J. Peinado-Onsurbe, H. Duez, J. Bergera, C.A. Cullinan, C.P. Sparrow, J. Baffic, G.D. Berger, C. Santini, R.W. Marquis, R.L. Tolman, R.G. Smith, D.E. Moller, and J. Auwerx. 2000. Activation of PPARdelta alters lipid metabolism in db/db mice. *FEBS letters*. 473:333-336.
- Leonardsson, G., J.H. Steel, M. Christian, V. Pocock, S. Milligan, J. Bell, P.W. So, G. Medina-Gomez, A. Vidal-Puig, R. White, and M.G. Parker. 2004. Nuclear receptor corepressor RIP140 regulates fat accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:8437-8442.
- Lepper, C., and C.M. Fan. 2010. Inducible lineage tracing of Pax7-descendant cells reveals embryonic origin of adult satellite cells. *Genesis*. 48:424-436.

- Lever, J.D., J.O. Nnodim, and D. Symons. 1985. Arteriovenous anastomoses in interscapular brown adipose tissue in the rat. *J Anat.* 143:207-210.
- Levine, J.A. 2004. Nonexercise activity thermogenesis (NEAT): environment and biology. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 286:E675-685.
- Levine, J.A. 2007. Nonexercise activity thermogenesis--liberating the life-force. *J Intern Med.* 262:273-287.
- Levine, J.A., N.L. Eberhardt, and M.D. Jensen. 1999. Role of nonexercise activity thermogenesis in resistance to fat gain in humans. *Science.* 283:212-214.
- Lewis, G.F., A. Carpentier, K. Adeli, and A. Giacca. 2002. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev.* 23:201-229.
- Li, L., T. Li, Y. Zhang, Z. Pan, B. Wu, X. Huang, Y. Zhang, Y. Mei, L. Ge, G. Shen, R.S. Ge, D. Zhu, and Y. Lou. 2015. Peroxisome proliferator-activated receptorbeta/delta activation is essential for modulating p-Foxo1/Foxo1 status in functional insulin-positive cell differentiation. *Cell Death Dis.* 6:e1715.
- Li, M., G. Pascual, and C.K. Glass. 2000. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Mol Cell Biol.* 20:4699-4707.
- Li, P., Z. Zhu, Y. Lu, and J.G. Granneman. 2005. Metabolic and cellular plasticity in white adipose tissue II: role of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 289:E617-626.
- Li, Y., T. Fromme, S. Schweizer, T. Schottl, and M. Klingenspor. 2014. Taking control over intracellular fatty acid levels is essential for the analysis of thermogenic function in cultured primary brown and brite/beige adipocytes. *EMBO Rep.* 15:1069-1076.
- Lidell, M.E., M.J. Betz, O. Dahlqvist Leinhard, M. Heglind, L. Elander, M. Slawik, T. Mussack, D. Nilsson, T. Romu, P. Nuutila, K.A. Virtanen, F. Beuschlein, A. Persson, M. Borga, and S. Enerback. 2013. Evidence for two types of brown adipose tissue in humans. *Nat Med.* 19:631-634.
- Lidell, M.E., M.J. Betz, and S. Enerback. 2014. Brown adipose tissue and its therapeutic potential. *J Intern Med.* 276:364-377.
- Lidell, M.E., E.L. Seifert, R. Westergren, M. Heglind, A. Gowing, V. Sukonina, Z. Arani, P. Itkonen, S. Wallin, F. Westberg, J. Fernandez-Rodriguez, M. Laakso, T. Nilsson, X.R. Peng, M.E. Harper, and S. Enerback. 2011. The adipocyte-expressed forkhead transcription factor Foxc2 regulates metabolism through altered mitochondrial function. *Diabetes.* 60:427-435.
- Liesa, M., and O.S. Shirihai. 2013. Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metab.* 17:491-506.
- Lilla, J., D. Stickens, and Z. Werb. 2002. Metalloproteases and adipogenesis: a weighty subject. *Am J Pathol.* 160:1551-1554.
- Lin, C.S., and M. Klingenberg. 1980. Isolation of the uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria. *FEBS letters.* 113:299-303.
- Lin, C.S., Z.C. Xin, C.H. Deng, H. Ning, G. Lin, and T.F. Lue. 2010. Defining adipose tissue-derived stem cells in tissue and in culture. *Histol Histopathol.* 25:807-815.
- Lin, Q., S.E. Ruuska, N.S. Shaw, D. Dong, and N. Noy. 1999. Ligand selectivity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Biochemistry.* 38:185-190.
- Linhart, H.G., K. Ishimura-Oka, F. DeMayo, T. Kibe, D. Repka, B. Poindexter, R.J. Bick, and G.J. Darlington. 2001. C/EBPalpha is required for differentiation of white, but not brown, adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:12532-12537.
- Liu, H.J., C.Y. Zhang, F. Song, T. Xiao, J. Meng, Q. Zhang, C.L. Liang, S. Li, J. Wang, B. Zhang, Y.R. Liu, T. Sun, and H.G. Zhou. 2015. A Novel Partial Agonist of Peroxisome

- Proliferator-Activated Receptor gamma with Excellent Effect on Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *J Pharmacol Exp Ther.* 353:573-581.
- Liu, J., A. Divoux, J. Sun, J. Zhang, K. Clement, J.N. Glickman, G.K. Sukhova, P.J. Wolters, J. Du, C.Z. Gorgun, A. Doria, P. Libby, R.S. Blumberg, B.B. Kahn, G.S. Hotamisligil, and G.P. Shi. 2009. Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. *Nat Med.* 15:940-945.
- Liu, S., B. Hatano, M. Zhao, C.C. Yen, K. Kang, S.M. Reilly, M.R. Gangl, C. Gorgun, J.A. Balschi, J.M. Ntambi, and C.H. Lee. 2011. Role of peroxisome proliferator-activated receptor  $\delta/\beta$  in hepatic metabolic regulation. *J Biol Chem.* 286:1237-1247.
- Livingstone, M.B., J.J. Strain, A.M. Prentice, W.A. Coward, G.B. Nevin, M.E. Barker, R.J. Hickey, P.G. McKenna, and R.G. Whitehead. 1991. Potential contribution of leisure activity to the energy expenditure patterns of sedentary populations. *Br J Nutr.* 65:145-155.
- Locke, R.M., and D.G. Nicholls. 1981. A re-evaluation of the role of fatty acids in the physiological regulation of the proton conductance of brown adipose tissue mitochondria. *FEBS letters.* 135:249-252.
- Loft, A., I. Forss, M.S. Siersbaek, S.F. Schmidt, A.S. Larsen, J.G. Madsen, D.F. Pisani, R. Nielsen, M.M. Aagaard, A. Mathison, M.J. Neville, R. Urrutia, F. Karpe, E.Z. Amri, and S. Mandrup. 2015. Browning of human adipocytes requires KLF11 and reprogramming of PPARgamma superenhancers. *Genes Dev.* 29:7-22.
- Lombardi, A., A. Lanni, P. de Lange, E. Silvestri, P. Grasso, R. Senese, F. Goglia, and M. Moreno. 2007. Acute administration of 3,5-diiodo-L-thyronine to hypothyroid rats affects bioenergetic parameters in rat skeletal muscle mitochondria. *FEBS letters.* 581:5911-5916.
- Lonard, D.M., and B.W. O'Malley. 2009. Emerging roles of the ubiquitin proteasome system in nuclear hormone receptor signaling. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 87:117-135.
- Long, J.Z., K.J. Svensson, L. Tsai, X. Zeng, H.C. Roh, X. Kong, R.R. Rao, J. Lou, I. Lokurkar, W. Baur, J.J. Castellot, Jr., E.D. Rosen, and B.M. Spiegelman. 2014. A smooth muscle-like origin for beige adipocytes. *Cell Metab.* 19:810-820.
- Loos, R.J., and G.S. Yeo. 2014. The bigger picture of FTO: the first GWAS-identified obesity gene. *Nat Rev Endocrinol.* 10:51-61.
- Loprinzi, P.D., E. Smit, and S. Mahoney. 2014. Physical activity and dietary behavior in US adults and their combined influence on health. *Mayo Clin Proc.* 89:190-198.
- Lowell, B.B., S.S. V, A. Hamann, J.A. Lawitts, J. Himms-Hagen, B.B. Boyer, L.P. Kozak, and J.S. Flier. 1993. Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature.* 366:740-742.
- Lu, X., X. Yang, and J. Liu. 2010. Differential control of ATGL-mediated lipid droplet degradation by CGI-58 and GOS2. *Cell Cycle.* 9:2719-2725.
- Lu, Y., Q. Zhou, Y. Shi, J. Liu, F. Zhong, X. Hao, C. Li, N. Chen, and W. Wang. 2013. SUMOylation of PPARgamma by rosiglitazone prevents LPS-induced NCoR degradation mediating down regulation of chemokines expression in renal proximal tubular cells. *PLoS One.* 8:e79815.
- Lubrano-Berthelier, C., B. Dubern, J.M. Lacorte, F. Picard, A. Shapiro, S. Zhang, S. Bertrais, S. Hercberg, A. Basdevant, K. Clement, and C. Vaisse. 2006. Melanocortin 4 receptor mutations in a large cohort of severely obese adults: prevalence, functional classification, genotype-phenotype relationship, and lack of association with binge eating. *J Clin Endocrinol Metab.* 91:1811-1818.
- Ludy, M.J., and R.D. Mattes. 2011. The effects of hedonically acceptable red pepper doses on thermogenesis and appetite. *Physiol Behav.* 102:251-258.

- Ludy, M.J., G.E. Moore, and R.D. Mattes. 2012. The effects of capsaicin and capsiate on energy balance: critical review and meta-analyses of studies in humans. *Chem Senses*. 37:103-121.
- Lumeng, C.N., J.L. Bodzin, and A.R. Saltiel. 2007. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*. 117:175-184.
- Lumeng, C.N., I. Maillard, and A.R. Saltiel. 2009. T-ing up inflammation in fat. *Nat Med*. 15:846-847.
- Lupi, R., S. Del Guerra, L. Marselli, M. Bugliani, U. Boggi, F. Mosca, P. Marchetti, and S. Del Prato. 2004. Rosiglitazone prevents the impairment of human islet function induced by fatty acids: evidence for a role of PPARgamma2 in the modulation of insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 286:E560-567.
- Luquet, S., J. Lopez-Soriano, D. Holst, A. Fredenrich, J. Melki, M. Rassoulzadegan, and P.A. Grimaldi. 2003. Peroxisome proliferator-activated receptor delta controls muscle development and oxidative capability. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 17:2299-2301.
- Lv, S.Y., Y.J. Yang, Y.J. Qin, J.R. Mo, N.B. Wang, Y.J. Wang, and Q. Chen. 2012. Central apelin-13 inhibits food intake via the CRF receptor in mice. *Peptides*. 33:132-138.
- Lynch, L., M. Nowak, B. Varghese, J. Clark, A.E. Hogan, V. Toxavidis, S.P. Balk, D. O'Shea, C. O'Farrelly, and M.A. Exley. 2012. Adipose tissue invariant NKT cells protect against diet-induced obesity and metabolic disorder through regulatory cytokine production. *Immunity*. 37:574-587.
- Lyngso, D., L. Simonsen, and J. Bulow. 2002. Metabolic effects of interleukin-6 in human splanchnic and adipose tissue. *The Journal of physiology*. 543:379-386.

## M

- Madsen, L., L.M. Pedersen, H.H. Lillefosse, E. Fjaere, I. Bronstad, Q. Hao, R.K. Petersen, P. Hallenborg, T. Ma, R. De Matteis, P. Araujo, J. Mercader, M.L. Bonet, J.B. Hansen, B. Cannon, J. Nedergaard, J. Wang, S. Cinti, P. Voshol, S.O. Doskeland, and K. Kristiansen. 2010. UCP1 induction during recruitment of brown adipocytes in white adipose tissue is dependent on cyclooxygenase activity. *PLoS One*. 5:e11391.
- Mandard, S., M. Muller, and S. Kersten. 2004. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 61:393-416.
- Mangelsdorf, D.J., U. Borgmeyer, R.A. Heyman, J.Y. Zhou, E.S. Ong, A.E. Oro, A. Kakizuka, and R.M. Evans. 1992. Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes Dev*. 6:329-344.
- Martin-Rodriguez, E., F. Guillen-Grima, A. Marti, and A. Brugos-Larumbe. 2015. Comorbidity associated with obesity in a large population: The APNA study. *Obes Res Clin Pract*.
- Martin, G., K. Schoonjans, B. Staels, and J. Auwerx. 1998. PPARgamma activators improve glucose homeostasis by stimulating fatty acid uptake in the adipocytes. *Atherosclerosis*. 137 Suppl:S75-80.
- Massague, J., J. Seoane, and D. Wotton. 2005. Smad transcription factors. *Genes Dev*. 19:2783-2810.
- Masuda, K., Y. Okamoto, Y. Tsuura, S. Kato, T. Miura, K. Tsuda, H. Horikoshi, H. Ishida, and Y. Seino. 1995. Effects of Troglitazone (CS-045) on insulin secretion in isolated rat pancreatic islets and HIT cells: an insulinotropic mechanism distinct from glibenclamide. *Diabetologia*. 38:24-30.

- Masuzaki, H., J. Paterson, H. Shinyama, N.M. Morton, J.J. Mullins, J.R. Seckl, and J.S. Flier. 2001. A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science*. 294:2166-2170.
- Matsushita, M., T. Yoneshiro, S. Aita, T. Kameya, H. Sugie, and M. Saito. 2014. Impact of brown adipose tissue on body fatness and glucose metabolism in healthy humans. *Int J Obes (Lond)*. 38:812-817.
- Maumus, M., J.A. Peyrafitte, R. D'Angelo, C. Fournier-Wirth, A. Bouloumie, L. Casteilla, C. Sengenès, and P. Bourin. 2011. Native human adipose stromal cells: localization, morphology and phenotype. *Int J Obes (Lond)*. 35:1141-1153.
- Maumus, M., C. Sengenès, P. Decaunes, A. Zakaroff-Girard, V. Bourlier, M. Lafontan, J. Galitzky, and A. Bouloumie. 2008. Evidence of in situ proliferation of adult adipose tissue-derived progenitor cells: influence of fat mass microenvironment and growth. *J Clin Endocrinol Metab*. 93:4098-4106.
- Mazzucotelli, A., N. Viguerie, C. Tiraby, J.S. Annicotte, A. Mairal, E. Klimcakova, E. Lepin, P. Delmar, S. Dejean, G. Tavernier, C. Lefort, J. Hidalgo, T. Pineau, L. Fajas, K. Clement, and D. Langin. 2007. The transcriptional coactivator peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)gamma coactivator-1 alpha and the nuclear receptor PPAR alpha control the expression of glycerol kinase and metabolism genes independently of PPAR gamma activation in human white adipocytes. *Diabetes*. 56:2467-2475.
- McKenna, N.J., and B.W. O'Malley. 2002. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell*. 108:465-474.
- McNelis, J.C., and J.M. Olefsky. 2014. Macrophages, immunity, and metabolic disease. *Immunity*. 41:36-48.
- Medina-Gomez, G., S. Virtue, C. Lelliott, R. Boiani, M. Campbell, C. Christodoulides, C. Perrin, M. Jimenez-Linan, M. Blount, J. Dixon, D. Zahn, R.R. Thresher, S. Aparicio, M. Carlton, W.H. Colledge, M.I. Kettunen, T. Seppanen-Laakso, J.K. Sethi, S. O'Rahilly, K. Brindle, S. Cinti, M. Oresic, R. Burcelin, and A. Vidal-Puig. 2005. The link between nutritional status and insulin sensitivity is dependent on the adipocyte-specific peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 isoform. *Diabetes*. 54:1706-1716.
- Mehta, T., K.R. Fontaine, S.W. Keith, S.S. Bangalore, G. de los Campos, A. Bartolucci, N.M. Pajewski, and D.B. Allison. 2014. Obesity and mortality: are the risks declining? Evidence from multiple prospective studies in the United States. *Obes Rev*. 15:619-629.
- Merlin, J., B.A. Evans, N. Dehvari, M. Sato, T. Bengtsson, and D.S. Hutchinson. 2015. Could burning fat start with a brite spark? Pharmacological and nutritional ways to promote thermogenesis. *Mol Nutr Food Res*.
- Michalik, L., B. Desvergne, and W. Wahli. 2004. Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: complex stories. *Nat Rev Cancer*. 4:61-70.
- Millar, J.S. 2013. Novel benefits of peroxisome proliferator-activated receptors on cardiovascular risk. *Curr Opin Lipidol*. 24:233-238.
- Mills, E.M., M.L. Banks, J.E. Sprague, and T. Finkel. 2003. Pharmacology: uncoupling the agony from ecstasy. *Nature*. 426:403-404.
- Milner, R.E., and P. Trayhurn. 1989. Cold-induced changes in uncoupling protein and GDP binding sites in brown fat of ob/ob mice. *Am J Physiol*. 257:R292-299.
- Miranville, A., C. Heeschen, C. Sengenès, C.A. Curat, R. Busse, and A. Bouloumie. 2004. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation*. 110:349-355.
- Mirbolooki, M.R., C.C. Constantinescu, M.L. Pan, and J. Mukherjee. 2011. Quantitative assessment of brown adipose tissue metabolic activity and volume using 18F-FDG PET/CT and  $\beta$ -adrenergic receptor activation. *EJNMMI Res*. 1:30.

- Misra, A., N. Singhal, and L. Khurana. 2010. Obesity, the metabolic syndrome, and type 2 diabetes in developing countries: role of dietary fats and oils. *J Am Coll Nutr.* 29:289S-301S.
- Misra, P., E.D. Owuor, W. Li, S. Yu, C. Qi, K. Meyer, Y.J. Zhu, M.S. Rao, A.N. Kong, and J.K. Reddy. 2002. Phosphorylation of transcriptional coactivator peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-binding protein (PBP). Stimulation of transcriptional regulation by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 277:48745-48754.
- Mitschke, M.M., L.S. Hoffmann, T. Gnad, D. Scholz, K. Kruithoff, P. Mayer, B. Haas, A. Sassmann, A. Pfeifer, and A. Kilic. 2013. Increased cGMP promotes healthy expansion and browning of white adipose tissue. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 27:1621-1630.
- Miyoshi, H., J.W. Perfield, 2nd, S.C. Souza, W.J. Shen, H.H. Zhang, Z.S. Stancheva, F.B. Kraemer, M.S. Obin, and A.S. Greenberg. 2007. Control of adipose triglyceride lipase action by serine 517 of perilipin A globally regulates protein kinase A-stimulated lipolysis in adipocytes. *J Biol Chem.* 282:996-1002.
- Mohamed-Ali, V., S. Goodrick, A. Rawesh, D.R. Katz, J.M. Miles, J.S. Yudkin, S. Klein, and S.W. Coppel. 1997. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor- $\alpha$ , in vivo. *J Clin Endocrinol Metab.* 82:4196-4200.
- Molina, A.J., J.D. Wikstrom, L. Stiles, G. Las, H. Mohamed, A. Elorza, G. Walzer, G. Twig, S. Katz, B.E. Corkey, and O.S. Shirihai. 2009. Mitochondrial networking protects beta-cells from nutrient-induced apoptosis. *Diabetes.* 58:2303-2315.
- Montagner, A., and W. Wahli. 2013. Contributions of peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta to skin health and disease. *Biomol Concepts.* 4:53-64.
- Montague, C.T., I.S. Farooqi, J.P. Whitehead, M.A. Soos, H. Rau, N.J. Wareham, C.P. Sewter, J.E. Digby, S.N. Mohammed, J.A. Hurst, C.H. Cheetham, A.R. Earley, A.H. Barnett, J.B. Prins, and S. O'Rahilly. 1997. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature.* 387:903-908.
- Moraes, C., V.O. Leal, S.M. Marinho, S.G. Barroso, G.S. Rocha, G.T. Boaventura, and D. Mafra. 2013. Resistance exercise training does not affect plasma irisin levels of hemodialysis patients. *Horm Metab Res.* 45:900-904.
- Moreno-Navarrete, J.M., F. Ortega, M. Serrano, E. Guerra, G. Pardo, F. Tinahones, W. Ricart, and J.M. Fernandez-Real. 2013. Irisin is expressed and produced by human muscle and adipose tissue in association with obesity and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 98:E769-778.
- Mori, T., H. Sakaue, H. Iguchi, H. Gomi, Y. Okada, Y. Takashima, K. Nakamura, T. Nakamura, T. Yamauchi, N. Kubota, T. Kadowaki, Y. Matsuki, W. Ogawa, R. Hiramatsu, and M. Kasuga. 2005. Role of Kruppel-like factor 15 (KLF15) in transcriptional regulation of adipogenesis. *J Biol Chem.* 280:12867-12875.
- Moro, C., J. Polak, B. Richterova, C. Sengenès, T. Pelikanova, J. Galitzky, V. Stich, M. Lafontan, and M. Berlan. 2005. Differential regulation of atrial natriuretic peptide- and adrenergic receptor-dependent lipolytic pathways in human adipose tissue. *Metabolism.* 54:122-131.
- Morrison, S.F., C.J. Madden, and D. Tupone. 2012. Central control of brown adipose tissue thermogenesis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 3.
- Morrison, S.F., and K. Nakamura. 2011. Central neural pathways for thermoregulation. *Front Biosci (Landmark Ed).* 16:74-104.
- Mory, G., F. Bouillaud, M. Combes-George, and D. Ricquier. 1984. Noradrenaline controls the concentration of the uncoupling protein in brown adipose tissue. *FEBS letters.* 166:393-396.



- Mossenbock, K., A. Vegiopoulos, A.J. Rose, T.P. Sijmonsma, S. Herzig, and T. Schafmeier. 2014. Browning of white adipose tissue uncouples glucose uptake from insulin signaling. *PLoS One*. 9:e110428.
- Mottillo, E.P., A.E. Bloch, T. Leff, and J.G. Granneman. 2012. Lipolytic products activate peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and delta in brown adipocytes to match fatty acid oxidation with supply. *J Biol Chem*. 287:25038-25048.
- Moura, M.A., W.T. Festuccia, N.H. Kawashita, M.A. Garofalo, S.R. Brito, I.C. Kettelhut, and R.H. Migliorini. 2005. Brown adipose tissue glyceroneogenesis is activated in rats exposed to cold. *Pflugers Arch*. 449:463-469.
- Mraz, M., and M. Haluzik. 2014. The role of adipose tissue immune cells in obesity and low-grade inflammation. *J Endocrinol*. 222:R113-127.
- Mueller, E., S. Drori, A. Aiyer, J. Yie, P. Sarraf, H. Chen, S. Hauser, E.D. Rosen, K. Ge, R.G. Roeder, and B.M. Spiegelman. 2002. Genetic analysis of adipogenesis through peroxisome proliferator-activated receptor gamma isoforms. *J Biol Chem*. 277:41925-41930.
- Mukherjee, R., P.A. Hoener, L. Jow, J. Bilakovics, K. Klausning, D.E. Mais, A. Faulkner, G.E. Croston, and J.R. Paterniti, Jr. 2000. A selective peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) modulator blocks adipocyte differentiation but stimulates glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol*. 14:1425-1433.
- Muoio, D.M., P.S. MacLean, D.B. Lang, S. Li, J.A. Houmard, J.M. Way, D.A. Winegar, J.C. Corton, G.L. Dohm, and W.E. Kraus. 2002a. Fatty acid homeostasis and induction of lipid regulatory genes in skeletal muscles of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha knock-out mice. Evidence for compensatory regulation by PPAR delta. *J Biol Chem*. 277:26089-26097.
- Muoio, D.M., J.M. Way, C.J. Tanner, D.A. Winegar, S.A. Kliewer, J.A. Houmard, W.E. Kraus, and G.L. Dohm. 2002b. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha regulates fatty acid utilization in primary human skeletal muscle cells. *Diabetes*. 51:901-909.
- Musso, G., M. Cassader, F. Rosina, and R. Gambino. 2012. Impact of current treatments on liver disease, glucose metabolism and cardiovascular risk in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a systematic review and meta-analysis of randomised trials. *Diabetologia*. 55:885-904.

## N

- Nagasawa, T., Y. Inada, S. Nakano, T. Tamura, T. Takahashi, K. Maruyama, Y. Yamazaki, J. Kuroda, and N. Shibata. 2006. Effects of bezafibrate, PPAR pan-agonist, and GW501516, PPARdelta agonist, on development of steatohepatitis in mice fed a methionine- and choline-deficient diet. *Eur J Pharmacol*. 536:182-191.
- Nagy, L., H.Y. Kao, D. Chakravarti, R.J. Lin, C.A. Hassig, D.E. Ayer, S.L. Schreiber, and R.M. Evans. 1997. Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell*. 89:373-380.
- Nagy, L., and J.W. Schwabe. 2004. Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. *Trends Biochem Sci*. 29:317-324.
- Nagy, L., P. Tontonoz, J.G. Alvarez, H. Chen, and R.M. Evans. 1998. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell*. 93:229-240.
- Nakamura, K., and S.F. Morrison. 2008. Preoptic mechanism for cold-defensive responses to skin cooling. *The Journal of physiology*. 586:2611-2620.

- Nan, Y.M., N. Fu, W.J. Wu, B.L. Liang, R.Q. Wang, S.X. Zhao, J.M. Zhao, and J. Yu. 2009. Rosiglitazone prevents nutritional fibrosis and steatohepatitis in mice. *Scand J Gastroenterol.* 44:358-365.
- Nan, Y.M., F. Han, L.B. Kong, S.X. Zhao, R.Q. Wang, W.J. Wu, and J. Yu. 2011. Adenovirus-mediated peroxisome proliferator activated receptor gamma overexpression prevents nutritional fibrotic steatohepatitis in mice. *Scand J Gastroenterol.* 46:358-369.
- Narala, V.R., R.K. Adapala, M.V. Suresh, T.G. Brock, M. Peters-Golden, and R.C. Reddy. 2010. Leukotriene B4 is a physiologically relevant endogenous peroxisome proliferator-activated receptor-alpha agonist. *J Biol Chem.* 285:22067-22074.
- Nawaz, Z., D.M. Lonard, C.L. Smith, E. Lev-Lehman, S.Y. Tsai, M.J. Tsai, and B.W. O'Malley. 1999. The Angelman syndrome-associated protein, E6-AP, is a coactivator for the nuclear hormone receptor superfamily. *Mol Cell Biol.* 19:1182-1189.
- Nedergaard, J., T. Bengtsson, and B. Cannon. 2007. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 293:E444-452.
- Nedergaard, J., V. Golozoubova, A. Matthias, A. Asadi, A. Jacobsson, and B. Cannon. 2001. UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. *Biochimica et biophysica acta.* 1504:82-106.
- Neels, J.G., T. Thinnes, and D.J. Loskutoff. 2004. Angiogenesis in an in vivo model of adipose tissue development. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 18:983-985.
- Negre-Salvayre, A., C. Hirtz, G. Carrera, R. Cazenave, M. Trolly, R. Salvayre, L. Penicaud, and L. Casteilla. 1997. A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 11:809-815.
- Newby, F.D., M.N. Sykes, and M. DiGirolamo. 1988. Regional differences in adipocyte lactate production from glucose. *Am J Physiol.* 255:E716-722.
- Ng, M., T. Fleming, M. Robinson, B. Thomson, N. Graetz, C. Margono, E.C. Mullany, S. Biryukov, C. Abbafati, S.F. Abera, J.P. Abraham, N.M. Abu-Rmeileh, T. Achoki, F.S. AlBuhairan, Z.A. Alemu, R. Alfonso, M.K. Ali, R. Ali, N.A. Guzman, W. Ammar, P. Anwari, A. Banerjee, S. Barquera, S. Basu, D.A. Bennett, Z. Bhutta, J. Blore, N. Cabral, I.C. Nonato, J.C. Chang, R. Chowdhury, K.J. Courville, M.H. Criqui, D.K. Cundiff, K.C. Dabhadkar, L. Dandona, A. Davis, A. Dayama, S.D. Dharmaratne, E.L. Ding, A.M. Durrani, A. Esteghamati, F. Farzadfar, D.F. Fay, V.L. Feigin, A. Flaxman, M.H. Forouzanfar, A. Goto, M.A. Green, R. Gupta, N. Hafezi-Nejad, G.J. Hankey, H.C. Harewood, R. Havmoeller, S. Hay, L. Hernandez, A. Husseini, B.T. Idrisov, N. Ikeda, F. Islami, E. Jahangir, S.K. Jassal, S.H. Jee, M. Jeffreys, J.B. Jonas, E.K. Kabagambe, S.E. Khalifa, A.P. Kengne, Y.S. Khader, Y.H. Khang, D. Kim, R.W. Kimokoti, J.M. Kinge, Y. Kokubo, S. Kosen, G. Kwan, T. Lai, M. Leinsalu, Y. Li, X. Liang, S. Liu, G. Logroscino, P.A. Lotufo, Y. Lu, J. Ma, N.K. Mainoo, G.A. Mensah, T.R. Merriman, A.H. Mokdad, J. Moschandreas, M. Naghavi, A. Naheed, D. Nand, K.M. Narayan, E.L. Nelson, M.L. Neuhouser, M.I. Nisar, T. Ohkubo, S.O. Oti, A. Pedroza, et al. 2014. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet.* 384:766-781.
- Nguyen, K.D., Y. Qiu, X. Cui, Y.P. Goh, J. Mwangi, T. David, L. Mukundan, F. Brombacher, R.M. Locksley, and A. Chawla. 2011. Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. *Nature.* 480:104-108.
- Nibbelink, M., K. Moulin, E. Arnaud, C. Duval, L. Penicaud, and L. Casteilla. 2001. Brown fat UCP1 is specifically expressed in uterine longitudinal smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 276:47291-47295.

- Nicholls, D.G. 1974. Hamster brown-adipose-tissue mitochondria. The chloride permeability of the inner membrane under respiring conditions, the influence of purine nucleotides. *European journal of biochemistry / FEBS*. 49:585-593.
- Nicholls, D.G., and R.M. Locke. 1984. Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev*. 64:1-64.
- Nielsen, S., Z. Guo, C.M. Johnson, D.D. Hensrud, and M.D. Jensen. 2004. Splanchnic lipolysis in human obesity. *J Clin Invest*. 113:1582-1588.
- Nielsen, T.S., N. Jessen, J.O. Jorgensen, N. Moller, and S. Lund. 2014. Dissecting adipose tissue lipolysis: molecular regulation and implications for metabolic disease. *J Mol Endocrinol*. 52:R199-222.
- Nieto-Vazquez, I., S. Fernandez-Veledo, C. de Alvaro, and M. Lorenzo. 2008. Dual role of interleukin-6 in regulating insulin sensitivity in murine skeletal muscle. *Diabetes*. 57:3211-3221.
- Nishimura, S., I. Manabe, M. Nagasaki, K. Eto, H. Yamashita, M. Ohsugi, M. Otsu, K. Hara, K. Ueki, S. Sugiura, K. Yoshimura, T. Kadowaki, and R. Nagai. 2009. CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med*. 15:914-920.
- Nishimura, S., I. Manabe, M. Nagasaki, Y. Hosoya, H. Yamashita, H. Fujita, M. Ohsugi, K. Tobe, T. Kadowaki, R. Nagai, and S. Sugiura. 2007. Adipogenesis in obesity requires close interplay between differentiating adipocytes, stromal cells, and blood vessels. *Diabetes*. 56:1517-1526.
- Nisoli, E., C. Tonello, L. Briscini, and M.O. Carruba. 1997. Inducible nitric oxide synthase in rat brown adipocytes: implications for blood flow to brown adipose tissue. *Endocrinology*. 138:676-682.
- Norris, A.W., L. Chen, S.J. Fisher, I. Szanto, M. Ristow, A.C. Jozsi, M.F. Hirshman, E.D. Rosen, L.J. Goodyear, F.J. Gonzalez, B.M. Spiegelman, and C.R. Kahn. 2003. Muscle-specific PPARgamma-deficient mice develop increased adiposity and insulin resistance but respond to thiazolidinediones. *J Clin Invest*. 112:608-618.
- Nosjean, O., and J.A. Boutin. 2002. Natural ligands of PPARgamma: are prostaglandin J(2) derivatives really playing the part? *Cell Signal*. 14:573-583.
- Nubel, T., and D. Ricquier. 2006. Respiration under control of uncoupling proteins: Clinical perspective. *Horm Res*. 65:300-310.

## O

- O'Shea, M., M.J. Hansen, K. Tatemoto, and M.J. Morris. 2003. Inhibitory effect of apelin-12 on nocturnal food intake in the rat. *Nutr Neurosci*. 6:163-167.
- Odegaard, J.I., R.R. Ricardo-Gonzalez, M.H. Goforth, C.R. Morel, V. Subramanian, L. Mukundan, A. Red Eagle, D. Vats, F. Brombacher, A.W. Ferrante, and A. Chawla. 2007. Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature*. 447:1116-1120.
- Ogata, M., M. Tsujita, M.A. Hossain, N. Akita, F.J. Gonzalez, B. Staels, S. Suzuki, T. Fukutomi, G. Kimura, and S. Yokoyama. 2009. On the mechanism for PPAR agonists to enhance ABCA1 gene expression. *Atherosclerosis*. 205:413-419.
- Ohno, H., K. Shinoda, K. Ohyama, L.Z. Sharp, and S. Kajimura. 2013. EHMT1 controls brown adipose cell fate and thermogenesis through the PRDM16 complex. *Nature*. 504:163-167.

- Ohno, H., K. Shinoda, B.M. Spiegelman, and S. Kajimura. 2012. PPAR $\gamma$  agonists induce a white-to-brown fat conversion through stabilization of PRDM16 protein. *Cell Metab.* 15:395-404.
- Ohtani, K., H. Shimizu, Y. Tanaka, N. Sato, and M. Mori. 1996. Pioglitazone hydrochloride stimulates insulin secretion in HIT-T 15 cells by inducing Ca<sup>2+</sup> influx. *J Endocrinol.* 150:107-111.
- Oishi, Y., I. Manabe, K. Tobe, K. Tsushima, T. Shindo, K. Fujiu, G. Nishimura, K. Maemura, T. Yamauchi, N. Kubota, R. Suzuki, T. Kitamura, S. Akira, T. Kadowaki, and R. Nagai. 2005. Kruppel-like transcription factor KLF5 is a key regulator of adipocyte differentiation. *Cell Metab.* 1:27-39.
- Okada-Iwabuchi, M., T. Yamauchi, M. Iwabuchi, T. Honma, K. Hamagami, K. Matsuda, M. Yamaguchi, H. Tanabe, T. Kimura-Someya, M. Shirouzu, H. Ogata, K. Tokuyama, K. Ueki, T. Nagano, A. Tanaka, S. Yokoyama, and T. Kadowaki. 2013. A small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity. *Nature.* 503:493-499.
- Olefsky, J.M., and C.K. Glass. 2010. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol.* 72:219-246.
- Olichon-Berthe, C., E. Van Obberghen, and Y. Le Marchand-Brustel. 1992. Effect of cold acclimation on the expression of glucose transporter Glut 4. *Mol Cell Endocrinol.* 89:11-18.
- Oliver, W.R., Jr., J.L. Shenk, M.R. Snaith, C.S. Russell, K.D. Plunket, N.L. Bodkin, M.C. Lewis, D.A. Winegar, M.L. Sznaidman, M.H. Lambert, H.E. Xu, D.D. Sternbach, S.A. Kliewer, B.C. Hansen, and T.M. Willson. 2001. A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:5306-5311.
- Olsen, J.M., M. Sato, O.S. Dallner, A.L. Sandstrom, D.F. Pisani, J.C. Chambard, E.Z. Amri, D.S. Hutchinson, and T. Bengtsson. 2014. Glucose uptake in brown fat cells is dependent on mTOR complex 2-promoted GLUT1 translocation. *J Cell Biol.* 207:365-374.
- Orava, J., P. Nuutila, M.E. Lidell, V. Oikonen, T. Noponen, T. Viljanen, M. Scheinin, M. Taittonen, T. Niemi, S. Enerback, and K.A. Virtanen. 2011. Different metabolic responses of human brown adipose tissue to activation by cold and insulin. *Cell Metab.* 14:272-279.
- Osborn, O., and J.M. Olefsky. 2012. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nat Med.* 18:363-374.
- Ostman, J., P. Arner, P. Engfeldt, and L. Kager. 1979. Regional differences in the control of lipolysis in human adipose tissue. *Metabolism.* 28:1198-1205.
- Ouchi, N., J.L. Parker, J.J. Lugus, and K. Walsh. 2011. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol.* 11:85-97.
- Ouellet, V., S.M. Labbe, D.P. Blondin, S. Phoenix, B. Guerin, F. Haman, E.E. Turcotte, D. Richard, and A.C. Carpentier. 2012. Brown adipose tissue oxidative metabolism contributes to energy expenditure during acute cold exposure in humans. *J Clin Invest.* 122:545-552.
- Ouellet, V., A. Routhier-Labadie, W. Bellemare, L. Lakhali-Chaieb, E. Turcotte, A.C. Carpentier, and D. Richard. 2011. Outdoor temperature, age, sex, body mass index, and diabetic status determine the prevalence, mass, and glucose-uptake activity of 18F-FDG-detected BAT in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 96:192-199.
- Ozguven, S., T. Ones, Y. Yilmaz, H.T. Turoglu, and N. Imeryuz. 2015. The role of active brown adipose tissue in human metabolism. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.*

## P

- Paillard, F., D. Catheline, F.L. Duff, M. Bouriel, Y. Deugnier, M. Pouchard, J.C. Daubert, and P. Legrand. 2008. Plasma palmitoleic acid, a product of stearoyl-coA desaturase activity, is an independent marker of triglyceridemia and abdominal adiposity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 18:436-440.
- Palmer, C.S., L.D. Osellame, D. Stojanovski, and M.T. Ryan. 2011. The regulation of mitochondrial morphology: intricate mechanisms and dynamic machinery. *Cell Signal.* 23:1534-1545.
- Pan, D., M. Fujimoto, A. Lopes, and Y.X. Wang. 2009. Twist-1 is a PPARdelta-inducible, negative-feedback regulator of PGC-1alpha in brown fat metabolism. *Cell.* 137:73-86.
- Pang, B., L.H. Zhao, Q. Zhou, T.Y. Zhao, H. Wang, C.J. Gu, and X.L. Tong. 2015. Application of berberine on treating type 2 diabetes mellitus. *Int J Endocrinol.* 2015:905749.
- Park, A., W.K. Kim, and K.H. Bae. 2014. Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells.* 6:33-42.
- Park, J.H., H.J. Kang, S.I. Kang, J.E. Lee, J. Hur, K. Ge, E. Mueller, H. Li, B.C. Lee, and S.B. Lee. 2013. A multifunctional protein, EWS, is essential for early brown fat lineage determination. *Dev Cell.* 26:393-404.
- Park, J.Y., J.S. Lim, E.Y. Park, A.R. Cho, B.I. Kim, G.J. Cheon, C.W. Choi, and S.M. Lim. 2010. The Prevalence and Characteristics of Brown Adipose Tissue in an (18)F-FDG PET Study of Koreans. *Nucl Med Mol Imaging.* 44:207-212.
- Pascual, G., and C.K. Glass. 2006. Nuclear receptors versus inflammation: mechanisms of transrepression. *Trends Endocrinol Metab.* 17:321-327.
- Patel, M.S., and L.G. Korotchkina. 2006. Regulation of the pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem Soc Trans.* 34:217-222.
- Patel, M.S., and T.E. Roche. 1990. Molecular biology and biochemistry of pyruvate dehydrogenase complexes. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 4:3224-3233.
- Pecqueur, C., T. Bui, C. Gelly, J. Hauchard, C. Barbot, F. Bouillaud, D. Ricquier, B. Miroux, and C.B. Thompson. 2008. Uncoupling protein-2 controls proliferation by promoting fatty acid oxidation and limiting glycolysis-derived pyruvate utilization. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 22:9-18.
- Pecqueur, C., E. Couplan, F. Bouillaud, and D. Ricquier. 2001. Genetic and physiological analysis of the role of uncoupling proteins in human energy homeostasis. *J Mol Med (Berl).* 79:48-56.
- Peirce, V., S. Carobbio, and A. Vidal-Puig. 2014. The different shades of fat. *Nature.* 510:76-83.
- Pekkala, S., P.K. Wiklund, J.J. Hulmi, J.P. Ahtiainen, M. Horttanainen, E. Pollanen, K.A. Makela, H. Kainulainen, K. Hakkinen, K. Nyman, M. Alen, K.H. Herzig, and S. Cheng. 2013. Are skeletal muscle FNDC5 gene expression and irisin release regulated by exercise and related to health? *The Journal of physiology.* 591:5393-5400.
- Perez-Leighton, C.E., K. Boland, J.A. Teske, C. Billington, and C.M. Kotz. 2012. Behavioral responses to orexin, orexin receptor gene expression, and spontaneous physical activity contribute to individual sensitivity to obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 303:E865-874.

- Perissi, V., A. Aggarwal, C.K. Glass, D.W. Rose, and M.G. Rosenfeld. 2004. A corepressor/coactivator exchange complex required for transcriptional activation by nuclear receptors and other regulated transcription factors. *Cell*. 116:511-526.
- Perissi, V., and M.G. Rosenfeld. 2005. Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6:542-554.
- Perkins, A.C., D.S. Mshelia, M.E. Symonds, and M. Sathekge. 2013. Prevalence and pattern of brown adipose tissue distribution of 18F-FDG in patients undergoing PET-CT in a subtropical climatic zone. *Nucl Med Commun*. 34:168-174.
- Perrone-Filardi, P., S. Paolillo, P. Costanzo, G. Savarese, B. Trimarco, and R.O. Bonow. 2015. The role of metabolic syndrome in heart failure. *Eur Heart J*.
- Persichetti, A., R. Sciuto, S. Rea, S. Basciani, C. Lubrano, S. Mariani, S. Ulisse, I. Nofroni, C.L. Maini, and L. Gnessi. 2013. Prevalence, mass, and glucose-uptake activity of (1)(8)F-FDG-detected brown adipose tissue in humans living in a temperate zone of Italy. *PLoS One*. 8:e63391.
- Peters, J.M., Y.M. Shah, and F.J. Gonzalez. 2012. The role of peroxisome proliferator-activated receptors in carcinogenesis and chemoprevention. *Nat Rev Cancer*. 12:181-195.
- Petrovic, N., I.G. Shabalina, J.A. Timmons, B. Cannon, and J. Nedergaard. 2008. Thermogenically competent nonadrenergic recruitment in brown preadipocytes by a PPARgamma agonist. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 295:E287-296.
- Petrovic, N., T.B. Walden, I.G. Shabalina, J.A. Timmons, B. Cannon, and J. Nedergaard. 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.
- Pisani, D.F., M. Djedaini, G.E. Beranger, C. Elabd, M. Scheideler, G. Ailhaud, and E.Z. Amri. 2011. Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells into "Brite" (Brown-in-White) Adipocytes. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2:87.
- Pisani, D.F., R.A. Ghandour, G.E. Beranger, P. Le Faouder, J.C. Chambard, M. Giroud, A. Vegiopoulos, M. Djedaini, J. Bertrand-Michel, M. Tauc, S. Herzig, D. Langin, G. Ailhaud, C. Duranton, and E.Z. Amri. 2014. The omega6-fatty acid, arachidonic acid, regulates the conversion of white to brite adipocyte through a prostaglandin/calcium mediated pathway. *Mol Metab*. 3:834-847.
- Pittenger, M.F., A.M. Mackay, S.C. Beck, R.K. Jaiswal, R. Douglas, J.D. Mosca, M.A. Moorman, D.W. Simonetti, S. Craig, and D.R. Marshak. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 284:143-147.
- Poissonnet, C.M., A.R. Burdi, and S.M. Garn. 1984. The chronology of adipose tissue appearance and distribution in the human fetus. *Early Hum Dev*. 10:1-11.
- Polymeropoulos, E.T., M. Jastroch, and P.B. Frappell. 2012. Absence of adaptive nonshivering thermogenesis in a marsupial, the fat-tailed dunnart (*Sminthopsis crassicaudata*). *J Comp Physiol B*. 182:393-401.
- Porter, R.K. 2006. A new look at UCP 1. *Biochimica et biophysica acta*. 1757:446-448.
- Portet, R., M. Beauvallet, and M. Solier. 1976. Variations of rat brown adipose tissue composition during cold acclimatization. *Arch Int Physiol Biochim*. 84:89-98.
- Pourcet, B., I. Pineda-Torra, B. Derudas, B. Staels, and C. Glineur. 2010. SUMOylation of human peroxisome proliferator-activated receptor alpha inhibits its trans-activity through the recruitment of the nuclear corepressor NCoR. *J Biol Chem*. 285:5983-5992.
- Powelka, A.M., A. Seth, J.V. Virbasius, E. Kiskinis, S.M. Nicoloso, A. Guilherme, X. Tang, J. Straubhaar, A.D. Cherniack, M.G. Parker, and M.P. Czech. 2006. Suppression of oxidative metabolism and mitochondrial biogenesis by the transcriptional corepressor RIP140 in mouse adipocytes. *J Clin Invest*. 116:125-136.

- Prieur, X., H. Coste, and J.C. Rodriguez. 2003. The human apolipoprotein AV gene is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  and contains a novel farnesoid X-activated receptor response element. *J Biol Chem.* 278:25468-25480.
- Produit-Zengaffinen, N., N. Davis-Lameloise, H. Perreten, D. Becard, A. Gjinovci, P.A. Keller, C.B. Wollheim, P. Herrera, P. Muzzin, and F. Assimacopoulos-Jeannet. 2007. Increasing uncoupling protein-2 in pancreatic beta cells does not alter glucose-induced insulin secretion but decreases production of reactive oxygen species. *Diabetologia.* 50:84-93.
- Prunet-Marcassus, B., B. Cousin, D. Caton, M. Andre, L. Penicaud, and L. Casteilla. 2006. From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: site-specific differences. *Exp Cell Res.* 312:727-736.
- Puigserver, P., Z. Wu, C.W. Park, R. Graves, M. Wright, and B.M. Spiegelman. 1998. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell.* 92:829-839.

## Q

- Qian, S.W., Y. Tang, X. Li, Y. Liu, Y.Y. Zhang, H.Y. Huang, R.D. Xue, H.Y. Yu, L. Guo, H.D. Gao, Y. Liu, X. Sun, Y.M. Li, W.P. Jia, and Q.Q. Tang. 2013. BMP4-mediated brown fat-like changes in white adipose tissue alter glucose and energy homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110:E798-807.
- Qiang, L., L. Wang, N. Kon, W. Zhao, S. Lee, Y. Zhang, M. Rosenbaum, Y. Zhao, W. Gu, S.R. Farmer, and D. Accili. 2012. Brown remodeling of white adipose tissue by SirT1-dependent deacetylation of Ppargamma. *Cell.* 150:620-632.
- Qin, X., X. Xie, Y. Fan, J. Tian, Y. Guan, X. Wang, Y. Zhu, and N. Wang. 2008. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\delta$  induces insulin-induced gene-1 and suppresses hepatic lipogenesis in obese diabetic mice. *Hepatology.* 48:432-441.
- Qiu, Y., K.D. Nguyen, J.I. Odegaard, X. Cui, X. Tian, R.M. Locksley, R.D. Palmiter, and A. Chawla. 2014. Eosinophils and type 2 cytokine signaling in macrophages orchestrate development of functional beige fat. *Cell.* 157:1292-1308.

## R

- Rabe, K., M. Lehrke, K.G. Parhofer, and U.C. Broedl. 2008. Adipokines and insulin resistance. *Mol Med.* 14:741-751.
- Rabelo, R., C. Reyes, A. Schifman, and J.E. Silva. 1996. A complex retinoic acid response element in the uncoupling protein gene defines a novel role for retinoids in thermogenesis. *Endocrinology.* 137:3488-3496.
- Rachid, T.L., A. Penna-de-Carvalho, I. Bringhenti, M.B. Aguila, C.A. Mandarim-de-Lacerda, and V. Souza-Mello. 2015. PPAR- $\alpha$  agonist elicits metabolically active brown adipocytes and weight loss in diet-induced obese mice. *Cell Biochem Funct.* 33:249-256.
- Rajakumari, S., J. Wu, J. Ishibashi, H.W. Lim, A.H. Giang, K.J. Won, R.R. Reed, and P. Seale. 2013. EBF2 determines and maintains brown adipocyte identity. *Cell Metab.* 17:562-574.

- Rakhshandehroo, M., G. Hooiveld, M. Muller, and S. Kersten. 2009. Comparative analysis of gene regulation by the transcription factor PPARalpha between mouse and human. *PLoS One*. 4:e6796.
- Rancoule, C., M. Viaud, S. Gres, N. Viguerie, P. Decaunes, A. Bouloumie, D. Langin, J.L. Bascands, P. Valet, and J.S. Saulnier-Blache. 2014. Pro-fibrotic activity of lysophosphatidic acid in adipose tissue: in vivo and in vitro evidence. *Biochimica et biophysica acta*. 1841:88-96.
- Randle, P.J. 1995. Metabolic fuel selection: general integration at the whole-body level. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 54:317-327.
- Randle, P.J. 1998. Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. *Diabetes/metabolism reviews*. 14:263-283.
- Rao, R.R., J.Z. Long, J.P. White, K.J. Svensson, J. Lou, I. Lokurkar, M.P. Jedrychowski, J.L. Ruas, C.D. Wrann, J.C. Lo, D.M. Camera, J. Lachey, S. Gygi, J. Seehra, J.A. Hawley, and B.M. Spiegelman. 2014. Meteorin-like is a hormone that regulates immune-adipose interactions to increase beige fat thermogenesis. *Cell*. 157:1279-1291.
- Raschke, S., M. Elsen, H. Gassenhuber, M. Sommerfeld, U. Schwahn, B. Brockmann, R. Jung, U. Wisloff, A.E. Tjonna, T. Raastad, J. Hallen, F. Norheim, C.A. Drevon, T. Romacho, K. Eckardt, and J. Eckel. 2013. Evidence against a beneficial effect of irisin in humans. *PLoS One*. 8:e73680.
- Rauch, J.C., and J.S. Hayward. 1969. Topography and vascularization of brown fat in a hibernator (little brown bat, *Myotis lucifugus*). *Can J Zool*. 47:1315-1323.
- Ravnskjaer, K., F. Frigerio, M. Boergesen, T. Nielsen, P. Maechler, and S. Mandrup. 2010. PPARdelta is a fatty acid sensor that enhances mitochondrial oxidation in insulin-secreting cells and protects against fatty acid-induced dysfunction. *J Lipid Res*. 51:1370-1379.
- Renaud, J.P., and D. Moras. 2000. Structural studies on nuclear receptors. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 57:1748-1769.
- Rheume, C., M.E. Leblanc, and P. Poirier. 2011. Adiposity assessment: explaining the association between obesity, hypertension and stroke. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 9:1557-1564.
- Ribeiro, M.O., S.D. Bianco, M. Kaneshige, J.J. Schultz, S.Y. Cheng, A.C. Bianco, and G.A. Brent. 2010. Expression of uncoupling protein 1 in mouse brown adipose tissue is thyroid hormone receptor-beta isoform specific and required for adaptive thermogenesis. *Endocrinology*. 151:432-440.
- Ribeiro, M.O., S.D. Carvalho, J.J. Schultz, G. Chiellini, T.S. Scanlan, A.C. Bianco, and G.A. Brent. 2001. Thyroid hormone--sympathetic interaction and adaptive thermogenesis are thyroid hormone receptor isoform--specific. *J Clin Invest*. 108:97-105.
- Ribet, C., E. Montastier, C. Valle, V. Bezaire, A. Mazzucotelli, A. Mairal, N. Viguerie, and D. Langin. 2010. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha control of lipid and glucose metabolism in human white adipocytes. *Endocrinology*. 151:123-133.
- Richard Dobbs, C.S., Fraser Thompson, James Manyika, Jonathan Woetzel, Peter Child, Sorcha McKenna, Angela Spatharou. 2014. Overcoming obesity: An initial economic analysis. *McKinsey Global Institute*.
- Ricote, M., A.C. Li, T.M. Willson, C.J. Kelly, and C.K. Glass. 1998. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*. 391:79-82.
- Ricquier, D., and F. Bouillaud. 2000. The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *The Biochemical journal*. 345 Pt 2:161-179.
- Ricquier, D., F. Bouillaud, P. Toumelin, G. Mory, R. Bazin, J. Arch, and L. Penicaud. 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.
- Ricquier, D., and J.C. Kader. 1976. Mitochondrial protein alteration in active brown fat: a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study. *Biochem Biophys Res Commun.* 73:577-583.
- Ricquier, D., M. Nechad, and G. Mory. 1982. Ultrastructural and biochemical characterization of human brown adipose tissue in pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 54:803-807.
- Riserus, U., D. Sprecher, T. Johnson, E. Olson, S. Hirschberg, A. Liu, Z. Fang, P. Hegde, D. Richards, L. Sarov-Blat, J.C. Strum, S. Basu, J. Cheeseman, B.A. Fielding, S.M. Humphreys, T. Danoff, N.R. Moore, P. Murgatroyd, S. O'Rahilly, P. Sutton, T. Willson, D. Hassall, K.N. Frayn, and F. Karpe. 2008. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) $\delta$  promotes reversal of multiple metabolic abnormalities, reduces oxidative stress, and increases fatty acid oxidation in moderately obese men. *Diabetes.* 57:332-339.
- Robidoux, J., W. Cao, H. Quan, K.W. Daniel, F. Moukdar, X. Bai, L.M. Floering, and S. Collins. 2005. Selective activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 and p38 $\alpha$  MAP kinase is essential for cyclic AMP-dependent UCP1 expression in adipocytes. *Mol Cell Biol.* 25:5466-5479.
- Robyr, D., A.P. Wolffe, and W. Wahli. 2000. Nuclear hormone receptor coregulators in action: diversity for shared tasks. *Mol Endocrinol.* 14:329-347.
- Roche, T.E., Y. Hiromasa, A. Turkan, X. Gong, T. Peng, X. Yan, S.A. Kasten, H. Bao, and J. Dong. 2003. Essential roles of lipoyl domains in the activated function and control of pyruvate dehydrogenase kinases and phosphatase isoform 1. *European journal of biochemistry / FEBS.* 270:1050-1056.
- Rochette-Egly, C. 2003. Nuclear receptors: integration of multiple signalling pathways through phosphorylation. *Cell Signal.* 15:355-366.
- Rodeheffer, M.S., K. Birsoy, and J.M. Friedman. 2008. Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo. *Cell.* 135:240-249.
- Rodriguez, A.M., C. Elabd, E.Z. Amri, G. Ailhaud, and C. Dani. 2005. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie.* 87:125-128.
- Rodriguez, A.M., C. Elabd, F. Delteil, J. Astier, C. Vernochet, P. Saint-Marc, J. Guesnet, A. Guezennec, E.Z. Amri, C. Dani, and G. Ailhaud. 2004. Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 315:255-263.
- Roeder, R.G. 2005. Transcriptional regulation and the role of diverse coactivators in animal cells. *FEBS letters.* 579:909-915.
- Rosell, S., and E. Belfrage. 1979. Blood circulation in adipose tissue. *Physiol Rev.* 59:1078-1104.
- Rosen, E.D., C.H. Hsu, X. Wang, S. Sakai, M.W. Freeman, F.J. Gonzalez, and B.M. Spiegelman. 2002. C/EBP $\alpha$  induces adipogenesis through PPAR $\gamma$ : a unified pathway. *Genes Dev.* 16:22-26.
- Rosen, E.D., R.N. Kulkarni, P. Sarraf, U. Ozcan, T. Okada, C.H. Hsu, D. Eisenman, M.A. Magnuson, F.J. Gonzalez, C.R. Kahn, and B.M. Spiegelman. 2003. Targeted elimination of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in beta cells leads to abnormalities in islet mass without compromising glucose homeostasis. *Mol Cell Biol.* 23:7222-7229.
- Rosen, E.D., and O.A. MacDougald. 2006. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7:885-896.

- Rosen, E.D., and B.M. Spiegelman. 2006. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature*. 444:847-853.
- Rosen, E.D., C.J. Walkey, P. Puigserver, and B.M. Spiegelman. 2000. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev*. 14:1293-1307.
- Rosenwald, M., A. Perdikari, T. Rulicke, and C. Wolfrum. 2013. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat Cell Biol*. 15:659-667.
- Rosenwald, M., and C. Wolfrum. 2014. The origin and definition of brite versus white and classical brown adipocytes. *Adipocyte*. 3:4-9.
- Ross, S.E., N. Hemati, K.A. Longo, C.N. Bennett, P.C. Lucas, R.L. Erickson, and O.A. MacDougald. 2000. Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science*. 289:950-953.
- Rothwell, N.J., and M.J. Stock. 1979. A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Nature*. 281:31-35.
- Rousset, S., M.C. Alves-Guerra, J. Mozo, B. Miroux, A.M. Cassard-Doulicier, F. Bouillaud, and D. Ricquier. 2004. The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes*. 53 Suppl 1:S130-135.
- Roux, C., D.F. Pisani, H.B. Yahia, M. Djedaini, G.E. Beranger, J.C. Chambard, D. Ambrosetti, J.F. Michiels, V. Breuil, G. Ailhaud, L. Euller-Ziegler, and E.Z. Amri. 2013. Chondrogenic potential of stem cells derived from adipose tissue: a powerful pharmacological tool. *Biochem Biophys Res Commun*. 440:786-791.
- Ruby, M.A., B. Goldenson, G. Orasanu, T.P. Johnston, J. Plutzky, and R.M. Krauss. 2010. VLDL hydrolysis by LPL activates PPAR-alpha through generation of unbound fatty acids. *J Lipid Res*. 51:2275-2281.
- Russell, A.P., J. Feilchenfeldt, S. Schreiber, M. Praz, A. Crettenand, C. Gobelet, C.A. Meier, D.R. Bell, A. Kralli, J.P. Giacobino, and O. Deriaz. 2003. Endurance training in humans leads to fiber type-specific increases in levels of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in skeletal muscle. *Diabetes*. 52:2874-2881.
- Ryden, M., M. Uzunel, J.L. Hard, E. Borgstrom, J.E. Mold, E. Arner, N. Mejhert, D.P. Andersson, Y. Widlund, M. Hassan, C.V. Jones, K.L. Spalding, B.M. Svahn, A. Ahmadian, J. Frisen, S. Bernard, J. Mattsson, and P. Arner. 2015. Transplanted Bone Marrow-Derived Cells Contribute to Human Adipogenesis. *Cell Metab*. 22:408-417.
- Ryu, V., J.T. Garretson, Y. Liu, C.H. Vaughan, and T.J. Bartness. 2015. Brown adipose tissue has sympathetic-sensory feedback circuits. *J Neurosci*. 35:2181-2190.

## S

- Sabatokos, G., N.A. Sims, J. Chen, K. Aoki, M.B. Kelz, M. Amling, Y. Bouali, K. Mukhopadhyay, K. Ford, E.J. Nestler, and R. Baron. 2000. Overexpression of DeltaFosB transcription factor(s) increases bone formation and inhibits adipogenesis. *Nat Med*. 6:985-990.
- Sacks, H., and M.E. Symonds. 2013. Anatomical locations of human brown adipose tissue: functional relevance and implications in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes*. 62:1783-1790.
- Sadie-Van Gijzen, H., N.J. Crowther, F.S. Hough, and W.F. Ferris. 2010. Depot-specific differences in the insulin response of adipose-derived stromal cells. *Mol Cell Endocrinol*. 328:22-27.
- Saito, M., Y. Okamatsu-Ogura, M. Matsushita, K. Watanabe, T. Yoneshiro, J. Nio-Kobayashi, T. Iwanaga, M. Miyagawa, T. Kameya, K. Nakada, Y. Kawai, and M. Tsujisaki. 2009.

- High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes*. 58:1526-1531.
- Saito, M., and T. Yoneshiro. 2013. Capsinoids and related food ingredients activating brown fat thermogenesis and reducing body fat in humans. *Curr Opin Lipidol*. 24:71-77.
- Salma, N., H. Xiao, E. Mueller, and A.N. Imbalzano. 2004. Temporal recruitment of transcription factors and SWI/SNF chromatin-remodeling enzymes during adipogenic induction of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma nuclear hormone receptor. *Mol Cell Biol*. 24:4651-4663.
- Sanchez-Alavez, M., I.V. Tabarean, O. Osborn, K. Mitsukawa, J. Schaefer, J. Dubins, K.H. Holmberg, I. Klein, J. Klaus, L.F. Gomez, H. Kolb, J. Secret, J. Jochems, K. Myashiro, P. Buckley, J.R. Hadcock, J. Eberwine, B. Conti, and T. Bartfai. 2010. Insulin causes hyperthermia by direct inhibition of warm-sensitive neurons. *Diabetes*. 59:43-50.
- Sanchez-Gurmaches, J., and D.A. Guertin. 2014. Adipocytes arise from multiple lineages that are heterogeneously and dynamically distributed. *Nat Commun*. 5:4099.
- Sanchez-Gurmaches, J., C.M. Hung, C.A. Sparks, Y. Tang, H. Li, and D.A. Guertin. 2012. 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.
- Sanchis-Gomar, F., R. Alis, H. Pareja-Galeano, E. Sola, V.M. Victor, M. Rocha, A. Hernandez-Mijares, and M. Romagnoli. 2014. Circulating irisin levels are not correlated with BMI, age, and other biological parameters in obese and diabetic patients. *Endocrine*. 46:674-677.
- Sandholt, C.H., T. Sparso, N. Grarup, A. Albrechtsen, K. Almind, L. Hansen, U. Toft, T. Jorgensen, T. Hansen, and O. Pedersen. 2010. Combined analyses of 20 common obesity susceptibility variants. *Diabetes*. 59:1667-1673.
- Sartipy, P., and D.J. Loskutoff. 2003. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:7265-7270.
- Sasahara, M., M. Nishi, H. Kawashima, K. Ueda, S. Sakagashira, H. Furuta, E. Matsumoto, T. Hanabusa, H. Sasaki, and K. Nanjo. 2004. Uncoupling protein 2 promoter polymorphism -866G/A affects its expression in beta-cells and modulates clinical profiles of Japanese type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 53:482-485.
- Satoh, M., Y. Andoh, C.S. Clingan, H. Ogura, S. Fujii, K. Eshima, T. Nakayama, M. Taniguchi, N. Hirata, N. Ishimori, H. Tsutsui, K. Onoe, and K. Iwabuchi. 2012. Type II NKT cells stimulate diet-induced obesity by mediating adipose tissue inflammation, steatohepatitis and insulin resistance. *PLoS One*. 7:e30568.
- Schepers, R.J., and M. Ringkamp. 2010. Thermoreceptors and thermosensitive afferents. *Neurosci Biobehav Rev*. 34:177-184.
- Schipper, H.S., M. Rakhshandehroo, S.F. van de Graaf, K. Venken, A. Koppen, R. Stienstra, S. Prop, J. Meerding, N. Hamers, G. Besra, L. Boon, E.E. Nieuwenhuis, D. Elewaut, B. Prakken, S. Kersten, M. Boes, and E. Kalkhoven. 2012. Natural killer T cells in adipose tissue prevent insulin resistance. *J Clin Invest*. 122:3343-3354.
- Schoiswohl, G., M. Stefanovic-Racic, M.N. Menke, R.C. Wills, B.A. Surlow, M.K. Basantani, M.T. Sitnick, L. Cai, C.F. Yazbeck, D.B. Stolz, T. Pulinilkunnil, R.M. O'Doherty, and E.E. Kershaw. 2015. Impact of reduced ATGL-mediated adipocyte lipolysis on obesity-associated insulin resistance and inflammation in male mice. *Endocrinology*:en20151322.
- Schrauwen, P., and M. Hesselink. 2002. UCP2 and UCP3 in muscle controlling body metabolism. *J Exp Biol*. 205:2275-2285.
- Schrauwen, P., V. Hinderling, M.K. Hesselink, G. Schaart, E. Kornips, W.H. Saris, M. Westerterp-Plantenga, and W. Langhans. 2002. Etomoxir-induced increase in UCP3 supports a role of uncoupling protein 3 as a mitochondrial fatty acid anion exporter.

- FASEB journal* : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 16:1688-1690.
- Schuler, M., F. Ali, C. Chambon, D. Duteil, J.M. Bornert, A. Tardivel, B. Desvergne, W. Wahli, P. Chambon, and D. Metzger. 2006. PGC1alpha expression is controlled in skeletal muscles by PPARbeta, whose ablation results in fiber-type switching, obesity, and type 2 diabetes. *Cell Metab.* 4:407-414.
- Scime, A., G. Grenier, M.S. Huh, M.A. Gillespie, L. Bevilacqua, M.E. Harper, and M.A. Rudnicki. 2005. Rb and p107 regulate preadipocyte differentiation into white versus brown fat through repression of PGC-1alpha. *Cell Metab.* 2:283-295.
- Seale, P. 2015. Transcriptional Regulatory Circuits Controlling Brown Fat Development and Activation. *Diabetes.* 64:2369-2375.
- Seale, P., B. Bjork, W. Yang, S. Kajimura, S. Chin, S. Kuang, A. Scime, S. Devarakonda, H.M. Conroe, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, M.A. Rudnicki, D.R. Beier, and B.M. Spiegelman. 2008. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature.* 454:961-967.
- Seale, P., H.M. Conroe, J. Estall, S. Kajimura, A. Frontini, J. Ishibashi, P. Cohen, S. Cinti, and B.M. Spiegelman. 2011. Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *J Clin Invest.* 121:96-105.
- Seale, P., S. Kajimura, W. Yang, S. Chin, L.M. Rohas, M. Uldry, G. Tavernier, D. Langin, and B.M. Spiegelman. 2007. Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell Metab.* 6:38-54.
- Seale, P., L.A. Sabourin, A. Girgis-Gabardo, A. Mansouri, P. Gruss, and M.A. Rudnicki. 2000. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell.* 102:777-786.
- Seimandi, M., G. Lemaire, A. Pillon, A. Perrin, I. Carlvann, J.J. Voegel, F. Vignon, J.C. Nicolas, and P. Balaguer. 2005. Differential responses of PPARalpha, PPARdelta, and PPARgamma reporter cell lines to selective PPAR synthetic ligands. *Anal Biochem.* 344:8-15.
- Sekiya, M., N. Yahagi, T. Matsuzaka, Y. Takeuchi, Y. Nakagawa, H. Takahashi, H. Okazaki, Y. Iizuka, K. Ohashi, T. Gotoda, S. Ishibashi, R. Nagai, T. Yamazaki, T. Kadowaki, N. Yamada, J. Osuga, and H. Shimano. 2007. SREBP-1-independent regulation of lipogenic gene expression in adipocytes. *J Lipid Res.* 48:1581-1591.
- Sengenès, C., K. Lolmede, A. Zakaroff-Girard, R. Busse, and A. Bouloumie. 2005a. Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display distinct features from the adult mesenchymal and hematopoietic stem cells. *J Cell Physiol.* 205:114-122.
- Sengenès, C., C. Moro, J. Galitzky, M. Berlan, and M. Lafontan. 2005b. [Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human fat cells]. *Med Sci (Paris).* 21 Spec No:29-33.
- Sera, Y., A.C. LaRue, O. Moussa, M. Mehrotra, J.D. Duncan, C.R. Williams, E. Nishimoto, B.A. Schulte, P.M. Watson, D.K. Watson, and M. Ogawa. 2009. Hematopoietic stem cell origin of adipocytes. *Exp Hematol.* 37:1108-1120, 1120 e1101-1104.
- Shabalina, I.G., A. Jacobsson, B. Cannon, and J. Nedergaard. 2004. Native UCP1 displays simple competitive kinetics between the regulators purine nucleotides and fatty acids. *J Biol Chem.* 279:38236-38248.
- Shabalina, I.G., N. Petrovic, J.M. de Jong, A.V. Kalinovich, B. Cannon, and J. Nedergaard. 2013. UCP1 in brite/beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic. *Cell Rep.* 5:1196-1203.
- Shan, T., X. Liang, P. Bi, P. Zhang, W. Liu, and S. Kuang. 2013. Distinct populations of adipogenic and myogenic Myf5-lineage progenitors in white adipose tissues. *J Lipid Res.* 54:2214-2224.

- Sharp, L.Z., K. Shinoda, H. Ohno, D.W. Scheel, E. Tomoda, L. Ruiz, H. Hu, L. Wang, Z. Pavlova, V. Gilsanz, and S. Kajimura. 2012. Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells. *PLoS One*. 7:e49452.
- Shekelle, P.G., M.L. Hardy, S.C. Morton, M. Maglione, W.A. Mojica, M.J. Suttorp, S.L. Rhodes, L. Jungvig, and J. Gagne. 2003. Efficacy and safety of ephedra and ephedrine for weight loss and athletic performance: a meta-analysis. *JAMA*. 289:1537-1545.
- Shen, W., and J. Chen. 2008. Application of imaging and other noninvasive techniques in determining adipose tissue mass. *Methods Mol Biol*. 456:39-54.
- Sher, T., H.F. Yi, O.W. McBride, and F.J. Gonzalez. 1993. cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. *Biochemistry*. 32:5598-5604.
- Shetty, S.R., S. Kumar, R.P. Mathur, K.H. Sharma, and A.D. Jaiswal. 2015. Observational study to evaluate the safety and efficacy of saroglitazar in Indian diabetic dyslipidemia patients. *Indian Heart J*. 67:23-26.
- Shi, H., C.K. Song, A. Giordano, S. Cinti, and T.J. Bartness. 2005. Sensory or sympathetic white adipose tissue denervation differentially affects depot growth and cellularity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 288:R1028-1037.
- Shi, M.A., and G.P. Shi. 2012. Different roles of mast cells in obesity and diabetes: lessons from experimental animals and humans. *Front Immunol*. 3:7.
- Shi, Y., and D. Cheng. 2009. Beyond triglyceride synthesis: the dynamic functional roles of MGAT and DGAT enzymes in energy metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 297:E10-18.
- Shibata, H., F. Perusse, and L.J. Bukowiecki. 1987. The role of insulin in nonshivering thermogenesis. *Can J Physiol Pharmacol*. 65:152-158.
- Shimba, S., N. Ishii, Y. Ohta, T. Ohno, Y. Watabe, M. Hayashi, T. Wada, T. Aoyagi, and M. Tezuka. 2005. Brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1), a component of the molecular clock, regulates adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:12071-12076.
- Shimizu, I., T. Aprahamian, R. Kikuchi, A. Shimizu, K.N. Papanicolaou, S. MacLauchlan, S. Maruyama, and K. Walsh. 2014. Vascular rarefaction mediates whitening of brown fat in obesity. *J Clin Invest*. 124:2099-2112.
- Shimizu, Y., H. Nikami, K. Tsukazaki, U.F. Machado, H. Yano, Y. Seino, and M. Saito. 1993. Increased expression of glucose transporter GLUT-4 in brown adipose tissue of fasted rats after cold exposure. *Am J Physiol*. 264:E890-895.
- Shimomura, I., R.E. Hammer, J.A. Richardson, S. Ikemoto, Y. Bashmakov, J.L. Goldstein, and M.S. Brown. 1998. Insulin resistance and diabetes mellitus in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue: model for congenital generalized lipodystrophy. *Genes Dev*. 12:3182-3194.
- Shoji, T., M. Ii, Y. Mifune, T. Matsumoto, A. Kawamoto, S.M. Kwon, T. Kuroda, R. Kuroda, M. Kurosaka, and T. Asahara. 2010. Local transplantation of human multipotent adipose-derived stem cells accelerates fracture healing via enhanced osteogenesis and angiogenesis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 90:637-649.
- Sidossis, L., and S. Kajimura. 2015. Brown and beige fat in humans: thermogenic adipocytes that control energy and glucose homeostasis. *J Clin Invest*. 125:478-486.
- Silva, J.E. 1995. Thyroid hormone control of thermogenesis and energy balance. *Thyroid*. 5:481-492.
- Silva, J.E. 2006. Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation. *Physiol Rev*. 86:435-464.
- Silvestri, E., L. Schiavo, A. Lombardi, and F. Goglia. 2005. Thyroid hormones as molecular determinants of thermogenesis. *Acta Physiol Scand*. 184:265-283.

- Singh, M. 2014. Mood, food, and obesity. *Front Psychol.* 5:925.
- Sinha, R., and A.M. Jastreboff. 2013. Stress as a common risk factor for obesity and addiction. *Biol Psychiatry.* 73:827-835.
- Sisson, S.B., S.M. Camhi, C. Tudor-Locke, W.D. Johnson, and P.T. Katzmarzyk. 2012. Characteristics of step-defined physical activity categories in U.S. adults. *Am J Health Promot.* 26:152-159.
- Sluse, F.E., W. Jarmuszkiwicz, R. Navet, P. Douette, G. Mathy, and C.M. Sluse-Goffart. 2006. Mitochondrial UCPs: new insights into regulation and impact. *Biochimica et biophysica acta.* 1757:480-485.
- Smith, A.J., B.R. Thompson, M.A. Sanders, and D.A. Bernlohr. 2007. Interaction of the adipocyte fatty acid-binding protein with the hormone-sensitive lipase: regulation by fatty acids and phosphorylation. *J Biol Chem.* 282:32424-32432.
- Smith, R.E. 1962. Thermoregulation by brown adipose tissue in cold. *Federation proceedings.* 21:221.
- Smith, S.R., J.C. Lovejoy, F. Greenway, D. Ryan, L. deJonge, J. de la Bretonne, J. Volafava, and G.A. Bray. 2001. Contributions of total body fat, abdominal subcutaneous adipose tissue compartments, and visceral adipose tissue to the metabolic complications of obesity. *Metabolism.* 50:425-435.
- Song, C.K., G.J. Schwartz, and T.J. Bartness. 2009. Anterograde transneuronal viral tract tracing reveals central sensory circuits from white adipose tissue. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 296:R501-511.
- Soukas, A., N.D. Socci, B.D. Saatkamp, S. Novelli, and J.M. Friedman. 2001. Distinct transcriptional profiles of adipogenesis in vivo and in vitro. *J Biol Chem.* 276:34167-34174.
- Souza, S.C., M.D. Chau, Q. Yang, M.S. Gauthier, K.B. Clairmont, Z. Wu, J. Gromada, and W.P. Dole. 2011. Atrial natriuretic peptide regulates lipid mobilization and oxygen consumption in human adipocytes by activating AMPK. *Biochem Biophys Res Commun.* 410:398-403.
- Spalding, K.L., E. Arner, P.O. Westermark, S. Bernard, B.A. Buchholz, O. Bergmann, L. Blomqvist, J. Hoffstedt, E. Naslund, T. Britton, H. Concha, M. Hassan, M. Ryden, J. Frisen, and P. Arner. 2008. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature.* 453:783-787.
- Speakman, J.R., and C. Selman. 2003. Physical activity and resting metabolic rate. *The Proceedings of the Nutrition Society.* 62:621-634.
- Spencer, L.A., and P.F. Weller. 2010. Eosinophils and Th2 immunity: contemporary insights. *Immunol Cell Biol.* 88:250-256.
- Spiegelman, B.M., and R. Heinrich. 2004. Biological control through regulated transcriptional coactivators. *Cell.* 119:157-167.
- Sprecher, D.L., C. Massien, G. Pearce, A.N. Billin, I. Perlstein, T.M. Willson, D.G. Hassall, N. Ancellin, S.D. Patterson, D.C. Lobe, and T.G. Johnson. 2007. Triglyceride:high-density lipoprotein cholesterol effects in healthy subjects administered a peroxisome proliferator activated receptor delta agonist. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27:359-365.
- Staels, B., and J.C. Fruchart. 2005. Therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Diabetes.* 54:2460-2470.
- Starkov, A.A. 2006. Protein-mediated energy-dissipating pathways in mitochondria. *Chem Biol Interact.* 163:133-144.
- Stefan, N., K. Kantartzis, N. Celebi, H. Staiger, J. Machann, F. Schick, A. Cegan, M. Elcnerova, E. Schleicher, A. Fritsche, and H.U. Haring. 2010. Circulating palmitoleate strongly and independently predicts insulin sensitivity in humans. *Diabetes Care.* 33:405-407.

- Steinberg, G.R., B.J. Michell, B.J. van Denderen, M.J. Watt, A.L. Carey, B.C. Fam, S. Andrikopoulos, J. Proietto, C.Z. Gorgun, D. Carling, G.S. Hotamisligil, M.A. Febbraio, T.W. Kay, and B.E. Kemp. 2006. Tumor necrosis factor alpha-induced skeletal muscle insulin resistance involves suppression of AMP-kinase signaling. *Cell Metab.* 4:465-474.
- Stenlof, K., I. Wernstedt, T. Fjallman, V. Wallenius, K. Wallenius, and J.O. Jansson. 2003. Interleukin-6 levels in the central nervous system are negatively correlated with fat mass in overweight/obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 88:4379-4383.
- Steppan, C.M., S.T. Bailey, S. Bhat, E.J. Brown, R.R. Banerjee, C.M. Wright, H.R. Patel, R.S. Ahima, and M.A. Lazar. 2001. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature.* 409:307-312.
- Storch, J., and L. McDermott. 2009. Structural and functional analysis of fatty acid-binding proteins. *J Lipid Res.* 50 Suppl:S126-131.
- Strable, M.S., and J.M. Ntambi. 2010. Genetic control of de novo lipogenesis: role in diet-induced obesity. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 45:199-214.
- Stunkard, A.J., T.I. Sorensen, C. Hanis, T.W. Teasdale, R. Chakraborty, W.J. Schull, and F. Schulsinger. 1986. An adoption study of human obesity. *N Engl J Med.* 314:193-198.
- Su, J.L., C.J. Simmons, B. Wisely, B. Ellis, and D.A. Winegar. 1998. Monitoring of PPAR alpha protein expression in human tissue by the use of PPAR alpha-specific MAbs. *Hybridoma.* 17:47-53.
- Sugden, M.C., K. Bulmer, G.F. Gibbons, B.L. Knight, and M.J. Holness. 2002. Peroxisome-proliferator-activated receptor-alpha (PPARalpha) deficiency leads to dysregulation of hepatic lipid and carbohydrate metabolism by fatty acids and insulin. *The Biochemical journal.* 364:361-368.
- Sukonina, V., A. Lookene, T. Olivecrona, and G. Olivecrona. 2006. Angiopoietin-like protein 4 converts lipoprotein lipase to inactive monomers and modulates lipase activity in adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:17450-17455.
- Sun, K., C.M. Kusminski, K. Luby-Phelps, S.B. Spurgin, Y.A. An, Q.A. Wang, W.L. Holland, and P.E. Scherer. 2014. Brown adipose tissue derived VEGF-A modulates cold tolerance and energy expenditure. *Mol Metab.* 3:474-483.
- Sun, L., H. Xie, M.A. Mori, R. Alexander, B. Yuan, S.M. Hattangadi, Q. Liu, C.R. Kahn, and H.F. Lodish. 2011. Mir193b-365 is essential for brown fat differentiation. *Nat Cell Biol.* 13:958-965.
- Sundvold, H., and S. Lien. 2001. Identification of a novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma promoter in man and transactivation by the nuclear receptor RORalpha1. *Biochem Biophys Res Commun.* 287:383-390.
- Swallen, K.C., E.N. Reither, S.A. Haas, and A.M. Meier. 2005. Overweight, obesity, and health-related quality of life among adolescents: the National Longitudinal Study of Adolescent Health. *Pediatrics.* 115:340-347.
- Swinburn, B., and G. Egger. 2004. The runaway weight gain train: too many accelerators, not enough brakes. *BMJ.* 329:736-739.
- Swinburn, B.A., I. Caterson, J.C. Seidell, and W.P. James. 2004. Diet, nutrition and the prevention of excess weight gain and obesity. *Public Health Nutr.* 7:123-146.
- Szeles, L., D. Torocsik, and L. Nagy. 2007. PPARgamma in immunity and inflammation: cell types and diseases. *Biochimica et biophysica acta.* 1771:1014-1030.
- Sztalryd, C., and A.R. Kimmel. 2014. Perilipins: lipid droplet coat proteins adapted for tissue-specific energy storage and utilization, and lipid cytoprotection. *Biochimie.* 96:96-101.

## T

- Takahashi, K., S. Mizuarai, H. Araki, S. Mashiko, A. Ishihara, A. Kanatani, H. Itadani, and H. Kotani. 2003. Adiposity elevates plasma MCP-1 levels leading to the increased CD11b-positive monocytes in mice. *J Biol Chem.* 278:46654-46660.
- Takeuchi, K., and K. Reue. 2009. Biochemistry, physiology, and genetics of GPAT, AGPAT, and lipin enzymes in triglyceride synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 296:E1195-1209.
- Talbot, D.A., A.J. Lambert, and M.D. Brand. 2004. Production of endogenous matrix superoxide from mitochondrial complex I leads to activation of uncoupling protein 3. *FEBS letters.* 556:111-115.
- Tam, C.S., V. Lecoultre, and E. Ravussin. 2012. Brown adipose tissue: mechanisms and potential therapeutic targets. *Circulation.* 125:2782-2791.
- Tanaka, T., N. Yoshida, T. Kishimoto, and S. Akira. 1997. Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene. *The EMBO journal.* 16:7432-7443.
- Tang, Q.Q., T.C. Otto, and M.D. Lane. 2004. Commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:9607-9611.
- Tang, W., D. Zeve, J.M. Suh, D. Bosnakovski, M. Kyba, R.E. Hammer, M.D. Tallquist, and J.M. Graff. 2008. White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science.* 322:583-586.
- Taschler, U., F.P. Radner, C. Heier, R. Schreiber, M. Schweiger, G. Schoiswohl, K. Preiss-Landl, D. Jaeger, B. Reiter, H.C. Koefeler, J. Wojciechowski, C. Theussl, J.M. Penninger, A. Lass, G. Haemmerle, R. Zechner, and R. Zimmermann. 2011. Monoglyceride lipase deficiency in mice impairs lipolysis and attenuates diet-induced insulin resistance. *J Biol Chem.* 286:17467-17477.
- Tavernier, G., P. Barbe, J. Galitzky, M. Berlan, D. Caput, M. Lafontan, and D. Langin. 1996. Expression of beta3-adrenoceptors with low lipolytic action in human subcutaneous white adipocytes. *J Lipid Res.* 37:87-97.
- Temple, K.A., R.N. Cohen, S.R. Wondisford, C. Yu, D. Deplewski, and F.E. Wondisford. 2005. An intact DNA-binding domain is not required for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) binding and activation on some PPAR response elements. *J Biol Chem.* 280:3529-3540.
- Tenenbaum, A., and E.Z. Fisman. 2012. Fibrates are an essential part of modern anti-dyslipidemic arsenal: spotlight on atherogenic dyslipidemia and residual risk reduction. *Cardiovasc Diabetol.* 11:125.
- Tenenbaum, A., M. Motro, and E.Z. Fisman. 2005. Dual and pan-peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) co-agonism: the bezafibrate lessons. *Cardiovasc Diabetol.* 4:14.
- Teruel, T., R. Hernandez, M. Benito, and M. Lorenzo. 2003. Rosiglitazone and retinoic acid induce uncoupling protein-1 (UCP-1) in a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent manner in fetal primary brown adipocytes. *J Biol Chem.* 278:263-269.
- Thomas, S.A., and R.D. Palmiter. 1997. Thermoregulatory and metabolic phenotypes of mice lacking noradrenaline and adrenaline. *Nature.* 387:94-97.
- Thompson, B.R., S. Lobo, and D.A. Bernlohr. 2010. Fatty acid flux in adipocytes: the in's and out's of fat cell lipid trafficking. *Mol Cell Endocrinol.* 318:24-33.
- Thulin, P., B. Glinghammar, J. Skogsberg, K. Lundell, and E. Ehrenborg. 2008. PPARdelta increases expression of the human apolipoprotein A-II gene in human liver cells. *Int J Mol Med.* 21:819-824.
- Timmons, J.A., K. Wennmalm, O. Larsson, T.B. Walden, T. Lassmann, N. Petrovic, D.L. Hamilton, R.E. Gimeno, C. Wahlestedt, K. Baar, J. Nedergaard, and B. Cannon. 2007.



- Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:4401-4406.
- Tiraby, C., and D. Langin. 2005. [PGC-1 $\alpha$ , a transcriptional coactivator involved in metabolism]. *Med Sci (Paris)*. 21:49-54.
- Tiraby, C., G. Tavernier, F. Capel, A. Mairal, F. Crampes, J. Rami, C. Pujol, J.A. Boutin, and D. Langin. 2007. Resistance to high-fat-diet-induced obesity and sexual dimorphism in the metabolic responses of transgenic mice with moderate uncoupling protein 3 overexpression in glycolytic skeletal muscles. *Diabetologia*. 50:2190-2199.
- Tiraby, C., G. Tavernier, C. Lefort, D. Larrouy, F. Bouillaud, D. Ricquier, and D. Langin. 2003. Acquisition of brown fat cell features by human white adipocytes. *J Biol Chem*. 278:33370-33376.
- Tomas, P., J. Jimenez-Jimenez, P. Zaragoza, V. Vuligonda, R.A. Chandraratna, and E. Rial. 2004. Activation by retinoids of the uncoupling protein UCP1. *Biochimica et biophysica acta*. 1658:157-164.
- Tomiyama, K., N. Murase, D.B. Stolz, H. Toyokawa, D.R. O'Donnell, D.M. Smith, J.R. Dudas, J.P. Rubin, and K.G. Marra. 2008. Characterization of transplanted green fluorescent protein+ bone marrow cells into adipose tissue. *Stem Cells*. 26:330-338.
- Tonello, C., A. Giordano, V. Cozzi, S. Cinti, M.J. Stock, M.O. Carruba, and E. Nisoli. 1999. Role of sympathetic activity in controlling the expression of vascular endothelial growth factor in brown fat cells of lean and genetically obese rats. *FEBS letters*. 442:167-172.
- Tong, Q., G. Dalgin, H. Xu, C.N. Ting, J.M. Leiden, and G.S. Hotamisligil. 2000. Function of GATA transcription factors in preadipocyte-adipocyte transition. *Science*. 290:134-138.
- Tong, Q., J. Tsai, G. Tan, G. Dalgin, and G.S. Hotamisligil. 2005. Interaction between GATA and the C/EBP family of transcription factors is critical in GATA-mediated suppression of adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol*. 25:706-715.
- Tontonoz, P., E. Hu, and B.M. Spiegelman. 1994. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*. 79:1147-1156.
- Tontonoz, P., and B.M. Spiegelman. 2008. Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annual review of biochemistry*. 77:289-312.
- Tordjman, J., G. Chauvet, J. Quette, E.G. Beale, C. Forest, and B. Antoine. 2003. Thiazolidinediones block fatty acid release by inducing glyceroneogenesis in fat cells. *J Biol Chem*. 278:18785-18790.
- Tordjman, J., A. Divoux, E. Prifti, C. Poitou, V. Pelloux, D. Hugol, A. Basdevant, J.L. Bouillot, J.M. Chevallier, P. Bedossa, M. Guerre-Millo, and K. Clement. 2012. Structural and inflammatory heterogeneity in subcutaneous adipose tissue: relation with liver histopathology in morbid obesity. *J Hepatol*. 56:1152-1158.
- Tran, K.V., O. Gealekman, A. Frontini, M.C. Zingaretti, M. Morroni, A. Giordano, A. Smorlesi, J. Perugini, R. De Matteis, A. Sbarbati, S. Corvera, and S. Cinti. 2012. The vascular endothelium of the adipose tissue gives rise to both white and brown fat cells. *Cell Metab*. 15:222-229.
- Trayhurn, P. 2005. Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat. *Acta Physiol Scand*. 184:285-293.
- Triandafillou, J., C. Gwilliam, and J. Himms-Hagen. 1982. Role of thyroid hormone in cold-induced changes in rat brown adipose tissue mitochondria. *Can J Biochem*. 60:530-537.
- Tseng, Y.H., E. Kokkotou, T.J. Schulz, T.L. Huang, J.N. Winnay, C.M. Taniguchi, T.T. Tran, R. Suzuki, D.O. Espinoza, Y. Yamamoto, M.J. Ahrens, A.T. Dudley, A.W. Norris, R.N. Kulkarni, and C.R. Kahn. 2008. New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature*. 454:1000-1004.
- Tsuchida, A., T. Yamauchi, S. Takekawa, Y. Hada, Y. Ito, T. Maki, and T. Kadowaki. 2005. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) $\alpha$  activation increases

adiponectin receptors and reduces obesity-related inflammation in adipose tissue: comparison of activation of PPARalpha, PPARgamma, and their combination. *Diabetes*. 54:3358-3370.

## U

- Uldry, M., W. Yang, J. St-Pierre, J. Lin, P. Seale, and B.M. Spiegelman. 2006. Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. *Cell Metab*. 3:333-341.
- Uppenberg, J., C. Svensson, M. Jaki, G. Bertilsson, L. Jendeberg, and A. Berkenstam. 1998. Crystal structure of the ligand binding domain of the human nuclear receptor PPARgamma. *J Biol Chem*. 273:31108-31112.
- Uysal, K.T., S.M. Wiesbrock, M.W. Marino, and G.S. Hotamisligil. 1997. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature*. 389:610-614.

## V

- Vallerand, A.L., F. Perusse, and L.J. Bukowiecki. 1987. Cold exposure potentiates the effect of insulin on in vivo glucose uptake. *Am J Physiol*. 253:E179-186.
- Valverde, A.M., M. Arribas, C. Mur, P. Navarro, S. Pons, A.M. Cassard-Doulier, C.R. Kahn, and M. Benito. 2003. Insulin-induced up-regulated uncoupling protein-1 expression is mediated by insulin receptor substrate 1 through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in fetal brown adipocytes. *J Biol Chem*. 278:10221-10231.
- van der Lans, A.A., J. Hoeks, B. Brans, G.H. Vijgen, M.G. Visser, M.J. Vosselman, J. Hansen, J.A. Jorgensen, J. Wu, F.M. Mottaghy, P. Schrauwen, and W.D. van Marken Lichtenbelt. 2013. Cold acclimation recruits human brown fat and increases nonshivering thermogenesis. *J Clin Invest*. 123:3395-3403.
- van Marken Lichtenbelt, W.D., and H.A. Daanen. 2003. Cold-induced metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 6:469-475.
- van Marken Lichtenbelt, W.D., J.W. Vanhommerig, N.M. Smulders, J.M. Drossaerts, G.J. Kemerink, N.D. Bouvy, P. Schrauwen, and G.J. Teule. 2009. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med*. 360:1500-1508.
- van Ooijen, A.M., W.D. van Marken Lichtenbelt, A.A. van Steenhoven, and K.R. Westerterp. 2005. Cold-induced heat production preceding shivering. *Br J Nutr*. 93:387-391.
- Varga, T., Z. Czimmerer, and L. Nagy. 2011. PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation. *Biochimica et biophysica acta*. 1812:1007-1022.
- Vazquez, G., S. Duval, D.R. Jacobs, Jr., and K. Silventoinen. 2007. Comparison of body mass index, waist circumference, and waist/hip ratio in predicting incident diabetes: a meta-analysis. *Epidemiol Rev*. 29:115-128.
- Vazquez, M., N. Roglans, A. Cabrero, C. Rodriguez, T. Adzet, M. Alegret, R.M. Sanchez, and J.C. Laguna. 2001. Bezafibrate induces acyl-CoA oxidase mRNA levels and fatty acid peroxisomal beta-oxidation in rat white adipose tissue. *Mol Cell Biochem*. 216:71-78.
- Vega, R.B., J.M. Huss, and D.P. Kelly. 2000. The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear

- genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Mol Cell Biol.* 20:1868-1876.
- Vegiopoulos, A., K. Muller-Decker, D. Strzoda, I. Schmitt, E. Chichelnitskiy, A. Ostertag, M. Berriel Diaz, J. Rozman, M. Hrabe de Angelis, R.M. Nusing, C.W. Meyer, W. Wahli, M. Klingenspor, and S. Herzig. 2010. Cyclooxygenase-2 controls energy homeostasis in mice by de novo recruitment of brown adipocytes. *Science.* 328:1158-1161.
- Verdich, C., P. Barbe, M. Petersen, K. Grau, L. Ward, I. Macdonald, T.I. Sorensen, and J.M. Oppert. 2011. Changes in body composition during weight loss in obese subjects in the NUGENOB study: comparison of bioelectrical impedance vs. dual-energy X-ray absorptiometry. *Diabetes Metab.* 37:222-229.
- Verma, N.K., J. Singh, and C.S. Dey. 2004. PPAR-gamma expression modulates insulin sensitivity in C2C12 skeletal muscle cells. *Br J Pharmacol.* 143:1006-1013.
- Vidal-Puig, A.J., R.V. Considine, M. Jimenez-Linan, A. Werman, W.J. Pories, J.F. Caro, and J.S. Flier. 1997. Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J Clin Invest.* 99:2416-2422.
- Vieira-Potter, V.J. 2014. Inflammation and macrophage modulation in adipose tissues. *Cell Microbiol.* 16:1484-1492.
- Vijgen, G.H., N.D. Bouvy, G.J. Teule, B. Brans, J. Hoeks, P. Schrauwen, and W.D. van Marken Lichtenbelt. 2012. Increase in brown adipose tissue activity after weight loss in morbidly obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 97:E1229-1233.
- Villanueva, C.J., L. Vergnes, J. Wang, B.G. Drew, C. Hong, Y. Tu, Y. Hu, X. Peng, F. Xu, E. Saez, K. Wroblewski, A.L. Hevener, K. Reue, L.G. Fong, S.G. Young, and P. Tontonoz. 2013. Adipose subtype-selective recruitment of TLE3 or Prdm16 by PPARgamma specifies lipid storage versus thermogenic gene programs. *Cell Metab.* 17:423-435.
- Villarroya, F., and M. Giralt. 2015. The Beneficial Effects of Brown Fat Transplantation: Further Evidence of an Endocrine Role of Brown Adipose Tissue. *Endocrinology.* 156:2368-2370.
- Virtanen, K.A., M.E. Lidell, J. Orava, M. Heglind, R. Westergren, T. Niemi, M. Taittonen, J. Laine, N.J. Savisto, S. Enerback, and P. Nuutila. 2009. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med.* 360:1518-1525.
- Viswakarma, N., Y. Jia, L. Bai, A. Vluggens, J. Borensztajn, J. Xu, and J.K. Reddy. 2010. Coactivators in PPAR-Regulated Gene Expression. *PPAR Res.* 2010.
- Volkow, N.D., G.J. Wang, J.S. Fowler, D. Tomasi, and R. Baler. 2012. Food and drug reward: overlapping circuits in human obesity and addiction. *Curr Top Behav Neurosci.* 11:1-24.
- Vosselman, M.J., B. Brans, A.A. van der Lans, R. Wierts, M.A. van Baak, F.M. Mottaghy, P. Schrauwen, and W.D. van Marken Lichtenbelt. 2013. Brown adipose tissue activity after a high-calorie meal in humans. *Am J Clin Nutr.* 98:57-64.
- Vosselman, M.J., A.A. van der Lans, B. Brans, R. Wierts, M.A. van Baak, P. Schrauwen, and W.D. van Marken Lichtenbelt. 2012. Systemic beta-adrenergic stimulation of thermogenesis is not accompanied by brown adipose tissue activity in humans. *Diabetes.* 61:3106-3113.
- Vu-Dac, N., P. Gervois, H. Jakel, M. Nowak, E. Bauge, H. Dehondt, B. Staels, L.A. Pennacchio, E.M. Rubin, J. Fruchart-Najib, and J.C. Fruchart. 2003. Apolipoprotein A5, a crucial determinant of plasma triglyceride levels, is highly responsive to peroxisome proliferator-activated receptor alpha activators. *J Biol Chem.* 278:17982-17985.
- Vu-Dac, N., K. Schoonjans, V. Kosykh, J. Dallongeville, J.C. Fruchart, B. Staels, and J. Auwerx. 1995. Fibrates increase human apolipoprotein A-II expression through activation of the peroxisome proliferator-activated receptor. *J Clin Invest.* 96:741-750.

Vu-Dac, N., K. Schoonjans, B. Laine, J.C. Fruchart, J. Auwerx, and B. Staels. 1994. Negative regulation of the human apolipoprotein A-I promoter by fibrates can be attenuated by the interaction of the peroxisome proliferator-activated receptor with its response element. *J Biol Chem.* 269:31012-31018.

## W

- Wagner, K.D., and N. Wagner. 2010. Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (PPARbeta/delta) acts as regulator of metabolism linked to multiple cellular functions. *Pharmacol Ther.* 125:423-435.
- Wahli, W., O. Braissant, and B. Desvergne. 1995. Peroxisome proliferator activated receptors: transcriptional regulators of adipogenesis, lipid metabolism and more. *Chem Biol.* 2:261-266.
- Wahli, W., and L. Michalik. 2012. PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation. *Trends Endocrinol Metab.* 23:351-363.
- Wajchenberg, B.L. 2000. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev.* 21:697-738.
- Walden, T.B., I.R. Hansen, J.A. Timmons, B. Cannon, and J. Nedergaard. 2012. Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, "brite," and white adipose tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 302:E19-31.
- Wallberg-Henriksson, H., and J.R. Zierath. 2009. A new twist on brown fat metabolism. *Cell.* 137:22-24.
- Wallenius, K., V. Wallenius, D. Sunter, S.L. Dickson, and J.O. Jansson. 2002. Intracerebroventricular interleukin-6 treatment decreases body fat in rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 293:560-565.
- Wang, E.A., D.I. Israel, S. Kelly, and D.P. Luxenberg. 1993. Bone morphogenetic protein-2 causes commitment and differentiation in C3H10T1/2 and 3T3 cells. *Growth Factors.* 9:57-71.
- Wang, H., and R.H. Eckel. 2009. Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 297:E271-288.
- Wang, H., Y. Zhang, E. Yehuda-Shnaidman, A.V. Medvedev, N. Kumar, K.W. Daniel, J. Robidoux, M.P. Czech, D.J. Mangelsdorf, and S. Collins. 2008. Liver X receptor alpha is a transcriptional repressor of the uncoupling protein 1 gene and the brown fat phenotype. *Mol Cell Biol.* 28:2187-2200.
- Wang, L., R. Teng, L. Di, H. Rogers, H. Wu, J.B. Kopp, and C.T. Noguchi. 2013a. PPARalpha and Sirt1 mediate erythropoietin action in increasing metabolic activity and browning of white adipocytes to protect against obesity and metabolic disorders. *Diabetes.* 62:4122-4131.
- Wang, L., B. Waltenberger, E.M. Pferschy-Wenzig, M. Blunder, X. Liu, C. Malainer, T. Blazevic, S. Schwaiger, J.M. Rollinger, E.H. Heiss, D. Schuster, B. Kopp, R. Bauer, H. Stuppner, V.M. Dirsch, and A.G. Atanasov. 2014a. Natural product agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma): a review. *Biochem Pharmacol.* 92:73-89.
- Wang, M.Y., M. Shimabukuro, Y. Lee, K.Y. Trinh, J.L. Chen, C.B. Newgard, and R.H. Unger. 1999. Adenovirus-mediated overexpression of uncoupling protein-2 in pancreatic islets of Zucker diabetic rats increases oxidative activity and improves beta-cell function. *Diabetes.* 48:1020-1025.

- Wang, Q., M. Zhang, G. Ning, W. Gu, T. Su, M. Xu, B. Li, and W. Wang. 2011. Brown adipose tissue in humans is activated by elevated plasma catecholamines levels and is inversely related to central obesity. *PLoS One*. 6:e21006.
- Wang, Q.A., C. Tao, R.K. Gupta, and P.E. Scherer. 2013b. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat Med*. 19:1338-1344.
- Wang, T., Y. Zang, W. Ling, B.E. Corkey, and W. Guo. 2003a. Metabolic partitioning of endogenous fatty acid in adipocytes. *Obes Res*. 11:880-887.
- Wang, W. 2003. The SWI/SNF family of ATP-dependent chromatin remodelers: similar mechanisms for diverse functions. *Curr Top Microbiol Immunol*. 274:143-169.
- Wang, W., M. Kissig, S. Rajakumari, L. Huang, H.W. Lim, K.J. Won, and P. Seale. 2014b. Ebf2 is a selective marker of brown and beige adipogenic precursor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111:14466-14471.
- Wang, X., and R. Wahl. 2014. Responses of the insulin signaling pathways in the brown adipose tissue of rats following cold exposure. *PLoS One*. 9:e99772.
- Wang, Y., and H.S. Sul. 2009. Pref-1 regulates mesenchymal cell commitment and differentiation through Sox9. *Cell Metab*. 9:287-302.
- Wang, Y.X. 2010. PPARs: diverse regulators in energy metabolism and metabolic diseases. *Cell Res*. 20:124-137.
- Wang, Y.X., C.H. Lee, S. Tjep, R.T. Yu, J. Ham, H. Kang, and R.M. Evans. 2003b. Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell*. 113:159-170.
- Warburton, D.E., C.W. Nicol, and S.S. Bredin. 2006. Health benefits of physical activity: the evidence. *CMAJ*. 174:801-809.
- Way, J.M., W.W. Harrington, K.K. Brown, W.K. Gottschalk, S.S. Sundseth, T.A. Mansfield, R.K. Ramachandran, T.M. Willson, and S.A. Kliewer. 2001. Comprehensive messenger ribonucleic acid profiling reveals that peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation has coordinate effects on gene expression in multiple insulin-sensitive tissues. *Endocrinology*. 142:1269-1277.
- Wei, L., X. Hou, and K. Tatemoto. 2005. Regulation of apelin mRNA expression by insulin and glucocorticoids in mouse 3T3-L1 adipocytes. *Regul Pept*. 132:27-32.
- Weisberg, S.P., D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R.L. Leibel, and A.W. Ferrante, Jr. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 112:1796-1808.
- Welters, H.J., A. El Ouaamari, D. Kawamori, J. Meyer, J. Hu, D.M. Smith, and R.N. Kulkarni. 2012. Rosiglitazone promotes PPARgamma-dependent and -independent alterations in gene expression in mouse islets. *Endocrinology*. 153:4593-4599.
- Weyer, C., P.A. Tataranni, S. Snitker, E. Danforth, Jr., and E. Ravussin. 1998. Increase in insulin action and fat oxidation after treatment with CL 316,243, a highly selective beta3-adrenoceptor agonist in humans. *Diabetes*. 47:1555-1561.
- Whitaker, E.M., S.H. Hussain, G.R. Hervey, G. Tobin, and K.M. Rayfield. 1990. Is increased metabolism in rats in the cold mediated by the thyroid? *The Journal of physiology*. 431:543-556.
- White, J.H., I. Fernandes, S. Mader, and X.J. Yang. 2004. Corepressor recruitment by agonist-bound nuclear receptors. *Vitam Horm*. 68:123-143.
- Whittle, A.J., S. Carobbio, L. Martins, M. Slawik, E. Hondares, M.J. Vazquez, D. Morgan, R.I. Csikasz, R. Gallego, S. Rodriguez-Cuenca, M. Dale, S. Virtue, F. Villarroya, B. Cannon, K. Rahmouni, M. Lopez, and A. Vidal-Puig. 2012. BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions. *Cell*. 149:871-885.

- Whittle, A.J., and A. Vidal-Puig. 2012. NPs -- heart hormones that regulate brown fat? *J Clin Invest.* 122:804-807.
- WHO. 2010. Obesity: preventing and managing the global epidemic. *Technical Report Series n°894.*
- WHO. 2015. Obesity and overweight. *Fact sheet N°311.*
- Wikstrom, J.D., K. Mahdavian, M. Liesa, S.B. Sereda, Y. Si, G. Las, G. Twig, N. Petrovic, C. Zingaretti, A. Graham, S. Cinti, B.E. Corkey, B. Cannon, J. Nedergaard, and O.S. Shirihai. 2014. Hormone-induced mitochondrial fission is utilized by brown adipocytes as an amplification pathway for energy expenditure. *The EMBO journal.* 33:418-436.
- Williams, K.V., and D.E. Kelley. 2000. Metabolic consequences of weight loss on glucose metabolism and insulin action in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 2:121-129.
- Willson, T.M., P.J. Brown, D.D. Sternbach, and B.R. Henke. 2000. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem.* 43:527-550.
- Wilson-Fritch, L., S. Nicoloso, M. Chouinard, M.A. Lazar, P.C. Chui, J. Leszyk, J. Straubhaar, M.P. Czech, and S. Corvera. 2004. Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone. *J Clin Invest.* 114:1281-1289.
- Winer, S., Y. Chan, G. Paltser, D. Truong, H. Tsui, J. Bahrami, R. Dorfman, Y. Wang, J. Zielenski, F. Mastronardi, Y. Maezawa, D.J. Drucker, E. Engleman, D. Winer, and H.M. Dosch. 2009. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat Med.* 15:921-929.
- Winter, Y., S. Rohrmann, J. Linseisen, O. Lanczik, P.A. Ringleb, J. Hebebrand, and T. Back. 2008. Contribution of obesity and abdominal fat mass to risk of stroke and transient ischemic attacks. *Stroke.* 39:3145-3151.
- Woods, C.G., A.M. Burns, B.U. Bradford, P.K. Ross, O. Kosyk, J.A. Swenberg, M.L. Cunningham, and I. Rusyn. 2007. WY-14,643 induced cell proliferation and oxidative stress in mouse liver are independent of NADPH oxidase. *Toxicol Sci.* 98:366-374.
- Wright, H.M., C.B. Clish, T. Mikami, S. Hauser, K. Yanagi, R. Hiramatsu, C.N. Serhan, and B.M. Spiegelman. 2000. A synthetic antagonist for the peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits adipocyte differentiation. *J Biol Chem.* 275:1873-1877.
- Wu, D., A.B. Molofsky, H.E. Liang, R.R. Ricardo-Gonzalez, H.A. Jouihan, J.K. Bando, A. Chawla, and R.M. Locksley. 2011. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science.* 332:243-247.
- Wu, J., P. Bostrom, L.M. Sparks, L. Ye, J.H. Choi, A.H. Giang, M. Khandekar, K.A. Virtanen, P. Nuutila, G. Schaart, K. Huang, H. Tu, W.D. van Marken Lichtenbelt, J. Hoeks, S. Enerback, P. Schrauwen, and B.M. Spiegelman. 2012. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell.* 150:366-376.
- Wu, Q., M. Kazantzis, H. Doege, A.M. Ortegon, B. Tsang, A. Falcon, and A. Stahl. 2006a. Fatty acid transport protein 1 is required for nonshivering thermogenesis in brown adipose tissue. *Diabetes.* 55:3229-3237.
- Wu, Q., A.M. Ortegon, B. Tsang, H. Doege, K.R. Feingold, and A. Stahl. 2006b. FATP1 is an insulin-sensitive fatty acid transporter involved in diet-induced obesity. *Mol Cell Biol.* 26:3455-3467.
- Wu, Z., E.D. Rosen, R. Brun, S. Hauser, G. Adelmant, A.E. Troy, C. McKeon, G.J. Darlington, and B.M. Spiegelman. 1999. Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell.* 3:151-158.
- Wulf, A., A. Harneit, M. Kroger, M. Kebenko, M.G. Wetzel, and J.M. Weitzel. 2008. T3-mediated expression of PGC-1alpha via a far upstream located thyroid hormone response element. *Mol Cell Endocrinol.* 287:90-95.

## X

- Xu, H.E., M.H. Lambert, V.G. Montana, D.J. Parks, S.G. Blanchard, P.J. Brown, D.D. Sternbach, J.M. Lehmann, G.B. Wisely, T.M. Willson, S.A. Kliewer, and M.V. Milburn. 1999. Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Mol Cell*. 3:397-403.
- Xu, H.E., M.H. Lambert, V.G. Montana, K.D. Plunket, L.B. Moore, J.L. Collins, J.A. Oplinger, S.A. Kliewer, R.T. Gampe, Jr., D.D. McKee, J.T. Moore, and T.M. Willson. 2001. Structural determinants of ligand binding selectivity between the peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:13919-13924.
- Xu, H.E., T.B. Stanley, V.G. Montana, M.H. Lambert, B.G. Shearer, J.E. Cobb, D.D. McKee, C.M. Galardi, K.D. Plunket, R.T. Nolte, D.J. Parks, J.T. Moore, S.A. Kliewer, T.M. Willson, and J.B. Stimmel. 2002. Structural basis for antagonist-mediated recruitment of nuclear co-repressors by PPARalpha. *Nature*. 415:813-817.
- Xu, J., D.J. Lloyd, C. Hale, S. Stanislaus, M. Chen, G. Sivits, S. Vonderfecht, R. Hecht, Y.S. Li, R.A. Lindberg, J.L. Chen, D.Y. Jung, Z. Zhang, H.J. Ko, J.K. Kim, and M.M. Veniant. 2009. Fibroblast growth factor 21 reverses hepatic steatosis, increases energy expenditure, and improves insulin sensitivity in diet-induced obese mice. *Diabetes*. 58:250-259.
- Xue, R., M.D. Lynes, J.M. Dreyfuss, F. Shamsi, T.J. Schulz, H. Zhang, T.L. Huang, K.L. Townsend, Y. Li, H. Takahashi, L.S. Weiner, A.P. White, M.S. Lynes, L.L. Rubin, L.J. Goodyear, A.M. Cypess, and Y.H. Tseng. 2015. Clonal analyses and gene profiling identify genetic biomarkers of the thermogenic potential of human brown and white preadipocytes. *Nat Med*. 21:760-768.
- Xue, Y., R. Cao, D. Nilsson, S. Chen, R. Westergren, E.M. Hedlund, C. Martijn, L. Rondahl, P. Krauli, E. Walum, S. Enerback, and Y. Cao. 2008. FOXC2 controls Ang-2 expression and modulates angiogenesis, vascular patterning, remodeling, and functions in adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:10167-10172.

## Y

- Yadav, N., D. Cheng, S. Richard, M. Morel, V.R. Iyer, C.M. Aldaz, and M.T. Bedford. 2008. CARM1 promotes adipocyte differentiation by coactivating PPARgamma. *EMBO Rep*. 9:193-198.
- Yamamoto, K., M. Sakaguchi, R.J. Medina, A. Niida, Y. Sakaguchi, M. Miyazaki, K. Kataoka, and N.H. Huh. 2010. Transcriptional regulation of a brown adipocyte-specific gene, UCP1, by KLF11 and KLF15. *Biochem Biophys Res Commun*. 400:175-180.
- Yamamoto, T., A. Yamamoto, M. Watanabe, M. Kataoka, H. Terada, and Y. Shinohara. 2011. Quantitative evaluation of the effects of cold exposure of rats on the expression levels of ten FABP isoforms in brown adipose tissue. *Biotechnol Lett*. 33:237-242.
- Yamazaki, Y., T. Osaka, T. Murakami, and S. Inoue. 2000. JTT-501, a new oral hypoglycemic agent, reverses hypertriglyceridemia in Zucker fatty and ventromedial hypothalamus-lesioned obese rats. *Metabolism*. 49:574-578.

- Yang, X., X. Lu, M. Lombes, G.B. Rha, Y.I. Chi, T.M. Guerin, E.J. Smart, and J. Liu. 2010. The G(0)/G(1) switch gene 2 regulates adipose lipolysis through association with adipose triglyceride lipase. *Cell Metab.* 11:194-205.
- Yang, X., X. Zhang, B.L. Heckmann, X. Lu, and J. Liu. 2011. Relative contribution of adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase to tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-induced lipolysis in adipocytes. *J Biol Chem.* 286:40477-40485.
- Yang, X.Y., L.H. Wang, T. Chen, D.R. Hodge, J.H. Resau, L. DaSilva, and W.L. Farrar. 2000. Activation of human T lymphocytes is inhibited by peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) agonists. PPARgamma co-association with transcription factor NFAT. *J Biol Chem.* 275:4541-4544.
- Yeh, W.C., Z. Cao, M. Classon, and S.L. McKnight. 1995. Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes Dev.* 9:168-181.
- Yen, C.L., S.J. Stone, S. Koliwad, C. Harris, and R.V. Farese, Jr. 2008. Thematic review series: glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *J Lipid Res.* 49:2283-2301.
- Yessoufou, A., and W. Wahli. 2010. Multifaceted roles of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) at the cellular and whole organism levels. *Swiss Med Wkly.* 140:w13071.
- Yin, H., A. Pasut, V.D. Soleimani, C.F. Bentzinger, G. Antoun, S. Thorn, P. Seale, P. Fernando, W. van Ijcken, F. Grosveld, R.A. Dekemp, R. Boushel, M.E. Harper, and M.A. Rudnicki. 2013. MicroRNA-133 controls brown adipose determination in skeletal muscle satellite cells by targeting Prdm16. *Cell Metab.* 17:210-224.
- Yoneshiro, T., S. Aita, Y. Kawai, T. Iwanaga, and M. Saito. 2012. Nonpungent capsaicin analogs (capsinoids) increase energy expenditure through the activation of brown adipose tissue in humans. *Am J Clin Nutr.* 95:845-850.
- Yoneshiro, T., S. Aita, M. Matsushita, T. Kameya, K. Nakada, Y. Kawai, and M. Saito. 2011. Brown adipose tissue, whole-body energy expenditure, and thermogenesis in healthy adult men. *Obesity (Silver Spring).* 19:13-16.
- Yoneshiro, T., S. Aita, M. Matsushita, T. Kayahara, T. Kameya, Y. Kawai, T. Iwanaga, and M. Saito. 2013. Recruited brown adipose tissue as an antiobesity agent in humans. *J Clin Invest.* 123:3404-3408.
- Yoneshiro, T., and M. Saito. 2013. Transient receptor potential activated brown fat thermogenesis as a target of food ingredients for obesity management. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 16:625-631.
- Yore, M.M., I. Syed, P.M. Moraes-Vieira, T. Zhang, M.A. Herman, E.A. Homan, R.T. Patel, J. Lee, S. Chen, O.D. Peroni, A.S. Dhaneshwar, A. Hammarstedt, U. Smith, T.E. McGraw, A. Saghatelian, and B.B. Kahn. 2014. Discovery of a class of endogenous mammalian lipids with anti-diabetic and anti-inflammatory effects. *Cell.* 159:318-332.
- Yoshikawa, T., Z. Brkanac, B.R. Dupont, G.Q. Xing, R.J. Leach, and S.D. Detera-Wadleigh. 1996. Assignment of the human nuclear hormone receptor, NUC1 (PPARD), to chromosome 6p21.1-p21.2. *Genomics.* 35:637-638.
- Youle, R.J., and A.M. van der Bliek. 2012. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science.* 337:1062-1065.
- Young, P., J.R. Arch, and M. Ashwell. 1984. Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse. *FEBS letters.* 167:10-14.
- Yu, J.G., S. Javorschi, A.L. Hevener, Y.T. Kruszynska, R.A. Norman, M. Sinha, and J.M. Olefsky. 2002. The effect of thiazolidinediones on plasma adiponectin levels in normal, obese, and type 2 diabetic subjects. *Diabetes.* 51:2968-2974.



- Yu, K., W. Bayona, C.B. Kallen, H.P. Harding, C.P. Ravera, G. McMahon, M. Brown, and M.A. Lazar. 1995. Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids. *J Biol Chem.* 270:23975-23983.
- Yu, S., K. Matsusue, P. Kashireddy, W.Q. Cao, V. Yeldandi, A.V. Yeldandi, M.S. Rao, F.J. Gonzalez, and J.K. Reddy. 2003. Adipocyte-specific gene expression and adipogenic steatosis in the mouse liver due to peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 (PPARgamma1) overexpression. *J Biol Chem.* 278:498-505.
- Yu, S., and J.K. Reddy. 2007. Transcription coactivators for peroxisome proliferator-activated receptors. *Biochimica et biophysica acta.* 1771:936-951.

## Z

- Zhang, F., B.E. Lavan, and F.M. Gregoire. 2007. Selective Modulators of PPAR-gamma Activity: Molecular Aspects Related to Obesity and Side-Effects. *PPAR Res.* 2007:32696.
- Zhang, H., X. Yi, X. Sun, N. Yin, B. Shi, H. Wu, D. Wang, G. Wu, and Y. Shang. 2004a. Differential gene regulation by the SRC family of coactivators. *Genes Dev.* 18:1753-1765.
- Zhang, J., M. Fu, T. Cui, C. Xiong, K. Xu, W. Zhong, Y. Xiao, D. Floyd, J. Liang, E. Li, Q. Song, and Y.E. Chen. 2004b. Selective disruption of PPARgamma 2 impairs the development of adipose tissue and insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:10703-10708.
- Zhang, Q., H. Ye, Q. Miao, Z. Zhang, Y. Wang, X. Zhu, S. Zhang, C. Zuo, Z. Zhang, Z. Huang, R. Xue, M. Zeng, H. Huang, W. Jin, Q. Tang, Y. Guan, and Y. Li. 2013. Differences in the metabolic status of healthy adults with and without active brown adipose tissue. *Wien Klin Wochenschr.* 125:687-695.
- Zhang, S., M.W. Hulver, R.P. McMillan, M.A. Cline, and E.R. Gilbert. 2014a. The pivotal role of pyruvate dehydrogenase kinases in metabolic flexibility. *Nutr Metab (Lond).* 11:10.
- Zhang, X.M., Q. Chang, L. Zeng, J. Gu, S. Brown, and R.S. Basch. 2006. TBLR1 regulates the expression of nuclear hormone receptor co-repressors. *BMC Cell Biol.* 7:31.
- Zhang, Z., H. Zhang, B. Li, X. Meng, J. Wang, Y. Zhang, S. Yao, Q. Ma, L. Jin, J. Yang, W. Wang, and G. Ning. 2014b. Berberine activates thermogenesis in white and brown adipose tissue. *Nat Commun.* 5:5493.
- Zhu, Y., C. Qi, S. Jain, M.S. Rao, and J.K. Reddy. 1997. Isolation and characterization of PBP, a protein that interacts with peroxisome proliferator-activated receptor. *J Biol Chem.* 272:25500-25506.
- Ziegler, O., D. Quilliot, and B. Guerci. 2000. [Physiopathology of obesity. Dietary factors, and regulation of the energy balance]. *Ann Endocrinol (Paris).* 61 Suppl 6:12-23.
- Zimmermann, R., G. Haemmerle, E.M. Wagner, J.G. Strauss, D. Kratky, and R. Zechner. 2003. Decreased fatty acid esterification compensates for the reduced lipolytic activity in hormone-sensitive lipase-deficient white adipose tissue. *J Lipid Res.* 44:2089-2099.
- Zimmermann, R., J.G. Strauss, G. Haemmerle, G. Schoiswohl, R. Birner-Gruenberger, M. Riederer, A. Lass, G. Neuberger, F. Eisenhaber, A. Hermetter, and R. Zechner. 2004. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science.* 306:1383-1386.
- Ziouzenkova, O., S. Perrey, L. Asatryan, J. Hwang, K.L. MacNaul, D.E. Moller, D.J. Rader, A. Sevanian, R. Zechner, G. Hoefler, and J. Plutzky. 2003. Lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins generates PPAR ligands: evidence for an antiinflammatory role for lipoprotein lipase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:2730-2735.

Zuk, P.A., M. Zhu, P. Ashjian, D.A. De Ugarte, J.I. Huang, H. Mizuno, Z.C. Alfonso, J.K. Fraser, P. Benhaim, and M.H. Hedrick. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 13:4279-4295.

---

## **ANNEXES**

---

# Fatty acids from fat cell lipolysis do not activate an inflammatory response but are stored as triacylglycerols in adipose tissue macrophages

Sylvie Caspar-Bauguil<sup>1,2,3</sup> · Catherine-Ines Kolditz<sup>1,2</sup> · Corinne Lefort<sup>1,2</sup> · Isabelle Vila<sup>1,2</sup> · Etienne Mouisel<sup>1,2</sup> · Diane Beuzelin<sup>1,2</sup> · Geneviève Tavernier<sup>1,2</sup> · Marie-Adeline Marques<sup>1,2</sup> · Alexia Zakaroff-Girard<sup>2,4,5</sup> · Christiane Pecher<sup>2,4</sup> · Marianne Houssier<sup>1,2</sup> · Lucile Mir<sup>1,2</sup> · Sarah Nicolas<sup>1,2</sup> · Cédric Moro<sup>1,2</sup> · Dominique Langin<sup>1,2,3</sup>

Received: 25 June 2015 / Accepted: 9 July 2015 / Published online: 6 August 2015  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

## Abstract

**Aims/hypothesis** Activation of macrophages by fatty acids (FAs) is a potential mechanism linking obesity to adipose tissue (AT) inflammation and insulin resistance. Here, we investigated the effects of FAs released during adipocyte lipolysis on AT macrophages (ATMs).

**Methods** Human THP-1 macrophages were treated with media from human multipotent adipose-derived stem (hMADS) adipocytes stimulated with lipolytic drugs. Macrophages were also treated with mixtures of FAs and an inhibitor of Toll-like receptor 4, since this receptor is activated by saturated FAs.

Levels of mRNA and the secretion of inflammation-related molecules were measured in macrophages. FA composition was determined in adipocytes, conditioned media and macrophages. The effect of chronic inhibition or acute activation of fat cell lipolysis on ATM response was investigated in vivo in mice.

**Results** Whereas palmitic acid alone activates THP-1, conditioned media from hMADS adipocyte lipolysis had no effect on IL, chemokine and cytokine gene expression, and secretion by macrophages. Mixtures of FAs representing de novo lipogenesis or habitual dietary conditions also had no effect. FAs derived from adipocyte lipolysis were taken up by macrophages and stored as triacylglycerol droplets. In vivo, chronic treatment with an antilipolytic drug did not modify gene expression and number of ATMs in mice with intact or defective *Tlr4*. Stimulation of adipocyte lipolysis increased storage of neutral lipids by macrophages without change in number and phenotype.

**Conclusions/interpretation** Our data suggest that adipocyte lipolysis does not activate inflammatory pathways in ATMs, which instead may act as scavengers of FAs.

Sylvie Caspar-Bauguil, Catherine-Ines Kolditz and Corinne Lefort contributed equally to this study.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00125-015-3719-0) contains peer-reviewed but unedited supplementary material, which is available to authorised users.

✉ Dominique Langin  
dominique.langin@inserm.fr

<sup>1</sup> Inserm, UMR1048, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, I2MC, Obesity Research Laboratory, Team 4, CHU Rangueil, 1 avenue Jean Poulhès, BP 84225, 31432 Toulouse Cedex 4, France

<sup>2</sup> University of Toulouse, UMR1048, Paul Sabatier University, Toulouse, France

<sup>3</sup> Toulouse University Hospitals, Department of Clinical Biochemistry, Toulouse, France

<sup>4</sup> Inserm, UMR1048, Cytometry Facility, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, Toulouse, France

<sup>5</sup> Inserm, UMR1048, Team 1, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, Toulouse, France

**Keywords** Adipocyte · Adipose tissue · De novo lipogenesis · Fatty acids · Inflammatory response · Insulin resistance · Lipolysis · Macrophage · Triacylglycerol · TLR4

## Abbreviations

AT Adipose tissue  
ATMs Adipose tissue macrophages  
FAs Fatty acids  
hMADS human multipotent adipose-derived stem

HSLi	Hormone-sensitive lipase inhibitor
LPS	Lipopolysaccharide
MCP1	Monocyte chemoattractant protein 1
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor- $\kappa$ B
TAG	Triacylglycerol
TLR4	Toll-like receptor 4
WT	Wild-type

## Introduction

Chronic low-grade inflammation is associated with insulin resistance and obesity-related metabolic disorders such as type 2 diabetes mellitus [1, 2]. This inflammatory state appears to initiate in adipose tissue (AT), as immune cell infiltration in AT has been shown in rodent models to take place gradually during the time course of obesity prior to the development of insulin resistance [3, 4]. Notably, infiltrated AT macrophages (ATMs) represent a major source of proinflammatory cytokines and chemokines, which may impair insulin sensitivity [1, 2, 5, 6] and interfere with adipocyte functions [7, 8], thereby aggravating the metabolic dysfunction of AT. However, excessive release of fatty acids (FAs) from expanded AT has been hypothesised to cause insulin resistance [9, 10]. Thus, there is growing evidence that both adipocytes and ATMs contribute to the development of insulin resistance. Crosstalk between the two cell types may play a key role in this process.

The metabolic factors regulating the ATM immune response remain poorly defined. Saturated FAs exert proinflammatory effects via the endotoxin receptor, Toll-like receptor 4 (TLR4), expressed in ATMs [11–15]. We, therefore, hypothesised that FAs released by stimulation of human adipocyte lipolysis could promote activation of inflammatory pathways in ATMs through TLR4 signalling. To test this hypothesis, conditioned media were prepared from human adipocytes stimulated with lipolytic and antilipolytic drugs and used to treat human macrophages. Human macrophages were also treated with mixtures of FAs similar to that in the lipolytic medium or representative of human AT in normal dietary conditions. The effect of acute activation or chronic inhibition of lipolysis on AT inflammation was investigated in vivo in mice expressing functional or defective TLR4 signalling.

## Methods

**Cell culture and lipolysis** Human multipotent adipose-derived stem (hMADS) cells provided by G. Ailhaud and E-Z Amri (CNRS, University of Nice-Sophia Antipolis, Nice, France) were cultured and differentiated as previously described [16]. Lipolytic challenges were performed by treating adipocytes for 3 h with forskolin (Sigma-Aldrich, Saint-Louis,

MO, USA), isoprenaline (Sigma-Aldrich), OPC3911 (Otsuka Pharmaceutical, Tokyo, Japan) [17] and/or BAY 59-9435 (NoValix, Illkirch, France) [18]. The same treatments were carried out in parallel in cell-free wells used as controls of hMADS conditioned media for THP-1 cell treatment. Glycerol and NEFA released in the medium were measured using free glycerol reagent (Sigma-Aldrich) and NEFA-HR (2) from Wako Chemicals (Neuss, Germany). Protein concentrations were determined with Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, France) protein assay using BSA as standard. THP-1 cells (TIB202, American Type Culture Collection, Teddington, UK) were routinely cultured in RPMI 1640 medium (Gibco, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% vol./vol. FBS. Cell lines are checked for mycoplasma contamination using Hoechst 33342 (Invitrogen, Paisley, UK). See the [electronic supplementary material](#) (ESM) Methods for further details.

**Fatty acid mixtures** Mixtures of FAs were prepared to mimic the composition of hMADS lipolysis conditioned media or a profile typical of human adipocyte lipolysis [19] (ESM Table 1).

**THP-1 cell treatments** THP-1 cells were treated for 72 h in the presence of 2% BSA with hMADS conditioned media or exogenous FAs. Culture supernatant fractions and cell extracts were collected and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. TAK-242, a specific inhibitor of the TLR4 signalling pathway, was kindly provided by GlaxoSmithKline (Les Ulis, France).

**Gas chromatography analysis of triacylglycerol FAs** After washing, cells were suspended in PBS. Lipid extraction was performed using the Folch method and FA composition was determined by capillary gas chromatography [20].

**Bodipy staining of neutral lipids** Cells were fixed with paraformaldehyde solution and non-specific interactions were blocked by 1% BSA. Lipid droplets and nuclei were stained with a Bodipy neutral lipid probe 493/503 (Invitrogen) and Hoechst 33342 (Invitrogen) in PBS for 30 min. Cells were then washed twice with PBS and visualised under reverse fluorescent microscopy.

**Cytokine quantification** IL-6, IL-10 and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1) were measured in cell culture supernatant fractions using ELISA kits (IL-6, Invitrogen; MCP1, Ray Biotech, Norcross, GA, USA; IL-10, Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA).

**Animal studies** Animal protocols were performed in accordance with French and European Animal Care Facility guidelines. Mice were housed at constant temperature ( $20\text{--}22^{\circ}\text{C}$ ) and humidity (50–60%) conditions, with a 12/12 h light/dark cycle (lights on at 07:00 hours) and given free access to food. Five-week-old male C3H/HeJ (stock 000659) mice (which

show defective TLR4 signalling) and wild-type (WT) C3H/HeOuJ (stock 000635) male mice were purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). After weaning, C3H/HeJ and C3H/HeOuJ mice were fed a high-fat diet (45% energy as fat, Research Diets D12451, New Brunswick, NJ, USA) for 8 weeks. Treatment with the antilipolytic drug BAY 59-9435 at 70 mg/kg or vehicle was given orally once a day in the last 2 weeks of diet. For in vivo lipolytic challenge, 16-week-old male C3H/HeOuJ mice fed a standard pellet diet (A04, Safe, Augy, France), were injected intraperitoneally with 1 mg/kg of the  $\beta_3$ -adrenergic agonist CL316,243 (C5976, Sigma-Aldrich) or vehicle 14 h prior to being killed.

**Flow cytometry analysis** Epididymal fat pad was digested by collagenase (Serlabo Technologies, Entraigues, France). Stromavascular fraction cells were incubated for 10 min at room temperature with FcBlock (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) in FACS buffer (PBS, 0.2% BSA, 2 mmol/l EDTA). Pools of specific fluorescent-labelled antibodies (PerCP-CD45, BV421-CD206, BV605-CD11c [Biolegend, San Diego, CA, USA]; FITC-F4/80 [Bio-Rad]) or Bodipy 493/503 (Invitrogen) were prepared and added to the stromavascular cell solution. Analyses were performed using a LSR Fortessa flow cytometer and DIVA software (BD Biosciences).

**Immunohistochemistry analysis** Epididymal fat samples were fixed in 10% formalin (Sigma-Aldrich) for 24 h, embedded in paraffin, sectioned and stained with F4/80 antibody

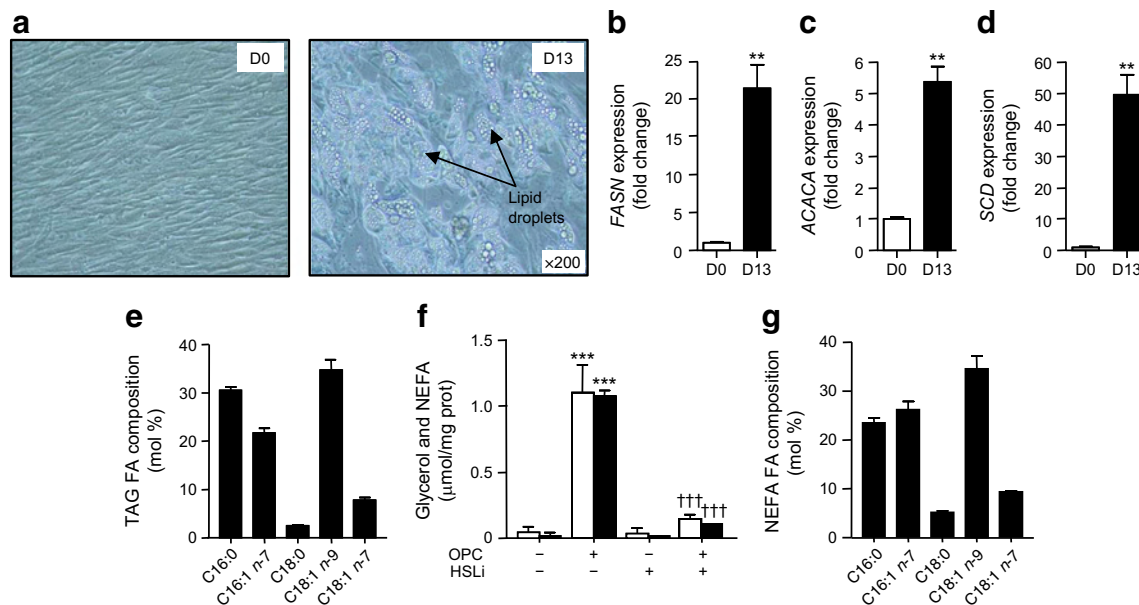
(AbD Serotec, Colmar, France), and revealed by an indirect peroxidase procedure. Digital images were captured using a light microscope coupled to a camera and analysed using a morphometric program (Lucia IMAGE, version 4.81; Laboratory Imaging, Prague, Czech Republic).

**Measurements of mRNA levels** Total RNA extraction and mRNA quantification was performed as previously described [21, 22]. Values were normalised to the levels of 18S rRNA (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) for murine epididymal adipose tissue, proteasome 26S subunit ATPase 4 (Applied Biosystems) for THP-1 cells and LDL receptor-related protein 10 (Applied Biosystems) for hMADS cells.

**Statistics** All data are presented as mean $\pm$ SEM. GraphPad Prism Software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) was used for statistical analyses. Data were analysed by ANOVA with Bonferroni correction and nonparametric tests whenever appropriate.

## Results

**The profile of FAs released by hMADS adipocytes reflects the composition of intracellular triacylglycerol** At day 13 of differentiation, hMADS cells were fully differentiated into adipocytes and had readily accumulated triacylglycerol (TAG) droplets (Fig. 1a). NEFAs and cholesteryl esters were



**Fig. 1** Lipid metabolism in hMADS adipocytes. **(a)** Photomicrograph of adipocytes and **(b–d)** mRNA levels of de novo lipogenesis enzymes at day 0 (D0) and day 13 (D13) of differentiation.  $**p < 0.01$  by Wilcoxon test. **(e)** FA composition of fat cell TAGs in differentiated adipocytes. **(f)** Glycerol (white bars) and NEFA (black bars) concentrations in lipolysis medium from adipocytes exposed or not exposed to  $1 \times 10^{-5}$  mol/l

OPC3911 (OPC) and  $1 \times 10^{-5}$  mol/l HSLi.  $***p < 0.001$  relative to basal condition,  $†††p < 0.001$  relative to the OPC condition by two-way ANOVA with Bonferroni post hoc test. Prot, protein **(g)** FA composition of lipolysis medium NEFAs. **(b–g)** Data are expressed as mean $\pm$ SEM of three to nine different experiments for each condition



not detected in the cellular fraction (data not shown). Differentiation was accompanied by robust induction of de novo lipogenesis gene expression (Fig. 1b–d). The major FAs found in the TAG fraction were oleic (C18:1 *n*-9), palmitic (C16:0) and palmitoleic (C16:1 *n*-7) acids (Fig. 1e). Smaller amounts of vaccenic (C18:1 *n*-7) and stearic (C18:0) acids were also found. The essential FAs C18:2 *n*-6 (linoleic acid) and C18:3 *n*-3 ( $\alpha$ -linolenic acid) and C20 to C22 FAs represented <0.5% (not shown). The FA profile of the TAG fraction reflects that expected in a case of strict de novo lipogenesis.

To investigate the effect of fat cell lipolysis on macrophage activation, we first screened for a drug with lipolytic potency on hMADS adipocytes but with minimal direct effects on THP-1 cells. Three commonly used lipolytic agents were tested: forskolin (an adenylyl cyclase activator), isoprenaline (an agonist of beta-adrenergic receptors) and OPC3911 (a cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B inhibitor). Forskolin induced the strongest lipolytic response on hMADS adipocytes (ESM Fig. 1a). However, it also potently induced *IL6* and *IL10* gene expression in THP-1 cells (ESM Fig. 1b,c). Isoprenaline showed a weak lipolytic action on hMADS adipocytes. It had a modest direct effect on THP-1 cell *IL6* mRNA level but induced *IL10* gene expression as strongly as forskolin. OPC3911 readily stimulated adipocyte lipolysis with minimal direct activation of THP-1 cell inflammatory marker gene expression and was, therefore, selected as the lipolytic agent (ESM Fig. 1, Fig. 1f).

Inhibition of lipolytic induction was obtained by adding the specific hormone-sensitive lipase inhibitor (HSLi) BAY 59-9435. The HSLi had no effect on FA and glycerol release when used alone but decreased the lipolytic effect of OPC3911 by >90% (Fig. 1f). We then analysed the nature of FAs that were released in the medium in response to lipolytic stimulation (Fig. 1g). The major FAs found in the culture media were oleic, palmitic and palmitoleic acids. Vaccenic and stearic acids were also detected at lower concentrations. Thus, the profile of FAs released by hMADS adipocytes upon lipolytic stimulation largely reflected that of the TAG fraction.

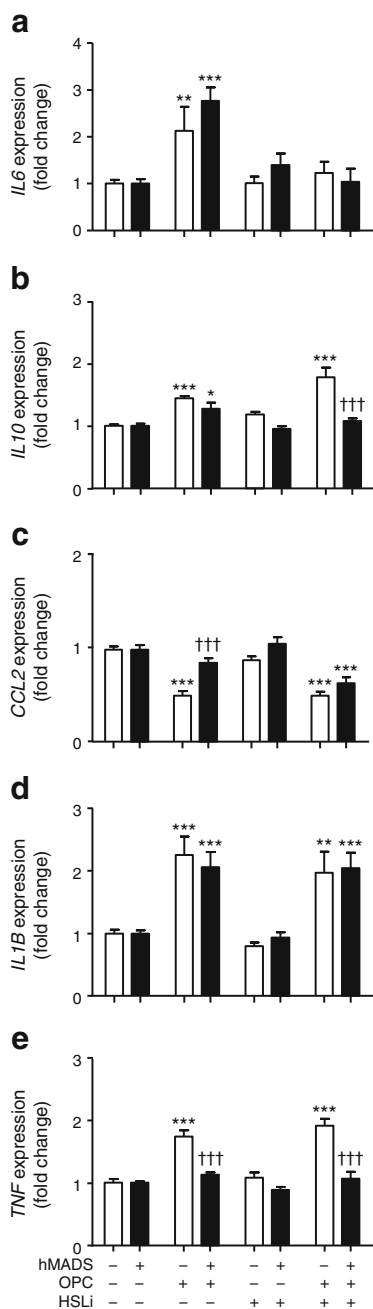
#### **FAs released by hMADS adipocytes during lipolytic challenges do not induce inflammatory response in THP-1 macrophages**

The effects of hMADS cell-conditioned media on the inflammatory response in THP-1 macrophages were investigated. To validate our culture protocol and for comparison with the effects of conditioned media, THP-1 macrophages were differentiated into M1 and M2 phenotypes. Gene expression of the proinflammatory markers *IL1B*, *IL6* and *TNF* were robustly increased in M1 macrophages, whereas mRNA levels of the anti-inflammatory marker *IL10* and the chemokine *CCL2* (MCP1) were markedly induced in M2 macrophages (ESM Fig. 2a). The lipid metabolism genes *FABP4* and *CD36* were expressed at comparable levels in M0 and M2 macrophages that were much higher than those

in M1 macrophages. Conditioned media of hMADS adipocytes with lipolytic stimulation or inhibition did not modify *IL6B*, *IL1B* and *TNF* gene expression, suggesting that adipocyte-derived lipolytic products do not induce the activation of inflammatory pathways in THP-1 cells (Fig. 2a, d, e). The lack of response to conditioned media was also observed for the M2 marker *IL10* and the chemokine *CCL2* (Fig. 2b, c). Indeed, when a modest change in gene expression was observed following conditioned media treatment, a similar change was observed in THP-1 cells treated with hMADS cell-free control media supplemented with OPC3911. This finding suggests a direct effect of the drug on THP-1 cell gene expression. For *TNF*, and to a lesser extent for *IL10* gene expression, direct induction by OPC3911 was abrogated in the presence of hMADS adipocyte-conditioned media, suggesting an effect involving a lipolysis-independent factor produced by hMADS adipocytes. Concordant data were obtained when measuring IL-6 and MCP1 secretion in culture media (Fig. 2f, h). There was a twofold increase in IL-10 production by THP-1 cells treated with media from OPC3911-treated hMADS adipocytes (Fig. 2g). The levels were lower than those typically observed in macrophages with the anti-inflammatory M2 phenotype (ESM Fig. 2b).

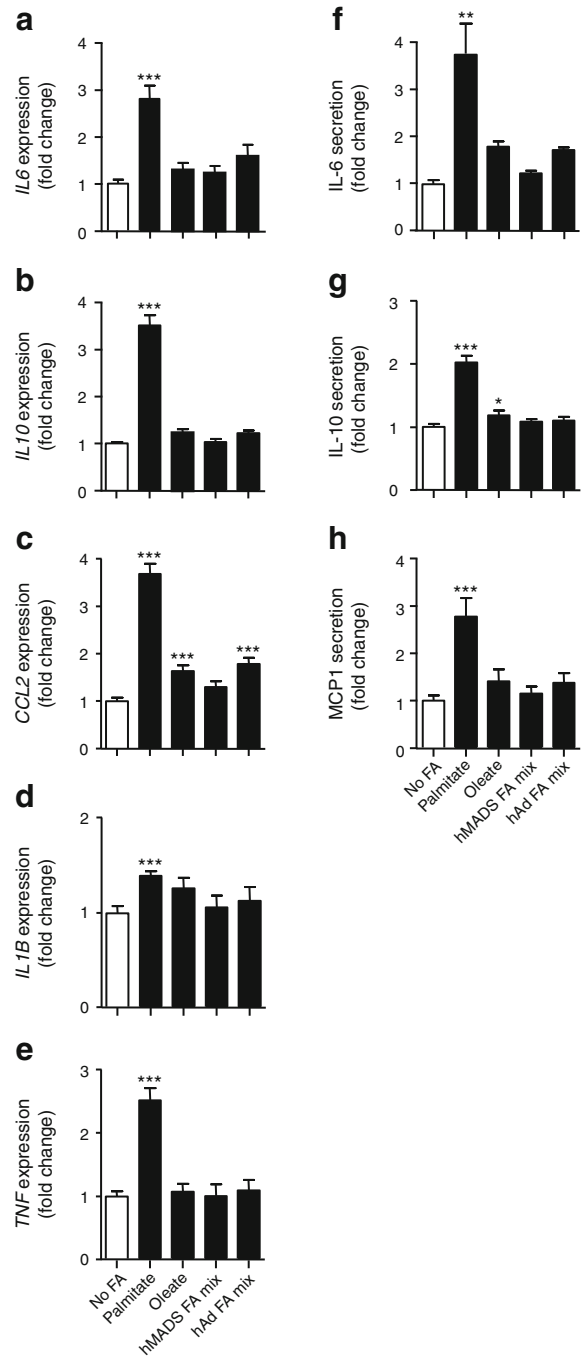
The possible implication of TLR4 in the effect of FAs released from adipocyte lipolysis on macrophages was assessed by treating THP-1 macrophages with TAK-242, a specific inhibitor of the TLR4 signalling pathway [23]. First, we checked that TLR4 was functional and that TAK-242 was efficient in THP-1 cells treated with lipopolysaccharide (LPS), the prototypical TLR4 ligand (ESM Fig. 3a). However, TAK-242 had no significant effect on inflammation-related marker gene expression in THP-1 cells treated with conditioned media from OPC3911-stimulated hMADS adipocytes (ESM Fig. 3b). These data show that lipolytic products, FAs or other molecules, do not activate TLR4 signalling pathways stimulating inflammation-related gene expression.

We next investigated the direct effect of mixtures of FAs mimicking the FA concentration and composition either of media from hMADS fat cells stimulated with a lipolytic agent, i.e. containing FAs synthesised by de novo lipogenesis, or of ex vivo lipolysis from human AT pieces, i.e. including FAs from dietary sources (ESM Table 1) [19]. Compared with the FA-free control, treatment of THP-1 macrophages with the FA mixtures induced no change in *IL6*, *IL10*, *IL1B* and *TNF* gene expression (Fig. 3a, b, d, e). A modest effect was seen on *CCL2* mRNA levels (Fig. 3c) that was much lower than the induction observed during differentiation into M2 macrophages (ESM Fig. 2a). Treatment with palmitate but not with oleate increased mRNA levels of *IL6*, *IL10*, *CCL2*, *IL1B* and *TNF* (Fig. 3a–e), as well as IL-6, IL-10 and MCP1 production in culture media (Fig. 3f–h).



**Fig. 2** Effects of adipocyte lipolysis conditioned media on (a–e) gene expression and (f–h) production of ILs and chemokine by THP-1 macrophages. Macrophages were treated with conditioned media from non-stimulated, OPC3911 (OPC) and/or HSLi-stimulated-hMADS (black bars) or exposed directly with drugs (white bars). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  relative to the control condition without treatment; ††† $p < 0.001$  relative to the condition without hMADS conditioned media by two-way ANOVA with Bonferroni post hoc test or Wilcoxon test. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of six different experiments for each condition

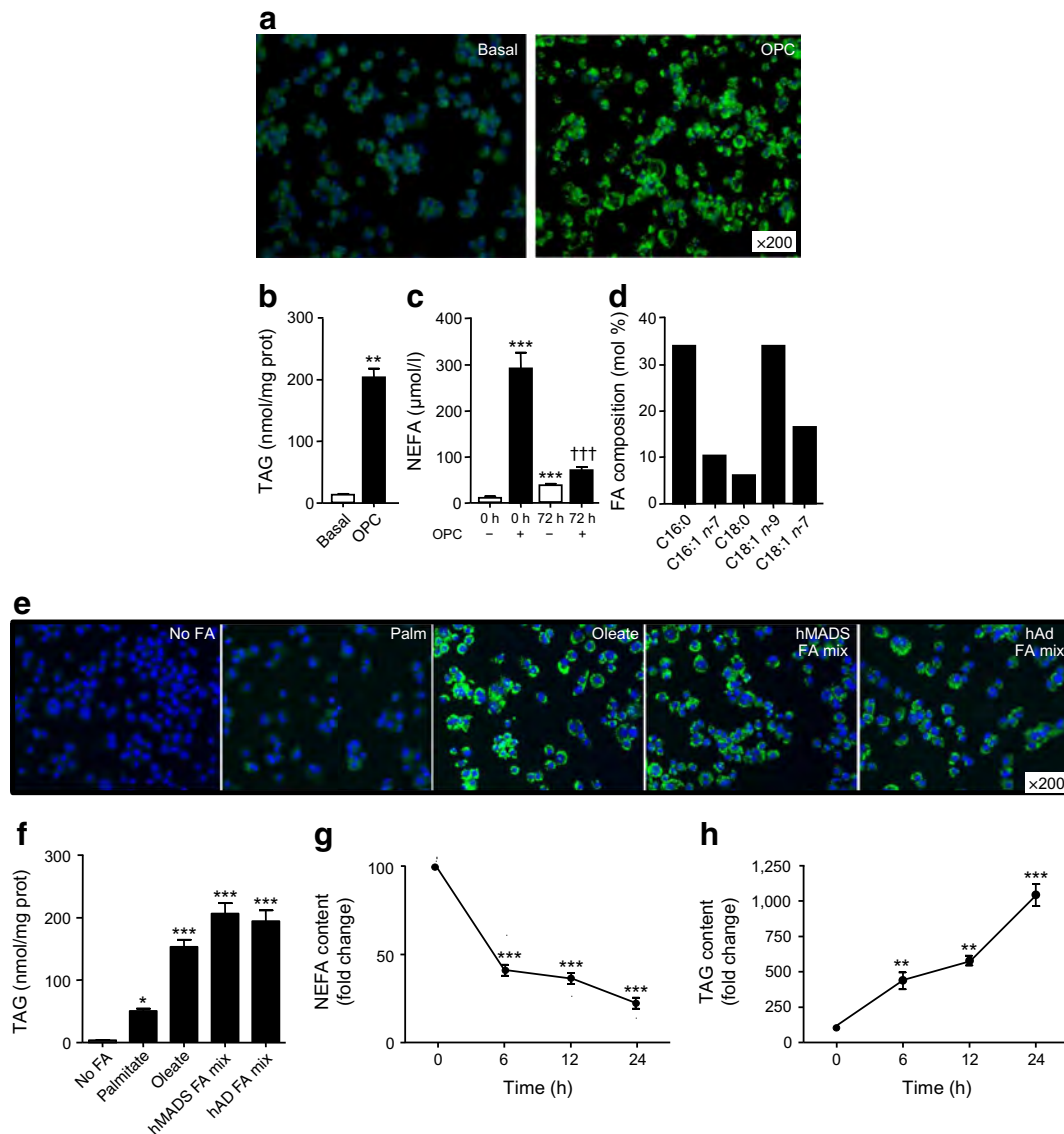
**THP-1 macrophages readily store TAG in the presence of adipocyte lipolysis-derived FA** Upon treatment with lipolysis-induced conditioned media, THP-1 macrophages accumulated intra-cytoplasmic droplets that gave them the



**Fig. 3** Effects of exogenous FA mixtures on gene expression (a–e) and (f–h) production of ILs and chemokine by THP-1 macrophages. Macrophages were treated with vehicle (no FA; white bars), 350 mmol/l of palmitate, oleate, hMADS adipocyte lipolysis (hMADS FA mix) or human adipocyte lipolysis (hAd FA mix) FA mixtures (black bars). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  relative to the control condition without treatment (white bars) by one-way ANOVA with Bonferroni post hoc test. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of nine different experiments for each condition

appearance of foam cells. These cells were stained with Bodipy, revealing that the droplets were filled with neutral lipids (Fig. 4a). Untreated THP-1 macrophages and





**Fig. 4** Effects of hMADS adipocyte lipolysis conditioned media and exogenous FA mixtures on lipid storage in THP-1 macrophages. **(a)** Fluorescent microscopy of neutral lipid accumulation in macrophages exposed to conditioned media from non-stimulated (basal) or OPC3911-stimulated (OPC) hMADS. Neutral lipid droplets show green fluorescence. **(b)** TAG content in macrophages exposed to conditioned media from non-stimulated (basal) or OPC-stimulated adipocytes.  $**p < 0.01$  relative to control condition by Wilcoxon test. Prot, protein **(c)** NEFA concentration in the macrophage culture medium before and after 72 h of treatment with conditioned media from non-stimulated (-) or OPC-stimulated (+) adipocytes.  $***p < 0.001$  relative to NEFA concentration at time 0 before THP-1 macrophage exposure with conditioned media from non-stimulated hMADS.  $†††p < 0.001$  relative to NEFA concentration at time 0 before macrophage exposure with conditioned media from OPC3911-stimulated hMADS by one-way ANOVA with

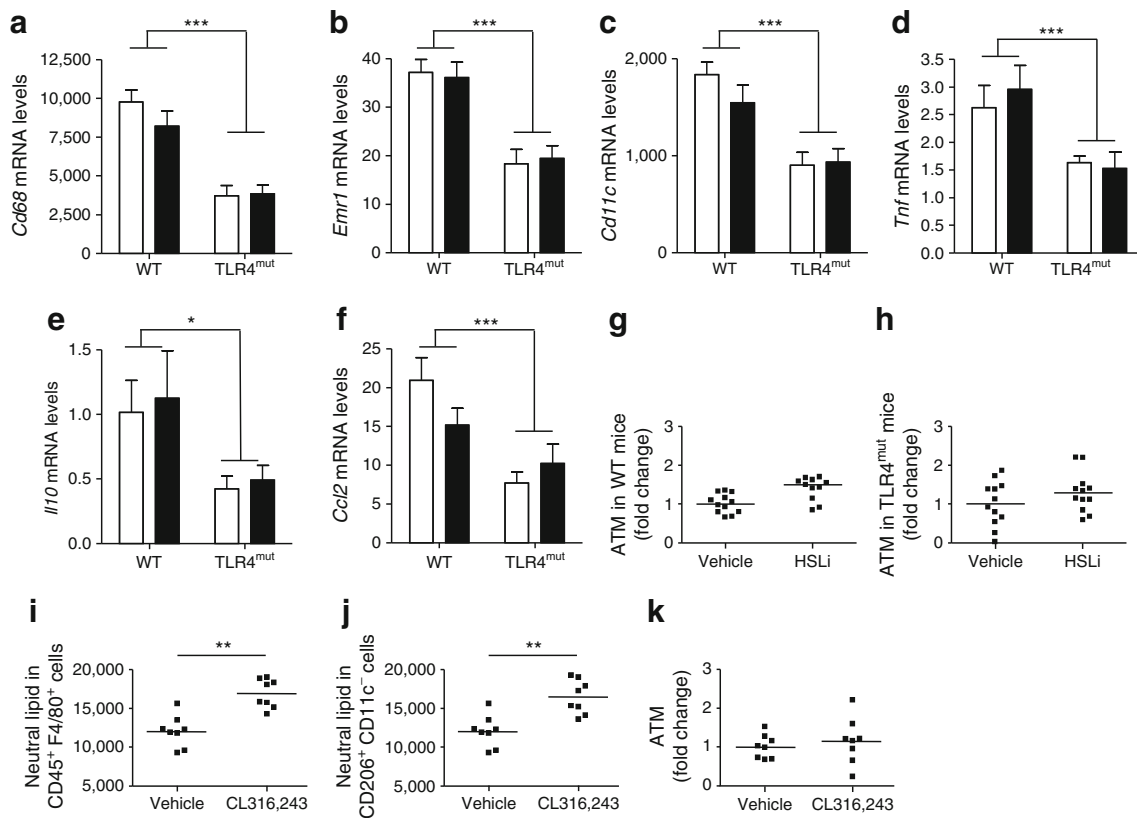
Bonferroni post hoc test. **(d)** FA composition of the macrophage TAG fraction after 72 h of treatment with conditioned media from OPC-stimulated adipocytes. **(e)** Fluorescent microscopy of neutral lipid accumulation in macrophages treated with vehicle (no FA) and 350 mmol/l of palmitate (Palm), oleate, in vitro hMADS adipocyte lipolysis (hMADS FA mix) or ex vivo human adipocyte lipolysis (hAd FA mix) FA mixtures. Neutral lipid droplets and nuclei show green and blue fluorescence, respectively. **(f)** TAG content in macrophages exposed to FA mixtures.  $*p < 0.05$ ,  $***p < 0.001$  relative to no FA condition by one-way ANOVA with Bonferroni post hoc test. Prot, protein. Time course of **(g)** NEFA concentrations in culture media and **(h)** TAG content of macrophages exposed to hMADS adipocyte lipolysis FA mixture.  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$  relative to T0 by one-way ANOVA with Bonferroni post hoc test. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of three to nine different experiments for each condition

macrophages treated with unstimulated conditioned media contained few intracellular stained structures, whereas abundant staining was observed in THP-1 macrophages treated with conditioned media from OPC3911-treated adipocytes. To determine the nature of the neutral lipids stored in the

droplets, we analysed the lipid composition of the cellular fractions of THP-1 cells. Neutral lipids accumulating in THP-1 macrophages were TAG (Fig. 4b). At the same time, NEFA concentration in the culture medium from THP-1 cells exposed to conditioned media from OPC3911-treated

adipocytes drastically fell after 72 h of culture (Fig. 4c). Conditioned media from OPC3911-treated adipocytes increased gene expression of lipid transport and storage molecules, *ADRP* (also known as *PLIN2*) and *CD36*, in THP1 cells (ESM Fig. 4). Overall, the FA profile of the THP-1 TAG subfraction (Fig. 4d) reflected that of both the lipolysis conditioned media (Fig. 1e) and the hMADS adipocyte TAG (Fig. 1c). When cultured in medium supplemented with FA mixtures, THP-1 macrophages exhibited plentiful intracellular Bodipy-stained structures that were not observed in THP-1 cells maintained in FA-free conditions (Fig. 4e). TAG accumulation was similar using oleate alone, FA mixtures containing de novo lipogenesis- or diet-derived FAs, and much higher than when palmitate alone was added to macrophages (Fig. 4e, f). The two FA mixtures stimulated gene expression of *ADRP* and *CD36* (ESM Fig. 4). Using de novo lipogenesis-derived FA mixture, TAG content gradually increased with time in THP-1 cells, whereas NEFA level in the media decreased in a concomitant manner (Fig. 4g, h).

**In vivo modulation of lipolysis impacts lipid accumulation but not inflammation in ATMs** In mice, lipid mobilisation from fat stores is maximal during the daily resting phase. To investigate the in vivo relationship between AT lipolysis and inflammation, we treated two strains of high-fat diet-fed mice in the morning with the antilipolytic drug HSLi for 15 days. C3H/HeOuJ mice have intact TLR4 signalling (WT), whereas C3H/HeJ mice show defective TLR4 signalling (*TLR4<sup>mut</sup>*) [24]. The chronic inhibition of lipolysis was shown by a robust decrease in plasma glycerol levels in the two strains (ESM Fig. 5a). Gene expression of ATM markers such as *CD68* (*Cd68*), *F4/80* (*Emr1* also known as *Adgre1*) and *CD11c* (*Cd11c* also known as *Itgax*) was significantly lower in *TLR4<sup>mut</sup>* mice than in WT mice (Fig. 5a–c). Deficiency in TLR4 signalling also showed lower mRNA levels of pro- (*Tnf*) and anti- (*Il10*) inflammatory markers and of the chemokine MCP1 (*Ccl2*) (Fig. 5d–f). Chronic inhibition of lipolysis had no effect on ATM- and inflammation-related marker gene expression. Accordingly, treatment with HSLi did not modify ATM content determined by flow cytometry (Fig. 5g, h).



**Fig. 5** In vivo effect of chronic inhibition and acute stimulation of lipolysis on ATMs. (a–f) mRNA levels in epididymal AT from C3H/HeJ carrying a mutation of *TLR4* (*TLR4<sup>mut</sup>*) and C3H/HeOuJ (WT) obese male mice treated with vehicle (white bars) or HSLi for 2 weeks (black bars); 12 animals per group. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  between WT and *TLR4<sup>mut</sup>* mice by two-way ANOVA with Bonferroni post hoc test. (g, h) Quantitation of ATMs (CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> cells) by flow cytometry. (i, j)

Neutral lipid (Bodipy mean fluorescence) in AT total macrophages (CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> cells) and M2 macrophages (CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>) of male C3H/HeOuJ mice treated with vehicle or lipolytic agent CL 316,243 for 14 h. \*\* $p < 0.01$  between the two groups by Mann–Whitney test. (k) Quantitation of ATMs (CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> cells) by flow cytometry. (g–k) Squares indicate data from individual mice and lines indicate means

To show *in vivo* lipid accumulation in ATMs consecutive with stimulated fat cell lipolysis, C3H/HeOJ mice were injected with the  $\beta_3$ -adrenergic agonist CL316,243. An increase in plasma glycerol level was observed at 6 and 14 h post-injection (ESM Fig 5b). At 14 h after injection of the lipolytic drug, there was a robust accumulation of neutral lipids in ATMs (Fig. 5i, j). This increase occurred without changes in ATM number (Fig. 5k). There was no modification of ATM phenotypes, i.e. the percentage of CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD206<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>, CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> and CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD206<sup>-</sup>CD11c<sup>-</sup> cells was unchanged (data not shown). Immunohistochemistry of AT sections showed no difference between vehicle and treated animals in the low number of crown-like structures, i.e. macrophages scavenging lipids released by necrotic adipocytes (ESM Fig. 5c).

## Discussion

In the present study, we investigated the effects of adipocyte lipolysis products, notably FAs, on human ATM activation. During lipolysis, FAs and other molecules are released from fat cells. Using *in vitro* and *in vivo* approaches, we showed that stimulation or inhibition of adipocyte lipolysis does not modulate the inflammation-related response of macrophages. Our results also rule out a role for TLR4, a receptor of innate immunity activated by saturated FA, in lipolysis-derived FA activation of macrophages. ATMs, however, play a role in scavenging FAs released by fat cell lipolysis. Our data suggest that, in usual dietary conditions, FAs released from fat cells are unlikely to be major determinants of ATM activation.

Mouse studies suggest that saturated FAs induce a proinflammatory response by ATMs [12–14, 25]. These effects are mostly dependent on TLR4. However, some studies argue against a direct activation of TLR4 signalling by saturated FAs [26, 27]. Recently, evidence for resolution of this paradox was provided. Fetuin-A, a liver-derived glycoprotein, acts as an adaptor between saturated FAs and TLR4 allowing activation of intracellular signal transduction pathways [28, 29]. In our *in vitro* experiments, the concentration of fetuin-A provided by FBS was sufficient to ensure maximal effect of the adaptor protein [29]. Indeed, addition of the saturated FA, palmitate, elicited an inflammatory response on macrophages. Therefore, the lack of immune response induced by FA mixtures similar in composition either to lipolytic media containing FA derived from *de novo* lipogenesis [30] or to *ex vivo* human AT lipolysis containing FA derived from the diet [19, 31] cannot be ascribed to the absence of an adaptor protein. Instead, the concentration and nature of the FAs released during lipolysis may explain the lack of effect. The concentration

of palmitate required to elicit activation of macrophages is higher than that found during AT lipolysis [29, 32]. Mono-unsaturated FAs do not stimulate TLR4-mediated activation of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) [29, 33]. Unsaturated FAs have been shown to inhibit the LPS-induced NF- $\kappa$ B signalling pathway in macrophages [25, 34]. Moreover, monounsaturated FAs, such as oleate, protect against various lipotoxic effects of palmitate [35–39]. The protective effects of oleate are reported at concentrations lower or equimolar to that of palmitate. In lipolysis-derived FA mixtures, the concentration of oleate is higher than that of palmitate and the ratio of monounsaturated to saturated FAs is above 1. Therefore, it is likely that the concentration of saturated FAs and the ratio of monounsaturated to saturated FAs produced during adipocyte lipolysis concur with the absence of an inflammatory response in macrophages. *In vivo*, acute stimulation and chronic inhibition of AT lipolysis did not modulate the AT immune response. Consistent with *in vitro* data, the mouse studies show that TLR4 was not involved in this adaptation. *In vivo*, stimulation of lipolysis promoted accumulation of neutral lipids in ATMs without change in number and phenotypes. Lipid droplet accumulation into ATMs occurred without a change in the number of crown-like structures that result from the recruitment of macrophages around dead adipocytes, which is a TLR4-dependent mechanism [24, 40, 41]. These data point to the presence of lipids from dead adipocytes rather than to FAs released from lipolysis in eliciting the proinflammatory response through TLR4-dependent signalling.

AT lipolysis-derived FAs were readily stored into macrophage TAGs as multilocular lipid droplets. The rapid fall in NEFA concentrations in the medium demonstrates the propensity of macrophages to efficiently absorb local excess of lipids. Accordingly, mouse ATMs accumulate lipids in response to lipolysis during fasting [42]. Here, we showed that this accumulation occurs during acute stimulation of lipolysis. The data indicate a role for ATMs as a buffer for local increase in FA concentrations. The uptake and metabolism of FAs in macrophages may modify their phenotype as shown in several recent studies [43, 44]. Along with this hypothesis, *in vivo* impairment of FA catabolism in ATMs that have accumulated lipids has systemic and local consequences [45]. However, long term lipid accumulation in ATMs promotes M1 polarisation and AT inflammation [46]. Together, these results suggest there is no association between fat cell lipolysis-derived FA uptake and subsequent storage as TAGs in ATMs and the induction of inflammatory pathways.

In summary, FAs released during AT lipolysis do not induce TLR4-mediated production of cytokines, chemokines and ILs by ATMs. Instead, macrophages scavenge FAs in excess and convert them into TAG stored within multilocular lipid droplets. This may reflect an adaptive function of ATMs to preserve AT homeostasis in times of moderate- or short-

term increase in lipid flux within AT, a mechanism that might be overridden with excess supply of saturated fat in the diet.

**Acknowledgements** We gratefully acknowledge the GenoToul Animal Care, Anexplo, Quantitative Transcriptomic (F. Martins and J. J. Maoret) facility. We especially thank M. Combes (Obesity Research Laboratory, I2MC) for expert technical assistance. DL is a member of Institut Universitaire de France.

**Funding** This work was supported by grants from Fondation pour la Recherche Médicale (to DL), Agence Nationale de la Recherche (LIPOB and OBELIP projects to DL), Région Midi-Pyrénées (to DL) and the Commission of the European Communities (Projects DioGenes, ADAPT and DIABAT to DL).

**Duality of interest** The authors declare that there is no duality of interest associated with this manuscript.

**Contribution statement** SCB, CIK, DL designed the research, analysed the data and wrote the manuscript. SCB, CIK, CL, IV, EM, DB, GT, MAM, AZG, CP, MH, LM, SN, CM performed the present study, contributed to analysis and interpretation of data and to critical revision of the manuscript. All authors approved the version to be published. DL is the guarantor of this work.

## References

- Lumeng CN, Saltiel AR (2011) Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J Clin Invest* 121:2111–2117
- Olefsky JM, Glass CK (2010) Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol* 72:219–246
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112:1796–1808
- Xu H, Barnes GT, Yang Q et al (2003) Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112:1821–1830
- Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM (1996) IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- $\alpha$ - and obesity-induced insulin resistance. *Science* 271:665–668
- Kanda H, Tateya S, Tamori Y et al (2006) MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* 116:1494–1505
- Duncan RE, Ahmadian M, Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Sul HS (2007) Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annu Rev Nutr* 27:79–101
- Langin D, Arner P (2006) Importance of TNF $\alpha$  and neutral lipases in human adipose tissue lipolysis. *Trends Endocrinol Metab* 17:314–320
- Samuel VT, Petersen KF, Shulman GI (2010) Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *Lancet* 375:2267–2277
- Suganami T, Nishida J, Ogawa Y (2005) A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:2062–2068
- Lee JY, Sohn KH, Rhee SH, Hwang D (2001) Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 276:16683–16689
- Nguyen MT, Favelyukis S, Nguyen AK et al (2007) A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J Biol Chem* 282:35279–35292
- Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS (2006) TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 116:3015–3025
- Suganami T, Tanimoto-Koyama K, Nishida J et al (2007) Role of the Toll-like receptor 4/NF- $\kappa$ B pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:84–91
- Tsukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB et al (2007) Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56:1986–1998
- Bezaire V, Mairal A, Ribet C et al (2009) Contribution of adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase to lipolysis in hMADS adipocytes. *J Biol Chem* 284:18282–18291
- Tavernier G, Galitzky J, Valet P et al (1995) Molecular mechanisms underlying regional variations of catecholamine-induced lipolysis in rat adipocytes. *Am J Physiol* 268:E1135–E1142
- Langin D, Dicker A, Tavernier G et al (2005) Adipocyte lipases and defect of lipolysis in human obesity. *Diabetes* 54:3190–3197
- Raclot T, Langin D, Lafontan M, Groscolas R (1997) Selective release of human adipocyte fatty acids according to molecular structure. *Biochem J* 324:911–915
- Caspar-Bauguil S, Fioroni A, Galinier A et al (2012) Pro-inflammatory phospholipid arachidonic acid/eicosapentaenoic acid ratio of dysmetabolic severely obese women. *Obes Surg* 22:935–944
- Girousse A, Tavernier G, Valle C et al (2013) Partial inhibition of adipose tissue lipolysis improves glucose metabolism and insulin sensitivity without alteration of fat mass. *PLoS Biol* 11:e1001485
- Viguerie N, Montastier E, Maoret JJ et al (2012) Determinants of human adipose tissue gene expression: impact of diet, sex, metabolic status, and cis genetic regulation. *PLoS Genet* 8:e1002959
- Ii M, Matsunaga N, Hazeki K et al (2006) A novel cyclohexene derivative, ethyl (6R)-6-[N-(2-Chloro-4-fluorophenyl)sulfamoyl]cyclohex-1-ene-1-carboxylate (TAK-242), selectively inhibits toll-like receptor 4-mediated cytokine production through suppression of intracellular signaling. *Mol Pharmacol* 69:1288–1295
- Vila IK, Badin PM, Marques MA et al (2014) Immune cell Toll-like receptor 4 mediates the development of obesity- and endotoxemia-associated adipose tissue fibrosis. *Cell Rep* 7:1116–1129
- Lee JY, Plakidas A, Lee WH et al (2003) Differential modulation of Toll-like receptors by fatty acids: preferential inhibition by n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res* 44:479–486
- Enridge C, Samani NJ (2009) Saturated fatty acids do not directly stimulate Toll-like receptor signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29:1944–1949
- Schaeffler A, Gross P, Buettner R et al (2009) Fatty acid-induced induction of Toll-like receptor-4/nuclear factor- $\kappa$ B pathway in adipocytes links nutritional signalling with innate immunity. *Immunology* 126:233–245
- Heinrichsdorff J, Olefsky JM (2012) Fetuin-A: the missing link in lipid-induced inflammation. *Nat Med* 18:1182–1183
- Pal D, Dasgupta S, Kundu R et al (2012) Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. *Nat Med* 18:1279–1285
- Collins JM, Neville MJ, Pinnick KE et al (2011) De novo lipogenesis in the differentiating human adipocyte can provide all fatty acids necessary for maturation. *J Lipid Res* 52:1683–1692
- Hodson L, Skeaff CM, Fielding BA (2008) Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake. *Prog Lipid Res* 47:348–380
- Huang S, Rutkowski JM, Snodgrass RG et al (2012) Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways. *J Lipid Res* 53:2002–2013



33. Dasu MR, Jialal I (2011) Free fatty acids in the presence of high glucose amplify monocyte inflammation via Toll-like receptors. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300:E145–E154
34. Chang CF, Chau YP, Kung HN, Lu KS (2012) The lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory response in RAW264.7 cells is attenuated by an unsaturated fatty acid-bovine serum albumin complex and enhanced by a saturated fatty acid-bovine serum albumin complex. *Inflamm Res* 61:151–160
35. Collins JM, Neville MJ, Hoppa MB, Frayn KN (2010) De novo lipogenesis and stearoyl-CoA desaturase are coordinately regulated in the human adipocyte and protect against palmitate-induced cell injury. *J Biol Chem* 285:6044–6052
36. Ishiyama J, Taguchi R, Akasaka Y et al (2011) Unsaturated FAs prevent palmitate-induced LOX-1 induction via inhibition of ER stress in macrophages. *J Lipid Res* 52:299–307
37. Kadotani A, Tsuchiya Y, Hatakeyama H, Katagiri H, Kanzaki M (2009) Different impacts of saturated and unsaturated free fatty acids on COX-2 expression in C(2)C(12) myotubes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297:E1291–E1303
38. L'Homme L, Esser N, Riva L et al (2013) Unsaturated fatty acids prevent activation of NLRP3 inflammasome in human monocytes/macrophages. *J Lipid Res* 54:2998–3008
39. Staiger K, Staiger H, Weigert C, Haas C, Haring HU, Kellerer M (2006) Saturated, but not unsaturated, fatty acids induce apoptosis of human coronary artery endothelial cells via nuclear factor-kappaB activation. *Diabetes* 55:3121–3126
40. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G et al (2005) Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res* 46:2347–2355
41. Saberi M, Woods NB, de Luca C et al (2009) Hematopoietic cell-specific deletion of Toll-like receptor 4 ameliorates hepatic and adipose tissue insulin resistance in high-fat-fed mice. *Cell Metab* 10:419–429
42. Kosteli A, Sogutcu E, Haemmerle G et al (2010) Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue. *J Clin Invest* 120:3466–3479
43. Huang SC, Everts B, Ivanova Y et al (2014) Cell-intrinsic lysosomal lipolysis is essential for alternative activation of macrophages. *Nat Immunol* 15:846–855
44. Klein-Wieringa IR, Andersen SN, Kwekkeboom JC et al (2013) Adipocytes modulate the phenotypic of human macrophages through secreted lipids. *J Immunol* 191:1356–1363
45. Xu X, Grijalva A, Skowronski A, van Eijk M, Serlie MJ, Ferrante AW Jr (2013) Obesity activates a program of lysosomal-dependent lipid metabolism in adipose tissue macrophages independently of classic activation. *Cell Metab* 18:816–830
46. Prieur X, Mok CY, Velagapudi VR et al (2011) Differential lipid partitioning between adipocytes and tissue macrophages modulates macrophage lipotoxicity and M2/M1 polarization in obese mice. *Diabetes* 60:797–809



## **Role of nuclear receptors PPAR $\gamma$ and PPAR $\alpha$ in white-to-brown conversion of human white adipocytes**

**Summary:** Two types of adipose tissue are present in mammals, white and brown adipose tissue. White adipose tissue (WAT) is specialized in storage and release of lipids, and brown adipose tissue (BAT) is specialized in energy dissipation as heat through the mitochondrial uncoupling protein 1 (UCP1). In humans, thermogenically-competent brown adipose tissue is negatively associated with body mass index and diabetes. BAT is composed of two distinct types of thermogenic cells, classical brown adipocytes located in specific depots and brite adipocytes (brown-in white). In mice, these cells appear in WAT upon cold exposure and are protective against obesity-induced insulin resistance. Therefore, fighting obesity through “browning” of white adipose tissue emerges as a promising strategy. However, the ability of human white adipocytes to acquire a brown/brite phenotype is not yet understood. Here, we aimed at identifying the molecular and metabolic changes associated with the white-to-brown conversion of human mesenchymal adipose-derived stem (hMADS) cells following treatment by agonists of the nuclear receptor PPAR $\gamma$  or PPAR $\alpha$ .

First, we demonstrated *in vitro* that PPAR $\gamma$  or PPAR $\alpha$  agonists similarly induce white-to-brown conversion of hMADS cells into brite adipocytes that possess high mitochondrial content and express UCP1. Second, we showed that browning is associated with profound metabolic changes. The lipolytic machinery and fatty acid re-esterification was stimulated by the two treatments, resulting in a futile cycle. These adaptations combined with an increase of fatty acid  $\beta$  oxidation provide substrates to sustain the high level of mitochondrial thermogenesis. In contrast, glucose uptake and oxidation are decreased through inactivation of the pyruvate dehydrogenase by PDK4. Consequently, glucose-carbons are redirected towards glyceroneogenesis to provide the glycerol-3-phosphate backbone necessary for triglyceride esterification. Thus, brite adipocyte metabolism is modified to promote fatty acid utilization as the main energy source.

In order to confirm the involvement of PPAR $\alpha$  in inducing browning *in vivo*, we treated mice with inactivation of the PPAR $\alpha$  gene with a  $\beta_3$ -adrenergic agonist. In subcutaneous WAT, expression of BAT- and brite-specific markers was lower in PPAR $\alpha$  knock out than in wild type mice, confirming that PPAR $\alpha$  is required for WAT browning.

Altogether, this study shows that PPAR $\gamma$  and PPAR $\alpha$  activation in human white adipocytes promotes browning associated with an increase in fatty acid utilization without enhancement of glucose metabolism. These metabolic changes favor intra-adipose fatty acid utilization and thus could diminish plasma fatty flux for ectopic storage into insulin-sensitive tissues.