



**HAL**  
open science

# Effet des acides gras polyinsaturés sur la conversion des adipocytes blancs en adipocytes brites

Rayane Ghandour

► **To cite this version:**

Rayane Ghandour. Effet des acides gras polyinsaturés sur la conversion des adipocytes blancs en adipocytes brites. Sciences agricoles. Université Nice Sophia Antipolis, 2016. Français. NNT : 2016NICE4010 . tel-01343180

**HAL Id: tel-01343180**

**<https://theses.hal.science/tel-01343180v1>**

Submitted on 7 Jul 2016

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

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

**UNIVERSITE NICE SOPHIA-ANTIPOLIS UFR SCIENCE**

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

**THESE**

**Pour obtenir le titre de**

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

**Mention : Interactions Cellulaires et Moléculaires**

Soutenu par

**Rayane A. GHANDOUR**

**Effets des acides gras polyinsaturés sur la conversion des  
adipocytes blancs en adipocytes brites**

Le 6 avril 2016 devant le jury composé de :

**Professeur Dominique Langin  
Docteur Annie Quignard-Boulangé  
Docteur Hervé Guillou  
Docteur Nathalie Billon  
Docteur Didier Pisani**

**Président  
Rapportrice  
Rapporteur  
Examinatrice  
Examineur**



# Remerciements

---

Je tiens en premier lieu à adresser mes sincères remerciements au docteur Annie Quignard-Boulangier et au docteur Hervé Guillou qui ont donné de leur temps pour juger mon travail de thèse. Je remercie également le docteur Nathalie Billon d'avoir accepté d'être examinatrice de ma thèse et le professeur Dominique Langin pour l'intérêt qu'il a donné à mes travaux en acceptant de présider le jury de ma thèse.

Je remercie le Professeur Gérard Ailhaud pour ses découvertes passées qui ont permis l'émergence de nos projets.

**Zoubir**, je te remercie d'avoir cru en moi et d'avoir été toujours à côté de moi depuis le premier jour de mon stage en 2011 et puis au cours de ces trois ans de doctorat. Je te remercie de m'avoir donné l'opportunité de présenter nos travaux dans des congrès nationaux et internationaux. Merci pour la confiance que tu m'as accordée et qui a renforcé ma confiance en moi-même. Merci pour ta question : « Qu'est ce qui ne va pas ? », pour tes encouragements : « t'inquiète pas, quand tu te trompes ça veut dire que tu travailles » et pour ta compréhension. Je suis très fière d'être parmi vous et j'espère que tu es content du travail que j'ai fait ces dernières années. Finalement en te remerciant, je ne peux que remercier Tala, car grâce à elle je suis ici aujourd'hui et pour qui je serai toujours reconnaissante.

**Didier...** Je ne sais pas par où commencer et quoi écrire. En résumé, je dirai que si je sais faire quoi que ce soit dans la recherche c'est grâce à toi. Merci pour la confiance que tu m'as accordée depuis que j'étais « jeune ». Merci pour toutes les discussions scientifiques, pour les répétitions des explications quand mon cerveau déconnecte. Je mémoriserai toujours tes phrases : « tu sais quoi, tu fais ce que tu veux tu es grande maintenant », « comme mes gosses quoi, je ne suis pas ton père » et tes menaces « tu vas voir je vais te sortir ça le jour de ta thèse ». A chaque fois que quelqu'un me demandait avec qui je travaille j'étais très fière de répondre « je suis l'étudiante de Didier ». Un grand merci pour Marina aussi qui m'a beaucoup défendue.

Merci **Jean Claude** pour les discussions intéressante qu'on a eu et pour le temps que tu as passé à m'écouter quand ça ne va pas. Je te souhaite tout le bonheur et toute la santé.

**Maude**, ma collègue qui a fini par être mon amie. Grâce à toi je suis devenue adolescente comme tu dis. Merci pour ton esprit... qui m'a initié à la vie en couple. Merci pour tes émotions, ils comptent beaucoup pour moi. Merci d'être à côté de moi le jour de ma thèse même si tu m'as laissée seule les 5 derniers mois. Je garderai toujours en souvenirs les crises de dépression que nous avons eu quelques dimanches au labo. Que du bonheur pour toi et ton schätzchen. J'espère vous voir bientôt au Liban.

Merci **Guillaume** j'espère que les années qui viennent t'apporteront de la chance et du bonheur. Merci à toutes les stagiaires que j'ai eu l'occasion de connaître, **Romane** (tu es brillante), **Günseli** la plus jolie et la plus mignonne (merci pour tes messages ça m'a bien touché), **Clémence** (tu mérites tout le bien) et **Amanda** (le sourire du labo en ce moment).

Merci pour le Dr. **Christian Dani**, pour **Claudine**, **Nicole**, **Pascal**, **Brigitte**, **Hédi**, **Claude** (pour ton humour et ta phrase du matin « t'as un beau voile aujourd'hui »), **Anne-Laure** (pour ta gentillesse, ton aide, tes messages et tes mails), **Annie** (pour tes conseils, pour l'intérêt que tu donnes à nous les étudiants et pour tes propositions d'aide surtout au début de mon stage de master), **Nico** (pour tes blagues, ton exemplaire de thèse et le stress que tu m'as mis avant que je commence la rédaction), **Chris** (pour ta gentillesse lorsque la dose de méchanceté des autres était au max et pour l'Haïkido que tu as pratiqué sur moi), **Martin** (pour ta finesse quand je suis pas bien, ta méchanceté quand je suis bien et pour ton soutien) et **Xi** (for your hello every morning).

**Julian** ou chouchou comme dit Didier, merci pour les matchs de foot et de basket, pour me chercher et me ramener, pour avoir été mon sac de boxing cette dernière année, pour ta « gentillesse », pour tous tes messages et surtout pour le lapin Lindor !!!!!

Merci **khalto Amal et ammo Hicham** pour m'avoir hébergée tout le long de mon séjour en France, pour toutes les fois où vous m'avez conduit à Sophia, au labo et à l'aéroport et pour toutes les aides que vous m'avez offert. Merci **Hamoudi et Karim** pour votre chambre et pour les années que nous avons partagées.

Je remercie tous les membres de ma grande famille, particulièrement **habibi jiddo, khalo Ibrahim, khalo Hamoudi. Khalo Abboudi, khalto joujou, khalto Ayda** et tous mes cousins et cousines.

**Teta** merci pour ton esprit qui ne m'a pas quitté aucune seconde, je voyais toujours tes yeux devant moi. J'aurais aimé que tu sois parmi nous.

Merci à ma belle-famille et surtout à **Rola** pour leur soutien.

**Sana**, ayeto d'amour, merci pour ta maison, pour tes conseils, pour les changements que j'ai faits grâce à toi, pour avoir été à côté de moi dans les situations les plus difficiles, pour les aides dans la rédaction, pour me remonter le moral, pour tout ce que nous avons partagé ces dernières années même si tu es parti à Paris sans retour...

**Mama w baba**.... Le principal but de cette thèse est de voir cette étincelle de joie dans vos yeux. Si je passe toute une vie entière à vous remercier ça ne me suffira pas. Merci pour être toujours près de moi et de mes problèmes. Merci pour tous les types de soutien. Allou2 (El 7anouné) w Hamoudi to2broune. Vous êtes ma fierté.

Merci à **Ali et Sarah** qui m'ont donné la joie de ma vie « **MARIA** ». Merci Maria pour tes photos qui m'ont bien soutenu lors des pires moments de la rédaction de cette thèse.

**Mostafa**... Tu étais la boule qui a absorbé tout le stress que j'ai eu ces derniers mois. Merci pour tout ce que tu as fait pour que je me sente bien, pour tout ce que tu as supporté suite à mon stress. Je serai toujours reconnaissante à cette thèse qui a commencé par notre rencontre en 2012 et qui a fini par notre union en 2016. Cette thèse qui m'a guidé vers ma plus belle découverte « **TOI** ». Hayete killa enta. Que notre union soit éternelle.

*Pour Maman, Papa et l'esprit de Mamie...*



# Table des Matières

---

<b>Table des Matières</b> .....	<b>1</b>
<b>Table des Figures</b> .....	<b>5</b>
<b>Abbreviations</b> .....	<b>9</b>
<b>Avant propos</b> .....	<b>13</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>15</b>
<b>Partie I Le tissu adipeux (TA)</b> .....	<b>17</b>
1 Le tissu adipeux blanc (TAB).....	17
1.1 Anatomie du TAB.....	18
1.2 Les cellules du TAB .....	19
1.2.1 Les adipocytes.....	19
1.2.2 Les cellules non-adipocytaires .....	21
1.3 Fonctions du TAB.....	22
1.3.1 Stockage de l'énergie.....	22
1.3.1.1 Le transport des AGs.....	23
1.3.1.2 La Lipoprotéine Lipase (LPL) .....	25
1.3.1.3 Le transport des AGs dans le TAB .....	25
1.3.1.4 La lipogenèse de novo .....	27
1.3.2 La synthèse des TGs.....	30
1.3.3 La lipolyse .....	32
1.3.3.1 Les lipases .....	32
1.3.3.1.1 L'Adipose Triglyceride Lipase (ATGL) .....	33
1.3.3.1.2 La lipase hormono-sensible (HSL) .....	33
1.3.3.1.3 La Monoglyceride Lipase (MGL).....	34
1.3.3.2 Les inducteurs de la lipolyse .....	34
1.3.3.3 Les inhibiteurs de la lipolyse .....	36
1.3.4 La sécrétion des adipokines .....	36
1.3.4.1 La leptine .....	37
1.3.4.2 L'adiponectine .....	37
1.3.4.3 La visfatine .....	38
1.4 La différenciation adipocytaire ou adipogenèse .....	38
1.4.1 Les inducteurs de l'engagement et de la différenciation adipocytaire .....	39
1.4.2 Les facteurs de transcription adipogénique .....	41

1.4.2.1	La famille des C/EBPs .....	41
1.4.2.2	La famille des PPARs .....	42
1.4.2.3	Les autres facteurs de transcription .....	44
2	Le tissu adipeux brun (TABr) .....	45
2.1	Historique .....	45
2.2	Anatomie du TABr .....	47
2.3	L'adipocyte brun.....	48
2.4	Les adipocytes « brites » ou beiges.....	49
2.5	La capacité thermogénique.....	50
2.5.1	Le découplage de la respiration mitochondriale .....	51
2.5.2	La protéine découplante 1 (UCP1).....	52
2.5.3	Activité de la protéine UCP1 .....	53
2.5.4	La mitochondrie .....	55
2.5.4.1	La mitochondriogenèse .....	56
2.5.4.2	Le changement morphologique.....	57
2.5.5	La lipolyse .....	59
2.5.6	La $\beta$ -oxydation .....	59
2.5.7	Les différents substrats énergétiques.....	61
2.6	Régulation de l'activité thermogénique.....	62
2.6.1	Les récepteurs $\beta$ -adrénergiques .....	62
2.6.2	Les peptides natriurétiques (NPs).....	64
2.6.3	Les hormones thyroïdiennes .....	65
2.6.4	TRPM8.....	65
2.6.5	Les autres activateurs .....	65
2.7	Origines des adipocytes brites .....	67
2.7.1	Origines développementales des préadipocytes brites.....	67
2.7.2	Précurseurs des adipocytes brites dans le TAB .....	68
2.7.3	La conversion des adipocytes blancs en brites .....	69
2.8	Les activateurs de la conversion des adipocytes blancs en brites .....	70
2.8.1	Les modulateurs moléculaires .....	70
2.8.1.1	PPAR $\gamma$ .....	71
2.8.1.2	PGC-1 $\alpha$ .....	72
2.8.1.3	C/EBP $\beta$ et PRDM16 .....	72
2.8.1.4	Micro ARNs (miR).....	72
2.8.1.5	Foxc2.....	73
2.8.2	Les facteurs extracellulaires .....	73
2.8.2.1	L'irisine .....	73

2.8.2.2	« Fibroblast Growth Factor-21 » (FGF21) .....	74
2.8.2.3	Les acides biliaires.....	74
3	Les cellules hMADS.....	76
3.1	Généralités .....	76
3.2	La différenciation adipocytaire des cellules hMADS .....	77
<b>Partie II</b>	<b>Les Acides Gras .....</b>	<b>79</b>
1	Généralités .....	79
1.1	Nomenclature .....	80
1.2	La biosynthèse des AGs.....	81
2	Les acides gras poly insaturés (AGPIs) à longue chaîne .....	83
2.1	L'essentialité des AGPIs.....	83
2.2	Sources Alimentaires des AGPIs essentiels .....	84
2.2.1	Les AGPIs $\omega$ 6 .....	84
2.2.2	Les AGPIs $\omega$ 3.....	85
2.3	Les apports nutritionnels conseillés d'AGPIs essentiels chez l'adulte.....	85
2.4	Le métabolisme des AGPIs essentiels.....	86
2.5	Les fonctions générales des AGPIs essentiels .....	87
2.5.1	Fonction structurale .....	88
2.5.2	Fonction énergétique .....	89
2.5.3	Fonction de ligand .....	89
3	Les métabolites oxygénés des AGPIs.....	90
3.1	Les eicosanoïdes.....	91
3.1.1	La voie des cyclooxygénases : les prostanoides.....	92
3.1.1.1	Les PGs de la série 2 dérivées de l'ARA.....	95
3.1.1.1.1	La prostaglandine E2 (PGE2) .....	95
3.1.1.1.2	La Prostaglandine F2 $\alpha$ (PGF2 $\alpha$ ) .....	95
3.1.1.1.3	La prostaglandine D2 (PGD2) .....	96
3.1.1.2	Les thromboxanes dérivés de l'ARA $\omega$ -6.....	96
3.1.1.3	La prostaglandine I2 ou prostacycline (PGI2) .....	97
3.1.2	La voie des lipooxygénases : les leucotriènes.....	98
3.1.3	Les eicosanoïdes dérivés de l'EPA.....	98
3.1.4	Les docosanoïdes.....	99
4	Notion de compétition entre les AGPIs $\omega$ 3 et $\omega$ 6 et impact sur le TA .....	100
4.1	Ratio AGPIs $\omega$ 6/ $\omega$ 3 .....	101
4.2	Effets des AGPIs sur le développement du TA .....	101
4.3	Effet de l'ARA et des PGs sur l'adipogénèse .....	102

4.3.1	PGI2 et adipogenèse .....	104
4.3.2	PGE2 et adipogenèse .....	104
4.3.3	PGF2 $\alpha$ et adipogenèse .....	105
4.3.4	PGD2 et adipogenèse .....	106
<b>OBJECTIFS .....</b>		<b>109</b>
<b>RESULTATS et DISCUSSIONS .....</b>		<b>111</b>
Article 1: .....		117
Discussion 1 .....		119
Article 2: .....		125
Discussion 2 .....		127
Revue: .....		135
<b>CONCLUSION .....</b>		<b>137</b>
<b>Références Bibliographiques .....</b>		<b>141</b>
<b>ANNEXES .....</b>		<b>161</b>
Liste des publications supplémentaires .....		163
Liste des présentations orales .....		177

## Table des Figures

---

Figure 1. Distribution des dépôts de TAB chez l'Homme.....	19
Figure 2. Schéma représentant la structure de la gouttelette lipidique. ....	20
Figure 3. Dessin illustrant les différentes cellules composant le TAB.....	21
Figure 4. Représentation des voies de transport des AGs dans l'organisme et des lipoprotéines impliquées.. ....	24
Figure 5. Hydrolyse des TGs par la LPL et entrée des AGs dans l'adipocyte. ....	27
Figure 6. Schématisation de la lipogenèse adipocytaire de novo. ....	28
Figure 7. Les sources du glycérol-3-phosphate et la voie de synthèse des TGs dans l'adipocyte.....	30
Figure 8. Etat basal de l'ATGL et de la PLIN1. ....	33
Figure 9. Régulation de la lipolyse.....	35
Figure 10. Induction de l'adipogenèse par une cascade de facteurs de transcription. ....	40
Figure 11. Schématisation des étapes engageant la différenciation adipocytaire. ...	44
Figure 12. Localisation du TABr chez l'homme et les rongeurs.....	47
Figure 13. Morphologie du TABr chez la souris.....	48
Figure 14. Description des adipocytes brites.....	50
Figure 15. Schéma représentant la phosphorylation oxydative (en bleu) et le découplage (en rouge) mitochondriaux. ....	52
Figure 16. Schémas de la structure de la protéine UCP1 et du promoteur du gène correspondant.....	53
Figure 17. Illustrations des possibles effets des AGs sur la protéine UCP1. ....	54
Figure 18. Contrôle de l'expression de PGC-1 $\alpha$ et d'UCP1.....	57
Figure 19. Analyse des mitochondries des adipocytes blancs et brites par microscopie électronique à transmission. ....	58
Figure 20. le rôle de la $\beta$ -oxydation dans la thermogenèse. ....	60
Figure 21. Schéma représentant les origines développementales des différents types d'adipocytes.....	68
Figure 22. Mécanisme d'action de KLF11. ....	71
Figure 23. Schéma récapitulatif des différents activateurs de la thermogenèse et de la conversion des adipocytes blancs en brites.....	75

Figure 24. Protocole de différenciation des cellules hMADS. ....	77
Figure 25. Nomenclature des acides gras. ....	80
Figure 26. Schéma représentant la différence entre les animaux et les végétaux dans l'expression des enzymes de désaturation des AGs.. ....	82
Figure 27. Composition des principales huiles riches en acides gras poly-insaturés $\omega$ 6.....	84
Figure 28. Schéma représentant le mécanisme de désaturation des AGs par les stéaroyl-CoA désaturases. ....	87
Figure 29. Biosynthèse des AGs insaturés.....	88
Figure 30. Les principaux facteurs de transcription modulés par les AGPIs $\omega$ 6 et $\omega$ 3. ....	90
Figure 31. Métabolisme de l'acide arachidonique (ARA).....	92
Figure 32. Voies de synthèse des différents métabolites de l'acide arachidonique par les cyclooxygénases (COX).....	93
Figure 33. Représentation des prostaglandines issues de l'acide arachidonique, de leurs récepteurs et des voies de signalisation associées. ....	94
Figure 34. Schéma représentant les molécules pro- et anti-inflammatoires synthétisées à partir de l'ARA, l'EPA et le DHA.....	99
Figure 35. Récapitulatif des effets des différentes prostaglandines sur l'adipogenèse. ....	107
Figure 36. Expression relative de l'ARNm d'UCP1 des cellules traitées par les AGPIs. ....	114
Figure 37. Expression d'ARNm d'UCP1 des cellules traitées par les analogues des prostaglandines.. ....	115
Figure 38. Effet de cPGI2 sur la différenciation adipocytaire et l'expression d'UCP1. ....	120
Figure 39. Effet de la carbaprostacycline sur la lipolyse des cellules hMADS.....	121
Figure 40. Poids corporel et perte de la masse des dépôts adipeux des groupes de souris nourries par un régime riche en LA ou en LNA et traités ou pas par le CL316,243.....	129
Figure 41. Effet des différents régimes alimentaires sur l'expression des gènes au niveau du tissu adipeux brun et sur la lipolyse chez la souris.....	131

Figure 42. Analyse histologique du tissu adipeux brun des souris nourries par un régime riche en LA ou en LNA traitées ou pas par le CL316,243.....	132
Figure 43. Schéma récapitulatif des effets des AGPIs $\omega$ 6 et $\omega$ 3 sur la conversion des adipocytes blancs en brites. ....	140



## Abbreviations

---

2-MAG	2-monoacyl-glycérol
ABHD5/CGI-58	ABHD5/Comparative Gene Identification 58
ACBP	Acyl-Coenzyme A binding Protein
ACC	Acétyl-Coenzyme A Carboxylase
ACLY	Acétyl-Coenzyme A
ACS	Acyl-Coenzyme A Synthétase
AdipoQ	Adiponectine
AdipoR	Adiponectine Receptor
AG	Acides Gras
AGMI	Acides Gras Mono-Insaturés
AGPAT	1-Acylglycérol-3-Phosphate O-Acyltransférase
AGPI	Acides Gras Poly-Insaturés
AGS	Acides Gras Saturés
AKR	Aldo Keto Reductase
AMPc	AMP cyclique
AMPK	AMP-ctivated protein Kinase
Angptl4	Angiopoietin like protein 4
ANP	Atrial Natriuretic Peptide
Apo	Apolipoprotéine
ARA	Acide Arachidonique
ARNm	ARN messenger
ATF	Activating Transcription Factor
ATGL	Adipoce Tri Glyceride Lipase
BAT	Brown Adipose Tissue
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BNP	Brain Natriuretic Peptide
C/EBP	CAAT/ Enhancer Binding Protein
LAP	Liver-enriched transcriptional Activator Protein
LIP	Liver-enriched transcriptional Inhibitory Protein
CACT	Carnitine-Acyl Carnitine Translocase
CHOP	CCAAT-enhancer-binding <i>protein</i> Homologous <i>Protein</i>
ChREBP	Carbohydrates Response Element Binding Protein
CIDEA	Cell Death-Inducing DFFA-Like Effector A
CITED	Cbp/P300-Interacting Transactivator
CoA	Coenzyme A
COX	Cyclooxygénase
cPGES	Cytosolic PGE synthase

cPGI2	carbaprostacycline
CPT	Carnityl-palmitoyltransférase
CPT1M	Carnityl-palmitoyltransférase musculaire
CRE	CREB Response Element
CREB	cAMP Response Element Binding Protein
CtBP	C-terminal-Binding Protein
DAG	DiAcylGlycérol
DGAT	DiacylGlycérol Acyl Transférase
DGLA	Dihomo $\gamma$ -Linoléique Acid
DHA	Docohexanoïc Acid
DIO2	Déiodinase 2
DIk-1/Pref-1	delta-like-1/preadipocyte factor-1
DP	PGD2 receptor
DRP-1	Dynamain Related Protein-1
Ebf2	Early B-cell Factor-2
EET	acides époxyéicosatriénoïques
ELOVLs	Elongation of Very Long Chain fatty acid
EP	PGE2 receptor
EPA	Eicosapentanoïc Acid
FABP	Fatty Acid Binding Protein
FABPpm	Fatty Acid Binding Protein plasma membrane
FADH2	Flavin Adenine Dinucleotide diHydrogen
FADS	Fatty Acid Desaturase
FAS	Fatty Acid Synthase
FAT	Fatty Acid Translocase
FATP	Fatty Acid Transporter Protein
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
Foxc2	Forkhead Box c2
FP	PGF2 $\alpha$ receptor
FSV	Fraction Stroma Vasculaire
G0S2	G0/G1 switch gene 2
G3P	Glycérol-3-Phosphate
G3PDH	Glycérol-3-Phosphate Déshydrogenase
GLP-1R	Glucagon Like Peptide Receptor
GPAT	Glycérol-3-Phosphate Acyltransférase
GPL	Glycéro Phospho Lipids
GR	Glucocorticoïd Receptor
HETE	acides hydroxyéicosatétranoïques
hMADS	human Multipotent Adipose Derived Stem Cells

H-PGDS	Hematopoietic PGD2 synthase
HSL	Hormone Sensitive Lipase
IMC	Indice de Masse Corporelle
IP	PGI2 receptor
IRS	Insuline Receptor Substrate
LA	Linoleic Acid
LNA	$\alpha$ -Linolenic Acid
LOX	Lipooxygénase
LPL	Lipoprotéine lipase
LT	Leucotriène
MAG	MonoAcylGlycerol
MAGT	MonoAcylGlycérol Transférase
MGL	MonoGlyceride Lipase
miR	micro RNA
mPGES	microsomal PGE2 synthase
NP	Natriuretic Peptide
OA	Oleic Acid
PDE	Phosphodiesterase
PDGFR	Platelet Derived Growth Factor Receptor
PG	Prostaglandine
PLIN	Pénilipine
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
PPRE	PPAR Response Element
SCD	stéaroyl-coA désaturases
SREBP	Sterol Response Element Binding Protein
T3	Triiodothyronine
T4	Tétraiodothyroxine
TA	Tissu Adipeux
TAB	Tissu Adipeux Blanc
TABr	Tissu Adipeux Brun
TAB-SC	Tissu Adipeux Blanc Sous-Cutané
TAB-V	Tissu Adipeux Blanc Viscéral
TG	TriGlycéride
TXs	Thromboxanes
UCP	Uncoupling Protein
$\alpha$ -AR	$\alpha$ -Adrenergic Receptor
$\beta$ -AR	$\beta$ -Adrenergic Receptor



## Avant propos

---

L'obésité résulte d'une rupture de la balance entre les apports et les dépenses d'énergie. L'augmentation de la prévalence de cette maladie chez l'Homme au cours de ces dernières années est essentiellement due aux changements de mode de vie et d'habitude alimentaires. Particulièrement, un mode de vie sédentaire couplé à un apport énergétique important peut être à l'origine de l'obésité et des maladies associées. Cependant, si la quantité d'apport alimentaire et spécialement celle des lipides a été longtemps mise en cause, l'attention aujourd'hui se dirige vers l'impact de la qualité de ces lipides sur le développement du surpoids et de l'obésité. Dans notre consommation actuelle, un déséquilibre entre l'apport alimentaire en acides gras polyinsaturés (AGPIs)  $\omega 6$  et  $\omega 3$  a été observé et semble être corrélé à la survenue de plusieurs pathologies dont l'obésité.

Chez les mammifères, il existe deux types de tissus adipeux, le tissu adipeux blanc spécialisé dans le stockage et la libération d'énergie et le tissu adipeux brun dont la fonction principale est d'utiliser cette énergie pour produire de la chaleur. La récente découverte d'adipocytes bruns fonctionnels chez l'homme adulte permet d'envisager leur utilisation pour augmenter la dépense d'énergie dans le cadre du traitement de l'obésité. De façon intéressante, des adipocytes thermogéniques peuvent apparaître au sein du tissu adipeux blanc suite à certains stimuli. Ces adipocytes nommés adipocytes "brites" pour "brown in white", ou beige, peuvent contribuer à la restauration de l'homéostasie énergétique en augmentant les dépenses d'énergie.

Afin de mieux comprendre la contribution des AGPIs dans l'homéostasie énergétique et plus particulièrement dans la dépense d'énergie, l'objectif de mes travaux de thèse était d'étudier les effets de ces AGPIs de types  $\omega 6$  et  $\omega 3$  et de leurs métabolites sur la conversion des adipocytes blancs en adipocytes "brites".

Ce manuscrit fera dans un premier temps le point sur les connaissances que nous avons du tissu adipeux blanc et brun, des acides gras et des effets des AGPIs sur le développement particulièrement du tissu adipeux blanc. Les résultats présentés ensuite en deux parties, porteront sur l'impact des AGPIs sur la formation et la fonction des adipocytes "brites". Chaque partie sera suivie par une discussion comprenant les perspectives de recherche envisagées. Enfin, une revue et une conclusion générale résumeront les travaux de cette thèse et permettront de les situer dans le cadre de la recherche sur l'obésité.



## **INTRODUCTION**

---



## **Partie I : Le tissu adipeux (TA)**

---

L'homéostasie énergétique se définit par un état d'équilibre entre les apports et les dépenses d'énergie. Cet équilibre est essentiel pour la conservation des fonctions vitales de l'organisme et permet à un individu de garder un poids corporel normal situé dans un intervalle défini génétiquement et environnementalement. Les apports énergétiques proviennent principalement de l'alimentation, alors que les dépenses d'énergie sont dues essentiellement au métabolisme cellulaire basal et aux exercices physiques. Le maintien de l'homéostasie nécessite la mise en place d'un dialogue entre le cerveau et les organes périphériques tel que le foie, le pancréas, le système gastro-intestinal et les tissus adipeux. Ces derniers sont localisés dans divers sites anatomiques de l'organisme selon leur fonction propre. Les principales cellules parenchymateuses de ces tissus sont les cellules adipocytaires ou adipocytes. On en distingue trois types: 1) l'adipocyte blanc, 2) l'adipocyte brun et 3) l'adipocyte brite, qui vont assurer des fonctions métaboliques et énergétiques différentes. Grâce à ses trois types de cellules, le tissu adipeux participera à l'homéostasie énergétique en régulant l'apport, le stockage, la libération et la dépense d'énergie.

### **1 Le tissu adipeux blanc (TAB)**

Toutes les espèces animales sont parvenues à stocker l'excès de leur énergie sous forme de matière grasse afin de l'utiliser en cas de besoin. La plupart des animaux possède un tissu appelé tissu adipeux blanc (TAB) au niveau duquel l'excès d'énergie est stocké sous formes de lipides. Au cours du XIXème siècle, le tissu adipeux blanc était considéré comme un tissu conjonctif sans anatomie spécifique, dans lequel des cellules capables de stocker les lipides étaient enveloppées dans un réseau de fibre de résistine et de matrice extracellulaire. Sa fonction était réservée à l'isolation thermique, au soutien et au stockage de lipides. Ce n'est qu'au milieu du XXème siècle que les scientifiques ont commencé à considérer le TAB comme un tissu spécifique constitué de cellules adipocytaires différentes de celles présentes dans le tissu conjonctif.

Chez l'Homme, le TAB apparait après le troisième trimestre de la grossesse et continue à s'accroître tout le long de la vie de l'individu. A l'âge adulte, ce tissu constitue 15 à 20% du poids corporel de l'homme et 20 à 25% de celui de la femme.

## 1.1 Anatomie du TAB

Contrairement aux invertébrés qui stockent leurs excès d'énergie exclusivement au niveau abdominal, les vertébrés sont capables de stocker cet excès à la fois au niveau intra-abdominal et/ou sous-cutané. Chez les mammifères, il y a deux types de TAB en fonction de la localisation, le TAB sous-cutané (TAB-SC) et viscéral (TAB-V). A partir de l'âge de l'adolescence, le TAB-SC se répartit différemment en fonction du sexe. Ce tissu constitue la majorité de la masse adipeuse corporelle. Il se localise principalement au niveau du cou, de l'abdomen et des épaules chez l'homme contrairement aux femmes où ce dépôt sera essentiellement localisé au niveau des hanches, des fessiers, des cuisses et des seins. La variabilité de taille des adipocytes constituant ce dépôt, reflète la plasticité et ainsi la capacité d'hypertrophie que peuvent avoir ces cellules en cas de rupture de l'homéostasie énergétique en faveur des apports d'énergie. Le TAB-SC représente le site privilégié de stockage d'énergie à long terme.

D'autre part, le TAB-V représente entre 5 et 20% de la totalité du TA. Ce tissu est moins ordonné mais beaucoup plus vascularisé et innervé que le TAB-SC. Le TAB-V possède une capacité de lipogenèse et de lipolyse intense. C'est le premier TA à pouvoir répondre à un stress métabolique ou à un besoin d'énergie pour assurer une disponibilité directe de substrats énergétiques. Chez l'Homme, on distingue trois types de TAB-V : le TAB **intra-péritonéal**, **rétro-péritonéal** et **péri-rénal**(**figure 1**). Le dépôt intra-péritonéal est à son tour divisé en dépôt mésentérique et omental, il se situe dans la partie ventrale du péritoine. Le dépôt rétro-péritonéal se localise aux alentours des reins au niveau de la partie dorsale du péritoine. Il se diffère du dépôt péri-rénal par l'absence de liaison directe avec la surface des reins. Chez les rongeurs, il existe un troisième type de TAB intra-péritonéal appelé le dépôt péri-gonadique, situé au niveau des appareils génitaux, il joue un rôle protectif de ces derniers (Cinti, 2005).

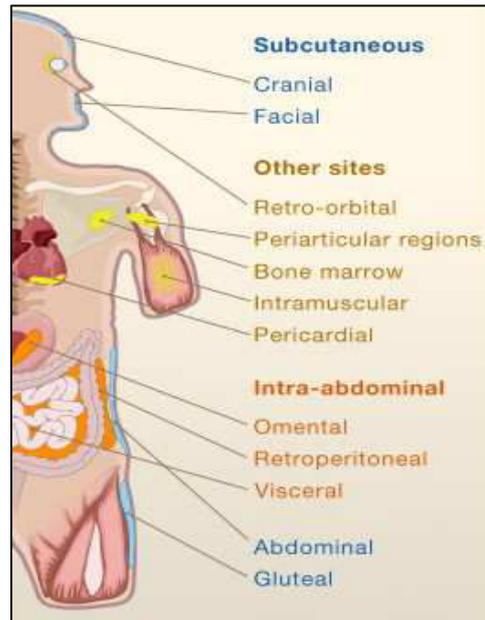


Figure 1. Distribution des dépôts de TAB chez l'Homme. D'après (Gesta et al., 2007)

## 1.2 Les cellules du TAB

Au niveau cellulaire, le TAB est constitué de cellules adipocytaires ou adipocytes et de cellules non-adipocytaires.

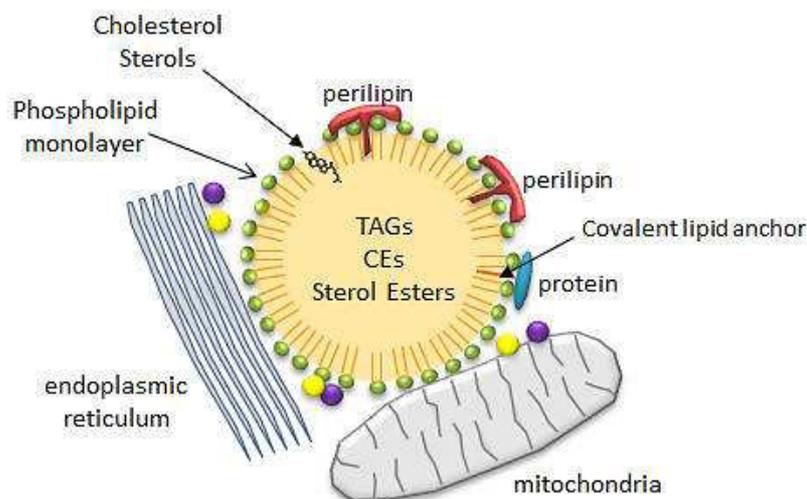
### 1.2.1 Les adipocytes

Ils sont organisés en lobules séparés par des cloisons de tissu conjonctif au niveau desquels on trouve des fibres de résistine, des cellules immunitaires et des fibroblastes. Les adipocytes blancs représentent l'unité fonctionnelle du TAB douée 1) d'une capacité de stocker l'énergie sous forme de triglycérides (TGs), 2) de mobiliser ce stock en cas de besoin et 3) d'une fonction endocrine (Zhang et al., 1994). Ce sont des cellules sphériques contenant, une grosse gouttelette lipidique de diamètre pouvant aller de 10 à 150  $\mu\text{m}$  et occupant 90% du volume de l'adipocyte, un noyau repoussé par la gouttelette lipidique vers la membrane cytoplasmique, quelques mitochondries et autres organites cellulaires. Les adipocytes sont entourés d'une membrane basale au niveau de laquelle ils entrent en contact avec les cellules endothéliales des capillaires sanguins. La taille de l'adipocyte

dépend de la taille de sa gouttelette lipidique et varie selon l'état métabolique de l'adipocyte.

### La gouttelette lipidique

La gouttelette lipidique a été longtemps considérée comme un réservoir lipidique intracellulaire inerte. Or, avec les avancées des études de la biologie de cette gouttelette, les chercheurs la considèrent aujourd'hui comme une organelle dynamique essentielle dans les fonctions de l'adipocyte. La gouttelette lipidique est formée d'une monocouche lipidique entourant un noyau de TG et d'ester de cholestérol et revêtue de protéines appartenant à la famille des « perilipins » (PLIN) (**figure 2**). Cette famille comprend la PLIN 1, l'adipophiline/PLIN 2, Tip (tail interacting protein)-47/PLIN 3, PLIN 4 et 5. La PLIN 1 représente la protéine la plus abondante au niveau de la membrane de cette gouttelette et représente le substrat majeur de la protéine kinase A (PKA) activée au cours de la lipolyse. De ce fait, la PLIN 1 joue un rôle essentiel dans la régulation de la mobilisation des TGs. D'une part, elle joue le rôle d'un obstacle empêchant les lipases cytoplasmiques d'accéder au TGs dans les conditions basales. Et d'autre part, la périlipine 1 est phosphorylée par la PKA suite à un stimuli lipolytique, facilitant ainsi l'accès des lipases (Brasaemle, 2007).



**Figure 2. Schéma représentant la structure de la gouttelette lipidique.** TAGs = triglycérides ; CEs = esters de cholestérols. Source: Chapter 1-Lipid Structure: Lipids in Water Biochemistry-Dr. JAKUBOWSKI 11/12/2015

L'origine de cette gouttelette est encore un sujet de débat. L'hypothèse la plus probable reste celle qui définit la gouttelette comme une conséquence de l'accumulation de lipides entre les deux couches du réticulum endoplasmique causant l'excision d'un bicelle. Après excision, la gouttelette lipidique reste en contact direct avec la membrane externe du réticulum endoplasmique. En plus de ce contact, la gouttelette peut avoir des connexions avec la membrane cytoplasmique grâce aux cavéoles appartenant aux « lipid Rafts ». Ces derniers sont des parties de la membrane cytoplasmique enrichies en CD36/FATP4 « fatty acid transport protein 4 » qui favorisent le transport des acides gras (AGs) depuis l'extérieur vers le noyau de la gouttelette lipidique.

### 1.2.2 Les cellules non-adipocytaires

Elles constituent la fraction stroma-vasculaire (FSV) et correspondent essentiellement à des fibroblastes, des précurseurs adipocytaires, des cellules endothéliales, des lymphocytes T, des cellules « Natural Killer » NK (Henegar et al., 2008), des mastocytes (Liu et al., 2009) et des macrophages (**figure 3**). Ces derniers représentent 15% des cellules de la FSV et selon leurs types, ils produisent des cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine-6 et l'interleukine-1 pour les macrophages de type 1 ou anti-inflammatoires tel que l'interleukine-10 et le TGF (transforming growth factor)- $\beta$  pour les macrophages de type 2 (Aron-Wisniewsky et al., 2009).

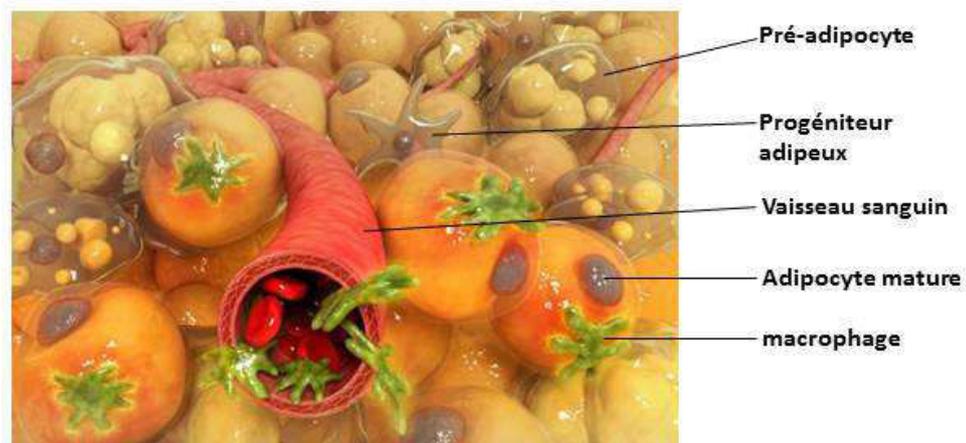


Figure 3. Dessin illustrant les différentes cellules composant le TAB. Source: illustration en biologie Christophe Martin.

### **1.3 Fonctions du TAB**

En plus de sa fonction de stockage et de libération d'énergie, le TAB est considéré comme un organe endocrine capable de synthétiser et sécréter des cytokines adipocytaires appelées adipokines. Ces dernières jouent un rôle important dans l'homéostasie énergétique. Enfin, le TAB présent au niveau des paumes des mains, des plantes de pieds et des fessiers chez l'Homme assure essentiellement une protection contre les pressions mécaniques abondantes à ces niveaux du corps. Dans ce chapitre, nous allons aborder en détails ces diverses fonctions du TAB.

#### **1.3.1 Stockage de l'énergie**

Le stockage énergétique représente le rôle le plus important du TAB. Ce dernier capte la quasi-totalité des lipides circulants, essentiellement d'origine alimentaire, et apporté par la circulation sanguine et lymphatique. Le TAB stocke ces lipides sous forme de TGs composés de 3 molécules d'AGs estérifiés sur une molécule de glycérol. Chez l'Homme adulte en bonne santé, le stock de TGs représente entre 90000 et 180000 kCal, contre 20000 kCal pour les protéines et seulement quelques centaines de kCal pour le glycogène et quelques dizaines pour le glucose (Foufelle and Ferré, 2013). Ce stock d'AGs servira comme source d'énergie couvrant les besoins des organes oxydatifs comme le foie, les muscles squelettiques, le cœur et le cortex rénal en cas de carence énergétique. La présence de la barrière hémato-encéphalique limite l'accès des AGs au cerveau. Pour couvrir ses besoins en énergie, ce dernier utilise donc les corps cétoniques produits par la métabolisation hépatique de ces AGs. Le stock de TGs dans le TAB permet à l'Homme de survivre à une période de jeûne prolongée pouvant aller de 2 mois chez l'Homme sain jusqu'à 3 mois chez l'Homme obèse, bien sûr dans des conditions exceptionnelles.

La formation ou la vidange de ce stock va donc dépendre de la prise alimentaire, des besoins métaboliques et de l'activité physique. Elle dépend aussi de l'état de stress de l'individu qui conduit à la libération entre autres de catécholamines, servant de dialogue entre le système nerveux central et le TAB.

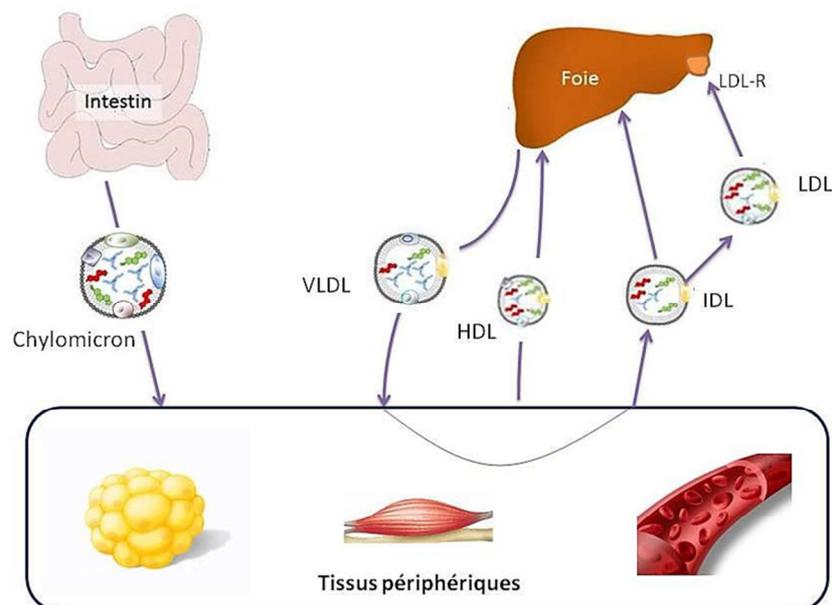
### 1.3.1.1 *Le transport des AGs*

Les AGs de l'alimentation sont généralement retrouvés sous formes d'esters dont les triglycérides (TGs) constituent environ 95% (Guesnet, 2005). Les triglycérides sont formés d'une molécule de glycérol estérifiée par trois AGs en position sn1 et 3 (position externe par rapport au glycérol) et sn2 (position interne par rapport au glycérol). Les triglycérides sont des molécules hydrophobes alors que leurs enzymes d'hydrolyse sont lipophiles, ce qui fait appel à une stratégie d'absorption spécifique différente de celle des protéines et des glucides. Arrivés au niveau de l'estomac, les lipides alimentaires forment des émulsions lipidiques dans lesquelles se forment des zones frontières entre les parties lipophiles et hydrophiles permettant ainsi aux lipases d'agir. La principale enzyme de digestion des TGs est la lipase pancréatique. Sous l'action de cette dernière, un TG génère deux molécules d'AGs et une molécule de monoglycéride gardant l'AG en position sn2 (2-monoacylglycérol, 2-MG). La deuxième étape de l'hydrolyse des lipides consiste à entourer les TGs par des acides biliaires ce qui forme les micelles, constitués ainsi de MG, d'AGs et d'acides biliaires, qui pourront être absorbé par les entérocytes au niveau de l'intestin grêle.

Deux modèles d'absorption d'AGs au niveau des entérocytes sont proposés. Cette absorption peut avoir lieu soit par une diffusion passive à travers la membrane cytoplasmique, soit par l'intermédiaire de transporteurs spécifiques d'AGs tel que FATP4 ou FAT/CD36. Ces transporteurs acheminent les AGs vers le réticulum endoplasmique où ils seront ré-estérifiés pour former de nouveaux TGs puis incorporés dans une structure que l'on appelle les chylomicrons (Iqbal and Hussain, 2009). Tous les lipides ingérés sont incorporés dans les chylomicrons qui sont constituées en leurs centres de TGs, de cholestérols estérifiés et de vitamines liposolubles assemblées de façon à avoir leurs parties hydrophiles vers l'extérieur. Après assemblage, les chylomicrons sont liés à une protéine d'adressage appelée l'ApoB48. Une fois complets, les chylomicrons sont libérés par exocytose dans la voie lymphatique puis déversés dans le sang, afin d'être distribués dans l'organisme. A la fin de la distribution, les chylomicrons résiduels, débarrassés d'une grande partie de leurs lipides sont captés par le foie.

D'autre part, il existe une autre voie endogène qui permet d'alimenter l'organisme en TGs. En effet, tous les AGs peuvent être synthétisés par l'organisme à l'exception des acides gras poly-insaturés essentiels (AGPIs) et les Vitamines liposolubles A, E et K. La plupart des cellules peuvent synthétiser des AGs mais le site privilégié pour cette biosynthèse est le foie.

Que ce soit d'origine alimentaire ou endogène, les AGs sont incorporés dans les TGs et transportés dans l'organisme sous forme de lipoprotéines. On en distingue quatre classes caractérisées par leurs densités, leurs charges électriques ainsi que leurs compositions en lipides et en protéines : les chylomicrons riches en TGs d'origine alimentaire portant la protéine Apo B48, les VLDL (very low density lipoproteins) de très basse densité riches en TGs synthétisés par le foie portant l'Apo B100, C et E, les LDL (low density lipoproteins) de basse densité riche en cholestérol portant l'Apo B100 et les HDL (High density lipoproteins) de haute densité riche en cholestérol et portant les Apo A. Les chylomicrons et les VLDL transportent les AGs d'origine alimentaire et endogène, respectivement, vers les organes périphériques. Les VLDL appauvris en AGs forment les LDL qui transportent donc le cholestérol. Par ailleurs, les HDL qui dérivent des chylomicrons transportent le cholestérol des organes périphériques vers le foie (Borel et al., 1997). **(Figure 4)**



**Figure 4. Représentation des voies de transport des AGs dans l'organisme et des lipoprotéines impliquées.**  
HDL : high density lipoprotein, IDL :intermediate density lipoprotein, LDL : low density lipoprotein, LDL-R : low density lipoprotein Receptor, VLDL :very low density lipoprotein.

### 1.3.1.2 **La Lipoprotéine Lipase (LPL)**

Les chylomicrons et les VLDL arrivent dans le TAB par la circulation sanguine, mais ces lipoprotéines sont trop volumineuses pour franchir l'endothélium des vaisseaux et entrer dans les adipocytes. Une étape d'hydrolyse des TGs, contenus dans les chylomicrons, en AGs est alors nécessaire. Pour cela, les adipocytes synthétisent la lipoprotéine lipase (LPL) et l'acheminent vers le côté luminal des cellules endothéliales. A ce niveau, la LPL hydrolyse les TGs présents dans les lipoprotéines en AGs et en 2-MAG. Cette enzyme est donc très importante et elle peut être régulée à différents niveaux. L'activation de la transcription de la LPL est stimulée par les facteurs de transcription « Sterol Regulator Element Binding Protein » (SREPB) 1 et 2 et par le récepteur nucléaire « Peroxisome Proliferator Activated Receptor  $\gamma$  » (PPAR $\gamma$ ) (Schoonjans et al., 2000; Schoonjans et al., 1996). Une fois synthétisée, la LPL subit une régulation post-traductionnelle *via* la « Lipase Maturation Factor 1 » (LMF1) pour la rendre catalytiquement active (Péterfy et al., 2007). Au niveau endothélial, la LPL interagit avec une protéine appelée « glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein binding protein 1 » (GPIHBP1) ce qui facilite l'interaction entre la LPL et les lipoprotéines (Dallinga-Thie et al., 2007). D'autre part, l'«Angiopoietin like protein 4» (Angptl4) inhibe l'activité de la LPL en cas de jeûne limitant ainsi le stockage de lipides au niveau du TAB (Sukonina et al., 2006). A l'inverse, dans l'étape post-prandiale l'organisme a besoin de stocker les AGs apportés par l'alimentation sous formes de TGs dans les adipocytes. La sécrétion d'insuline au cours de cette étape stabilise l'ARNm, active et induit la sécrétion de la LPL induisant ainsi l'entrée des AGs dans l'adipocyte (Semenkovich et al., 1989).

### 1.3.1.3 **Le transport des AGs dans le TAB**

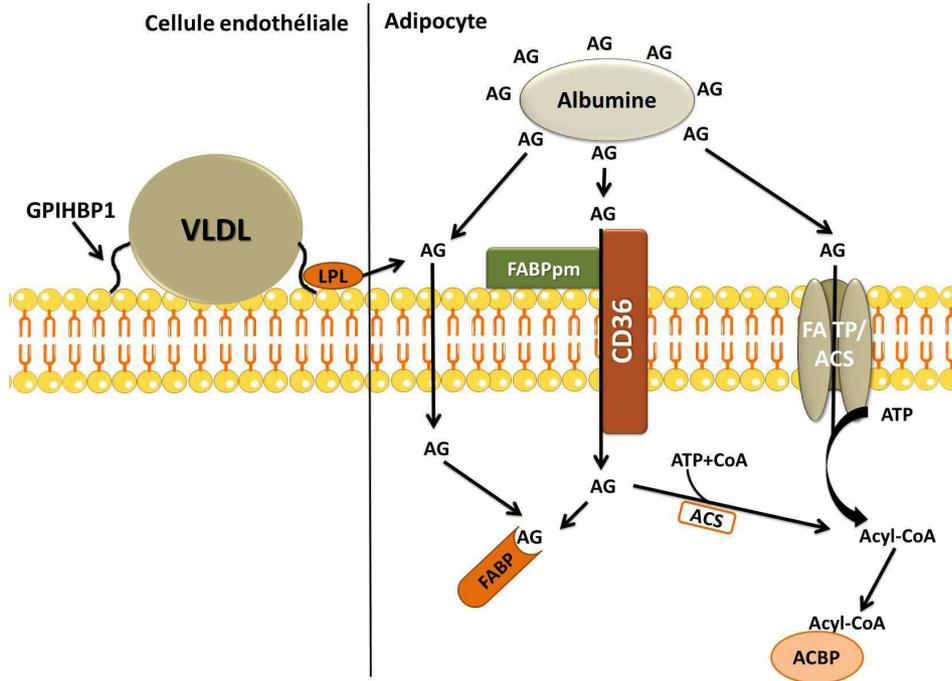
Après l'action de la LPL sur les TGs, les AGs et les 2-MAGs ainsi formés doivent entrer dans les adipocytes. Or, malgré leur caractère hydrophobe leurs permettant de traverser la membrane cytoplasmique par simple diffusion, il existe un système membranaire de transport saturable capable de transporter non seulement la faible concentration des AGs non estérifiés libres mais aussi la majorité d'AGs non estérifiés liés à l'albumine. Parmi ces transporteurs, on distingue : 1) la famille des protéines : transporteurs d'AGs « Fatty Acid

Transporter Protein » (FATP) localisée sur la membrane plasmique, 2) le récepteur « scavenger » ou « Fatty Acid Translocase/Cluster of Differentiation 36 » (FAT/CD36) et 3) la protéine de liaison aux AGs de la membrane cytoplasmique « Fatty Acid Binding Protein plasma membrane » (FABPpm) (Foufelle and Ferré, 2013).

Les FATPs sont des protéines transmembranaires, dont la forme la plus exprimée dans le TAB est la FATP1. Cette protéine migre du compartiment intracellulaire vers la membrane cytoplasmique en réponse à l'insuline (Wu et al., 2006). On suppose que le transport des AGs par la FATP1 est facilité par la possible activité acyl-CoA synthétase (ACS) de cette dernière. L'AG ainsi transporté est transformé en acyl-CoA et pris en charge par les protéines cytoplasmiques de liaisons à l'acyl-CoA « Acyl-CoA-Binding Protein » (ACBP) (Kazantzis and Stahl, 2012).

CD36 est une protéine transmembranaire présente dans plusieurs types de cellules y compris les adipocytes. Sa présence au niveau des adipocytes mais pas au niveau des pré-adipocytes fait de cette protéine un marqueur de différenciation adipocytaire. Il a été montré que l'inactivation du CD36 réduit le transport d'AGs à longue chaîne de 60% dans les adipocytes (Coburn et al., 2000).

A l'inverse des deux transporteurs des AGs précédents, la FABPpm ne possède pas de domaines transmembranaires mais elle est associée à la membrane cytoplasmique. Une fois à l'intérieur des adipocytes les AGs lipophiles ont besoin d'une protéine de transport afin d'être transportés dans le cytoplasme. On parle donc de la famille des protéines cytoplasmiques de liaisons aux AGs « cytoplasmic Fatty Acid Binding Protein » (cFABP) dont la FABP4 représente la forme la plus exprimée au niveau du TAB. Cette protéine transporte les molécules lipophiles comme les AGs saturés, insaturés et les éicosanoïdes, à l'intérieur d'une poche hydrophobe. Comme le CD36, l'expression de FABP4 augmente au cours de la différenciation adipocytaire (Hunt et al., 1986) et cette expression est induite par les AGs dans l'adipocyte mature (Amri et al., 1991). **(Figure 5)**

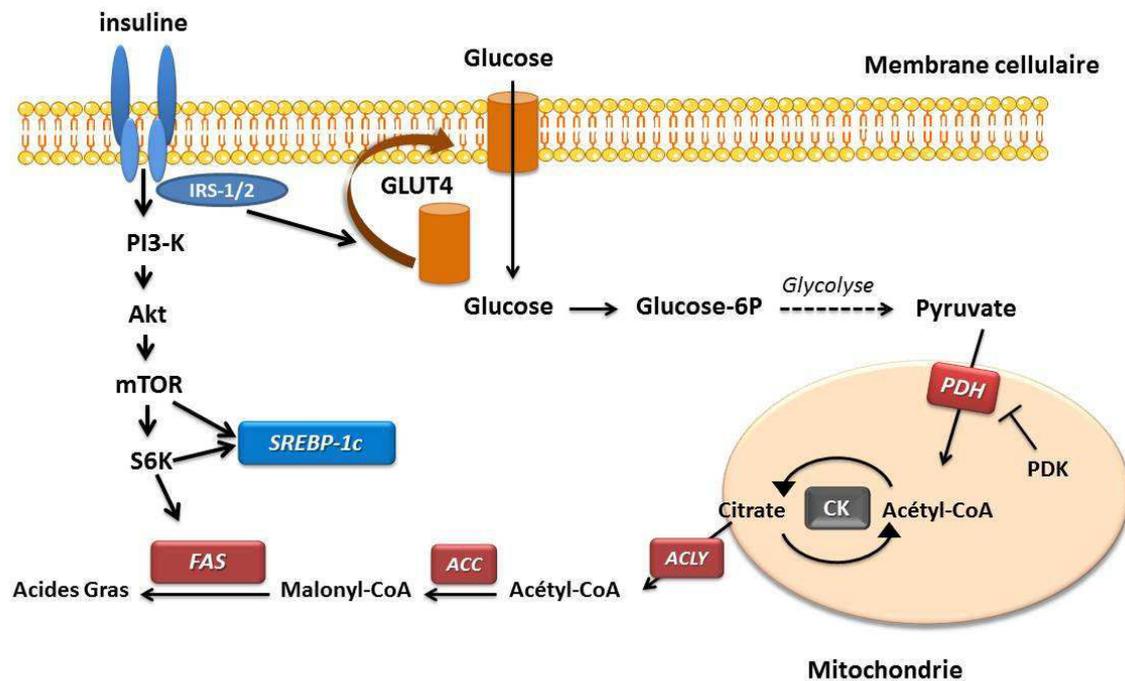


**Figure 5. Hydrolyse des TGs par la LPL et entrée des AGs dans l'adipocyte.** Les chylomicrons et les VLDL arrivent au niveau des cellules endothéliales où elles interagissent avec la LPL par l'intermédiaire de la GPIHBP1. Les TGs des lipoprotéines sont hydrolysés pour libérer les AGs qui vont alors se lier à l'albumine pour atteindre l'adipocyte. L'entrée des AGs dans l'adipocyte se fait par le complexe FABPpm/CD36, par la FATP/ACS ou passivement. Dans le cytoplasme, les AGs sont pris en charge par la FABP ou activés par l'ACS pour former l'acyl-CoA. VLDL : very low density lipoprotein, ACS : Acyl-CoA synthétase, ACBP: Acyl-CoA binding protein, AG : acide gras, FABPpm: fatty acid binding protein plasma membrane, GPIHBP1: glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein binding protein.

#### 1.3.1.4 La lipogenèse de novo

C'est la synthèse *de novo* des AGs à partir du glucose. Chez les rongeurs, cette synthèse se déroule essentiellement dans les cellules hépatiques et dans une moindre mesure dans les cellules adipocytaires. Dans l'étape post-prandial, le taux de glucose sanguin augmente, ce glucose arrive au niveau des adipocytes et y rentre par l'intermédiaire des transporteurs de glucose appartenant à la famille des « Glucose Transporters » GLUTs. Les GLUT1 et GLUT4 représentent la forme constitutive et induite par l'insuline de transporteurs de glucose dans l'adipocyte, respectivement. Dans le cytoplasme, le glucose est phosphorylé par les hexokinases en glucose-6 phosphate. Ce dernier subit une glycolyse et produit ainsi du pyruvate qui sera transformé en acétyl-CoA dans la mitochondrie par le pyruvate déshydrogénase. L'acétyl-CoA est transformé en citrate par la citrate synthase. Le citrate

ainsi formé, sera clivé dans le cytoplasme par l'ATP citrate lyase (ACLY) pour redonner de l'acétyl-coA. A partir de ce dernier un AG sera synthétisé suite aux actions successives de l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) et l'enzyme de synthèse des AGs « Fatty Acid Synthase » (FAS) (Foufelle and Ferré, 2013). **(Figure 6)**



**Figure 6. Schématisation de la lipogenèse adipocytaire de novo.** En présence d'insuline, GLUT4 migre du cytoplasme vers la membrane cytoplasmique et assure l'entrée du glucose qui va être phosphorylé avant de subir la glycolyse et donner du pyruvate. Le pyruvate entre dans la mitochondrie sous forme d'acétyl-CoA suite à l'activité de la PDH. L'acétyl-CoA rejoint le cytoplasme par un système qui implique le cycle de KREBS et l'ACLY. Il est ensuite transformé par l'ACC en malonyl-CoA qui servira à la synthèse des AGs. ACC :acétyl-CoA carboxylase, ACLY :acétyl-CoA lyase, CK : cycle de KREBS, FAS : fatty acid synthase, IRS : insulín receptor substrate, PDH : pyruvate déshydrogénase, PDK : pyruvate déshydrogénase kinase, SREBP : sterol response element binding protein.

## Régulation de la lipogenèse

Il existe deux types de contrôle de la lipogenèse, à court terme et à long terme.

1) A court terme, la lipogenèse est essentiellement régulée par l'insuline qui induit la mobilisation des GLUT4 des compartiments intracellulaires vers la membrane cytoplasmique augmentant ainsi l'entrée de glucose dans les adipocytes (Rowland et al., 2011). En effet, l'insuline active son récepteur l' « Insulin Receptor » (IR) à activité tyrosine kinase. Une fois activée, ce dernier active les substrats de réponse à l'insuline « Insuline Response

substrate » (IRS1 et 2). Les IRS activent alors la voie de signalisation phospho-inositol-3-kinase/Akt/mTOR et S6K. Cette voie de signalisation induit la mobilisation de GLUT4 et l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la lipogenèse *de novo*.

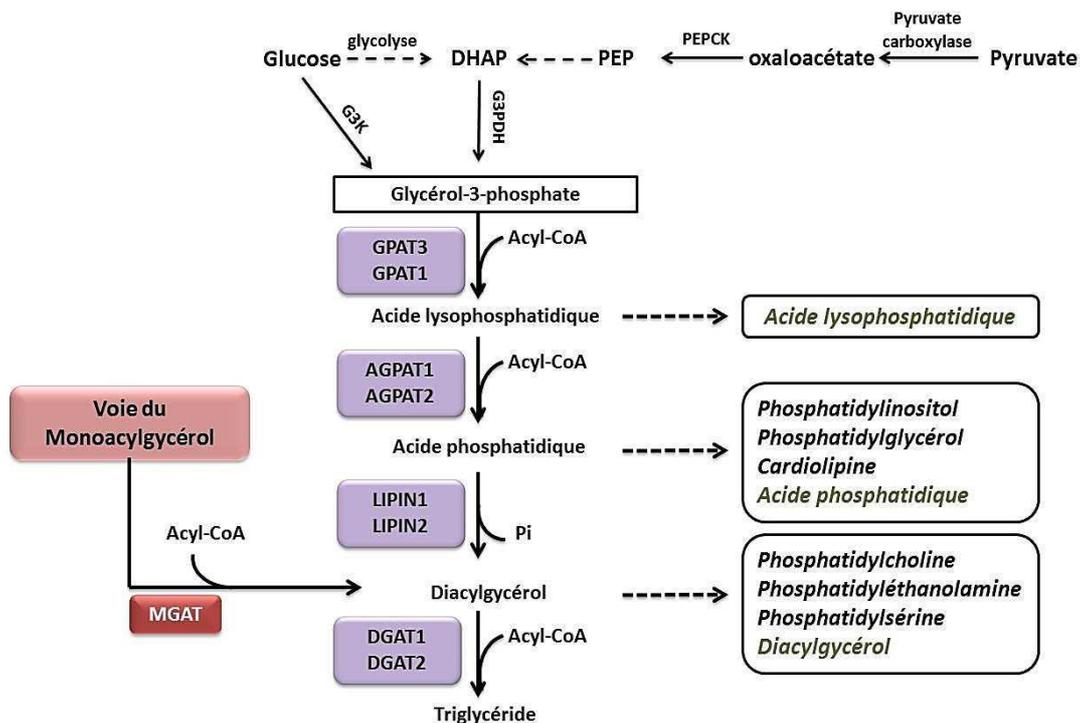
D'autre part, la lipogenèse est inhibée par la phosphorylation et donc l'inactivation de la PDH par la PDH Kinase (PDK) (Peters, 2003). Dans le TAB la principale PDK présente est la PDK4 (Forner et al., 2009; Park et al., 2014). Elle est induite par le jeûne, les catécholamines et l'exercice musculaire (Wan et al., 2010). En outre, il a été démontré que l'augmentation du taux d'AMPc par les catécholamines active la protéine kinase activée par l'AMP « AMP-activated protein kinase » (AMPK) et que cette dernière régule la lipogenèse en phosphorylant et ainsi inhibant l'activité de l'ACC (Kahn et al., 2005).

2) Alors que les mécanismes de contrôle de la lipogenèse à court terme modulent l'activité des enzymes impliquées, les mécanismes de contrôle à long terme modulent la quantité de ces enzymes en modulant leur transcription. Il a été démontré que l'insuline (Moustaïd et al., 1994) et le glucose (Foufelle et al., 1992) sont les principaux inducteurs de l'expression des enzymes de la lipogenèse. Cette régulation semble indispensable puisqu'il existe quelques enzymes de la lipogenèse comme la FAS qui n'est modulée qu'au niveau transcriptionnel. Les principaux acteurs de cette modulation sont la SREBP-1c et la protéine de liaison à l'élément de réponse aux carbohydrates « Carbohydrates response element binding protein » (ChREBP). Ces facteurs de transcription sont essentiellement régulés par l'insuline pour le premier, et le glucose pour le second (Foufelle and Ferré, 2002; Postic et al., 2007).

Chez l'Homme, il était assumé que la lipogenèse se déroule essentiellement dans les hépatocytes et qu'elle est quasi-absente dans le TAB (Shrago et al., 1969). Or, les pré-adipocytes humains cultivés *in vitro* sont capables de se différencier en adipocytes et d'accumuler des lipides en absence de toutes sources d'AGs dans le milieu de culture. Ceci montre que les pré-adipocytes humains possèdent la machinerie nécessaire pour la synthèse *de novo* des AGs.

### 1.3.2 La synthèse des TGs

Les TGs sont synthétisés à partir d'AGs et de glycérol au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique. Afin d'être incorporés dans les TGs, les AGs doivent subir une étape d'activation ou de transformation en acyl-CoA. Cette réaction est catalysée soit par la FATP, soit par les ACSs (Ellis et al., 2010). Dans le TAB, l'isoforme ACS1 représente la forme la plus exprimée de ces enzymes. Elle est localisée au niveau de la membrane cytoplasmique, de la membrane de la gouttelette lipidique, des microsomes et de la membrane mitochondriale (Soupene and Kuypers, 2008). Il existe deux voies de synthèse de TGs qui diffèrent par leurs points de départ qui peut être le glycérol-3-phosphate (G3P) ou le monoacylglycérol (MAG). Dans la voie où le MAG représente le point de départ, un acyl-CoA est rajouté à ce dernier par la MAG transférase (MAGT). Le produit ainsi formé est le diacylglycérol (DAG) qui sera acylé pour former les TGs. (Figure 7)



**Figure 7. Les sources du glycérol-3-phosphate et la voie de synthèse des TGs dans l'adipocyte.** La voie du glycérol-3-phosphate dont les enzymes sont schématisées en violet est la voie prédominante. Les enzymes les plus importantes sont indiquées. Les intermédiaires de cette voie qui peuvent servir comme second messager sont encadrés. AGPAT : 1-acylglycérol-3-phosphate O-acyltransférase, DGAT : diacylglycérol acyl transférase, DHAP : dihydroxyacétone-phosphate, G3PDH : glycérol-3-Phosphate déshydrogenase, G3K : glucose-3-kinase, MGAT : monoacylglycérol transférase, PEP : phosphoénolpyruvate, PEPCK : phosphoénolpyruvate carboxykinase.

Dans les adipocytes, la principale voie de synthèse des TGs est la voie médiée par le G3P. Au cours de cette voie, le G3P est acylé une première fois par la glycérol-3-phosphate acyltransférase (GPAT) pour donner l'acide lysophosphatidique qui sera à son tour acylé par le 1-acylglycérol-3-phosphate O-acyltransférase (AGPAT). Ceci donne l'acide phosphatidique qui sera déphosphorylé suite à l'action d'une enzyme appelée lipine (LIPIN). Cette réaction enzymatique génère le DAG qui sera acylé par les diacylglycérol acyl transférase (DGAT) pour générer une molécule de TG. Les intermédiaires générés au cours de cette cascade jouent un rôle important au niveau de la fonction cellulaire. En effet, ils possèdent des fonctions de structure, de second messager et des précurseurs de glycérophospholipides (GPL) comme le phosphatidylinositol, la phosphatidylcholine et plusieurs autres GPL qui représentent des composants importants des membranes cellulaires (Shi and Cheng, 2009).

**Source de G3P :** Pour s'intégrer dans les TGs, le glycérol doit être phosphorylé en G3P par l'action de la glycérol Kinase. Cette enzyme exprimée dans les hépatocytes et les adipocytes bruns est cependant absente dans les adipocytes blancs. Le G3P dans les adipocytes blancs provient donc de la réduction de la dihydroxyacétone-phosphate produite lors de la glycolyse du glucose. Cette réduction est catalysée par la glycérol-3-phosphate déshydrogenase (G3PDH).

De plus, la présence de certaines enzymes de la néoglucogénèse hépatique comme la pyruvate carboxylase et la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK) dans l'adipocyte montre que le pyruvate peut être incorporé dans le glycérol-3-phosphate en utilisant les premières étapes de la néoglucogénèse (Ballard et al., 1967). Il a été démontré que la surexpression de la PEPCK dans le TA murin induit une augmentation de la ré-estérification des AGs accompagnée par une augmentation de la taille des adipocytes et ainsi de la masse grasse (Franckhauser et al., 2002). La voie de synthèse de glycérol-3-phosphate à partir du pyruvate est nommée glycéronéogénèse et semble être importante dans la formation de G3P dans le TAB. En effet, chez des souris nourries par un régime riche en glucides, 30% du G3P provenait de la néoglycéronéogénèse. Ce pourcentage atteint les 70% lorsque ces souris sont nourries par un régime riche en lipides (Bederman et al., 2009). Reste à noter que l'expression de la PEPCK peut être modulée par PPAR $\gamma$  vu la présence d'un élément de

réponse aux PPARs (PPRE) au niveau du promoteur du gène de cette enzyme (Tontonoz et al., 1995).

### **1.3.3 La lipolyse**

La synthèse des TGs décrite précédemment, représente la principale fonction du TAB durant la période postprandiale. Ces TGs vont être dégradés, dans le cas de jeûne ou d'exercices physiques, pour générer du glycérol et des AGs. Ces derniers vont ainsi servir de substrats énergétiques pour la cellule adipocytaire mais aussi pour les cellules du corps entier. Bien que la lipogenèse peut avoir lieu dans des autres sites que le TAB, comme le foie par exemple, la lipolyse est limitée principalement aux adipocytes et dans une moindre mesure aux muscles squelettiques (Badin et al., 2012). La lipolyse résulte de l'activité concertée de plusieurs acteurs enzymatiques et protéiques comme les PLIN et les différentes lipases.

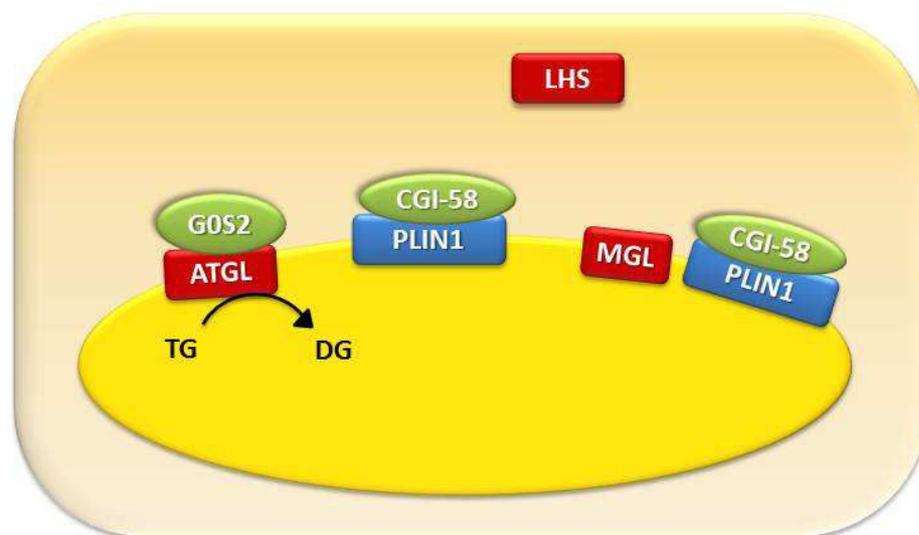
#### **1.3.3.1 Les lipases**

Au cours de la lipolyse les TGs sont dégradés en AGs et glycérol suite à des réactions enzymatiques séquentielles qui libèrent en premier lieu un diacylglycérol (DAG), puis un monoacylglycérol (MAG) pour enfin libérer le glycérol. Au cours de chaque réaction enzymatique un AG est libéré. Les enzymes responsables de ces réactions sont les lipases. On distingue essentiellement l' « adipose triglyceride lipase » (ATGL), la lipase hormono-sensible (HSL) et la monoglycéride lipase (MGL). A la fin de ces réactions, le glycérol ainsi libéré est utilisé essentiellement au niveau du foie et des muscles squelettiques, alors que les AGs seront utilisés principalement par le cœur et le foie. Il est à noter que certains AGs non-estérifiés libérés lors de la lipolyse peuvent être réutilisés par l'adipocyte pour former à nouveau les TGs.

Comme je l'avais déjà décrit, la gouttelette lipidique représente le stock de TGs dans les adipocytes. Cette gouttelette est une organelle dynamique capable de subir plusieurs réorganisations structurelles afin de rendre les TGs accessibles aux lipases.

### 1.3.3.1.1 L'Adipose Triglyceride Lipase (ATGL)

L'ATGL est la première enzyme à intervenir lors de la lipolyse, et ceci revient à sa plus grande affinité pour les TGs que pour les DAGs. A l'inverse de la HSL dont l'activité est prépondérante en condition stimulée, l'ATGL joue un rôle à la fois lors de la lipolyse basale et stimulée (Bezaire et al., 2009). Son activité peut-être régulée par son interaction avec la co-lipase « ABHD5/comparative gene identification 58 » (ABHD5/CGI-58) qui est normalement associée à la PLIN de la gouttelette lipidique. Lorsque la lipolyse est activée, l'ABHD5/CGI-58 se dissocie de la PLIN et interagit avec l'ATGL pour hydrolyser les TGs (Granneman et al., 2007). A l'inverse, ATGL est co-localisée avec la protéine « G0/G1 switch gene 2 » (GOS2) à la surface de la gouttelette lipidique, qui régule la lipolyse en inhibant l'activité de cette lipase (Schweiger et al., 2012). **(Figure 8)**



**Figure 8. Etat basal de l'ATGL et de la PLIN1.** Dans un état basal, l'ATGL est associée à la protéine GOS2 qui inhibe son activité et la PLIN1 est associée à la CGI-58 empêchant la liaison de cette dernière à l'ATGL. ATGL: Adipose triglyceride lipase, CGI-58: ABHD5/ comparative gene identification 58, GOS2: G0/G1 switch gene 2, DG: diglyceride, LHS: lipase hormono sensible, MGL: monoglyceride lipase, PLIN1: périlipine 1, TG: triglyceride.

### 1.3.3.1.2 La lipase hormono-sensible (HSL)

C'est la deuxième enzyme intervenant lors de la lipolyse des TGs. Cette enzyme est activée par la PKA et la PKG. Dans des conditions où les taux d'AMPC et de GMPc sont élevés, la HSL est phosphorylée et migre du compartiment cytosolique vers la surface de la gouttelette lipidique. La HSL va alors hydrolyser les TGs en DAGs et les DAGs en MAGs, avec

une plus grande affinité pour les DAGs. Il existe une interaction entre la HSL et la FABP4 qui joue le rôle d'une protéine chaperonne responsable du transport des AGs libérés suite à l'activité de la HSL (Smith et al., 2007).

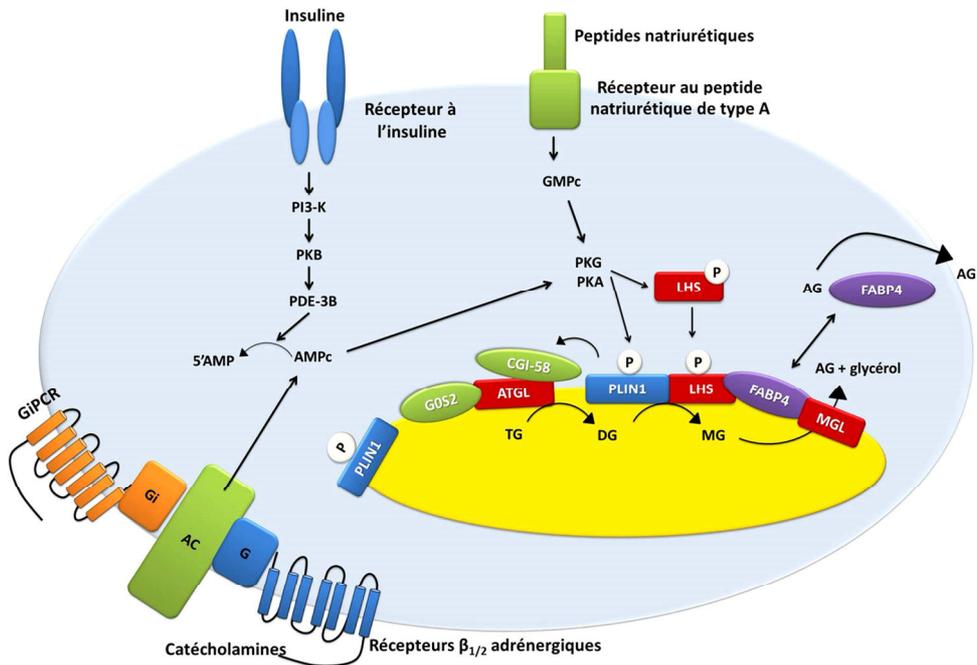
#### 1.3.3.1.3 La Monoglyceride Lipase (MGL)

La MGL est très abondante dans les adipocytes et intervient après la HSL pour hydrolyser les MAGs en AGs et glycérol.

La lipolyse est essentiellement contrôlée, négativement et positivement, par des hormones telles que la noradrénaline et l'adrénaline, appartenant à la famille des catécholamines, les peptides natriurétiques et l'insuline.

#### 1.3.3.2 **Les inducteurs de la lipolyse**

Les catécholamines induisent la lipolyse en activant les récepteurs  $\beta$  adrénergiques présents au niveau des adipocytes (blancs et bruns). Il existe 3 types de ces récepteurs : les récepteurs  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  et  $\beta_3$  adrénergiques ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  et  $\beta_3$ -AR pour « Adrenergic Receptor ». On trouve les  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -AR dans plusieurs tissus de l'organisme, alors que le  $\beta_3$ -AR est présent abondamment dans les adipocytes blancs et bruns chez les rongeurs. Il est ainsi responsable de la lipolyse chez ces derniers. Chez l'Homme, ce sont essentiellement les  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -AR qui sont responsables de l'induction de la lipolyse *in vivo* et *in vitro* (Langin, 2006). Par contre, le  $\beta_3$ -AR n'est que faiblement impliqué dans la lipolyse induite par les catécholamines dans le TAB chez l'Homme. Mais, son rôle lipolytique reste important au niveau du TA brun (TABr) et pourrait avoir une action spécifique chez l'homme (Cypess et al., 2015). Ces récepteurs sont couplés à une protéine Gs activatrice de la voie de signalisation de l'AMPc. Cette dernière active la protéine kinase A (PKA) qui va phosphoryler les PLINs et la lipase homono-sensible (HSL) et induire ainsi la lipolyse. **(Figure 9)**



**Figure 9. Régulation de la lipolyse.** L'élévation des taux d'AMPc ou de GMPc vont entraîner l'activation de la PKA et de la PKG. Ces kinases phosphorylent 1) la LHS qui migre vers la surface de la gouttelette lipidique et 2) la PLIN1 libérant ainsi la CGI-58 qui se lie donc à l'ATGL induisant son activité. Lorsque la PLIN1 est phosphorylée, une modification de la structure de la gouttelette lipidique a lieu favorisant les activités de la LHS et de l'ATGL. FABP4 joue un rôle de navette entre les AGs libérés au niveau de la gouttelette lipidique et la membrane cytoplasmique où ils vont être libérés. La voie de signalisation de l'insuline représente la principale voie d'inhibition de la lipolyse. AC : adénylate cyclase, ATGL: Adipose triglyceride lipase, CGI-58: ABHD5/ comparative gene identification 58, GOS2: G0/G1 switch gene 2, DG: diglyceride, FABP4 : fatty acid binding protein 4, LHS: lipase hormono sensible, MG, monoglycéride, MGL: monoglyceride lipase, PDE-3B: phosphodiesterase-3B, PKA : protéine kinase A, PKG : protéine kinase G, PLIN1: périlipine 1, TG: triglyceride.

De plus, le peptide natriurétique atrial « Atrial Natriuretic Peptide » (ANP) et cérébral « Brain Natriuretic Peptide » (BNP) ont été caractérisés comme des protéines lipolytiques chez l'Homme. En effet, leurs récepteurs possèdent une activité guanylate cyclase. Cette dernière augmente le taux de GMPc intracellulaire et active ainsi la protéine Kinase G (PKG). Comme la PKA, la PKG induit la lipolyse en phosphorylant les PLINs et la HSL (Sengenes et al., 2005). Par contre, chez les rongeurs ces peptides restent incapables d'induire la lipolyse du fait de l'expression importante de leur récepteur de type c (pour clairance), qui induit la clairance de ces protéines évitant ainsi la transmission du signal des NPs à travers la membrane cytoplasmique (Bordicchia et al., 2012)

### 1.3.3.3 *Les inhibiteurs de la lipolyse*

L'insuline est la principale hormone anti-lipolytique dans les adipocytes humains en agissant par l'inhibition de la génération d'AMPc intracellulaire. En effet, l'insuline active son récepteur à activité tyrosine kinase permettant l'activation de la phosphatidyl-inositol kinase-3 (PIK-3). Cette dernière active la protéine kinase B (Akt) qui à son tour active la nucléotide phosphodiesterase 3B (PDE3B). PDE3 va induire la dégradation d'AMPc en 5'AMP et donc empêcher les phosphorylations des PLINs et de la HSL. **(Figure 9)**

Plusieurs molécules activant des récepteurs couplés à une protéine G inhibitrice de la voie de signalisation de l'AMPc ont été mises en évidence. On distingue : 1) Les catécholamines qui sont capables d'inhiber la lipolyse en activant les récepteurs  $\alpha$ 2-ARs ; 2) les AGs à courte chaîne activant le récepteur GPR41 et les AGs à chaîne moyenne activant le GPR40 (Hirasawa et al., 2008) ; 3) l'acide nicotinique par son récepteur GPR109a (Ahmed et al., 2009) ; 4) le neuropeptide Y (NPY) et le peptide Y (PPY) par leur récepteur NPY-Y1 (Lafontan and Langin, 2009) et 5) la prostaglandine E2 agissant sur son récepteur EP3, qui est la prostaglandine la plus impliquée dans le contrôle de la lipolyse (voir partie II chapitre 4.3.2).

### 1.3.4 **La sécrétion des adipokines**

Comme nous l'avons décrit précédemment, les fonctions du TAB ne se limitent pas au stockage et à la libération des AGs. En effet, le TA est considéré comme un organe sécrétoire important capable de synthétiser et de libérer plusieurs cytokines appelées adipokines. Ces adipokines sont capables d'agir localement d'une façon autocrine/paracrine ou systémiquement d'une manière endocrine. Elles exercent ainsi des effets biologiques divers. On distingue plusieurs adipokines tel que : la leptine, l'adiponectine, l'apeline, l'adipsine, la nesfatine et la visfatine. La synthèse des adipokines n'est pas limitée aux adipocytes du TAB. Par exemple, l'interleukine 6 et le TNF $\alpha$  sont synthétisés à la fois par les adipocytes et les macrophages. Vu le nombre important d'adipokines, j'ai choisi de décrire le rôle que de la leptine, de l'adiponectine et de la visfatine.

#### 1.3.4.1 *La leptine*

En 1949, il a été décrit qu'il existe un modèle de souris génétiquement obèse dont le gène muté était nommé ob. Ce modèle de souris est appelé ob/ob (INGALLS et al., 1950). En 1994, Friedman et ses collaborateurs ont découvert pour la première fois le produit du gène responsable de ce défaut génétique. En effet, ils ont démontré que le gène était exprimé dans le TA et codait pour une protéine qu'ils l'ont appelée « leptine » (Zhang et al., 1994). Plus tard, les chercheurs ont caractérisé les récepteurs spécifiques de cette protéine. Et ils ont pu démontrer que la forme longue de ce récepteur était très fortement exprimée au niveau du système nerveux central (Elmquist et al., 1998; Tartaglia et al., 1995). La leptine est une hormone qui agit au niveau de l'hypothalamus pour inhiber la prise alimentaire, autrement dit c'est l'hormone de la satiété (Cowley et al., 2001). La leptinémie (= niveau circulant de leptine) augmente avec la masse de TAB pour limiter la prise alimentaire. Dans les cas d'obésité, la leptinémie est très élevée sans qu'elle joue pleinement son rôle. Cela implique qu'il existe une résistance à l'action de la leptine, certainement au niveau des cellules de l'hypothalamus possédant le récepteur à cette hormone (Myers et al., 2010). Ce récepteur est très important dans la régulation de la prise alimentaire, par exemple la souris *db/db*, qui présente une forme inactive de ce récepteur, va développer une obésité sévère ainsi qu'un diabète de type 2 (Lee et al., 1996).

#### 1.3.4.2 *L'adiponectine*

En 1996, le groupe de Spiegelman a mis en évidence la présence d'une nouvelle adipokine appelée adiponectine (AdipoQ). A l'inverse de la leptine, la sécrétion de l'AdipoQ est inversement proportionnelle à l'IMC et semble être inhibée chez les individus obèses (Hu et al., 1996). Elle présente 0.01% des protéines plasmatiques. Lorsque les concentrations plasmatiques de la leptine sont de l'ordre de 2 à 8 **ng/ml**, celles de l'AdipoQ sont de l'ordre de 5 à 30 **µg/ml**. Cette concentration est plus faible chez les hommes par rapport aux femmes, car il y a un effet inhibiteur de la testostérone sur la sécrétion de l'AdipoQ (Wang et al., 2008b). Deux récepteurs de cette adipokine ont été identifiés. On distingue l'isoforme AdipoR1 présent abondamment au niveau musculaire et l'isoforme AdipoR2 présent essentiellement dans le foie (Kadowaki et al., 2006). En activant ses récepteurs, l'AdipoQ induit l'oxydation des AGs au niveau hépatique et musculaire, stimule le transport du

glucose dans les muscles et inhibe la néoglucogenèse dans le foie par l'activation de l'AMPK (Yamauchi et al., 2002). Il a été démontré que l'amélioration de la sensibilité à l'insuline et les effets antidiabétiques des agonistes du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  sont dus partiellement à l'induction de la sécrétion de l'AdipoQ. Finalement, en plus des effets aux niveaux des muscles et du foie, l'AdipoQ induit la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires (Tsuchida et al., 2005).

#### 1.3.4.3 *La visfatine*

C'est l'enzyme de synthèse de la nicotinamide mononucléotide à partir de la nicotinamide. C'est une adipokine exprimée au niveau du TAB et TABr des rongeurs (Revollo et al., 2007). Elle agit d'une manière endocrine sur les cellules  $\beta$  du pancréas pour potentialiser la sécrétion de l'insuline stimulée par le glucose (Spinnler et al., 2013). Récemment, notre équipe a démontré que la visfatine est préférentiellement exprimée dans les adipocytes bruns sans avoir une relation avec l'activité de ces derniers.(DF et al., 2015) Nos résultats montrent que l'expression de la visfatine au niveau du TAB épидidymal suite à une stimulation des souris par l'agoniste des récepteurs  $\beta$ -adrénergique est en corrélation avec l'activité lipolytique de ce tissu (DF et al., 2015). La corrélation entre le taux circulant de la visfatine et l'obésité reste controversée. Bien que des études montrent qu'il existe une corrélation positive entre le taux plasmatique de la visfatine et l'obésité (Filippatos et al., 2007; Haider et al., 2006), d'autres ne sont pas en faveur de cette corrélation (Berndt et al., 2005).

## 1.4 La différenciation adipocytaire ou adipogenèse

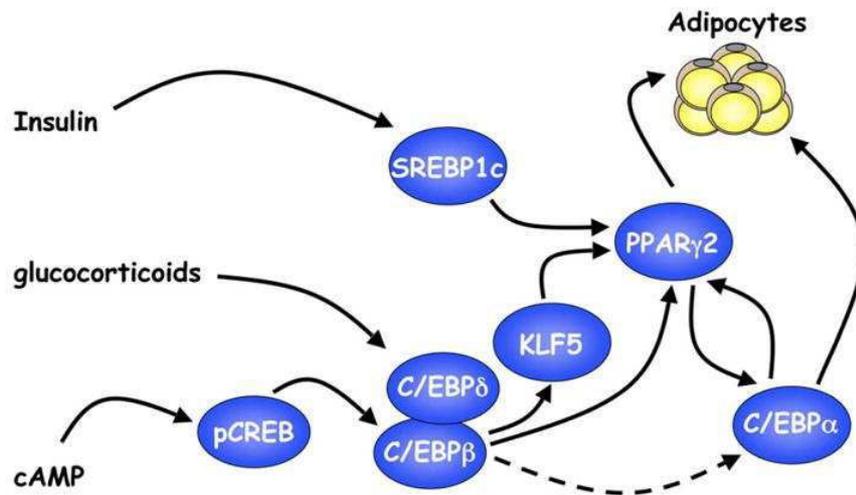
Nous avons déjà vu que la formation du TAB commence durant le troisième trimestre de la grossesse chez l'Homme. L'adipogenèse est le processus au cours duquel les cellules souches mésenchymateuses (MSC) se différencient en adipocytes formant le TA. Ce processus se déroule en 2 étapes : la détermination adipocytaire et la différenciation.

- 1) La détermination adipocytaire consiste en une perte de plasticité des cellules souches qui se transforment en progéniteurs capables de se différencier en adipocytes. Ces cellules sont ainsi nommées pré-adipocytes. Cette détermination est un processus complexe qui se distingue bien des autres phases *in vivo*. *In vitro*, la détermination se mélange à l'engagement proprement dit à l'étape de confluence.
- 2) Les pré-adipocytes vont alors subir plusieurs divisions (=phase d'amplification) avant de sortir du cycle cellulaire (=phase d'engagement) et de se différencier en adipocytes matures. Durant la progression des pré-adipocytes en adipocytes, les cellules acquièrent des capacités métaboliques d'un adipocyte blanc, sous l'effet d'une cascade de facteurs de transcription. Parmi ces derniers, PPAR $\gamma$  et les CAAT/Enhancer Binding Proteins (C/EBPs) représentent les facteurs cruciaux de la différenciation adipocytaire.

Dans ce chapitre nous aborderons les différents éléments induisant l'engagement et la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes matures fonctionnels.

#### **1.4.1 Les inducteurs de l'engagement et de la différenciation adipocytaire**

Après une phase de croissance exponentielle, les pré-adipocytes en culture atteignent la confluence et arrêtent leur prolifération. Après l'arrêt de la croissance, les cellules de certaines lignées pré-adipocytaires, essentiellement murines, subissent une mitose post-confluence avant de sortir du cycle cellulaire. Le processus d'engagement dans la différenciation va se caractériser par un remodelage du cytosquelette et l'expression de facteurs de transcription clés de l'adipogenèse, tels que la famille des C/EBPs et des PPARs, qui vont permettre l'activation coordonnée de plusieurs gènes spécifiques aux adipocytes (Rosen and Spiegelman, 2000). Parmi les composés nécessaires à l'engagement de cette différenciation *in vitro*, on distingue l'insuline, la triiodothyronine (T3), l'isobutyl-methylxanthine (IBMX) et la dexaméthasone, puis seul l'insuline et de la T3 vont être nécessaire à la différenciation. **(Figure 10)**



**Figure 10. Induction de l'adipogenèse par une cascade de facteurs de transcription.** L'exposition des préadipocytes à un cocktail inducteur de l'adipogenèse comprenant l'insuline, les glucocorticoïdes, l'isobutylméthylxanthine élevant le taux de l'AMPc, induit l'expression de plusieurs facteurs de transcription qui activent PPAR $\gamma$ . PPAR $\gamma$  induit l'expression de C/EBP $\alpha$  et ensemble ces deux facteurs de transcription induisent la différenciation adipocytaire. Illustration d'après (Farmer, 2006)

L'insuline va induire l'expression des marqueurs précoces de l'adipogénèse comme SREBP1c et ainsi augmenter l'expression des gènes de l'adipogenèse et de PPAR $\gamma$ .

La T3 résulte de l'action de l'enzyme déiodinase de type 2 (DIO2) sur la pré-hormone thyroxine T4 synthétisée physiologiquement par la thyroïde. De par l'activation des récepteurs aux hormones thyroïdiennes, la T3 est impliquée, *in vivo et in vitro*, à la fois dans la prolifération des pré-adipocytes, mais aussi dans l'adipogenèse et les processus fonctionnels tel que la lipogénèse et la lipolyse (Obregon, 2014).

L'IBMX est un inhibiteur des phosphodiéstérases responsables du clivage de l'AMPc en 5'AMP. *In vitro*, il permet d'induire l'adipogenèse en maintenant un taux élevé d'AMPc et en induisant l'expression de C/EBP $\beta$ . L'AMPc est responsable de l'activation de la protéine kinase A (PKA) qui phosphoryle la protéine CREB. Ce dernier se fixe sur l'élément de réponse à CREB (CRE) situé au niveau des promoteurs de plusieurs gènes de la différenciation adipocytaire, et agit comme un facteur induisant la transcription de ces gènes. *In vivo*, différents composés vont être capables d'induire cette élévation d'AMPc, comme la prostacycline (voir partie II chapitre 4.3.1).

La dexaméthasone est un glucocorticoïde synthétique qui induit la différenciation adipocytaire en activant son récepteur (GR) qui va lui-même agir entre autre sur l'expression: 1) de la phospholipase A2 (PLA2), responsable de la libération de l'acide arachidonique (ARA) depuis les membranes et donc de la synthèse des prostaglandines (voir partie II chapitre 3.1) et 2) de C/EBP $\delta$  (Ailhaud et al., 1992; Loftus and Lane, 1997).

Certaines cellules humaines comme les cellules hMADS que nous allons développer plus tard nécessitent un activateur de PPAR $\gamma$  afin de se différencier en adipocytes. Le ligand de PPAR $\gamma$  principalement utilisé est la rosiglitazone qui appartient à la famille des dérivés lipidiques appelée thiazolidinediones.

## **1.4.2 Les facteurs de transcription adipogénique**

### **1.4.2.1 La famille des C/EBPs**

Ce sont des facteurs de transcription possédant un domaine de liaison à la région CCAAT des promoteurs et un domaine à glissière de leucine (« leucine zipper ») leur permettant de former des homo-dimères ou des hétéro-dimères avec les autres membres de la même famille. Au cours de la phase précoce de la différenciation adipocytaire, ce sont les C/EBP $\beta$  et  $\delta$  qui sont exprimés en premier lieu sous l'action de l'AMPc et des glucocorticoïdes respectivement (Yeh et al., 1995). Une étude faite sur un modèle de souris invalidé pour C/EBP $\beta$  et  $\delta$  montre que ces deux protéines fonctionnent en synergie pour induire la différenciation terminale des adipocytes en induisant l'expression de C/EBP $\alpha$  et de PPAR $\gamma$ 2 (Tanaka et al., 1997).

Il existe deux isoformes de C/EBP $\beta$  : l'activateur transcriptionnel LAP et l'inhibiteur transcriptionnel LIP (Descombes and Schibler, 1991). C'est le ratio entre les deux formes qui va déterminer l'effet plutôt activateur, ou plutôt inhibiteur de C/EBP $\beta$ . L'expression de C/EBP $\beta$ -LAP est induite par le traitement des pré-adipocytes par l'IBMX au cours de l'engagement adipocytaire, et inhibée au cours de la différenciation (Lechner et al., 2013). Une expression ectopique de C/EBP $\beta$ -LIP inhibe la différenciation adipocytaire des pré-adipocytes en inhibant l'expression de C/EBP $\alpha$ , PPAR $\gamma$ 2 et FABP4. Par contre, une surexpression de C/EBP $\beta$ -LAP est capable d'induire les phases précoces et d'inhiber les

phases tardives de l'adipogenèse (Lechner et al., 2013; Yeh et al., 1995). C/EBP $\beta$  influence la différenciation terminale par l'induction de l'expression initiale de SREBP-1c, un régulateur essentiel du métabolisme de lipides dans les adipocytes. Avec la progression de l'adipogenèse, l'expression de C/EBP $\beta$  est inhibée par celle de C/EBP $\alpha$ , régulateur de l'expression de SREBP-1c au cours la phase tardive de l'adipogenèse (Payne et al., 2010).

Il a été montré que l'expression de C/EBP $\alpha$  précède celles de nombreux gènes adipocytaires et semble être capable d'activer sa propre transcription (Loftus and Lane, 1997). Les souris invalidées pour C/EBP $\alpha$  sont complètement dépourvues de TAB, ce qui montre l'essentialité de cette protéine dans la mise en place du TAB (Wang et al., 1995). Bien que les C/EBPs soient importantes pour la différenciation adipocytaire, ces facteurs restent incapables d'induire l'adipogenèse en absence de PPAR $\gamma$ . Par exemple, C/EBP $\alpha$  est incapable de restaurer l'adipogenèse dans les fibroblastes n'exprimant pas PPAR $\gamma$ . Par contre, une expression exogène de PPAR $\gamma$  est capable de restaurer l'adipogenèse des cellules déficientes en C/EBP $\alpha$  (El-Jack et al., 1999; Wu et al., 1999b).

#### 1.4.2.2 *La famille des PPARs*

Les « Peroxysome Proliferator-Activated Receptor » PPARs sont des récepteurs nucléaires qui se dimérisent avec le récepteur à l'acide 9-cis rétinolique « Retinoic X receptor » (RXR) pour activer l'expression des gènes ayant un élément de réponse de type PPRE (« PPARs response element ») au niveau de leurs promoteurs. Il a été montré que ce dernier est présent au niveau des promoteurs de très nombreux gènes impliqués dans l'adipogenèse (Spiegelman and Flier, 1996). Il existe 3 formes de PPARs chez les mammifères : PPAR  $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  et  $\gamma$ .

**PPAR $\gamma$**  est la forme la plus importante dans le TAB. On la trouve sous plusieurs isoformes. Au niveau du TA, on distingue PPAR $\gamma$ 1 et PPAR $\gamma$ 2. Ces isoformes sont issus de l'épissage alternatif et de l'usage de différents promoteurs au cours de la transcription du même gène. Alors que PPAR $\gamma$ 2 est strictement adipocytaire, on trouve PPAR $\gamma$ 1 dans de nombreuses cellules comme les macrophages (Rosen and MacDougald, 2006). Dans le cadre de l'étude de l'implication de ces isoformes dans la différenciation adipocytaire, il a été démontré que PPAR $\gamma$ 2 était plus efficace que PPAR $\gamma$ 1 pour induire ce processus (Mueller et

al., 2002; Zhang et al., 2004). Néanmoins, PPAR $\gamma$ 1 est lui aussi capable d'induire l'adipogenèse comme cela est le cas dans les souris invalidées pour PPAR $\gamma$ 2 qui présente un TAB normal (Medina-Gomez et al., 2005).

L'activité de PPAR $\gamma$  durant la phase précoce de l'adipogenèse est dépendante du niveau d'AMPc. En effet une augmentation de ce niveau dans des cellules de préadipocytes murins était responsable de la génération des ligands activateurs de PPAR $\gamma$  (Tzameli et al., 2004). En addition, SREBP1c et C/EBP $\beta$  peuvent induire la production des ligands de PPAR $\gamma$  et ainsi l'activité de ce dernier (Hamm et al., 2001; Kim et al., 1998). Les effets des AGs et des PGs sur l'activité de PPAR $\gamma$  seront développés ultérieurement (voir partie II chapitre 4.3).

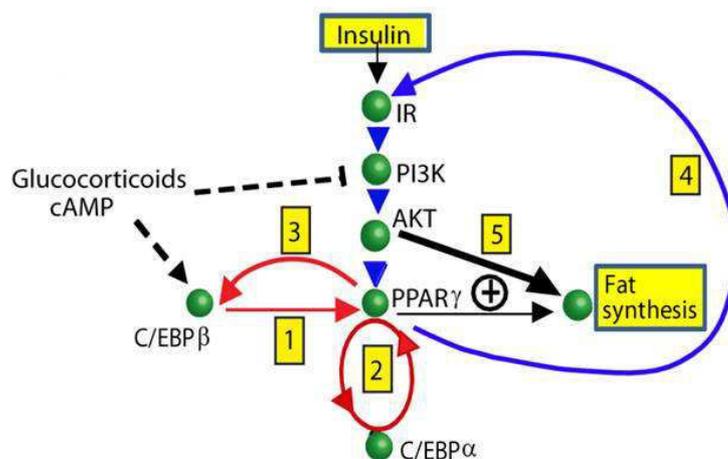
**PPAR $\alpha$**  est exprimé dans le TA brun, le TAB, le cœur, les muscles et le foie. Il est responsable de l'activation catabolisme des AGs, plus particulièrement la  $\beta$ -oxydation (Lee et al., 1995). Par ailleurs, chez des souris invalidées pour PPAR $\alpha$  on observe une augmentation de la masse du TAB due à une hypertrophie et une hyperplasie adipocytaire, une induction de l'expression des récepteur Glut4 et donc une hypersensibilité des adipocytes à l'insuline (Knauf et al., 2006).

**PPAR $\beta/\delta$**  est exprimé dans les tissus qui métabolisent les lipides, comme l'intestin grêle, les muscles squelettiques, le cœur et le TA. Il régule l'expression des gènes impliqués dans la mobilisation des AGs, tel que les FATPs, FABPs et l'ACS (Amri et al., 1995). Ce récepteur est activé essentiellement par les AGs à longues chaînes et la prostacycline (voir partie II chapitre 4.3.1). Il est exprimé dans la phase précoce de l'adipogenèse. Et à l'inverse de PPAR $\gamma$ , PPAR $\beta/\delta$  seul est insuffisant pour induire ce processus. Il a été montré que l'effet de ce récepteur dans la différenciation adipocytaire revient à sa capacité à activer l'expression de PPAR $\gamma$  (Bastie et al., 1999). Des études chez les souris invalidées pour PPAR $\beta/\delta$  ont montré que PPAR $\gamma$  et PPAR $\beta/\delta$ , ensemble étaient important pour une accumulation maximale de lipides et une différenciation adipocytaire complète (Matsusue et al., 2004).

### 1.4.2.3 Les autres facteurs de transcription

En plus des C/EBPs et des PPARs, il existe plusieurs autres facteurs modulant la différenciation adipocytaire. Par exemple, les protéines appartenant à la famille des « kruppel like factor » (KLF). KLF15, exprimé dès la phase précoce de l'adipogenèse, favorise la différenciation des préadipocytes et induit l'expression de Glut4 (Gray et al., 2002; Mori et al., 2005). KLF5 induit l'adipogenèse en activant l'expression de PPAR $\gamma$ 2 tandis que KLF2 et 7 l'inhibe. KLF6 favorise cette différenciation en inhibant l'expression du complexe « delta-like-1/preadipocyte factor-1 » (dlk-1/Pref-1), inhibiteur de cette dernière. D'autres protéines de la famille des C/EBP comme C/EBP $\gamma$  et CHOP se dimérisent avec C/EBP $\beta$  pour empêcher sa dimérisation avec C/EBP $\delta$  inhibant ainsi l'expression de PPAR $\gamma$ . Enfin, GATA2 appartenant à la famille des « GATA binding protein » se fixe sur le promoteur de PPAR $\gamma$ 2 et inhibe son expression (Rosen and MacDougald, 2006).

En conclusion, l'ensemble de ces facteurs et de ces voies a pour principal but d'induire l'expression de PPAR $\gamma$ 2, qui est lui le facteur crucial de l'adipogénèse. Cette étape est le point central de l'adipogénèse comme ont pu le décrire très récemment Park et collaborateurs, qui ont démontré que l'adipogenèse n'est déclenchée que lorsque l'expression de PPAR $\gamma$ 2 atteint un seuil critique. Ils ont ainsi caractérisé l'existence de plusieurs boucles positives coordonnées qui vont contrôler le passage irréversible des pré-adipocytes dans l'adipogénèse (Park et al., 2012). **(Figure 11)**



**Figure 11. Schématisation des étapes engageant la différenciation adipocytaire.** Les boucles qui contrôlent le passage irréversible des préadipocytes en adipocytes matures sont représentées en rouge. Illustrations d'après (Park et al., 2012).

## **2 Le tissu adipeux brun (TABr)**

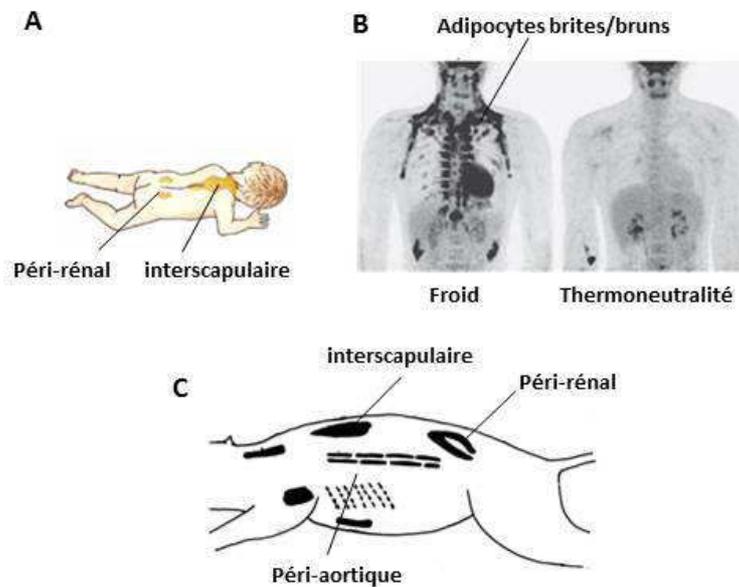
A l'inverse du TAB, décrit ci-dessus, qui a pour principal rôle de stocker et libérer l'énergie, le rôle principal du TABr est de dissiper l'énergie sous forme de chaleur. Cette fonction est rendue possible par la présence exclusive de la protéine découplante 1 (UCP1) au niveau de la membrane interne des nombreuses mitochondries contenues par les adipocytes bruns.

### **2.1 Historique**

En 1551, Gessner a démontré pour la première fois la présence du TABr chez les mammifères hibernants (Halpern et al., 2014). Dans les années 1960, Smith et ses collaborateurs ont défini le rôle thermogénique de ce tissu. Ce dernier sert de source de chaleur importante lors du réveil des animaux (SMITH and HOCK, 1963). En 1970, Rothwell et Stock ont observé un changement de la morphologie du TABr après une période d'exposition au froid, et ce changement était similaire à celui observé suite à un régime riche en lipides chez les rats (Rothwell and Stock, 1979). En 1964, les anatomistes décrivent la présence d'une similarité entre le TABr des mammifères et les dépôts de TA présents au niveau des régions dorsales et cervicales chez le nouveau-né. Ils ont donc supposé que ces dépôts produisaient de la chaleur nécessaire pour éviter l'hypothermie à la naissance (SILVERMAN et al., 1964). La capacité de thermogénèse non-frissonnante effectuée par le TABr chez le nouveau-né diminuait fortement avec l'âge, ce qui a conduit les chercheurs à considérer ce tissu comme absent chez l'Homme adulte. Néanmoins, cette considération n'était pas complètement acceptée car, des études faites sur des cadavres humains montrèrent que le TABr pouvait persister même après 8 décennies de vie chez l'Homme (Heaton, 1972). En 1984, Ricquier et ses collaborateurs ont défini la présence de TABr chez des patients souffrant d'un phéochromocytome (Ricquier et al., 1982). Ces découvertes ont permis de décrire le TABr chez l'Homme adulte dans des situations spécifiques et sans relation avec le métabolisme.

Il faut ensuite attendre les avancées technologiques en médecine nucléaire et la démocratisation de l'imagerie par émission de positons (PET-scan), pour voir apparaître un regain d'intérêt pour l'étude du TABr chez l'Homme. Le PET-scan utilise le glucose radioactif pour déterminer les tissus métaboliquement actifs (qui consomment des grandes quantités de glucose) comme le cœur, le cerveau et les tumeurs. En 2002, Les différentes données obtenues par la médecine nucléaires chez des patients souffrants d'un cancer ont montré qu'il existait des dépôts très actifs métaboliquement au niveau para-vertébral, supra-claviculaire, para-aortique et inter-scapulaire. Aux vues de la symétrie de ces dépôts de part et d'autre de la colonne vertébrale, il était impossible de les considérer comme des masses tumorales (Hany et al., 2002). De plus, ces dépôts étaient activés par le froid et le système nerveux sympathique comme le TABr chez les rongeurs ceci a permis donc la redécouverte et la renaissance du TABr chez l'homme (Nedergaard et al., 2007). C'est en 2009 que les preuves moléculaires sont apportées avec la mise en évidence de la présence de la protéine exclusive du TABr, UCP1, au niveau des dépôts d'adipocytes répartis entre les muscles du cou (Zingaretti et al., 2009). Dans le même temps, en utilisant la technique de PET-scan, trois équipes ont démontrés la présence de TABr actif et exprimant UCP1 chez des sujets sains exposés au froid et non actif chez les sujets à thermoneutralité. Point important, l'activité de ce tissu était négativement corrélée à l'IMC chez l'Homme (van Marken Lichtenbelt et al., 2009; Virtanen et al., 2009b). **(Figure 12)**

Depuis ces découvertes, les travaux sur le TABr et son implication dans l'homéostasie énergétique sont nombreux et en constante progression ; on peut comptabiliser plus de 2848 publications sur le TABr depuis 2009 dont la moitié sur l'obésité.



**Figure 12. Localisation du TABr chez l'homme et les rongeurs.** A : TABr chez le nouveau-né, B : visualisation des adipocytes thermogéniques par la technique d'imagerie par émission de positrons chez l'homme adulte exposé au froid d'après (van Marken Lichtenbelt et al., 2009; Virtanen et al., 2009b), C : localisation du TABr chez les rongeurs. D'après (Cannon and Nedergaard, 2004).

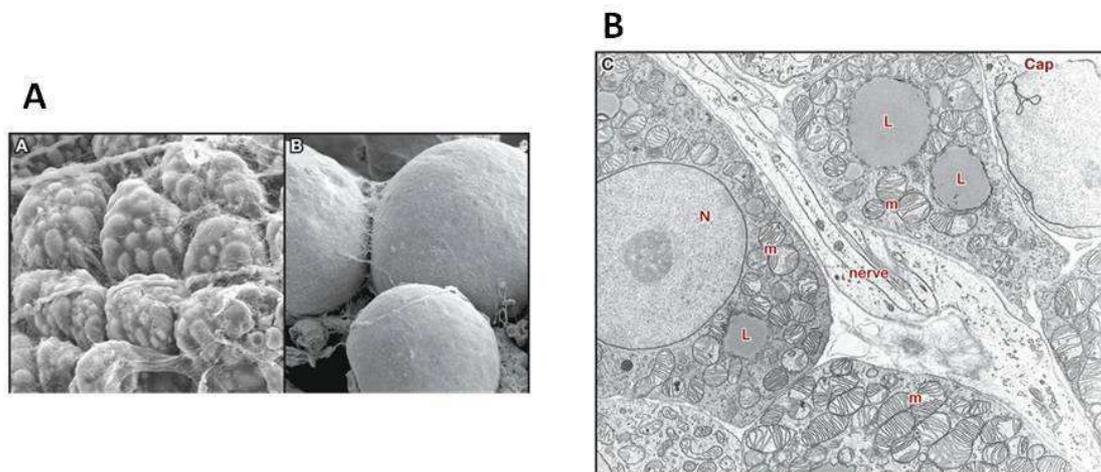
## 2.2 Anatomie du TABr

Les dépôts de TABr sont localisés au niveau de la région para-vertébrale, para-aortique, péri-rénale, péri-cardiaque, inter-scapulaire et entre les muscles du cou (supra-claviculaire). Ce tissu se caractérise par une vascularisation et une innervation importante. Au cours d'exposition au froid, l'innervation sympathique va libérer des catécholamines induisant l'activité thermogénique du TABr, les vaisseaux sanguins se dilatent et le débit sanguin se renforce. Le sang est ainsi chauffé et distribué aux organes vitaux comme le cœur, le cerveau et les reins (Nicholls and Locke, 1984). Chez les rongeurs, le dépôt interscapulaire représente le TABr le plus important car il est responsable du réchauffement du sang allant au cœur (Rauch and Hayward, 1969). Par contre, chez l'Homme le dépôt le plus important est le TABr supra-claviculaire qui réchauffe le sang alimentant le cerveau (Sidossis and Kajimura, 2015). **(Figure 13)**

## 2.3 L'adipocyte brun

Le TABr est constitué principalement d'adipocytes bruns et de pré-adipocytes. Dans des conditions de demande de thermogénèse, les préadipocytes se divisent et se différencient en adipocytes bruns matures et fonctionnels. Ce recrutement de nouveaux adipocytes entraîne une hypertrophie du tissu et est alors associée à une augmentation du nombre de capillaires et de terminaisons nerveuses (Cannon and Nedergaard, 2004).

Morphologiquement, les adipocytes bruns diffèrent des adipocytes blancs par leur forme polygonale, leur taille réduite, leur noyau central, et leur nombre élevé de gouttelettes lipidiques de petite taille ce qui donne à ces cellules un aspect multiloculaire. En plus de ces caractères morphologiques, les adipocytes bruns contiennent un nombre très important de mitochondries bien développées et occupant la majorité du cytoplasme. Ces mitochondries sont riches en crêtes mitochondriales et ainsi en chaînes respiratoires. Le contenu en mitochondrie et la vascularisation importante donne au TABr sa couleur foncée par rapport au TAB (Lee et al., 2013).



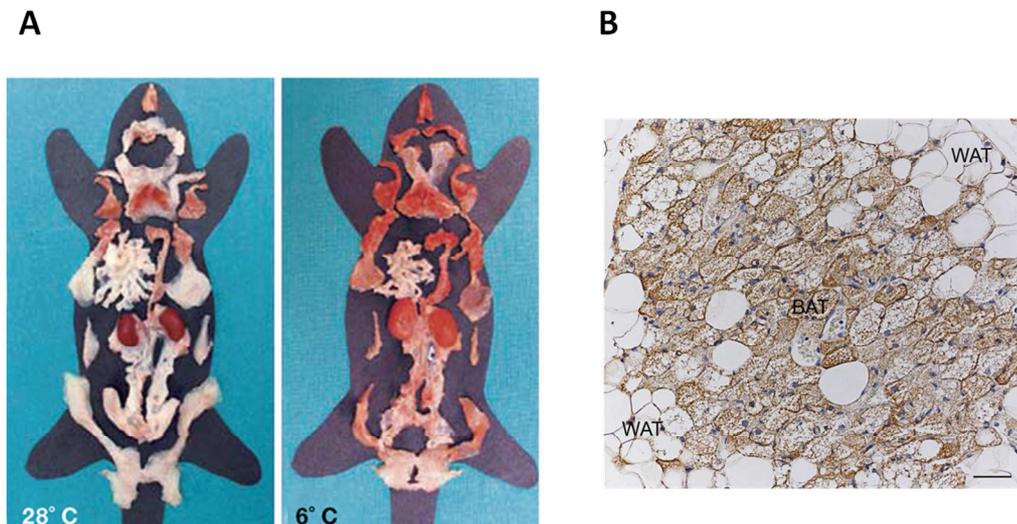
**Figure 13. Morphologie du TABr chez la souris.** A) Images de microscopie électronique à balayage des adipocytes bruns et blancs. B) TABr observé par microscopie électronique à transmission, Cap : capillaire, L : gouttelette lipidique, m : mitochondrie, N : noyau. D'après (Frontini and Cinti, 2010).

## 2.4 Les adipocytes « brites » ou beiges

En 1998, Guerra et al. ont montré que des adipocytes bruns exprimant UCP1, appelé « Brown-like adipocytes », peuvent apparaître au sein du TAB des souris suite à une exposition au froid ou à une activation de la voie  $\beta$ -adrénergique (Guerra et al., 1998). Plus tard, Cinti a supposé que ces cellules résultent d'une conversion des adipocytes blancs en adipocytes bruns et que cette conversion était réversible (Cinti, 2011).

Chez l'Homme, la présence des adipocytes bruns classiques est encore discutée. Les études histologiques des dépôts de TABr chez l'enfant sont très informatifs et montrent qu'il existe une différence entre les adipocytes présents dans la région interscapulaire et supra-claviculaire. Le TABr inter-scapulaire est composé d'adipocytes bruns multiloculés exprimant UCP1 et séparés du TAB par un tissu conjonctif. En plus de l'expression d'UCP1, ces adipocytes expriment Zic1 qui est le marqueur principal des adipocytes bruns chez la souris (Cinti, 2005; Lidell et al., 2013). Par contre, les adipocytes présents au niveau de la région supra-claviculaire expriment UCP1 sans exprimer Zic1. Ces cellules possèdent le caractère thermogénique mais n'ont pas la même signature caractéristique des adipocytes bruns interscapulaires. Ces adipocytes sont appelés « brown-like adipocytes » car ils coexistent avec les adipocytes blancs sans aucune séparation entre les deux. Ces adipocytes sont aussi nommés « brite » pour « Brown in White » ou adipocyte beige. **(Figure 14)**

Les adipocytes bruns et brites sont des adipocytes thermogéniques. Ils partagent plusieurs caractéristiques communes, mais se distinguent aussi par quelques particularités spécifiques à chacun. Parmi les caractéristiques communes, nous distinguons : les capacités thermogénique et lipolytique, l'activité mitochondriale et l'expression d'UCP1.



**Figure 14. Description des adipocytes brites.** A) photographie des dépôts adipeux des souris femelles avant et après une semaine d'exposition au froid (6°C), le changement de la couleur du TA est dû à l'apparition d'adipocytes brites au sein du TAB. B) Marquage des cellules qui expriment UCP1 par immunohistochimie d'une coupe histologique de TA SC d'une femme âgée de 24 ans. Les adipocytes multiloculés UCP1 positifs sont marqués en brun. D'après (Cinti, 2009).

## 2.5 La capacité thermogénique

Chez les mammifères, espèce homéotherme, la thermogenèse obligatoire correspond au métabolisme basal dû aux réactions métaboliques libérant de la chaleur et permettant à l'organisme de maintenir une température corporelle constante. Or, il existe un autre type de thermogenèse qui a lieu en réponse à des modifications de l'environnement, il s'agit de la thermogenèse dite adaptative ou induite. Dans des conditions d'exposition au froid, un mammifère a besoin de produire plus de chaleur pour lutter contre la baisse de sa température corporelle. Les premiers effecteurs de cette thermogenèse sont les muscles squelettiques qui libèrent de la chaleur par une thermogenèse dite frissonnante. Lorsque l'exposition au froid est plus importante en temps ou en intensité, la capacité thermogénique des muscles demeure insuffisante pour maintenir la température corporelle et ainsi, une thermogenèse non frissonnante se met en place au niveau du TA. Les adipocytes thermogéniques (bruns et brites) représentent les principaux effecteurs de cette thermogenèse. Il a été montré qu'une exposition chronique au froid induit un recrutement d'adipocytes thermogéniques et dans ces conditions l'expression d'UCP1 est induite de

l'ordre de 10 fois (Jacobsson et al., 1994). En plus de l'augmentation du nombre de cellules thermogéniques, on observe un accroissement du taux de mitochondrie et des enzymes mitochondriales et une induction de l'oxydation des AGs (Bukowiecki et al., 1982). La capacité thermogénique des adipocytes bruns et brites est due au phénomène de découplage de l'activité mitochondriale par UCP1, qui correspond à la dissipation du gradient de protons généré par les chaînes respiratoires au détriment de la synthèse d'ATP

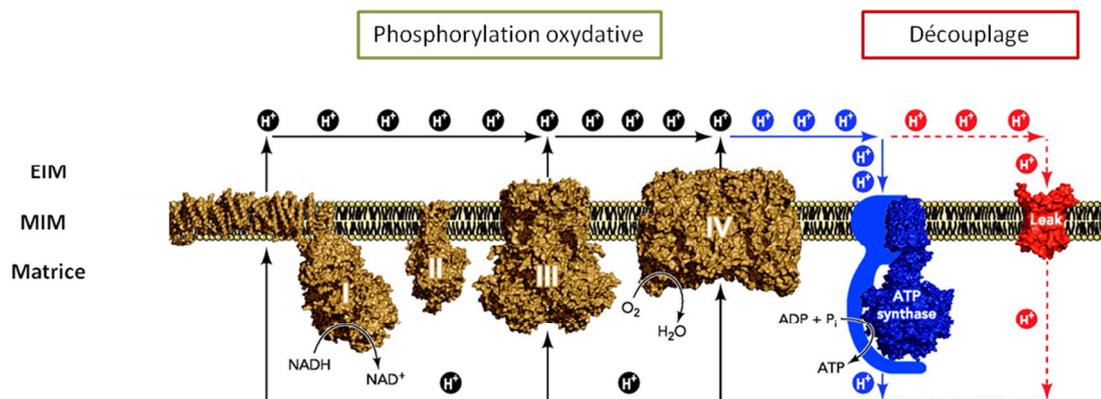
### 2.5.1 Le découplage de la respiration mitochondriale

La respiration mitochondriale représente le processus biologique utilisé par les cellules pour oxyder les coenzymes NADH et FADH<sub>2</sub>, obtenues à partir du cycle de Krebs, afin de former l'ATP nécessaire aux fonctions biologiques. Dans les mitochondries de la plupart des cellules la quasi-totalité de la respiration mitochondriale est couplée à la synthèse d'ATP. Cela n'est pas le cas dans les mitochondries des adipocytes thermogéniques activés.

Les coenzymes obtenues par le cycle de Krebs dans la matrice de la mitochondrie vont céder leurs électrons aux différents complexes de la chaîne respiratoire située au niveau de la membrane interne de la mitochondrie. Ces complexes amènent ces électrons par une série de réaction d'oxydoréduction vers une molécule d'oxygène pour former une molécule d'eau. L'activité des chaînes respiratoires va entraîner le passage de protons H<sup>+</sup> de la matrice vers l'espace intermembranaire de la mitochondrie. Ceci crée un gradient de protons de part et d'autre de la membrane interne de la mitochondrie. Ce gradient est utilisé par le complexe V de la chaîne respiratoire représenté par l'ATP-synthase pour générer de l'ATP. Le couplage de l'**oxydation** des coenzymes avec la **phosphorylation** de l'ADP en ATP est nommé la **phosphorylation oxydative**.

En 1967 Smith et Lindberg ont constaté que les mitochondries isolées à partir des adipocytes bruns respiraient beaucoup mais sans produire d'ATP (Ricquier and Kader, 1976). En d'autres termes, la respiration de ces mitochondries était découplée de l'ATP-synthase. Ce découplage est dû à la présence de la protéine UCP1 qui agit comme un canal à protons qui va dissiper le gradient de protons de l'espace intermembranaire, inutilisable alors par

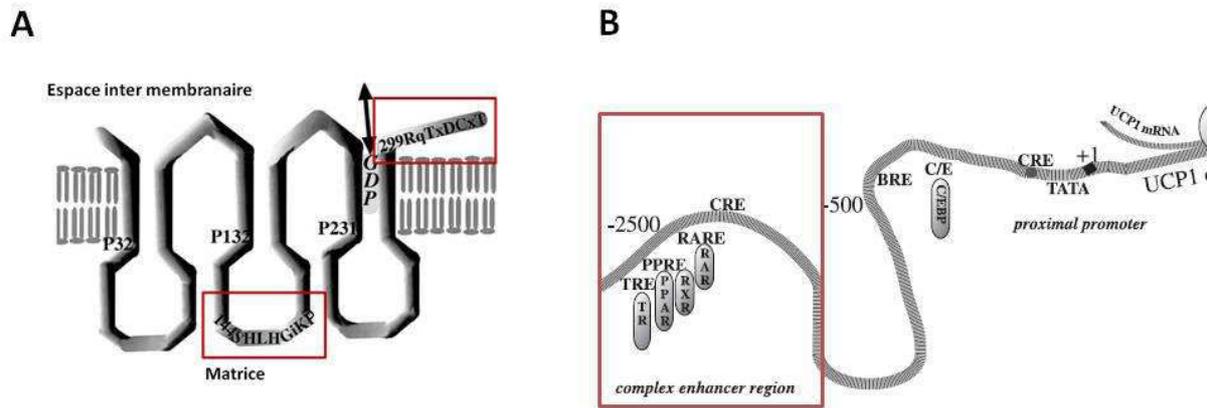
l'ATP synthase. Cette dissipation s'accompagne d'une production de chaleur (Cannon and Nedergaard, 2004; Nicholls and Locke, 1984; Ricquier and Kader, 1976). (**Figure 15**)



**Figure 15.** Schéma représentant la phosphorylation oxydative (en bleu) et le découplage (en rouge) mitochondriaux. I, II, III, IV représentent les différents complexes respiratoires. EIM : espace intermembranaire, MIM : Membrane interne de la mitochondrie. Adapté de (Divakaruni and Brand, 2011).

## 2.5.2 La protéine découplante 1 (UCP1)

En 1976, Ricquier et Kader ont décrit la protéine UCP1, présente dans les mitochondries des adipocytes bruns mais pas des hépatocytes, comme étant la protéine unique dont l'activité était induite par l'exposition au froid et inhibée lors de l'exposition des animaux à température relativement élevée (Ricquier and Kader, 1976). Dans les adipocytes thermogéniques, cette protéine représente 1 à 4% des protéines totales et 2 à 8% des protéines mitochondriales. C'est une protéine de 300 acides aminés ( $\approx$  32 kDa) appartenant à la famille des échangeurs mitochondriaux (Nübel and Ricquier, 2006). Elle partage avec les autres membres de la même famille une structure tripliquée formant 3 hélices de 100 acides aminés chacune. UCP1 se distingue des autres membres de cette famille par la présence exclusive d'une séquence d'acides aminés au niveau de l'hélice centrale et d'une autre séquence dans sa région C-terminale. (**Figure 16**)



**Figure 16. Schémas de la structure de la protéine UCP1 et du promoteur du gène correspondant.** A) Structure tripliquée des UCPs. Les séquences encadrées représentent celles spécifiques à l'UCP1. B) Schéma représentant la région proximale et la région du complexe amplificateur localisé au niveau du promoteur du gène UCP1. BRE : région spécifique au TABr, CRE : CREB response element, PPRE : PPAR response element, RAR :retinoïc acid receptor, RARE : retinoïc acid response element, RXR : retinoïc acid receptor X, TR :thyroïd hormone receptor, TRE : Thyroïd hormone response element. Adapté de (Cannon and Nedergaard, 2004).

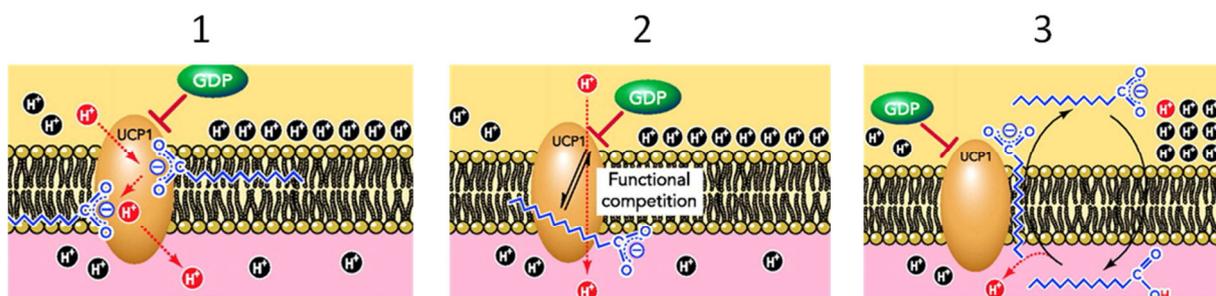
En 1997, Enerbäck et ses collaborateurs ont montré que les souris invalidées pour le gène UCP1 étaient incapable de maintenir leur homéothermie au cours d'une exposition au froid (Enerbäck et al., 1997). Chez l'Homme, comme chez les rongeurs, la transcription du gène UCP1 est contrôlée par plusieurs séquences localisées au niveau du promoteur de ce dernier. La plus importante est le complexe amplificateur « complex enhancer » occupant une séquence de 90 nucléotides située dans la région distale de ce promoteur. Au niveau de ce complexe se trouve la majorité des éléments de réponse aux inducteurs de l'expression d'UCP1, tel que l'élément de réponse à la T3 (TRE), aux PPARs (PPRE), à l'acide rétinoïque (RARE) et à CREB (CRE). (Cassard-Doulcier et al., 1998; Rim and Kozak, 2002)

### 2.5.3 Activité de la protéine UCP1

D'une part et comme nous avons vu précédemment, Ricquier et Kader ont défini UCP1 comme étant une protéine activée ou inhibée en fonction des modifications environnementales. Les facteurs responsables de l'inhibition de l'activité d'UCP1 au repos sont toujours un sujet de débat. En effet, il existe deux théories pour expliquer cette inhibition :

- 1) La première suppose qu'en absence de stimuli, UCP1 est exposée aux nucléotides cytosoliques tel que l'ADP, l'ATP, la GDP et la GTP. Et que ce sont ces nucléotides qui sont responsable de l'inhibition de l'activité d'UCP1.
- 2) La deuxième théorie suppose que l'inactivation d'UCP1 est simplement due à l'absence des ses facteurs activateurs. (Cannon and Nedergaard, 2004)

D'autre part, le principal facteur responsable de l'activation d'UCP1 au final est bien défini comme étant les AGs. A ce niveau, une nouvelle question se pose à propos de la définition de l'effet exact de ces AGs sur la protéine UCP1. Jusqu'à présent, il existe au moins trois hypothèses pouvant répondre à cette question : les AGs agissent 1) comme régulateurs allostériques d'UCP1, 2) comme cofacteurs et 3) comme navettes pour les protons (Cannon and Nedergaard, 2004; Divakaruni and Brand, 2011)



**Figure 17. Illustrations des possibles effets des AGs sur la protéine UCP1.** 1) Le modèle d'interaction allostérique, 2) La théorie de cofacteur et 3) La théorie de navette. D'après (Divakaruni and Brand, 2011).

- 1) Le modèle d'interaction allostérique : dans ce modèle, l'AG se fixe sur un site spécifique au niveau de la protéine UCP1 et modifie sa structure entraînant son activation
- 2) La théorie de cofacteur : l'AG se fixe sur son site de liaison situé au niveau du « canal conduisant les protons » de la protéine UCP1. Et par l'intermédiaire de sa fraction acide (chargée négativement), cet AG va servir de marches d'escaliers aidant les protons à passer tout au long des segments transmembranaires de ce canal (Winkler and Klingenberg, 1994).
- 3) La théorie de navette : dans ce cas, UCP1 n'est pas un transporteur de protons. En effet, cette théorie suppose que les protons traversent la membrane mitochondriale

interne sous une forme associée aux AGs. Ce passage est passif vu le caractère lipophile des AGs. Une fois dans la matrice mitochondriale, les protons H<sup>+</sup> se dissocient des AGs. Ces derniers chargés ainsi négativement sortent de la matrice vers l'espace intermembranaire par l'intermédiaire d'UCP1 (Garlid et al., 1998).

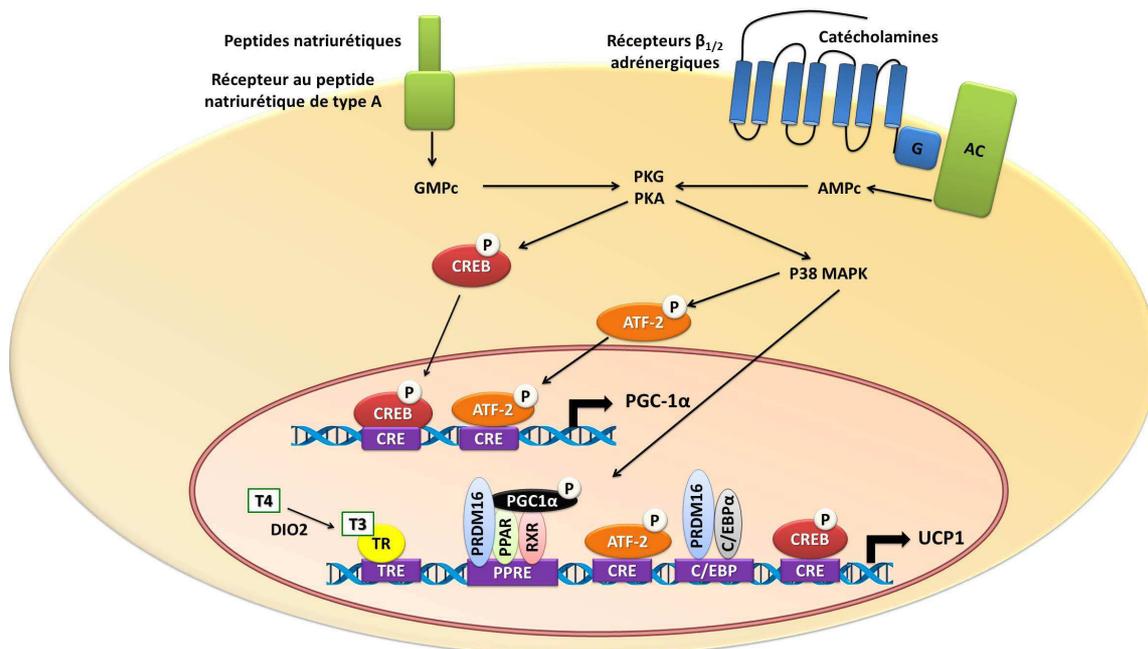
UCP1 n'est pas la seule protéine découplante, elle appartient à une famille de plusieurs membres chez les mammifères, parmi lesquels UCP2, UCP3, UCP4 et UCP5. UCP2 et UCP3 présentent environ 57% de similarité avec UCP1 (Pecqueur et al., 2001). UCP2 est exprimée dans la majorité des tissus chez les mammifères (Azzu et al., 2008), alors que l'expression d'UCP3 est limitée aux cellules musculaires squelettiques, cardiaques et faiblement au TABr (Nübel and Ricquier, 2006). A l'inverse d'UCP1, UCP2 et UCP3 ne sont pas impliquées dans la thermogénèse en réponse au froid mais elles jouent un rôle dans la thermogénèse basale (Bouchard et al., 1997). De plus, il a été démontré que ces deux protéines sont impliquées dans la limitation de la production des espèces réactives de l'oxygène (Arsenijevic et al., 2000; Vidal-Puig et al., 2000). Enfin, UCP4 et UCP5, présentes au niveau du cerveau des rongeurs sont impliqués dans la thermogénèse spécifique au tissu qui les expriment (Echtay, 2007).

#### **2.5.4 La mitochondrie**

Le découplage respiratoire et la protéine UCP1, développés dans les paragraphes précédents, sont les effecteurs principaux de la thermogénèse. Ce dernier a lieu au niveau des mitochondries présentes en grandes quantités dans les adipocytes thermogéniques. En effet, l'induction de l'expression et de l'activité d'UCP1 au cours de la thermogénèse est accompagnée d'une augmentation de l'activité mitochondriale et ainsi de la consommation d'oxygène, afin de compenser le manque d'ATP. Cette induction peut être due à plusieurs facteurs dont l'augmentation de la mitochondriogenèse et le changement de la morphologie des mitochondries.

#### 2.5.4.1 *La mitochondriogenèse*

La mitochondriogenèse, c'est-à-dire la multiplication du contenu en mitochondrie, nécessite d'abord la multiplication de l'ADN d'une mitochondrie mère, son allongement et ensuite la fission de cette dernière en plusieurs mitochondries filles. Il a été démontré qu'une stimulation de la voie  $\beta$ 3-adrénergique induisait une augmentation du nombre des mitochondries d'un facteur trois (Klingenspor et al., 1996). Plus tard, l'équipe de Spiegelman a montré que le co-facteur-1 $\alpha$  de PPAR $\gamma$  (« PPAR $\gamma$  co-factor-1 $\alpha$  », PGC-1 $\alpha$ ) était induit par le froid (Puigserver et al., 1998). Et un an après, cette même équipe a démontré que PGC-1 $\alpha$  était le facteur de transcription majeur impliqué dans la mitochondriogenèse (Wu et al., 1999a). En effet, PGC-1 $\alpha$  induit l'expression des facteurs nucléaires de la respiration « Nuclear respiratory factor » (NRF-1 et NRF-2). Ensuite, PGC-1 $\alpha$  et NRF-1 agissent ensemble pour induire le facteur de transcription mitochondrial A « Transcription Factor A Mitochondrial » (TFAM). Ce dernier est un régulateur direct de la réplication et la transcription de l'ADN mitochondrial (Wu et al., 1999a). Dans les adipocytes thermogéniques, PGC-1 $\alpha$  est l'effecteur transcriptionnel principal de l'activation adrénergique, son expression et son activation étant directement régulées par cette voie de signalisation. Plus précisément, PGC-1 $\alpha$  est : 1) Transcrit suite à l'effet du facteur de transcription « activating transcription factor 2 » (ATF2) activé par la voie adrénergique ; 2) Phosphorylé et donc activé par la protéine p38, elle-même activée en réponse à une stimulation sympathique. Activé, PGC-1 $\alpha$  régule l'expression des gènes thermogéniques comme PPAR $\gamma$ , PPAR $\alpha$ , le récepteur thyroïdien et plusieurs autres. Ensemble, PGC-1 $\alpha$  et PPAR $\gamma$  induisent l'expression d'UCP1 (Harms and Seale, 2013). **(Figure 18)**

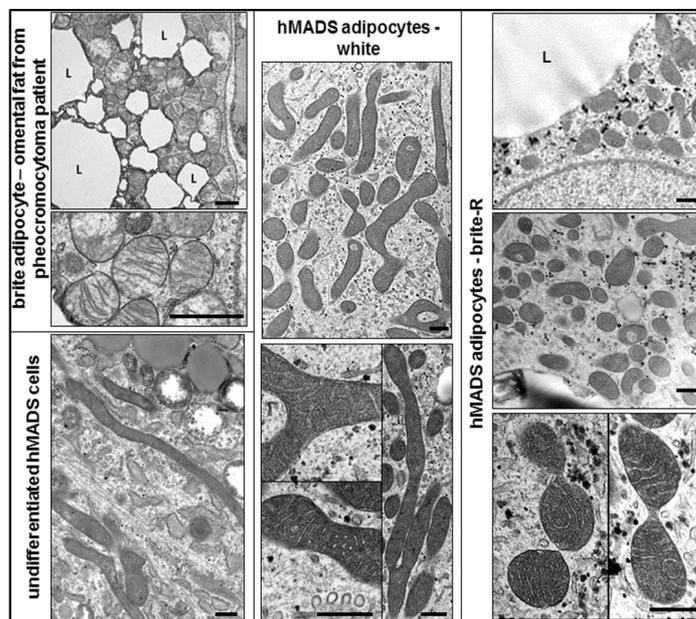


**Figure 18. Contrôle de l'expression de PGC-1 $\alpha$  et d'UCP1.** Les catécholamines et les peptides natriurétiques, par l'activation de leurs propres récepteurs, induisent une augmentation du taux d'AMPc et de GMPc intracellulaires. L'AMPc et la GMPc activent la PKA ou la PKG qui vont phosphoryler CREB et/ou la MAPK p38. Après leurs phosphorylations, CREB se lie à son élément de réponse pour induire l'expression de PGC-1 $\alpha$  et d'UCP1 et p38 phosphoryle les facteurs de transcription impliqués dans l'expression de ces deux gènes comme ATF-2 et PGC-1 $\alpha$ . AC : adénylate cyclase, ATF-2: activating transcription factor 2, CRE: CREB response element, CREB : cAMP response element binding protein, PPRE: PPARs response element, PRDM16 : PR domain containing 16, T3 : triiodothyronine, T4 :tetraiodothyroxine, DIO2 : déiodinase 2

Plusieurs facteurs de transcription inhibent la thermogénèse en interférant avec l'activité et l'expression de PGC-1 $\alpha$ . Par exemple, les membres de la famille des protéines du rétinoblastome (pRb), comme Rb1 et p107, inhibent la transcription de PGC-1 $\alpha$  affectant ainsi l'expression des gènes spécifiques des adipocytes thermogéniques (Scimè et al., 2005). En plus, le co-répresseur nucléaire (Rip-140) se fixe sur PGC-1 $\alpha$  pour inhiber l'activité de cette dernière (Hallberg et al., 2008). Et finalement, le récepteur nucléaire LXR- $\alpha$  recrute le Rip-140 pour inhiber l'activité de PGC-1 $\alpha$  et ainsi l'expression d'UCP1 et la thermogénèse (Wang et al., 2008a).

#### 2.5.4.2 *Le changement morphologique*

La morphologie des mitochondries change suivant des cycles de fusion (morphologie tubulaire) et de fission (morphologie ronde) mitochondriales (Twig and Shirihai, 2011). Ces changements morphologiques sont corrélés au changement de l'activité et du stress mitochondriaux. Il a été démontré qu'il existe un lien entre la fragmentation des mitochondries et la demande d'énergie (Liesa and Shirihai, 2013). En 2014, Wikstrom et ses collaborateurs ont montré que les mitochondries des adipocytes bruns acquièrent une forme ronde suite à une stimulation adrénérgique des souris et que ce changement morphologique était dû à la phosphorylation de la protéine « Dynamin Related Protein-1 » (DRP-1) (Wikstrom et al., 2014). A l'inverse des mitochondries fusionnées des cellules non différenciées et des adipocytes blancs qui possèdent des crêtes courts et linéaires, les mitochondries rondes des adipocytes thermogéniques affichent des crêtes laminaires (Frontini and Cinti, 2010). Récemment, notre équipe a démontré que la conversion des adipocytes blancs, issus des préadipocytes humains, en adipocytes thermogéniques est accompagnée d'une induction de l'expression d'UCP1 et d'une fission mitochondriale due à la phosphorylation de DRP-1. **(Figure 19)**



**Figure 19. Analyse des mitochondries des adipocytes blancs et brites par microscopie électronique à transmission.** Le TAB omental des patients atteints d'un phéochromocytome, les cellules humaines hMADS non différenciées et les adipocytes blancs et brites sont analysés. Échelle = 1 µm. L: gouttelette lipidique. On remarquera la forme sphérique des mitochondries de l'adipocyte brite comparé à leur forme allongée dans l'adipocyte blanc et les cellules non différenciés. hMADS : human multipotent adipose derived stem cells.

### 2.5.5 La lipolyse

Selon Cannon et Nedergaard, la thermogénèse est essentiellement due à l'activation d'UCP1 par la lipolyse (Cannon and Nedergaard, 2004). Dans les adipocytes la lipolyse est déclenchée après la phosphorylation des lipases et de la PLIN par la PKA. Elle est observée par la libération d'AGs et de glycérol. Une partie de ces AGs sera libérée par les cellules et une autre partie sera prise en charge par les FABPs. Il a été démontré que les adipocytes bruns possèdent plusieurs types de FABPs comme la FABP3, non exprimées dans les adipocytes blancs (Vergnes et al., 2011). Ceci pourrait expliquer la faible présence d'AGs libres dans ces adipocytes malgré la vitesse élevée de la lipolyse. Les AGs seront ensuite acheminés par les FABPs dans les peroxysomes et surtout vers les mitochondries. Au niveau de ces derniers, ils vont subir la  $\beta$ -oxydation. Dans la mitochondrie, les AGs  $\beta$ -oxydés vont servir de substrats énergétiques afin de compenser le manque d'ATP dû au découplage. En outre, les AGs non métabolisés vont participer à la fonction d'UCP1 en modifiant la conformation de ce dernier ou en servant de navette de protons entre l'espace inter-membranaire et la matrice mitochondriale.

### 2.5.6 La $\beta$ -oxydation

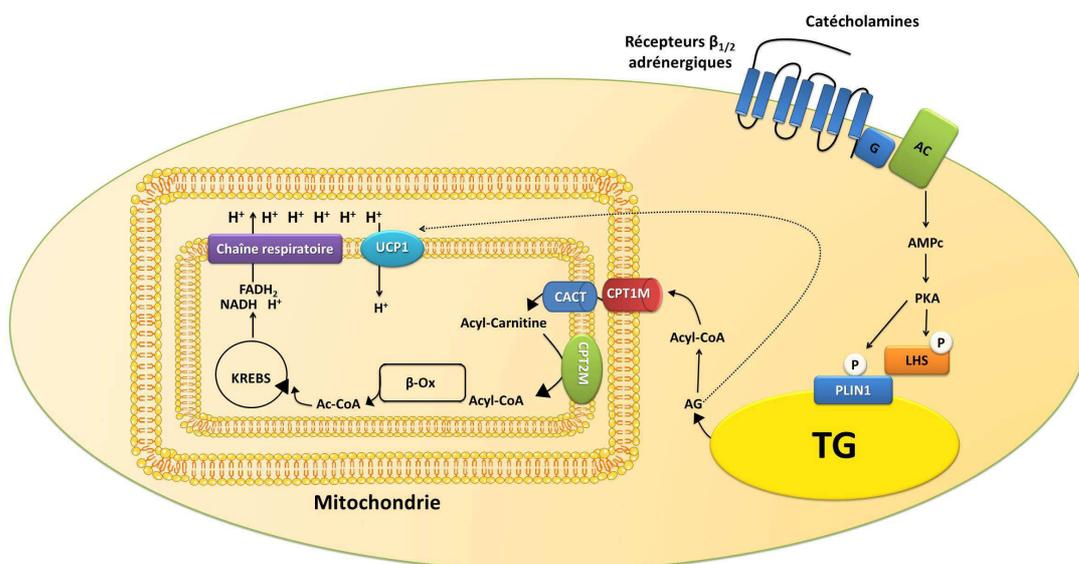
La première étape de l'oxydation des AGs se déroule au niveau de la membrane externe de la mitochondrie. Elle transforme les AGs en acyl-CoA par l'action de l'Acyl-CoA synthétase. Afin de rejoindre la matrice mitochondriale où se déroulent les réactions de  $\beta$ -oxydation, les AGs vont être transportés par un système de transport. Ce transport est assuré en premier lieu par la carnitine palmitoyl-transferase 1 (CPT-1) qui transporte l'acyl-CoA du cytosol vers l'espace inter-membranaire de la mitochondrie en le transformant en acyl-carnitine. Le nouvel acyl-carnitine peut donc traverser la membrane mitochondriale externe puis être transporté à travers la membrane mitochondriale interne par l'acyl-carnitine translocase (CACT). Arrivé au niveau de la matrice mitochondriale, le groupement acyl est restitué au CoA par la carnitine palmitoyl-transférase 2. A ce niveau, les acyl-CoA vont être dégradés par une cascade de 4 réactions :

- 1) Déshydrogénation : catalysée par l'acyl-CoA déshydrogénase couplée à la FAD, elle génère un déhydro-acyl-CoA et une molécule de FADH<sub>2</sub>.

- 2) Ré-hydratation : catalysée par l'énoyl-CoA-hydratase, elle produit le bêta-hydroxy-acyl-CoA.
- 3) Déshydrogénation : catalysée par le 3-hydroxy-acyl-CoA déshydrogénase, elle libère une molécule de NADH et un proton H<sup>+</sup>.
- 4) Clivage : catalysée par la 3-cétothiolase, elle libère un acétyl-CoA qui va rentrer dans le cycle de Krebs.

La  $\beta$ -oxydation des AGs suivit du cycle de Krebs va générer les coenzymes NADH et FADH<sub>2</sub> qui vont céder leurs électrons aux complexes de la chaîne respiratoire. Ceci sera accompagné par la génération d'un gradient de protons dans l'espace inter membranaire de la mitochondrie.

Au final, il existe donc une relation positive entre la lipolyse libérant des AGs, les coenzymes NADH/FADH<sub>2</sub>, le gradient de protons et la thermogénèse. (**Figure 20**)



**Figure 20. Le rôle de la  $\beta$ -oxydation dans la thermogénèse.** L'activation de la lipolyse par les catécholamines entraîne une libération des AGs dans le cytoplasme qui vont être transformés en acyl-CoA par l'acyl-CoA synthétase. L'Acyl-CoA traverse les membranes mitochondriales externe et interne, sous forme d'acyl-carnitine et est retransformé en acyl-CoA par CPT2M puis  $\beta$ -oxydé en acétyl-CoA. Ce dernier génère des molécules de NADH et de FADH<sub>2</sub> qui vont servir de substrat à la chaîne respiratoire. Les AGs peuvent directement activer UCP1, ceci est représenté par la flèche pointillée. AG : acides gras, CPT1M : carnitine palmitoyltransférase 1 musculaire, CACT : carnitine acyl-carnitine translocase, CPT2M : carnitine palmitoyltransférase 2 musculaire,  $\beta$ -ox :  $\beta$ -oxydation.

Le principal niveau de régulation de la  $\beta$ -oxydation se situe au niveau du transport des acyl-CoA du cytoplasme vers la mitochondrie, qui est réalisé par CPT1M (ou CPT1B). Cette forme de CPT1, présente dans les mitochondries des adipocytes thermogéniques et des fibres musculaires, est essentielle à l'activité thermogénique, son inhibition, par exemple par l'etomoxir, abolie complètement la respiration mitochondriale des adipocytes bruns. Dans des situations où il n'y a pas de demande de chaleur, l'activité de CPT1M est inhibée/contrôlée par le malonyl-CoA qui est produit lors de la lipogenèse. Cela favorise alors le stockage au détriment de l'utilisation des acides gras (Cannon and Nedergaard, 2004). L'expression de CPT1M est activée par PGC-1 $\alpha$  (Louet et al., 2002).

### 2.5.7 Les différents substrats énergétiques

La fonction thermogénique est donc grande consommatrice de substrats énergétiques, dont les AGs provenant de la lipolyse des TGs sont les principaux. Néanmoins, la mitochondrie des adipocytes bruns et brites peut aussi utiliser d'autres sources d'énergie. A l'inverse de ce que nous pensions, alors que le glucose est un substrat préférentiel des mitochondries, au sein des adipocytes thermogéniques il est utilisé de manière très importante mais pas comme substrat énergétique. En effet, le glucose va être plutôt utilisé pour former du glycérol-3-P, *via* la néoglycogénèse, et donc participer à la formation des TGs. Cela est permis par la surexpression de PDK4, une des kinases inhibitrices de la pyruvate déshydrogénase (PDH) empêchant donc la métabolisation du pyruvate en acétyl-CoA (Barquissau et al., 2016).

D'autre part, il a été montré que les adipocytes bruns sont capables d'utiliser les corps cétoniques. Ces derniers, produits par le foie à partir d'acétyl-CoA, vont être retransformés en acétyl-CoA au sein des adipocytes bruns. Cet acétyl-CoA va pouvoir alors être utilisé directement comme substrats énergétiques mais aussi participer à la resynthèse d'AGs (Wright and Agius, 1983).

De manière intéressante, l'équipe de Bruce Spiegelman a montré récemment qu'un cycle de métabolisation de la créatine était présent au niveau des mitochondries des adipocytes brites et induisait une activité respiratoire et thermogénique de ces dernières.

Ces résultats posent de nombreuses questions, car ils sont difficilement compatibles avec la fonction thermogénique d'UCP1 car l'ADP généré en grande quantité par la créatine est l'inhibiteur le plus fort, avec le GDP, de la fonction d'UCP1. On peut donc se demander si cette thermogénèse dépendante de la créatine prend vraiment place au niveau des adipocytes thermogéniques exprimant UCP1, surtout que ce cycle est fonctionnel dans les animaux invalidés pour UCP1, dans lesquels des systèmes compensatoires indépendants d'UCP1 sont en place (Kazak et al., 2015).

## **2.6 Régulation de l'activité thermogénique**

L'activité thermogénique dépend principalement de l'expression et de l'activité d'UCP1. Ces derniers sont souvent régulés par le système nerveux sympathique, activé suite aux changements environnementaux. Néanmoins, cette activité peut être modulée par plusieurs autres facteurs que je détaillerai dans ce chapitre.

### **2.6.1 Les récepteurs $\beta$ -adrénergiques**

Le froid représente le régulateur dominant de l'activité des adipocytes thermogéniques. Ce régulateur peut agir de différentes manières : 1) il active la sécrétion de la noradrénaline par les terminaisons nerveuses sympathiques innervant les TAB et TABr. 2) En plus des terminaisons nerveuses, les macrophages activées du TA sont capables de sécréter des catécholamines, comme la noradrénaline, en réponse au froid (Nguyen et al., 2011). La noradrénaline va activer les récepteurs  $\alpha$ - et  $\beta$ -adrénergiques et induire une cascade de signalisation capable de moduler l'expression de plusieurs gènes thermogéniques (Collins, 2011). Les récepteurs  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  sont couplés à une protéine Gq et Gi respectivement. Ils vont inhiber l'activité de l'adénylate cyclase directement ou par l'intermédiaire du  $Ca^{2+}$  intracellulaire. Par contre, les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques sont eux couplés à des protéines Gs activatrices de la voie de signalisation de l'AMPc et ainsi de la thermogénèse. Une telle co-présence entre deux systèmes opposés permettrait au TA de moduler sa réponse à une stimulation par la norépinephrine (Cannon and Nedergaard, 2004).

En plus du froid, les adipocytes thermogéniques vont être recrutés et activés dans des situations où les catécholamines sont secrétées de manière importante comme par exemple lors d'un stress telle que la peur ou la douleur (Carter et al., 2011). Dernièrement une étude a pu montrer le recrutement d'adipocytes brites chez des grand-brulés présentant donc un stress adrénérgique intense (Sidossis and Kajimura, 2015). Comme nous avons déjà pu le voir, ceci est vrai aussi dans le cas de phéochromocytomes qui correspondent à des tumeurs de la glande surrénale entraînant une libération massive et continue de catécholamines (Ricquier et al., 1982). Chez ces patients, le tissu adipeux omental proche de la tumeur va présenter de nombreux adipocytes thermogéniques (Frontini et al., 2013).

La thermogénèse induite par les régimes est-elle aussi régulée par le système parasympathique que ce soit à long terme ou à court terme (Westerberp, 2004), ce que l'on appelle alors la thermogénèse postprandiale. Cette thermogénèse est dépendante de la taille et de la composition des repas et peut-être corrélée positivement à la teneur en acides gras polyinsaturés, particulièrement de type  $\omega 3$  (Kim et al., 2015).

Chez les rongeurs, le récepteur  $\beta 3$ -adrénérgique est le récepteur adrénérgique le plus abondant dans les adipocytes thermogéniques. Ce récepteur est couplé à une protéine Gs activatrice de la voie de signalisation de l'AMPc. Une fois activé par les catécholamines, ce récepteur va engendrer une activation de la PKA qui à son tour va phosphoryler la protéine CREB (Thonberg et al., 2002). Phosphorylée, CREB devient active et migre vers le noyau. Elle se fixe sur son élément de réponse, CRE, situé au niveau de plusieurs promoteurs de gènes impliqués dans la thermogénèse, y compris UCP1 (Cannon and Nedergaard, 2004). La PKA est aussi capable d'activer une autre voie des MAP kinase, comme la voie p38. Une fois activée, cette dernière phosphoryle le facteur de transcription « activating transcription factor 2 » (ATF2). A son tour, ATF2 active l'expression d'UCP1 et ainsi la thermogénèse (Cao et al., 2001).

Dans le cadre d'un travail collaboratif entre notre équipe et l'équipe de Tore Bengtsson en Suède, il a été montré que, bien que le récepteur  $\beta 3$ -adrénérgique soit le plus abondant dans les adipocytes, le récepteur  $\beta 1$ -adrénérgique était aussi capable d'induire la thermogénèse chez la souris. L'effet de ce récepteur n'est mis en évidence que lorsque

l'induction de la thermogenèse, et ainsi l'expression d'UCP1, ont été activés par le récepteur  $\beta$ 1-adrénergique chez les souris  $\beta$ 3-ADR<sup>-/-</sup> exposées au froid. Le récepteur  $\beta$ 2-adrénergique présent au niveau des pré-adipocytes n'est pas impliqué dans la thermogenèse chez ces souris. De même, ce même travail a démontré que l'expression d'UCP1 était induite à la fois par les agonistes  $\beta$ 1 et  $\beta$ 3-adrénergiques dans les adipocytes humains *in vitro* ce qui n'était pas le cas de l'agoniste du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique (Mattsson et al., 2011).

Récemment, notre équipe a étudié l'implication dans la thermogenèse des canaux potassiques sensibles au pH «Twik-related acid-sensitive K<sup>+</sup> channel» TASK-1, fortement exprimé dans le TABr des souris et de l'Homme. Nous avons pu démontrer que les souris invalidées pour le gène TASK-1 développent une réponse altérée à l'activation des récepteurs  $\beta$ 3-adrénergiques, qui se traduit par une diminution de l'expression d'UCP1, de la lipolyse et de l'activité mitochondriale. Nos résultats montrent que ce canal contrôle l'activité des adipocytes bruns en modulant la voie de signalisation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques (Pisani et al., 2015).

### **2.6.2 Les peptides natriurétiques (NPs)**

En plus de l'activité lipolytique de l'ANP et du BNP dont nous avons parlé précédemment, un travail collaboratif entre l'équipe de Sheila Collins aux Etats-Unis et notre laboratoire a récemment démontré que le taux circulant des peptides natriurétiques est induit suite à l'exposition au froid des souris invalidées pour le récepteur NPRc et que ceci induisait la thermogenèse. En effet, le traitement des souris par du BNP induisait l'expression d'UCP1 et de PGC-1 $\alpha$  dans le BAT, accompagnée d'une élévation de la respiration et de la dépense énergétique. En addition, ils ont pu démontrer que l'effet de ces protéines sur l'expression des gènes impliqués dans la thermogenèse était dépendant de la voie GMPc/PKG/p38/ATF2 et de PGC-1 $\alpha$ . Ces résultats ont été validés chez l'Homme. En effet, le traitement des adipocytes bancs humains *in vitro* par les peptides natriurétiques activait l'expression de PGC-1 $\alpha$  et d'UCP1, la mitochondriogenèse et l'activité mitochondriale (Bordicchia et al., 2012).

### 2.6.3 Les hormones thyroïdiennes

Comme les préadipocytes, les adipocytes thermogéniques matures expriment l'enzyme DIO2 responsable de la transformation de la T4 en T3. *In vivo*, L'expression de cette enzyme est induite par la voie de signalisation de l'AMPc activée suite à une stimulation adrénergique (Bianco and Silva, 1988). L'activité de DIO2 est capable d'induire, via l'action de la T3, l'expression du gène UCP1 grâce à la présence d'un élément de réponse aux hormones thyroïdiennes au niveau du promoteur de ce gène (Lee et al., 2013). En plus, il a été montré que la T3 était capable d'induire la mitochondriogenèse et ainsi la consommation d'oxygène dans les cellules en culture primaire des rongeurs et les préadipocytes humains (Lee et al., 2012a).

### 2.6.4 TRPM8

Le « Transient Receptor Potential Melastanin 8 » (TRPM8) est un des nombreux canaux ioniques impliqués dans la transmission des signaux extérieurs vers la cellule. C'est un canal calcique non sélectif détecteur du froid, il est essentiellement exprimé dans les nerfs sensoriels, le système nerveux central, la vessie et les vaisseaux sanguins (Peier et al., 2002). Outre le froid, ce récepteur peut être activé par les agents rafraichissants comme le menthol. Récemment, Ma et al. ont démontré que TRPM8 est présent et fonctionnel au niveau du TABr des souris. Ils ont ainsi montré que chez les souris TRPM8<sup>-/-</sup>, il existe un défaut au niveau de l'expression d'UCP1 et de la thermogénèse en réponse au froid (Ma et al., 2011). Plus tard, l'équipe de Roberto Vittor a montré que ce récepteur est présent au niveau des adipocytes blancs chez l'Homme et que l'activation de ce dernier induit une augmentation du taux de Ca<sup>++</sup> intracellulaire. Ceci était accompagné par une induction de l'expression d'UCP1 et d'une activité thermogénique (Rossato et al., 2014). De notre côté, nous avons pu montrer qu'il existe une corrélation entre l'expression de TRPM8 et l'expression d'UCP1 dans les adipocytes humains *in vitro*.

### 2.6.5 Les autres activateurs

En plus des activateurs de la thermogénèse discutés ci-dessus, il existe de nombreuses autres molécules ayant le même effet. On peut citer, **BMP8b** qui est une

protéine produite et sécrétée par les adipocytes bruns matures, agit sur ces derniers d'une manière autocrine pour amplifier leur réponse thermogénique suite à une activation adrénergique. En effet, la T3 et la BMP8b sont capables d'activer la thermogénèse en agissant directement sur les adipocytes bruns, ou indirectement par l'intermédiaire du système nerveux central (Harms and Seale, 2013). L'acide aminé, **citrulline**, qui a été décrit comme activateur de l'expression d'UCP1, de PGC-1 $\alpha$  et ainsi de la thermogénèse dans des explants de TAB de jeunes rats (Joffin et al., 2015). L'**adénosine**, un nucléoside purine omniprésent dans l'espace extracellulaire et sécrété par le TABr suite à une stimulation nerveuse sympathique. Il a été démontré que l'adénosine induisait la lipolyse dans les adipocytes humains et les adipocytes bruns murins. Cet effet est médié par son récepteur A2A couplé à la protéine Gs, est requise pour induire la thermogénèse chez la souris (Bordicchia et al., 2012; Gnad et al., 2014). Le « Glucagon-like peptide 1 » (**GLP-1**) est capable d'activer le TABr chez la souris et l'Homme, directement au niveau des adipocytes par l'activation de son récepteur GLP-1R et de la voie PKA ou indirectement par la fonction endocrine du système nerveux central (Kooijman et al., 2015; Lockie et al., 2012). GLP-1 permet ainsi d'induire par exemple l'utilisation de glucose et d'AGs plasmatiques ou de diminuer la prise de poids. Ces données sont très intéressantes, car des agonistes de GLP-1R comme l'exendin-4 sont déjà utilisés pour traiter des patients diabétiques. Enfin, il a été récemment démontré qu'en plus de ces nombreuses implications physiologiques, le microbiote intestinal est capable de réguler d'une manière directe ou indirecte la fonction du TABr et ainsi la thermogénèse (Rosen, 2016).

Jusqu'à présent, nous avons vu les caractères communs entre les adipocytes bruns et blancs. En effet, ces adipocytes partagent plusieurs points communs en relation avec leur fonction thermogénique, mais ils se distinguent par leur origine développementale et leur signature moléculaire. Ces derniers seront détaillés dans le chapitre suivant.

## 2.7 Origines des adipocytes brites

### 2.7.1 Origines développementales des préadipocytes brites

Les progéniteurs adipeux blancs ont été décrits comme provenant des MSCs dérivés du mésoderme. Or, chez les mammifères il a été montré que les progéniteurs adipeux peuvent émerger à la fois du mésoderme mais aussi de la crête neurale. Cette dernière dérive du neurectoderme et lors de la fermeture du tube neurale les cellules de la crête migrent vers différentes zones de l'embryon pour se différencier en différents types de cellules y compris les adipocytes (Billon et al., 2007).

Les progéniteurs des adipocytes bruns proviennent d'une sous-population du dermomyotome capable aussi de générer des cellules musculaires. La presque totalité des adipocytes du TABr interscapulaire provient de précurseurs exprimant *Myf5*. Ce dernier est un gène exprimé spécifiquement au niveau des précurseurs des muscles squelettiques (Seale et al., 2008). Cette origine commune entre adipocytes bruns et muscle squelettique est attestée par le fait que la signature génétique et le profil protéomique mitochondrial des adipocytes bruns sont plus apparentés avec ceux des cellules musculaires que ceux des adipocytes blancs (Forner et al., 2009). L'engagement dans la voie adipocytaire, au détriment de la voie musculaire, est dû essentiellement à l'expression de *PRDM16* concomitante à la répression de *Myf5* (Seale et al., 2008). Cette origine développementale est donc différente des progéniteurs du TAB. Néanmoins, les données disponibles sur ce sujet sont encore contradictoires. En 2008, Seale et ses collaborateurs définissaient les adipocytes brites comme dérivés de précurseurs *Myf5* négatif (Seale et al., 2008). Par contre, une étude publiée en 2012 a montré que les précurseurs des adipocytes brites pouvaient exprimer *Myf5* (Sanchez-Gurmaches et al., 2012). Ensuite, le groupe de Spiegelman a pu montrer qu'environ 10 à 15% des adipocytes brites exprimaient le *Myh11*. Ce dernier représente un des marqueurs les plus spécifiques des cellules musculaires lisses et non squelettiques (Long et al., 2014). Plus tard, une équipe montre que suite à une exposition des souris au froid les adipocytes bruns présents au niveau du TABr inter-scapulaire

proviennent de précurseurs exprimant PDGFR $\alpha$ , proches de la signature moléculaire des préadipocytes blancs (Lee et al., 2015). (Figure 21)

### 2.7.2 Précurseurs des adipocytes brites dans le TAB

Dans le TAB de l'individu adulte, les adipocytes brites peuvent provenir : 1) de la différenciation *de novo* des progéniteurs brites présents au sein du TAB et 2) de la conversion directe des adipocytes blancs matures en adipocytes brites. En plus des études sur l'expression de Myf5 et ou de Myh11, plusieurs autres études ont été réalisées sur l'origine des pré-adipocytes brites. Elles montrent au final que dans le TAB, il existe plusieurs sources de progéniteurs capables de se différencier en adipocytes brites.

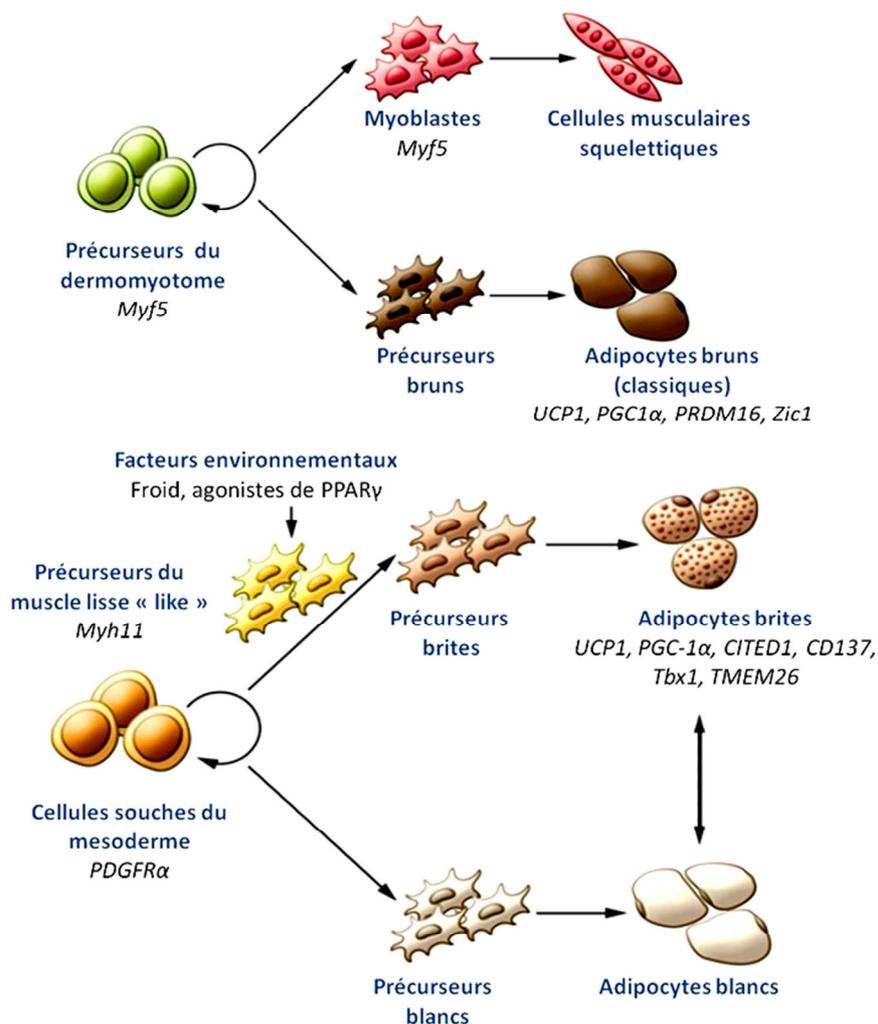


Figure 21. Schéma représentant les origines développementales des différents types d'adipocytes. Adapté de (Lo and Sun, 2013; Sidossis and Kajimura, 2015).

Les adipocytes brites présent dans le TAB viscéral proviendraient de la prolifération et la différenciation des précurseurs des adipocytes blancs. Ces précurseurs expriment le « Platelet-Derived Growth Factor  $\alpha$  » (PDGFR  $\alpha$ ), CD34 et le « Stem Cell Antigen-1 » (Sca-1) (Lee et al., 2012b). Une étude récente a montré que l'origine des adipocytes brites dans le TAB varie en fonction de la durée de la stimulation par le froid. Ils montrent que pendant la première semaine d'exposition des souris au froid, les adipocytes brites apparus proviennent soit de la conversion des adipocytes blancs en brites, soit de l'activation des adipocytes brites déjà présents mais inactifs. Par contre, au cours de la deuxième semaine d'exposition au froid, les adipocytes brites proviennent essentiellement de la différenciation des cellules périvasculaires exprimant PDGFR $\beta$  (Vishvanath et al., 2015b). Ces cellules, aussi appelées péricytes sont une source bien connue de progéniteurs adipeux et de manière plus générale des lignages mésenchymateux (Crisan et al., 2008).

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

Les études morphologiques des différents dépôts de TA ont permis de montrer l'existence de trois types d'adipocytes : uniloculés-UCP1 négatif, multiloculés-UCP1 négatif et multiloculés-UCP1 positif (Cinti, 2009). Les adipocytes multiloculés-UCP1 négatif représenteraient une étape intermédiaire entre les deux autres types d'adipocytes. La présence de ces trois types de cellules au sein du TAB laissait donc penser à une certaine plasticité des adipocytes. L'existence de cette plasticité était soutenue par le fait qu'une exposition des souris au froid induit un changement au niveau de la composition du TAB, où des adipocytes brites (multiloculés-UCP1 positif) apparaissent, sans qu'il y ait un changement au niveau du nombre des adipocytes (Barbatelli et al., 2010; Vitali et al., 2012). Cette source d'adipocytes brites à partir d'adipocytes blancs au niveau du TAB serait même prépondérante (Lee et al., 2015).

De façon intéressante, on trouve des adipocytes multiloculés-UCP1 négatif même au niveau du TABr. Ces adipocytes pouvant être considérés comme une étape intermédiaire dans la conversion des adipocytes blancs en bruns, Saverio Cinti a avancé le concept de transdifférenciation réversible entre les différents types d'adipocytes. En d'autres termes, l'exposition des souris au froid va induire la conversion des adipocytes blancs en adipocytes

brites pour augmenter la production de chaleur. Alors que durant l'exposition de ces souris à un environnement obésogénique les adipocytes bruns se transforment en adipocytes blancs dans le but d'augmenter leur capacité de stockage d'énergie (Cinti, 2009). Ce concept a été validé par une étude récente faite au sein de l'équipe de Christian Wolfrum en Suisse, qui démontre que les adipocytes brites qui apparaissent au niveau du TAB après une exposition au froid se reconvertissent en adipocytes blancs après un retour des souris à une température proche de la thermoneutralité (Rosenwald et al., 2013b). De la même manière, Jo et ses collaborateurs ont montré que les cellules souches dérivées du TAB sous-cutanée de l'Homme se différencient après 7 jours de culture *in vitro* en adipocytes multiloculaires exprimant UCP1 et plusieurs autres gènes spécifiques de l'adipocyte thermogénique. Mais, lorsque la durée de la différenciation est prolongée, ces derniers deviennent remplis de lipides contenus dans une large gouttelette lipidique et leur niveau d'expression d'UCP1 diminue (Jo et al., 2011).

Bien que les adipocytes brites et bruns partagent l'expression des gènes impliqués dans leur fonction thermogénique commune, comme: UCP1, CTP1M et PGC-1 $\alpha$ . Il existe des gènes spécifiques de chaque type de cellules. Par exemple, les adipocytes bruns expriment *PRDM16*, *Zic-1*, *Lhx8*, *Meox* alors que les adipocytes brites expriment *CD137*, *Tbx1*, *PAT2*, *TMEM26* et *CITED1* (Lo and Sun, 2013; Sidossis and Kajimura, 2015).

## **2.8 Les activateurs de la conversion des adipocytes blancs en brites**

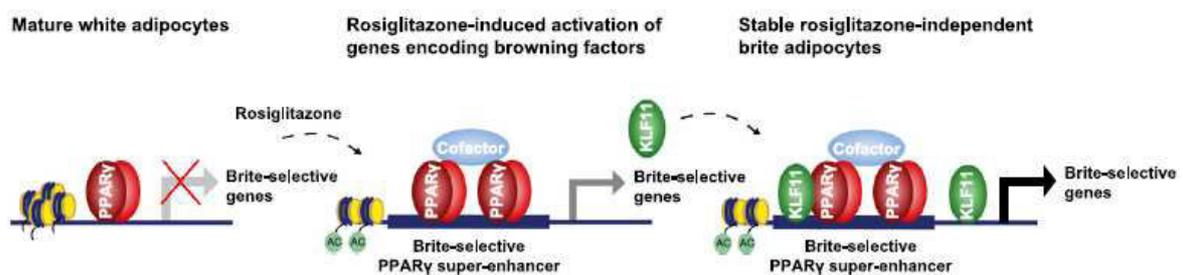
En plus des activateurs de la thermogénèse développés précédemment, les adipocytes brites peuvent apparaître suite à l'effet de plusieurs modulateurs moléculaires et facteurs extracellulaires qui sont détaillés dans ce chapitre.

### **2.8.1 Les modulateurs moléculaires**

Les mécanismes précis de l'induction ou de l'inhibition de l'apparition des adipocytes brites ne sont pas encore bien élucidés. Néanmoins, différents facteurs de transcription ont été décrits pour jouer un rôle essentiel dans cette régulation.

### 2.8.1.1 PPAR $\gamma$

En plus de son rôle essentiel dans l'adipogenèse, ce récepteur nucléaire contrôle l'expression de plusieurs gènes dans les adipocytes. Il a été démontré que les ligands synthétiques de ce récepteur « les thiazolidinediones », comme la rosiglitazone, la troglitazone et la ciglitazone, étaient capables de remodeler les adipocytes blancs en adipocytes bruns *in vivo* chez les rongeurs (Koh et al., 2009) et *in vitro* chez l'Homme (Elabd et al., 2009b). Récemment, une étude collaborative entre notre équipe et celle de Mandrup au Danemark a montré que dans les adipocytes humains en culture une activation prolongée de PPAR $\gamma$ , par la rosiglitazone, induit un état de différenciation à partir de laquelle les adipocytes sont capables de garder leur "caractère brite" même après enlèvement du ligand. En effet, la rosiglitazone active l'expression du facteur de transcription KLF11 et induit un remodelage au niveau des gènes induits par PPAR $\gamma$ . Ce remodelage crée une région appelée « Brite-selective PPAR $\gamma$  super-enhancer » sur laquelle se fixe KLF11 pour maintenir l'expression de ces gènes même en absence de la rosiglitazone (Loft et al., 2015). (**Figure 22**)



**Figure 22. Mécanisme d'action de KLF11.** L'agoniste de PPAR $\gamma$ , la rosiglitazone, induit l'expression de KLF11. KLF11 se lie ensuite à PPAR $\gamma$  au niveau de la région « super-enhancer » localisé dans le promoteur des gènes spécifiques des adipocytes brites permettant ainsi une activation prolongée de l'expression de ces derniers. D'après (Loft et al., 2015).

Par ailleurs, Rajakumari et ses collaborateurs ont montré que le « Early B-cell Factor-2 » (Ebf2) régulaient l'activité de liaison de PPAR $\gamma$ , et que cette régulation oriente les cellules vers une différenciation adipocytaire brite. En effet, la surexpression de cette protéine au niveau des myocytes ou des préadipocytes blancs, était capable de recruter PPAR $\gamma$  vers des sites de liaisons spécifiques pour induire cette différenciation. De plus, la surexpression d'Ebf2 dans des adipocytes différenciés à partir de la FSV de TAB de souris, favorise la liaison

de PPAR $\gamma$  aux gènes spécifiques des adipocytes thermogéniques et inhibe celle des gènes spécifiques aux adipocytes blancs (Rajakumari et al., 2013).

#### 2.8.1.2 **PGC-1 $\alpha$**

Nous avons déjà vu le rôle de ce co-facteur au niveau de la thermogénèse. En plus de ses implications dans la fonction thermogénique, PGC-1 $\alpha$  est un régulateur clé de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans l'acquisition du phénotype des adipocytes bruns (Smorlesi et al., 2012). En effet, il a été démontré que les souris transgéniques surexprimant PGC-1 $\alpha$  développent plus d'adipocytes bruns au sein du TAB que les souris WT (Boström et al., 2012). De plus, il a été démontré que les coactivateurs des récepteurs des stéroïdes (SRCs) jouent un rôle important dans la conversion des adipocytes blancs en bruns en agissant sur l'activité de PGC-1 $\alpha$  (Louet and O'Malley, 2007).

#### 2.8.1.3 **C/EBP $\beta$ et PRDM16**

Ces deux protéines représentent des inducteurs potentiels du brunissage des adipocytes blancs. Elles forment un complexe crucial pour la différenciation adipocytaire brune. En effet, PRDM16 se fixe à C/EBP $\beta$  pour recruter les deux protéines « C-terminal-binding Protein » CtBP1 et CtBP2. Ces deux protéines agissent comme corépresseurs de l'expression des gènes associés aux adipocytes blancs et aux myocytes. La surexpression de ce complexe dans des cellules fibroblastiques induisait la différenciation de ces cellules en adipocytes bruns fonctionnels (Kajimura et al., 2009; Kajimura et al., 2008). Par ailleurs, la surexpression de PRDM16 chez les souris favorisait l'apparition des adipocytes bruns au niveau du TAB SC. Ce phénomène était accompagné d'une augmentation de la dépense énergétique et d'une résistance à l'obésité chez ces souris (Seale et al., 2007). Même si l'efficacité de ces protéines à induire le recrutement d'adipocytes bruns est bien établie, il reste à démontrer la pertinence de ce mécanisme *in vivo* dans un contexte physiologique non modifié.

#### 2.8.1.4 **Micro ARNs (miR)**

Ce sont de petits ARNs non codants régulateurs post-transcriptionnels de l'expression de plusieurs gènes. Il a été démontré que le **miR193b-365**, partiellement induit par PRDM16

et PPAR $\alpha$  est impliqué dans le phénomène de la conversion des adipocytes blancs en adipocytes bruns *in vitro* chez la souris (Sun et al., 2011). Récemment, Hu et al. ont montré que le **miR30-b** inhibait l'expression de RIP-140 et induisait l'expression d'UCP1 et la thermogénèse et ainsi le brunissage (Hu et al., 2015). Notre équipe a démontré que 1) le **miR-125b-5p** inhibe la conversion des adipocytes blancs en adipocytes bruns *in vitro* sur les cellules humaines (hMADS) et *in vivo* chez la souris et 2) le **let-7i-5p** est capable d'inhiber cette conversion *in vitro* dans les cellules hMADS (articles soumis).

#### 2.8.1.5 **Foxc2**

Foxc2 est un facteur de transcription capable d'induire la différenciation adipocytaire brune, l'apparition d'adipocytes bruns et la mitochondriogenèse (Harms and Seale, 2013). Dans les adipocytes, Foxc2 induit l'expression de la sous-unité régulatrice R1 $\alpha$  de la PKA. Ceci sensibilise les adipocytes à l'effet du froid et des catécholamines. En addition, il a été démontré que la surexpression de ce facteur de transcription permet de limiter l'obésité chez la souris (Cederberg et al., 2001).

Ces facteurs de transcription sont des acteurs clés de la conversion des adipocytes blancs en bruns, mais ils sont avant tout contrôlés par divers signaux extracellulaires.

### 2.8.2 **Les facteurs extracellulaires**

En plus des catécholamines qui représentent les hormones les plus importantes dans la conversion des adipocytes blancs en bruns, et des autres activateurs des voies de signalisation PKA et PKG, tel que les NPs et l'adénosine, il existe plusieurs autres stimuli et facteurs de croissance circulants capables d'induire ce phénomène.

#### 2.8.2.1 **L'irisine**

En 2012, Spiegelman et ses collaborateurs ont identifié l'irisine (issue du clivage de FNDC5) comme une hormone sécrétée par les muscles squelettiques sous la dépendance de PGC-1 $\alpha$ , et responsable du recrutement des adipocytes bruns dans le TAB (Boström et al.,

2012). Les concentrations de cette hormone augmenteraient après un exercice physique chez l'Homme et la souris et seraient reliées aux capacités métaboliques de l'organisme. Même si de très nombreuses études ont été menées depuis cette découverte, la pertinence des méthodes de détection et de l'implication physiologique de l'irisine reste encore très fortement controversée (Albrecht et al., 2015; Atherton and Phillips, 2013; Vosselman et al., 2015).

#### 2.8.2.2 « *Fibroblast Growth Factor-21* » (*FGF21*)

Le FGF21 est produit majoritairement par le foie et, dans une moindre mesure, par le TABr, mais il ne semble pas produit par le TAB. Son expression est sous le contrôle de PPAR $\alpha$ , et il est sécrété essentiellement dans un contexte de jeûne et de dépenses énergétiques où il va être responsable de l'augmentation de l'oxydation des lipides et de l'inhibition de la lipogenèse. Il agit de manière autocrine et paracrine en activant le complexe récepteur FGFR/co-récepteur  $\beta$ klotho et permet entre autre l'induction de PGC-1 $\alpha$  dans les adipocytes. Le FGF21 va donc pouvoir agir de manière autocrine dans le TABr ou paracrine sur les adipocytes du TABr et du TAB. Il a été montré aussi un effet indirect *via* le système nerveux central où il induit les voies parasympathique et donc la libération de catécholamines. Dans tous les cas, le FGF21 induit le recrutement et l'activation des adipocytes thermogéniques chez la souris (Harms and Seale, 2013; Smorlesi et al., 2012). Récemment, il a été démontré que les taux plasmatiques de FGF21 étaient reliés à l'activité du TABr chez l'Homme, et qu'il pouvait donc participer là aussi à la dépense énergétique et au maintien de la thermoneutralité (Hanssen et al., 2015).

L'effet du FGF21 sur la dépense énergétique n'est pas dû qu'au recrutement d'adipocytes thermogéniques. (**Figure 23**)

#### 2.8.2.3 *Les acides biliaires*

Les **acides biliaires** sont issus de l'oxydation du cholestérol et produits par le foie. Ils ont de nombreux rôles, particulièrement dans la digestion des graisses alimentaires au niveau de l'intestin, mais on les retrouve aussi dans divers tissus dont le tissu adipeux, particulièrement en situation postprandiale, où ils vont pouvoir activer des récepteurs qui

leur sont spécifiques comme le « farnesyl-X receptor » (FXR). Au niveau des adipocytes, les acides biliaires vont être capables d'induire l'expression d'UCP1 par une voie impliquant le récepteur membranaire TGR5, qui est couplé à une protéine Gs activatrice de la voie de signalisation de l'AMPc (Watanabe et al., 2006). L'augmentation du taux intracellulaire d'AMPc va induire l'activité de DIO2 qui aboutit à la transactivation du promoteur d'UCP1 par la T3 (Lee et al., 2013; Zietak and Kozak, 2015). Récemment, il a été démontré que l'acide chenodeoxycholique (CDCA) était capable d'induire l'expression d'UCP1 au niveau du TAB inguinal des souris et oriente les cellules vers un métabolisme lipidique (Teodoro et al., 2014).

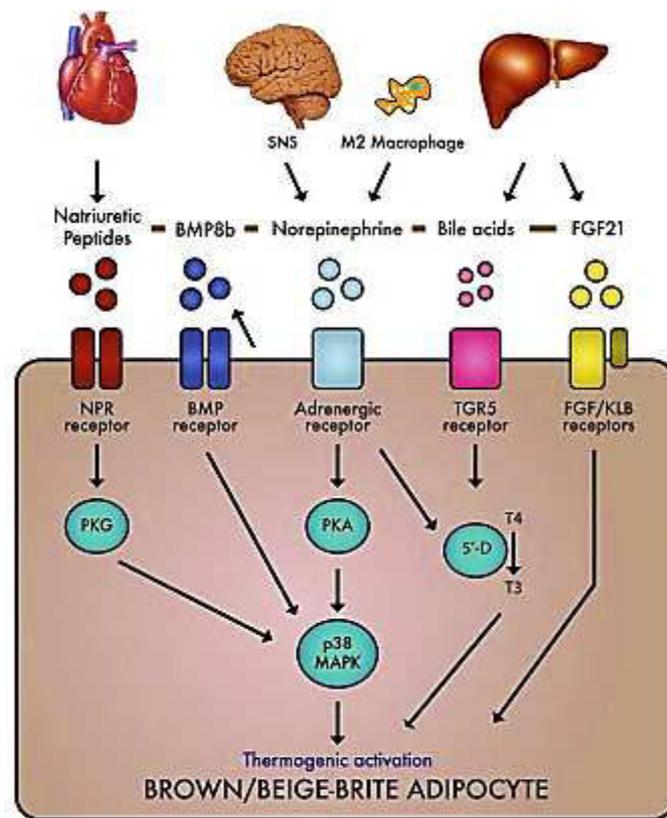


Figure 23. Schéma récapitulatif des différents activateurs de la thermogénèse et de la conversion des adipocytes blancs en brites. D'après (Villarroya and Vidal-Puig, 2013)

Enfin, les effets des PGs issus du métabolisme de l'ARA sont des médiateurs importants de l'apparition des adipocytes brites dans le TAB et seront discutés plus loin (voir partie II chapitre 4.3).

## 3 Les cellules hMADS

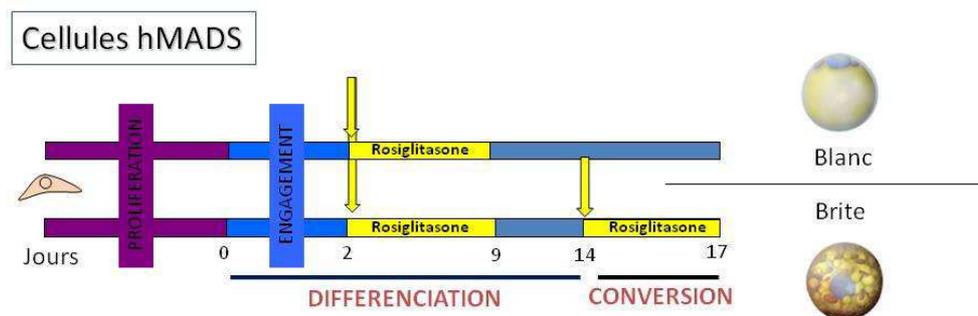
### 3.1 Généralités

Depuis la découverte du TABr fonctionnel chez l'Homme, quelques modèles cellulaires humains permettant d'étudier la différenciation adipocytaire brune ont été développés. Néanmoins, et contrairement à d'autres espèces, aucune cellule primaire ou clonale permettant des études homogènes et reproductibles n'était disponible au moment de ces grandes découvertes. Seul des modèles de cellules immortalisées et/ou modifiées étaient disponibles comme les cellules PAZ6 (Guennoun et al., 2015; Kazantzis and Stahl, 2012). Ces cellules présentent de fait de nombreuses limitations et n'ont finalement vraiment jamais été utilisées. La plupart des études se basées donc sur l'utilisation de cellules primaires de moelle osseuse ou de tissu adipeux. Cela ne permet pas de réaliser des analyses homogènes et reproductibles, car ces cellules proviennent de patients différents et ne sont maintenues que quelques passages en culture.

Au sein de notre laboratoire, un nouveau modèle de cellules souches mésenchymateuses humaines a été développé au début des années 2000. Il s'agit des cellules souches mésenchymateuses multipotentes dérivées du TAB de jeunes donneurs qui sont appelées cellules hMADS pour « human Multipotent Adipose Derived Stem cells » (Rodriguez et al., 2004). Les cellules hMADS présentent un caryotype normal, une capacité d'auto-renouvellement en même temps qu'une absence de tumorigénécité. *In vitro*, ces cellules sont capables de se différencier en adipocytes, en chondrocytes et en ostéoblastes. Et *in vivo*, elles peuvent participer à la régénération osseuse et musculaire (Elabd et al., 2007; Rodriguez et al., 2004). Parmi 12 types de cellules hMADS issus de 12 donneurs différents, 3 types sont particulièrement utilisés: les hMADS 1, 2 et 3 qui sont établis à partir du TAB ombilical d'une donneuse âgée de 31 mois, du TAB pubien d'un donneur âgé de 5 ans et du TAB pré-pubien d'un donneur âgé de 4 mois, respectivement. Durant ma thèse, les cellules hMADS utilisées appartenait principalement au type 3.

## 3.2 La différenciation adipocytaire des cellules hMADS

Après la confluence, les cellules hMADS sont capables de se différencier dans un milieu dépourvu de sérum en adipocytes blancs. Comme la différenciation adipocytaire des cellules murines, celle des cellules hMADS exige la présence d'un cocktail de différenciation. Au cours de la phase d'engagement dans la différenciation adipocytaire (jour 0 à 2), les cellules hMADS sont traitées par l'insuline, la transferrine, la dexaméthasone, la T3 et l'isobutylméthylxantine (IBMX) (voir chapitre 1.4.2). Après cet engagement les cellules sont traitées par la rosiglitazone (agoniste de PPAR $\gamma$ , Rosi) pour une durée de 7 jours, ce qui les dirige vers une différenciation adipocytaire blanche (**Figure 24**). Les adipocytes ainsi formé possèdent, dès le jour 14, les caractéristiques des adipocytes blancs humains : 1) ils expriment les marqueurs moléculaires spécifiques des adipocytes blancs, 2) ils sont capables de générer une réponse lipolytique aux agonistes  $\beta$ -adrénergiques et aux peptides natriurétiques, 3) ils possèdent un système de transport de glucose stimulé par l'insuline et 4) ils sont capables de produire et de sécréter la leptine et l'adiponectine (Rodriguez et al., 2004).



**Figure 24. Protocole de différenciation des cellules hMADS.** Schéma représentant les différentes étapes de différenciation des cellules hMADS en adipocytes blancs et la conversion de ces adipocytes blancs en brites sous l'action de la rosiglitazone.

Ces adipocytes sont capables de se différencier en adipocytes bruns fonctionnels suite à une activation chronique de PPAR $\gamma$  par la Rosi (de jour 2 à 18 de différenciation). Ceci est accompagnée par l'induction entre autres: 1) de l'expression des marqueurs des adipocytes thermogéniques comme UCP1, CIDEA, PGC1 $\alpha$  et ELOVL3, 2) de l'activité

mitochondriale mesurée par l'activité du cytochrome c oxidase (une enzyme de la chaîne respiratoire mitochondriale), et 3) de l'expression des marqueurs mitochondriaux comme CPT1M (Elabd et al., 2009b).

L'originalité des cellules hMADS réside dans le fait qu'un traitement terminal par la Rosi (jour 14 à 18 de différenciation) des adipocytes blancs issus de ces cellules était capable de convertir ces derniers en adipocytes bruns fonctionnels (Pisani et al., 2011). Le caractère brun de ces adipocytes est validé par l'absence d'expression des marqueurs des adipocytes bruns humains comme Zic1 et l'expression des marqueurs bruns tel que Tbx1. Ces cellules représentent donc un modèle approprié pour l'étude de la conversion des adipocytes blancs en bruns et offrent l'avantage d'être non transformées, facilement amplifiable tout en gardant leur capacité de différenciation (Rodriguez et al., 2005).

Les cellules hMADS en tant que modèle d'étude de la conversion des adipocytes blancs en bruns chez l'Homme, ont permis en quelques années de caractériser de nombreux mécanismes intervenant dans cette conversion, mais aussi de démontrer que les mécanismes mis en évidence dans d'autres espèces n'étaient pas tous transposables chez l'Homme (Pisani et al., 2011). Notre équipe a pu ainsi obtenir une vue globale des modifications fonctionnelles et morphologiques qui interviennent lors de la transformation d'un adipocyte blanc en brun chez l'Homme. En synthèse, l'activité de PPAR $\gamma$ , maintenue entre autre par le superenhancer KLF11, permet la mise en place d'un programme thermogénique qui est centré sur l'expression et l'activité de la protéine UCP1, entraînant une hyperactivité mitochondriale et la consommation accrue de substrat. Cette activité de découplage va être dépendante de différentes adaptations à la fois métaboliques et morphologiques, dont l'activité et la fission mitochondriales, ainsi que le métabolisme des acides gras (Bordicchia et al., 2012; Elabd et al., 2009b; Gnad et al., 2014; Karbiener et al., 2014; Lee et al., 2011; Lee et al., 2012a; Loft et al., 2015; Mattsson et al., 2011; Olsen et al., 2014; Pisani et al., 2011; Svensson et al., 2014)

Ce manuscrit est centré sur l'effet des acides gras poly-insaturés et leurs métabolites sur la conversion des adipocytes blancs issus des cellules hMADS en adipocytes bruns.

## Partie II : Les Acides Gras

---

### 1 Généralités

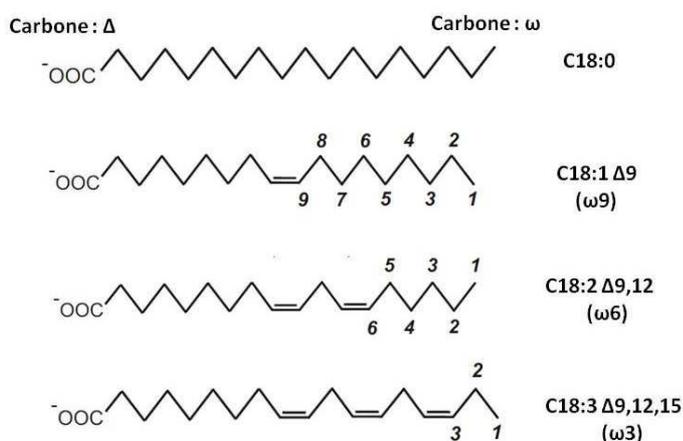
La découverte des acides gras revient au chimiste Français Chevreuil qui a défini pour la première fois la structure glycérique des huiles et des graisses animales et qui a mis en évidence ainsi la notion d'acide gras. Les acides gras sont des acides carboxyliques composés d'une tête hydrophile portant une fonction carboxyle et d'une longue chaîne hydrophobe portant un nombre pair de groupement méthyl. Ils peuvent se trouver dans des formes libres ou associées. Quand ils sont associés à une molécule de glycérol, les acides gras sont sous leur forme de stockage, les triglycérides.

Les acides gras jouent un rôle important dans la physiologie cellulaire, ils sont indispensables pour la formation de la bicouche lipidique, leurs dérivés peuvent agir comme hormone ou comme messenger intracellulaire et ils constituent une source importante d'énergie pour la cellule. Ceci est dû au fait qu'un acide gras contenant  $n$  atome de carbone génère plus d'ATP qu'un glucide équivalent. Alors que l'oxydation des acides gras libère 9 kCal/g, celle des glucides et des protéines ne libère que 4kCal/g (DL and MM, 2005).

En se référant au nombre de double liaison dans leurs chaînes aliphatiques, les acides gras peuvent être divisés en trois familles. On distingue ainsi les acides gras saturés (AGSs) dépourvus de doubles liaisons, mono insaturés (AGMIs) ayant une seule double liaison dans leurs chaînes hydrophobes et polyinsaturés (AGPIs) comportant au moins deux doubles liaisons (tableau). Naturellement, les doubles liaisons sont générées dans une configuration cis, la configuration trans étant retrouvée dans les acides gras industriels et est reliée à une augmentation du risque des maladies cardiovasculaire (de Souza et al., 2015).

## 1.1 Nomenclature

Un acide gras possède deux extrémités, une extrémité méthyl où l'atome de carbone est désigné par le terme oméga ( $\omega$ ) et une extrémité carboxyle avec le carbone delta ( $\Delta$ ). La nomenclature des acides gras est représenté sous la forme : CN :p n-x où « CN » désigne le nombre de carbone, « p » le nombre de double liaison présent dans la chaîne aliphatique et « x » la position de la première double liaison par rapport au par rapport à l'extrémités  $\omega$  ou  $\Delta$  (IUPAC-IUB, 1977). **(Figure 25)**



Nomenclature	Nom utilisé	Abbréviation	Famille	Essentialité
C16:0	palmitique	PA	saturé	-
C16:1 n-7	palmitoléique	POA	MI	-
C18:0	stéarique	SA	saturé	-
C18:1 n-9	oléique	OA	MI	-
C18:2 n-6	linoléique	LA	PI	+
C18:3 n-6	$\gamma$ -linoléique	GLA	PI	-
C18:3 n-3	$\alpha$ -linoléique	ALA (LNA)	PI	+
C20:0	arachidique	AA	saturé	-
C20:4 n-6	arachidonique	AA (ARA)	PI	-
C20:5 n-3	timnodonique	EPA	PI	+/-
C22:6 n-3	clupadonique	DHA	PI	+/-

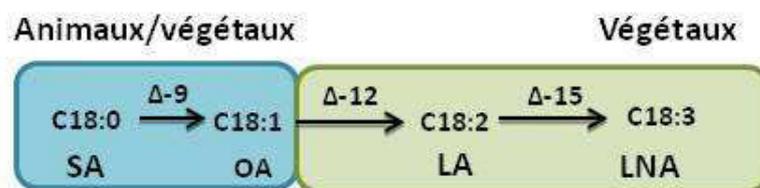
**Figure 25. Nomenclature des acides gras.** MI : mono-insaturé, PI : poly-insaturé, + : caractère essentiel, - : caractère non essentiel, +/- : caractère conditionnellement essentiel.

## 1.2 La biosynthèse des AGs

La composition en acides gras d'une espèce est principalement déterminée génétiquement mais peut être modifiée par l'apport alimentaire. Les mammifères peuvent néo-synthétiser un nombre important d'acides gras, préférablement composés d'une chaîne aliphatique saturée et d'un nombre pair de carbone. A l'inverse de la voie de catabolisme des AGs (la  $\beta$ -oxydation) qui se déroule dans la mitochondrie ou le peroxyosome, la néo-synthèse des acides gras chez les cellules animales se déroule dans le cytosol à l'aide de l'acétyl coenzyme A carboxylase, du NADPH, de l'ATP et du complexe enzymatique homodimérique « Fatty Acid Synthase » (FAS) ou acides gras synthétase (DL and MM, 2005). La première étape de cette synthèse est la formation du malonyl-CoA (formé de 3 atomes de carbone) par le transfert d'une molécule de CO<sub>2</sub> du bicarbonate vers l'acétyl-CoA (formé de deux atomes de carbone), par l'action de l'acétyl-CoA Carboxylase. Ensuite, la FAS permet l'addition de cette molécule de malonyl-CoA à une molécule d'acétyl-CoA tout en libérant une molécule de CO<sub>2</sub> ce qui permet la formation d'une molécule composée de 4 atomes de carbone. A cette molécule néosynthétisée est ajoutée une molécule de malonyl-CoA tout en libérant une molécule de CO<sub>2</sub> ce qui donne ainsi une molécule de 6 atomes de carbone. Ce cycle d'addition de malonyl-CoA sur les molécules néo-synthétisées est catalysé par la FAS et conduit à la formation des AGSs, particulièrement l'acide palmitique. Cette synthèse se déroule dans le foie, le cerveau et le tissu adipeux de tous les organismes vivants. La longueur des chaînes d'acides gras varie entre 4 et plus de 20 atomes de carbone. L'acide palmitique (C16:0) résultant du mécanisme ci-dessus, représente l'AGS le plus abondamment synthétisé par les cellules animales. Les AGSs à plus longue chaîne sont synthétisés à partir de ce dernier par l'activité des enzymes appelées élongases. En plus de leur origine endogène, les AGSs sont apportés d'une manière importante par l'alimentation vu leur abondance dans les huiles animales et végétales (ANSES, 2011). Ces acides gras sont en partie stockés sous forme de triglycérides (TGs) au niveau du tissu adipeux et en partie transformés en AGMIs par l'action des désaturases (enzymes responsables de la formation des doubles liaisons au niveau de la chaîne aliphatique). L'efficacité de cette désaturation est proportionnelle à la longueur de la chaîne carbonée (Legrand et al., 2002). Comme les AGSs, les AGMIs peuvent être synthétisés par notre organisme par l'élongation et/ou la

désaturation des AGS mais peuvent provenir aussi de l'apport alimentaire. L'acide palmitoléique (C16:1 n-7) et l'acide oléique (C18:1 n-9) sont les deux principaux AGMIs. Ils sont produits à partir de l'acide palmitique et l'acide stéarique, respectivement, par l'action de la delta-9-désaturase ( $\Delta$ -9-désaturase) qui introduit une double liaison au niveau de l'atome de carbone situé dans la position 9 par rapport à l'extrémité carboxyle (carbone  $\Delta$ ).

Au contraire de l'acide oléique qui est abondamment synthétisé par les cellules et fréquemment présent dans les aliments d'origine animale et végétale, l'acide palmitoléique est très faiblement synthétisé par les cellules et quasi absent dans l'alimentation ce qui rend l'acide oléique le principale AGMI dans la nutrition chez l'Homme. Les AGs membres de ces deux familles, étant physiologiquement synthétisés sont donc considérés comme des AGs non essentiels. Le terme essentiel est attribué aux nutriments indispensables pour le bon fonctionnement et le développement des cellules des mammifères, et dont leurs précurseurs ou leurs formes actives doivent être apporté obligatoirement par l'alimentation. Parmi les AGs alimentaires, seules l'acide linoléique (LA, C18 :2 n-6) et l'acide- $\alpha$ -linoléique (LNA, C18 :3 n-3) précurseurs des AGPIs  $\omega$ 6 et  $\omega$ 3, respectivement, sont considérés comme essentiels. Ces deux acides gras sont synthétisés chez les végétaux suite à l'activité des  $\Delta$ -12 et  $\Delta$ -15 désaturases qui introduisent des doubles liaisons au niveau du carbone  $\omega$ -6 et  $\omega$ -3 de l'acide oléique (C18:1). **(Figure 26)**



**Figure 26.** Schéma représentant la différence entre les animaux et les végétaux dans l'expression des enzymes de désaturation des AGs.

Les autres membres de la familles des AGPIs peuvent être synthétisés physiologiquement par des séries de réactions enzymatiques de désaturation et d'élongation du LNA et du LA. Ces dérivés sont considérés comme « conditionnellement

essentiels » étant donné que leur biodisponibilité dépend de l'apport nutritionnel de leurs précurseurs essentiels (ANSES, 2011).

## **2 Les acides gras poly insaturés (AGPIs) à longue chaîne**

### **2.1 L'essentialité des AGPIs**

La notion d'AGs essentiels revient aux nombreuses expériences de Burr et Burr publiées dans les années 1920 dans lesquelles des rats nourris par un régime dépourvu de lipides développent différents symptômes, définis plus tard comme « symptômes de déficit en AGs alimentaires ». Ces symptômes se manifestent par un retard de croissance, une altération de la reproduction, des problèmes cutanés, une stéatose hépatique et une altération du fonctionnement rénale. Il sont complètement corrigés par l'addition du LA  $\omega_6$  et partiellement par une supplémentation en LNA  $\omega_3$  dans le régime (Burr and Burr, 1973). Du fait de l'incapacité des cellules des mammifères à synthétiser le LA et le LNA, ils ont ensuite été définis comme essentiels. Le LA et le LNA entrent en **compétition** au niveau de leurs enzymes de métabolisation et sont capable de générer, respectivement, l'acide docohéxaéonique (C22 :6 n-3, DHA) et l'acide arachidonique (C20 :4 n-6, ARA). De manière intéressante, ce dernier est plus efficace que son précurseur dans la correction des symptômes de carences en AGs alimentaires (Holman, 1970).

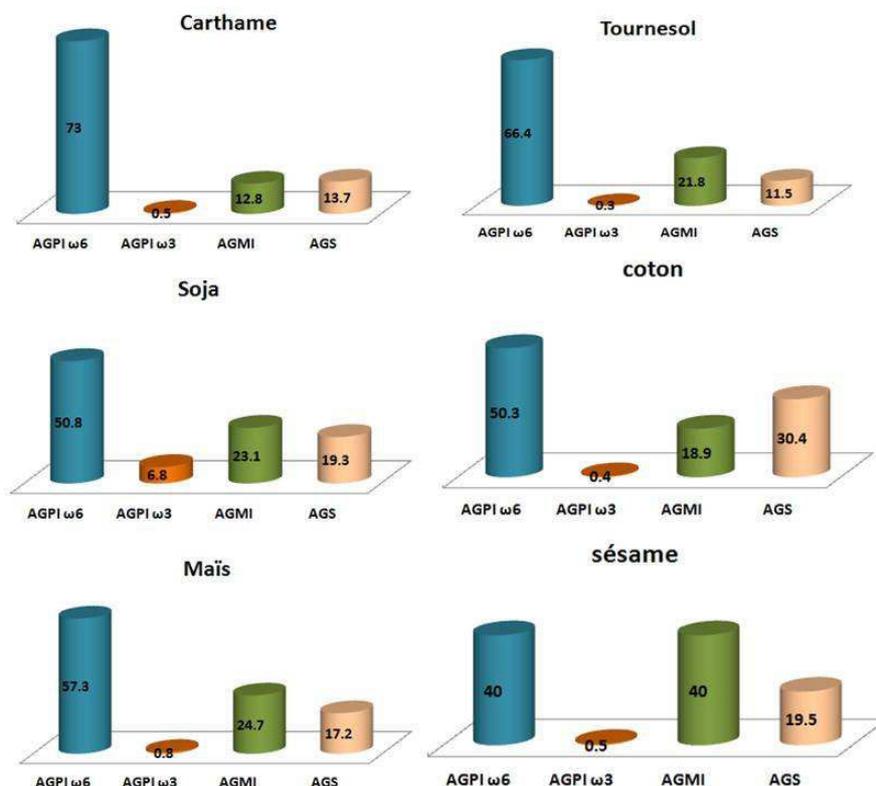
En 1970, des expériences de carences alimentaires en AGs chez l'Homme adultes et chez les nouveau-nés, ont montré que le LA était le seul AGs capable de réparer les syndromes cutanés de carence en AGs, mettant en évidence pour la première fois l'essentialité du LA chez l'Homme (Soderhjrlm et al., 1970). Plus tard, les chercheurs ont envisagé un possible rôle du LNA dans le bon fonctionnement de l'organisme, et en 1971 le DHA a été montré comme abondant dans les phospholipides du cerveau et de la rétine de tous les mammifères. Entre les années 1975 et 1990, une relation entre la déficience en AGPIs  $\omega_3$  et des perturbations neuronales et visuelles a été mise en évidence chez les rongeurs et les singes. D'autre part, une fillette nourrie par voie parentérale avec une

émulsion dépourvue de LNA développait des troubles neurologiques et visuels. L'introduction du LNA dans ces émulsions a permis de corriger ces troubles, ce qui a conduit à donner au LNA un caractère d'AG essentiels en 1985 (ANSES, 2011).

## 2.2 Sources Alimentaires des AGPIs essentiels

### 2.2.1 Les AGPIs $\omega$ 6

Le LA représente l'AG parental des membres de la famille des AGPIs  $\omega$ 6. Il est présent en grande quantité dans les huiles de Soja, de tournesol, de carthame, d'onagre, de pépins de raisins, de graines de pavots, de maïs, de coton et de sésame (**Figure 27**) (Tvrzicka et al., 2011). Le LA étant principalement métabolisé en ARA chez les mammifères, on peut retrouver celui-ci dans les aliments d'origine animale tel que la viande rouge, la charcuterie, les œufs et la viande de poulet.



**Figure 27. Composition des principales huiles riches en acides gras poly-insaturés  $\omega$ 6.** AGPI : acides gras poly-insaturés, AGMI : acides gras mono-insaturés, AGS : acides gras saturés.

### **2.2.2 Les AGPIs $\omega$ 3**

Le LNA représente l'AG parental de la famille des AGPIs  $\omega$ 3. Il est principalement métabolisé en DHA, et en acide eicosapentanoïque (EPA, C20:5 n-3). Le LNA est présent dans les germes de Soja, les graines de lin, les feuilles de bourache et les pépins de cassis, ce qui fait qu'on le retrouve dans leurs huiles et tourteaux. Vu que la conversion du LNA en AGPIs de 20 et 22 carbone est plus efficace chez les animaux marins que chez l'Homme, les poissons gras représentent une source majeure d'EPA et de DHA. Une portion de 150 g de ces poissons contient approximativement 2 g d'AGPIs  $\omega$ 3 (Tvrzicka et al., 2011).

## **2.3 Les apports nutritionnels conseillés d'AGPIs essentiels chez l'adulte**

L'évaluation des apports nutritionnels recommandés d'AGs chez l'Homme se limitent aux AGs essentiels et conditionnellement essentiels, particulièrement aux LA, LNA et DHA qui ne sont pas synthétisés par les cellules humaines et dont l'apport dépend de la nutrition. Pour couvrir les besoins en ces AGs et éviter les symptômes de carence en AGPIs, les lipides doivent constituer 30% de l'apport énergétique total chez l'Homme. Le besoin minimal en AGPIs  $\omega$ 6 constituait un conflit pour les chercheurs qui considéraient que les valeurs recommandées de ces AGs étaient surestimée. En réalité, Le LA était longtemps considéré comme le seul AG essentiel et la plupart des études faites à propos des besoins nutritionnels en LA ont eu lieu en absence d'AGs  $\omega$ 3 ce qui sous-estime la potentialité biologique de ces derniers (Cunnane, 2003). Cependant, l'apport de LNA chez les individus nourris par un régime dépourvu de LA, était capable de corriger les symptômes de carence et réduire ainsi le besoin de ce dernier (Legrand, 2013). L'évaluation du besoin physiologique du LA en prenant en considération le faible apport en LNA avait pour but de limiter le déséquilibre présent entre ces deux AGs, ce déséquilibre qui limite l'utilisation des AGPIs  $\omega$ 3 par les cellules.

Actuellement, le besoin physiologique minimal en LA est estimé à 2%, et l'apport nutritionnel conseillé est de 4% de l'apport énergétique total ce qui équivaut 8.8 g/j. Le besoin physiologique minimal de notre corps en LNA est estimé à 0.8% et son apport

conseillé est fixé à 1% de l'apport énergétique total, équivalent à 2.2 g/j. En outre, le DHA fait partie des AGs dont un apport nutritionnel a été retenu. Ceci est dû aux nouvelles données montrant la faible conversion du LNA en DHA, et à l'importance de ce dernier au niveau du système nerveux. L'apport recommandé de DHA est fixé à 250 mg/j ce qui équivaut 0.1% de l'énergie totale apportée (ANSES, 2011; Legrand, 2013). Actuellement, il n'existe pas d'arguments suffisants pour considérer les autres membres des deux familles d'AGPIs comme essentiels.

## 2.4 Le métabolisme des AGPIs essentiels

Les AGPIs  $\omega_6$  et  $\omega_3$  sont synthétisés à partir de leurs précurseurs, les AGs essentiels LA et LNA respectivement, suite à différentes réactions enzymatiques nécessitant la présence des enzymes appelés désaturases et élongases présentes essentiellement au niveau du réticulum endoplasmique des cellules hépatiques et adipocytaires des mammifères (Guesnet, 2005). Les doubles liaisons et les atomes de carbone sont ainsi rajoutés à proximité de l'extrémité carboxyle afin de garder les structures  $\omega_6$  et  $\omega_3$  des précurseurs d'origine. Les élongases présents au niveau des microsomes agissent de la même manière que la FAS cytosolique, ces enzymes sont responsables de l'addition d'une unité formée de deux atomes de carbone à un acyl-CoA par l'intermédiaire du malonyl-CoA et du NADPH. L'élongation des AGs se déroule en plusieurs étapes nécessitant quatre enzymes distinctes. Chez les mammifères, les élongases représentent la première étape, limitante, de cette élongation. Jusqu'à présent, il existe sept types d'élongases nommées ELOVLs pour « Elongation of Very Long Chain Fatty Acids » et numérotés de 1 à 7. Les différentes ELOVLs possèdent des préférences vis-à-vis des AGs, *i.e.* ELOVLs1, 3, 6 et 7 préfèrent les AGS et les AGMI comme substrats, alors que les ELOVLs2, 4 et 5 agissent sur les AGPIs (Guillou et al., 2010). Les désaturases ou acyl-CoA désaturases sont eux responsables de l'addition d'une double liaison dans une position spécifique au niveau de la chaîne aliphatique des AGs. Les cellules des mammifères expriment trois types de désaturases responsables de la génération d'une saturation au niveau de l'atome  $\Delta 5$ ,  $\Delta 6$  ou  $\Delta 9$  de la chaîne aliphatique et sont ainsi nommées  $\Delta 5$ ,  $\Delta 6$  et  $\Delta 9$ -désaturases. On en distingue deux familles : 1) les « stéaroyl-coA désaturases » (SCDs) et les « Fatty Acid Désaturases »

(FADS). Les SCDs introduisent une double liaison au niveau du carbone  $\Delta 9$  des AGSs tel que l'acide palmitique (C16:0) et l'acide stéarique (C18:0). La désaturation des AGs par ces enzymes nécessite la présence d'une molécule de NADH, d'oxygène, de cytochrome b5 donneur d'électron et de son enzyme de réduction couplée au flavoprotéine (**Figure 28**). Quatre isoformes de SCD ont été identifiés chez la souris alors qu'on en trouve que deux chez l'Homme : la SCD-1 exprimée essentiellement au niveau du tissu adipeux et du foie et la SCD-5 présente abondamment dans le cerveau et le pancréas.

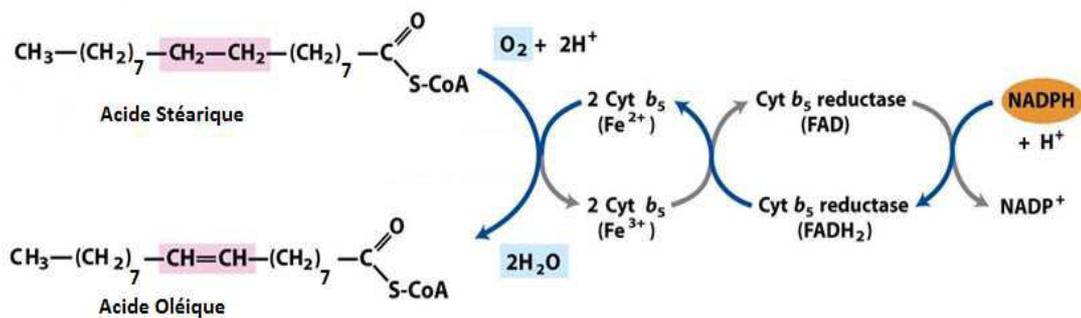
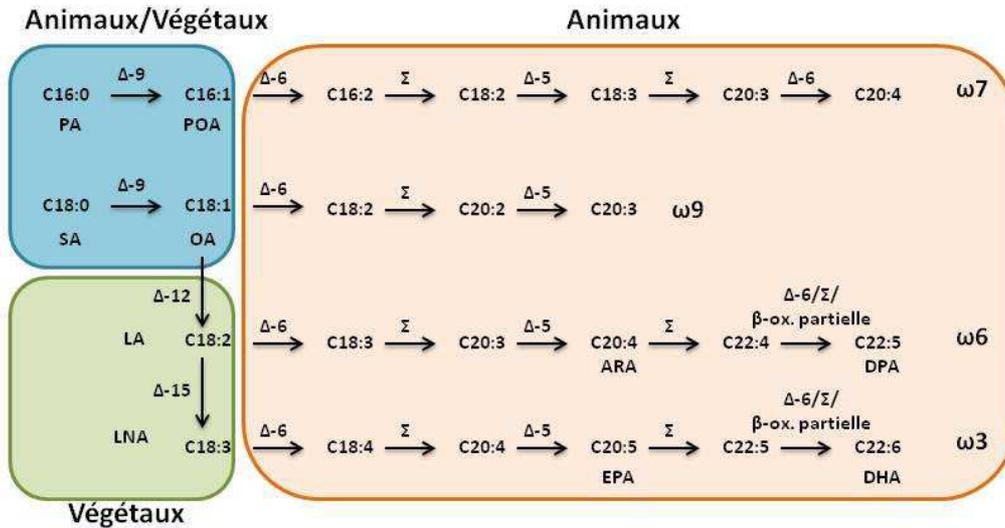


Figure 28. Schéma représentant le mécanisme de désaturation des AGs par les stéaroyl-CoA désaturases

A l'inverse des SCDs, les FADS introduisent des doubles liaisons à la position  $\Delta 5$  ou  $\Delta 6$  de la chaîne aliphatique des AGs. La  $\Delta 6$ -désaturase ou FADS2 peut agir sur les AGPIs à 18 atomes de carbone et sur ceux qui présentent une chaîne plus longue (**Figure 29**). Il a été décrit que cette désaturase présente une meilleure affinité pour le LNA comparativement au LA ce qui crée une **compétition** entre ces deux AGPIs en faveur du LNA dont le métabolisme est donc accéléré diminuant ainsi sa biodisponibilité par rapport au précurseur des AGPIs  $\omega 6$  (Brenner and Peluffo, 1966). D'autre part, la  $\Delta 5$ -désaturase ou FADS1 est responsable de la désaturation des AGPIs de 20 atomes de carbone. Il est à noter qu'une troisième désaturase a été clonée et dont l'activité n'est pas encore élucidée (Guillou et al., 2010).

## 2.5 Les fonctions générales des AGPIs essentiels

Les AGPIs sont des molécules essentielles pour le bon fonctionnement de l'organisme, ils sont indispensables au niveau structural, énergétique et phénotypique de la cellule.



**Figure 29. Biosynthèse des AGs insaturés.** ARA : acide arachidonique, EPA : acide éicosapentanoïque, LA : acide linoléique, LNA : acide  $\alpha$ -linoléique, OA : acide oléique, PA : acide palmitique, POA : acide palmitoléique, SA : acide stéarique,  $\Delta$  : désaturation,  $\Sigma$  : élongation,  $\beta$ -ox. Partielle :  $\beta$ -oxydation Partielle.

### 2.5.1 Fonction structurale

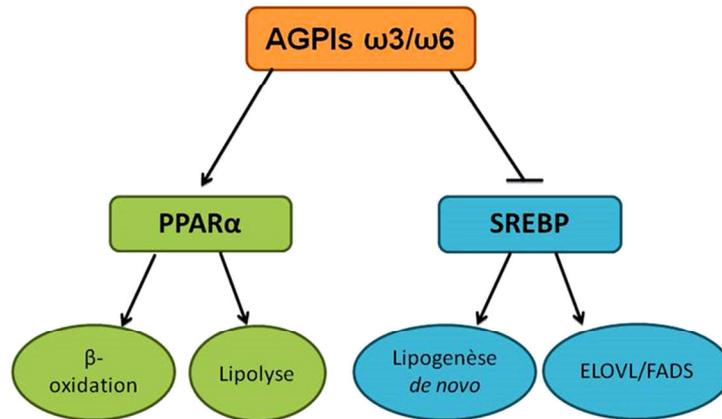
Les lipides, sous formes de cholestérol et de phospholipides, représentent environ 49% de la composition des membranes biologiques. Les AGPIs tel que le LA, l'ARA et le DHA sont les constituants majeurs des phospholipides de ces membranes (Lavialle and Layé, 2010). Ces phospholipides sont constitués d'une molécule de glycérol sur laquelle sont attachés un acide phosphorique et deux acides gras en position sn-1 et sn-2. Grâce à leur conformation spatiale formant des angles au niveau de leurs chaînes aliphatiques, les AGPIs jouent un rôle essentiel dans la fluidité des membranes biologiques et favorisent ainsi la fonctionnalité des protéines présentes. Indirectement, les AGPIs induisent la séparation et la distribution des domaines membranaires enrichis en AGSs et cholestérol auxquels sont associés des complexes protéiques actifs (Shaikh et al., 2004). Par exemple, Le DHA abondamment présent dans la membrane du photorécepteur de la rétine favorise la fluidité de cette dernière ce qui facilite le changement de conformation du pigment essentiel à la vision, la rhodopsine (Niu et al., 2004).

### 2.5.2 Fonction énergétique

Comme tous les AGs, les AGPIs subissent la  $\beta$ -oxydation mitochondriale et peroxysomale afin de produire de l'acétyl-CoA et ainsi de l'ATP. Le LA et le LNA sont les substrats préférentiels de cette oxydation par rapport aux AGs des autres familles. L'acide oléique (OA, C18 :1) appartenant à la famille des AGMs représente l'AGs le plus abondant dans le tissu adipeux des mammifères, sa concentration est deux fois plus élevée que celle du LA et entre 25 à 100 fois que celle du LNA. De plus, la vitesse moyenne de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale du OA représente 94% de celle du LA et 50% celle du LNA (Cunnane, 2003). Le LNA étant l'acide gras le plus rapidement  $\beta$ -oxydé, il existe donc une sorte de **compétition** au niveau de cette étape du catabolisme entre ce dernier et les autres AGs, plus particulièrement le LA.

### 2.5.3 Fonction de ligand

En plus de leurs fonctions énergétiques et structurales, les AGPIs et leurs métabolites (développé ultérieurement) ont été identifiés comme régulateurs de l'expression de nombreux gènes impliqués dans la lipogenèse, la lipolyse et la  $\beta$ -oxydation. Cette régulation se fait dans les noyaux des cellules hépatiques et adipocytaires par interaction directe avec les récepteurs nucléaires dont ils sont ligands ou indirecte en inhibant la transcription de ces derniers. Parmi les facteurs de transcription régulés, on distingue essentiellement la famille des PPARs et la protéine de liaison à l'élément de régulation des stérols (SREBP). Selon le type cellulaire et le récepteur activé, ces AGs engendrent des effets différents. Par ailleurs, il a été démontré que les AGPIs sont capable d'inhiber l'expression ou l'activation du SREBP-1c hépatique (Jump et al., 2013). En inactivant ce dernier, les AGPIs inhibent la transcription des gènes des enzymes impliquées dans la biosynthèse des AGs tel que les désaturases, les élongases et la FAS. Plus généralement, les AGPIs régulent positivement les facteurs de transcriptions responsables de l'expression des gènes qui catabolisent les AGs et négativement ceux qui sont responsables de la lipogenèse de novo (Guesnet, 2005; Kremmyda et al., 2011). **(Figure 30)**



**Figure 30. Les principaux facteurs de transcription modulés par les AGPIs ω6 et ω3.** PPARα: peroxisome proliferator activator receptor α, SREBP: sterol response element binding protein, ELOVL : elongation of very long chain fatty acid protein, FADS: fatty acid desaturase.

D'autre part, il a été démontré que les AGPIs ω3 sont les ligands du récepteur couplé à la protéine G, le GPR120, nommé ainsi « functional ω3 Fatty acids receptor/sensor » et exprimé dans les adipocytes et les macrophages (Oh et al., 2010). Une fois activé, ce récepteur inhibe les voies de signalisation pro-inflammatoire induite par le toll like receptor 4 (TLR4) et le tumor necrosis factor receptor (TNFR) inactivant ainsi le facteur de transcription NF-κB responsable de l'expression des cytokines inflammatoires (Mickaël, 2014).

Néanmoins, les AGs sont des ligands bien moins importants que leurs métabolites, qui sont eux impliqués dans de très nombreux mécanismes cellulaires.

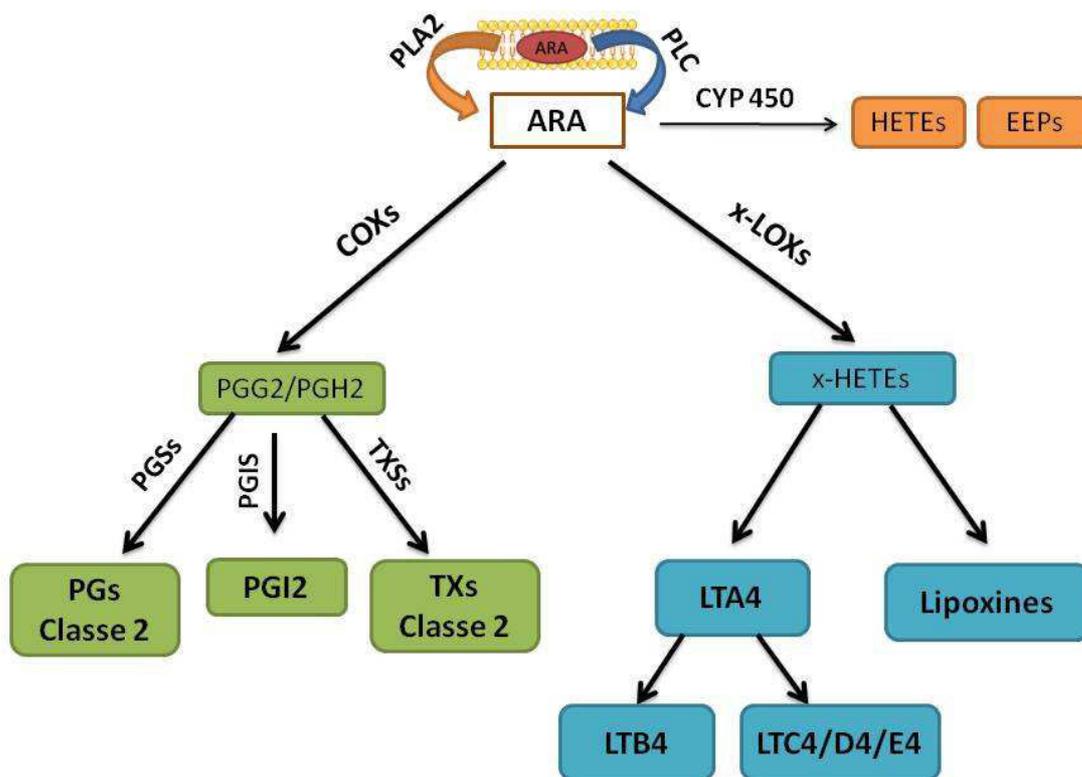
### **3 Les métabolites oxygénés des AGPIs**

La principale raison pour laquelle le LA et le LNA sont considérés comme essentiels au bon fonctionnement de l'organisme est qu'ils sont précurseurs de médiateurs oxygénés. La

nomenclature de ces médiateurs oxygénés va dépendre du nombre de carbone de leur AGPI précurseur. On va ainsi distinguer les eicosanoïdes (20 atomes de carbone) et les docosanoïdes (22 atomes de carbone).

### 3.1 Les eicosanoïdes

Les eicosanoïdes sont une famille de composés lipidiques formés de 20 atomes de carbone et comportant plusieurs sites d'insaturations et générés à partir des AGPIs formés de 20 atomes de carbone comme l'ARA (C20:4  $\omega$ 6), de l'acide dihomog $\gamma$ -linoléique (DGLA C20:3  $\omega$ 6) et de l'EPA (C20:5  $\omega$ 3), eux aussi composés du même nombre d'atome de carbone. Ces médiateurs oxygénés sont synthétisés dans toutes les cellules des mammifères, à l'exception des érythrocytes. Ces molécules sont douées d'une capacité à produire des effets biologiques profonds sur les cellules qui les synthétisent, celles situées à proximité, et sur des cellules cibles situées à distance. L'ARA est l'AG le plus abondamment métabolisé en médiateurs lipidiques oxygénés due à son abondance dans les cellules par rapport à l'EPA et au DGLA. La première étape de la synthèse des éicosanoïdes nécessite la libération des AGs de la position sn-2 des phospholipides membranaires. Cela se fait directement par l'action d'une phospholipase de type A2 (PLA2) ou indirectement par l'action de la phospholipase C (PLC). Les AGs ainsi libérés peuvent subir des réactions enzymatiques d'oxygénation, d'hydroxylation et de peroxydation conduisant à la formation des divers types d'eicosanoïdes. Les deux principales voies enzymatiques du métabolisme des précurseurs des eicosanoïdes sont la voie des cyclooxygénases (COX) et celle des lipooxygénases (LOX). Selon la voie empruntée, les AGs génèrent les prostanoïdes (prostaglandines, thromboxanes et prostacycline), ou les leucotriènes. Il existe une troisième voie enzymatique impliquant le cytochrome P450 époxygénase qui génère à partir de l'ARA des AGs hydroperoxydés et des époxydes. On distingue les acides hydroxyéicosatétraoïques (HETEs) et les acides époxyéicosatriénoïques (EETs), ces derniers agissent comme effecteurs autocrines et paracrines au niveau du système cardiovasculaire et rénal (Spector et al., 2004) et comme inhibiteurs de l'apoptose au niveau des cellules épithéliales. Cette voie est prédominante dans les cellules où les expressions des COXs et des LOXs sont indétectables (Chen et al., 2001). **(Figure 31)**



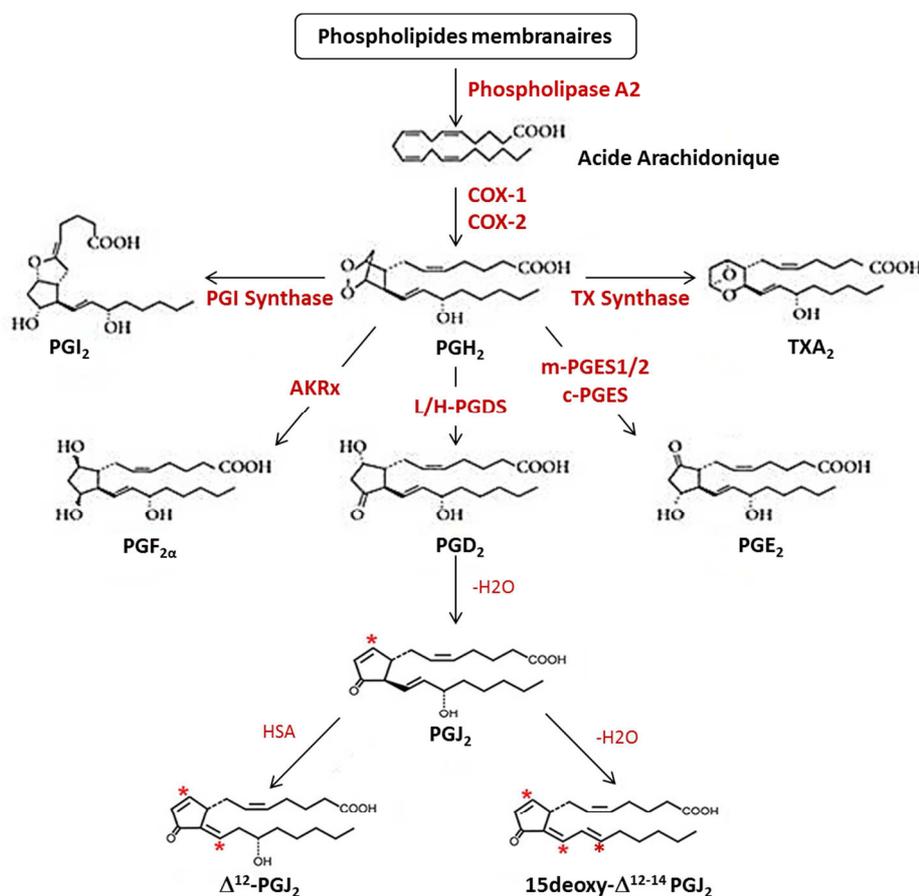
**Figure 31. Métabolisme de l'acide arachidonique (ARA).** Trois voies de métabolisation de l'ARA sont représentées dans ce schéma. 1) la voie des cyclooxygénases (COXs), 2) la voie des lipooxygénases (LOXs) et 3) la voie du cytochrome P450 (CYP 450). HETEs : acides hydroxyéicosatétraoïques, EEPs : acides époxyéicosatriénoïques, LT : leucotriènes, PLA2 : phospholipase A2, PLC : phospholipase C, PG : prostaglandines, PGI2 : prostacycline, PGS : prostaglandine synthétase, PGIS : prostacycline synthétase, TX : thromboxane, TXS : thromboxane synthétase.

### 3.1.1 La voie des cyclooxygénases : les prostanoides

Les prostanoides sont les dérivés oxygénés de l'ARA, de l'EPA et du DGLA synthétisés suite à l'action des enzymes cyclooxygénases. Ces dernières induisent la formation d'un cycle cyclopentane au niveau de la structure de ces AGs d'où la racine « cyclo ». La famille des prostanoides est composée des prostaglandines (PGs), de la prostacycline, et des thromboxanes. Il existe deux principaux isoformes de la COX, la COX-1 et la COX-2. La COX-1 isolée en 1976 représente la forme constitutive de cette enzyme, activée en permanence dans les cellules, elle assure le maintien des fonctions physiologiques en maintenant la synthèse des PGs nécessaires pour le bon fonctionnement de l'organisme (Regina, 2005). Nous pouvons citer le rôle anti-thrombotique de la prostacycline synthétisée au niveau de

l'endothélium et son rôle cytoprotecteur au niveau de la muqueuse gastrique (Regina, 2005). D'autre part, la COX-2 a été identifiée comme étant la forme inducible des COXs. Les PGs synthétisées par cette enzyme sont impliquées dans la douleur et la réaction inflammatoire. Une troisième COX, nommée COX-3 a été caractérisée comme la forme résultante de l'épissage alternatif de l'ARN messager de la COX-1 et dont la fonction n'est pas encore élucidée (Regina, 2005).

Les prostaglandines sont classées selon le nombre de doubles liaisons présentes dans leurs chaînes carbonées en différentes classes. Les PGs dérivées de l'ARA, l'EPA et le DGLA appartiennent aux classes 2, 3 et 1, respectivement. De plus, ces PGs sont classées dans des séries distinctes (représentées en lettres majuscules dans la nomenclature des PGs) en fonction de la nature des radicaux oxygénés liés au noyau cyclopentane. (**Figure 32**)



**Figure 32. Voies de synthèse des différents métabolites de l'acide arachidonique par les cyclooxygénases (COX).** Les différentes enzymes de synthèse sont en rouge. AKR :aldokétoréductase, HSA : human serum albumin, L/H-PGDS : Lipocaline/hématopoétique- prostaglandine D synthases, m et c PGES : microsomal et cytoplasmic prostaglandine E synthases, PGI :prostacycline, TX :thromboxane.

Doués d'une activité cyclooxygénase et peroxydase, les COXs métabolisent l'ARA en PGG2 puis en PGH2. La PGH2 joue le rôle d'un carrefour à partir duquel divergent différentes voies enzymatiques qui mènent à la synthèse de différentes prostanoïdes. Ces derniers agissent essentiellement d'une manière autocrine ou paracrine et exercent leurs effets par l'intermédiaire des récepteurs membranaires appropriés. Ces récepteurs sont couplés à la protéine G qui selon la sous unité  $\alpha$  associée, activent ou inhibent la vitesse de génération de seconds messagers : le  $Ca^{2+}$  ou l'AMPc. En effet, il existe 3 types de sous-unité  $\alpha$  de la protéine G : la sous-unité  $G_s$  qui active l'adénylate cyclase et ainsi la voie de signalisation de l'AMPc, la  $G_i$  qui inhibe cette voie, et la  $G_q$  qui induit une voie de signalisation calcique. (Figure 33)

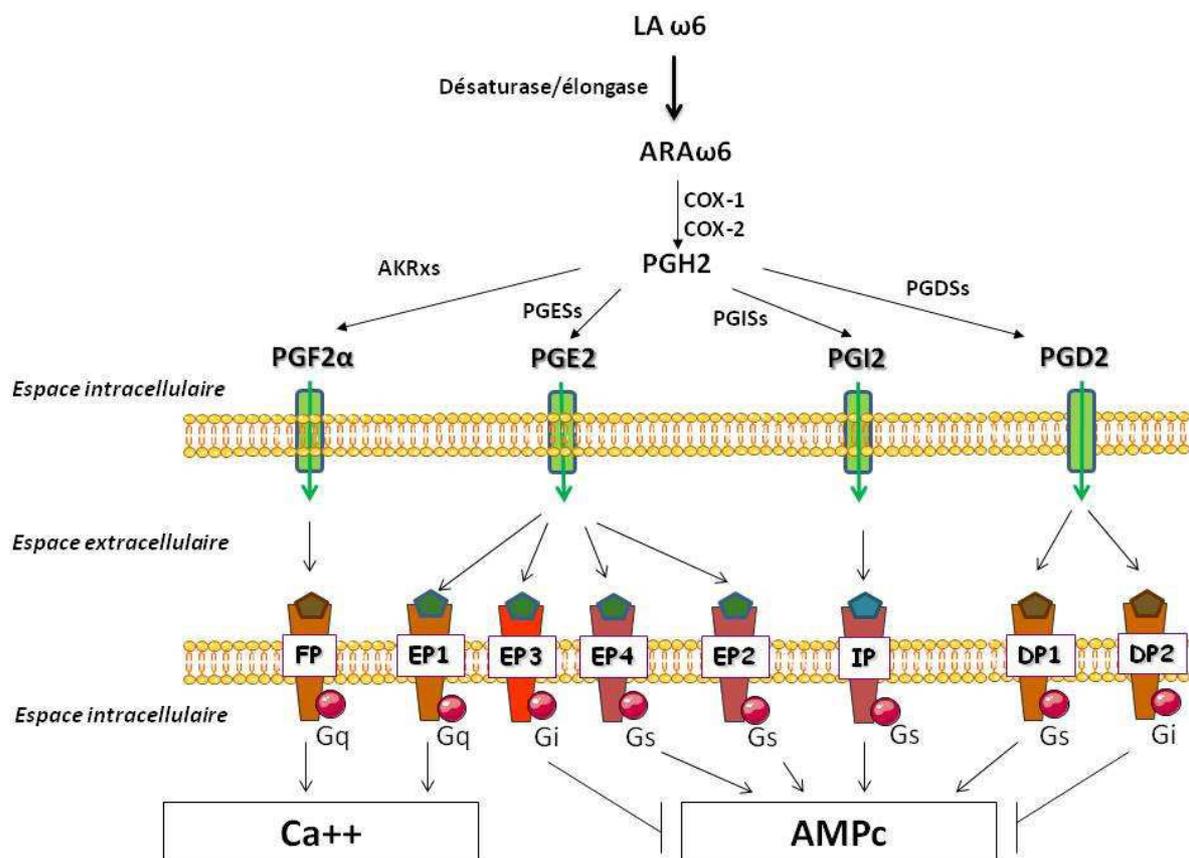


Figure 33. Représentation des prostaglandines issues de l'acide arachidonique, de leurs récepteurs et des voies de signalisation associées. DP : récepteur de PGD2, EP : récepteur de PGE2, FP : récepteur de PGF2 $\alpha$ , G : protéine G, LA :Linoleic acid.

### 3.1.1.1 *Les PGs de la série 2 dérivées de l'ARA*

Dans cette famille, on distingue la PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub> $\alpha$  et la PGD<sub>2</sub> que nous détaillerons ci-dessous.

#### 3.1.1.1.1 La prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)

PGE<sub>2</sub> est générée suite à l'action, de l'une de ses trois enzymes de synthèse, sur la PGH<sub>2</sub> : i) la PGE<sub>2</sub> synthase microsomale 1 (mPGES-1) abondante dans la prostate, le placenta, la vessie et la glande mammaire, représente la forme inductible de cette enzyme, elle est essentiellement localisée au niveau de la membrane nucléaire des cellules. ii) la PGES cytoplasmique (cPGES) ubiquitaire et constitutive, localisée au niveau du cytoplasme et de la membrane nucléaire et iii) la mPGES-2 constitutive, abondante dans le cerveau, le cœur, les muscles squelettiques, les reins et le foie et localisée au niveau de l'appareil de Golgi et le cytoplasme (Park et al., 2006). Il existe quatre récepteurs membranaires pouvant fixer PGE<sub>2</sub>, le récepteur EP<sub>1</sub> lié à une protéine G<sub>q</sub> activant une voie de signalisation calcique, les récepteurs EP<sub>2</sub> et EP<sub>4</sub> couplés à des protéines G<sub>s</sub> stimulant la voie de signalisation de l'AMPC, et le récepteur EP<sub>3</sub> couplé à une protéine G<sub>i</sub> capable d'inhiber l'activité adénylate cyclase et ainsi la voie de signalisation de l'AMPC (Børghlum et al., 1999). PGE<sub>2</sub> possède de très nombreuses propriétés : relaxantes au niveau des muscles lisses, vaso-dilatateur au niveau des muscles vasculaires, broncho-dilatateur au niveau des poumons, inhibiteur du suc gastrique, activateur du débit sanguin rénal et de l'excrétion urinaire d'eau et de sels, et pro-inflammatoires au niveau des cellules immunitaires (Borel et al., 1997).

#### 3.1.1.1.2 La Prostaglandine F<sub>2</sub> $\alpha$ (PGF<sub>2</sub> $\alpha$ )

Plusieurs enzymes de synthèse de cette PG ont été décrites. Ces enzymes appartiennent à la famille des aldo-kéto-réductases (AKR) 1C, 5A et 1B. Chez l'Homme, seules l'AKR1B1 et l'AKR1C3 sont capables de transformer la PGH<sub>2</sub> en PGF<sub>2</sub> $\alpha$  (Watanabe, 2011). Cette PG se fixe sur son récepteur membranaire FP couplé à une protéine G<sub>q</sub> capable

d'induire une voie de signalisation calcique par l'intermédiaire de la phospholipase C (Liu and Clipstone, 2007).  $\text{PGF}_2\alpha$  stimule la croissance des cellules hépatiques, la contraction des muscles longitudinaux au niveau du tube digestif, la contraction des muscles utérins en cas de grossesse et possède une propriété pro inflammatoire au niveau des cellules immunitaires (DL and MM, 2005).

#### 3.1.1.1.3 La prostaglandine D2 (PGD2)

Il existe deux enzymes de synthèse de cette PG, i) la Lipocaline-PGDS (L-PGDS) qui possède une double fonction d'enzyme et de transporteur de petites molécules lipophiles. Elle est abondante dans les organes génitaux males, le cerveau et le cœur et est localisée au niveau de la membrane nucléaire et du réticulum endoplasmique; ii) l'hématopoétine-PGDS (H-PGDS) cytoplasmique abondante dans les cellules immunitaires et les mastocytes. PGD2 possède une structure instable, après sa synthèse elle est rapidement déshydratée dans le milieu extracellulaire pour donner la 15-désoxy-PGJ2. Jusqu'à présent aucune enzyme de métabolisation de la PGD2 en 15-dsoxy-PGJ2 n'a été décrite. Or, *in vitro*, cette réaction est catalysée par l'albumine du sérum humain (Powell, 2003). Les récepteurs de la PGD2 sont deux : le DP1 couplé à une protéine Gs activant l'adénylate cyclase et ainsi la voie de signalisation de l'AMPc et le DP2 couplé à une protéine Gi inhibitrice de cette voie AMPc. Cette PG est impliquée dans la perception de la douleur tactile, le sommeil, la réaction allergique, la formation des gonades males et la communication foeto-placentaire durant la grossesse. En outre, la 15-désoxy-PGJ2 est capable d'activer le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  pour inhiber la réaction inflammatoire (Malki et al., 2008).

#### 3.1.1.2 **Les thromboxanes dérivés de l'ARA $\omega$ -6**

Les thromboxanes (TXs) sont des dérivés d'AG contenant un noyau cyclohexane au niveau de leurs structures. Ils sont générés à partir de la PGH2 suite à l'activité de la thromboxane synthase. On distingue deux TXs dérivés de l'ARA, la TXA2 instable dans un

milieu aqueux et sa forme inactivée la TXB<sub>2</sub>. Le récepteur au TX est couplé à une protéine G<sub>q</sub> activant la phospholipase C et ainsi une voie de signalisation calcique. Secrétés essentiellement par les plaquettes, les TXs sont responsables de l'agrégation plaquettaire. En outre, TXA<sub>2</sub> provoque la contraction des muscles artériels et bronchiques.

### 3.1.1.3 **La prostaglandine I<sub>2</sub> ou prostacycline (PGI<sub>2</sub>)**

On distingue deux enzymes de synthèse de PGI<sub>2</sub>, la PGIS nucléaire et celle localisée au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique. PGI<sub>2</sub> agit par sa fixation sur le récepteur membranaire IP couplé à une protéine G<sub>s</sub> activant l'adénylate cyclase. Celui-ci induit une augmentation du taux d'AMPc intracellulaire par l'intermédiaire de la protéine kinase A ou une mobilisation du Ca<sup>2+</sup> par l'activation de la protéine kinase C. Comme pour PGD<sub>2</sub>, la structure chimique de PGI<sub>2</sub> est instable, elle se transforme d'une manière spontanée dans le milieu extracellulaire en 6-Kéto-PGF<sub>1</sub>α inactive. En plus de sa capacité à activer son récepteur membranaire, PGI<sub>2</sub> est capable d'activer PPAR<sub>δ</sub>, PPAR<sub>α</sub> et PPAR<sub>γ</sub> (Brun et al., 1996). En activant PPAR<sub>δ</sub>, PGI<sub>2</sub> favorise l'implantation de l'embryon au niveau de l'utérus, induit l'apoptose des cellules rénales *in vitro*. En addition, PGI<sub>2</sub> via l'IP et PPAR<sub>δ</sub> exerce des effets, anti-coagulateur, vasodilatateur et pro-angiogénique (Lim and Dey, 2002).

Vue les effets anti-coagulateur et vasodilatateur de PGI<sub>2</sub>, les chercheurs se sont intéressés à un possible effet thérapeutique de ce dernier dans un contexte d'hypertension. Mais la durée de demi vie de PGI<sub>2</sub> étant de quelques secondes, ceci représentait une limitation pour son utilisation dans des traitements *in vivo*. Pour surmonter cet obstacle, les chimistes ont développé plusieurs analogues stables de cette prostacycline. Par exemple, la prostacycline synthétique appelée « epoprostenol », et les analogues synthétiques de PGI<sub>2</sub> comme la carbaprostacycline, l'iloprost et le beraprost. Ces analogues possèdent une durée de vie qui peut aller de 30 minutes jusqu'à une heure. Ceci rend ces molécules aptes à être utilisées dans des buts thérapeutiques chez l'Homme et la souris (Hildebrand, 1992; Hildebrand et al., 1990).

### 3.1.2 La voie des lipooxygénases : les leucotriènes

Les leucotriènes (LTs) sont des AGs à 20 atomes de carbone contenant 4 doubles liaisons dont 3 sont conjuguées. Ils sont formés à partir de l'ARA ou de l'EPA par l'action des différentes enzymes d'oxydation : les lipooxygénases (LOXs). On distingue 4 types de LOXs : 5-LOX, 12-LOX, 15-LOX et 3-LOX. Ces enzymes introduisent une fonction hydroperoxyde sur les positions 5, 12, 15 et 3 de la structure des AGs, pour former les, 5-hydroxyperoxyéicosatétraoïque (5-HETE), 12-HETE, 15-HETE et 3-HETE. Parmi les dérivés de la 5-HETE, on distingue : i) la LTA4 et la LTB4, qui favorisent l'agrégation des leucocytes en induisant le chimiotactisme, ii) Les LTC4, D4 et E4, liés à des molécules peptidiques, sont considérés comme les vaso/broncho-constricteurs les plus puissants dans l'organisme (Mickael, 2014), et iii) les lipoxines (LX) A et B, formés par l'action de la 15-LOX sur le LTA4, possèdent des effets anti-inflammatoires (Serhan et al., 1984).

### 3.1.3 Les eicosanoïdes dérivés de l'EPA

De manière identique à l'ARA, l'EPA subit des réactions de cyclooxygénations et de lipooxygénations pour générer les PGs et les TXs de la classe 3 et les LTs de la classe 5. A l'inverse des prostanoides issus de l'ARA, ceux issus de l'EPA possèdent plutôt des effets anti-inflammatoires (Simopoulos, 2002). Les enzymes responsables de la formation des eicosanoïdes à partir de l'EPA et de l'ARA étant communes, il existe donc une **compétition** entre ces deux AGs au niveau de la phospholipase A2, des COXs et des LOXs, ce qui explique l'effet inhibiteur de l'EPA sur la synthèse des eicosanoïdes issus de l'ARA (Calder, 2006). Récemment, il a été montré que l'EPA était capable de subir des réactions de cyclooxygénations en présence de l'aspirine (inhibiteur des cyclooxygénases) pour générer des molécules à activité anti-inflammatoire « la famille des résolvines E ». Cette dernière comporte la résolvine E1 (RvE1) et E2 (RvE2) responsables de l'inhibition de la production des cytokines pro-inflammatoires, de la migration des cellules immunitaires et de l'infiltration de ces dernières au niveau des sites d'inflammation (Schwab et al., 2007; Serhan et al., 2015).

### 3.1.4 Les docosanoïdes

Des études récentes ont montré que le métabolisme du DHA mène à la formation de plusieurs types de médiateurs oxygénés bioactifs : les docosanoïdes. Ces molécules sont issues de la conversion du DHA par les LOXs ou les COXs et regroupent les résolvines de la série D, les neuroprotectines et les marésines (Serhan et al., 2015). Comme les résolvines issus de l'EPA, la résolvine D1 inhibe la migration et l'infiltration des neutrophiles au niveau des sites inflammatoires. Cette résolvine est également capable d'inhiber l'expression de la cytokine inflammatoire TNF- $\alpha$  (Serhan et al., 2008). Des études ont montré que les propriétés anti-inflammatoires du DHA observées au niveau du système nerveux central sont dues à la conversion de cet AG par la 15-LOX en neuroprotectine D1 (Bazan, 2005). Le DHA est aussi métabolisé par la 14-LOX au niveau des macrophages pour donner la marésine 1 capable d'inhiber la migration des neutrophiles et d'induire la phagocytose des cellules apoptotiques luttant ainsi contre l'inflammation (Serhan et al., 2015). Il faut noter que les enzymes de synthèse des docosanoïdes sont communes à la synthèse des eicosanoïdes issus de l'ARA ce qui évoque à nouveau la notion de **compétition** entre les AG  $\omega$ 3 et  $\omega$ 6 surtout au niveau inflammatoire. (Figure 34)

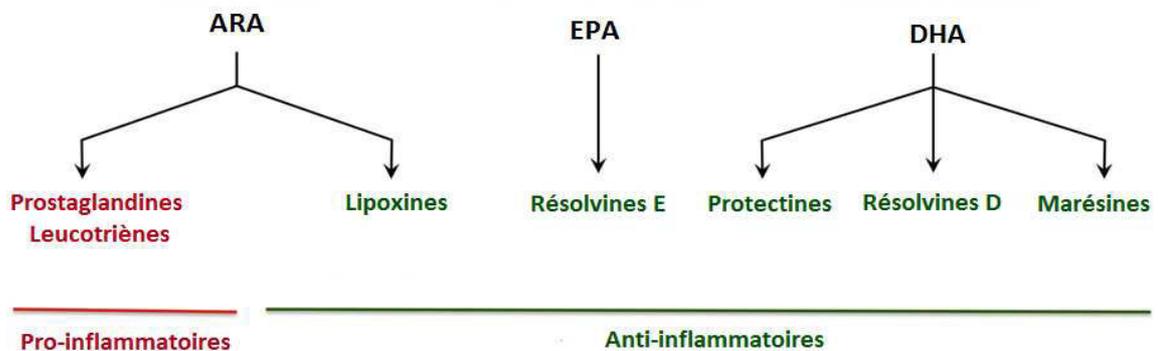


Figure 34. Schéma représentant les molécules pro- et anti-inflammatoires synthétisées à partir de l'ARA, l'EPA et le DHA. ARA :acide arachidonique, EPA :acide eicosapentanoïque, DHA :acide docohexanoïque.

## **4 Notion de compétition entre les AGPIs $\omega$ 3 et $\omega$ 6 et impact sur le TA**

En plus de la **compétition** présente entre le LA et le LNA au niveau des enzymes de synthèse des éicosanoïdes, comme décrit précédemment, les AGPIs  $\omega$ 6 et  $\omega$ 3 partagent plusieurs enzymes de synthèse et de métabolisme, parmi lesquelles on cite les  $\Delta$ -désaturases, les enzymes de la  $\beta$ -oxydation et les phospholipases.

La formation des différents AGPIs dépend de l'activité des  $\Delta$ -désaturases et des élongases sur le LA et le LNA, précurseurs des AGPIs  $\omega$ 6 et  $\omega$ 3, respectivement. La première et la plus limitante étape de la bio-synthèse de ces AGs est catalysée par la  $\Delta$ 6-désaturase. En plus des LA et LNA, les AGPIs à 24 atomes de carbone peuvent former des substrats de cette désaturase (D'Andrea et al., 2002). Par conséquent, il semble évident qu'une **compétition** s'impose lorsque plusieurs substrats sont métabolisés par une même enzyme.

D'autre part, le LNA représente l'AGs le plus rapidement  $\beta$ -oxydé comparé à l'OA et au LA (Cunnane, 2003). Ce qui crée une **compétition** dans le métabolisme des AGPIs qui est alors responsable de la diminution de la biodisponibilité du LNA et ainsi celle de ses métabolites (l'EPA et le DHA) dans l'organisme.

Il existe en plus un troisième niveau de **compétition** entre les AGPIs  $\omega$ 6 et  $\omega$ 3 qui a lieu au niveau de l'action de la phospholipase A2 sur les phospholipides membranaires, la première étape de synthèse des métabolites oxygénés de ces AGs (Calder, 2006). Cette enzyme permet la libération de l'EPA responsable de la génération des PGs anti-inflammatoire par rapport à l'ARA donnant naissance aux PGs pro-inflammatoires.

L'ensemble de ces différents niveaux de compétition montre bien l'importance de la biodisponibilité de ces différents AGPIs pour déterminer au final les métabolites synthétisés et donc les effets biologiques.

## 4.1 Ratio AGPIs $\omega 6/\omega 3$

Etant donnée l'essentialité des AGPIs  $\omega 6$  et  $\omega 3$ , leur importance dans l'organisme et la compétition qui existe entre eux à différents niveaux, l'apport nutritionnel de ces AGs est très important. En effet, depuis l'attribution du caractère essentiel du LA, les recommandations alimentaires pour cet AGPI n'ont pas cessé d'augmenter et ceci sans prendre en considération nos besoins en LNA. Ce qui a créé un débat à propos de la surestimation des besoins de LA en défaveur de celle du LNA (Cunnane, 2003). Les régimes alimentaires des pays occidentaux contiennent 17 fois plus d'AGPIs  $\omega 6$  que d'AGPIs  $\omega 3$  ce qui se traduit par un ratio  $\omega 6/\omega 3$  très élevé (Simopoulos, 2002), qui semble corrélé à l'IMC et la fréquence de plusieurs maladies métaboliques et cardiovasculaires (Ailhaud et al., 2008). Pour ces raisons et en tenant compte des possibles compétitions entre les deux types d'AGPI, les institutions de santé recommandent un ratio alimentaire LA/LNA plus faible que 4/1 (ANSES, 2011). Ce rapport n'est important que lorsque les apports journaliers recommandés de LA et de LNA ne sont pas respectés (Legrand, 2013). En plus du respect du ratio  $\omega 6/\omega 3$ , un taux maximal de LA, a été fixé à 3% de l'apport énergétique total et au-delà duquel cet AG deviendrait néfaste pour l'organisme (ANSES, 2011).

## 4.2 Effets des AGPIs sur le développement du TA

Le tissu adipeux représente le principal site de stockage des lipides alimentaires dont les AGPIs essentiels : le LA  $\omega 6$  et le LNA  $\omega 3$ . Les AGs ainsi stockés sous formes de TGs au sein de la gouttelette lipidique, pourront-être  $\beta$ -oxydés (essentiellement dans les adipocytes thermogéniques), ou métabolisés en éicosanoïdes. Comme dans la plupart des cellules de l'organisme, les AGs et leurs métabolites sont capables d'exercer des effets biologiques divers au niveau de l'adipocyte. Ces effets sont des modifications métaboliques, morphologiques et des variations au niveau de l'expression des gènes. Toutefois, l'impact de l'alimentation sur le tissu adipeux ne dépend pas juste de la quantité d'AGs apportés mais surtout de la qualité de ces AGs. En tenant compte de la compétition qui peut avoir lieu

entre les AGPIs  $\omega_6$  et  $\omega_3$ , les effets biologiques des uns sont dépendants de l'abondance ou la déficience des autres.

Au cours du développement de l'individu, il existe des fenêtres de temps critiques, qui coïncident avec les périodes majeures de développement des systèmes métaboliques de l'organisme. Ces périodes s'étalent de la pré-naissance jusqu'à l'âge de deux ans chez l'Homme et de la phase fœtale jusqu'à la phase de lactation chez les rongeurs. Durant ces phases, l'exposition à un environnement nutritionnel non-optimal est capable d'augmenter le risque d'incidence des maladies métaboliques et de prédisposer les individus à l'obésité à l'âge adulte. Récemment, il a été montré que l'exposition périnatale des souris à un régime riche en AGPI  $\omega_6$  (ratio LA/LNA=28) induisait une accumulation progressive de la masse grasse corporelle au cours des générations (Massiera et al., 2010), et qu'un régime riche en LA était capable d'induire la survenue du surpoids due à l'augmentation de la masse du TAB chez les souris adultes (Javadi et al., 2004). Une autre étude publiée en 2010 a montré qu'un régime riche en LA induisait l'expression des gènes impliqués dans la lipogénèse : SREBP1c, FAS, SCD-1 et PPAR $\gamma$  au niveau du tissu adipeux omental chez les rats ce qui n'était pas le cas des rats nourris par le même régime mais cette fois-ci enrichis en LNA (Muhlhausler et al., 2010). Chez l'Homme, des études épidémiologiques ont montré qu'il existe un lien entre le contenu en AGPIs  $\omega_6$  dans l'alimentation et le pourcentage des enfants en surpoids au sein de la population (Ailhaud et al., 2006).

Ensemble, ces observations montrent que le rapport  $\omega_6/\omega_3$  est capable de contrôler le développement du tissu adipeux.

### **4.3 Effet de l'ARA et des PGs sur l'adipogénèse**

Du fait de l'impact du LA sur la masse grasse et le métabolisme général, l'influence des métabolites oxygénés dérivés des AGPIs  $\omega_6$  sur la biologie du tissu adipeux a été largement étudiée. Dans les années 1980, plusieurs études ont été menées sur la lignée de préadipocytes murins Ob1771, et ont permis de montrer que l'ARA  $\omega_6$  est capable d'induire la différenciation adipocytaire de ces cellules par l'intermédiaire de l'AMPc. Cet effet était inhibé par l'aspirine, inhibiteur des COXs, montrant ainsi que la capacité pro-adipogénique

de l'ARA était due à ses métabolites issus de la voie des COXs (Gaillard et al., 1989b; Massiera et al., 2003). Cela a été confirmé par une autre étude publiée en 2010 qui montre que les souris invalidées pour le gène COX2 (*cox2<sup>-/-</sup>*) possèdent un poids corporel et un pourcentage de masse grasse plus faibles que les souris sauvage (WT) (Ghoshal et al., 2011). Une troisième étude approuve les deux précédentes en montrant que l'indométhacine, inhibiteur des COXs, empêche l'augmentation de la masse du TAB épидidymal, inguinal et rétropéritonéal provoquée par un régime riche en lipides et en glucides (Fjære et al., 2014). Or, il semble que l'effet de l'ARA sur la différenciation soit beaucoup plus complexe. En effet, Madsen et ses collaborateurs ont pu démontrer que l'effet pro-adipogénique des AGPIs  $\omega 6$  sur les pré-adipocytes murins cultivés *in vitro* était dépendant du taux d'AMPc intracellulaire. Pour eux, l'ARA était pro-adipogénique lorsque les cellules avaient un taux d'AMPc faible et anti-adipogénique lorsque ce taux était élevé. Un taux élevé d'AMPc dans les pré-adipocytes active la protéine kinase A et ainsi l'expression de la cyclooxygénase 2, responsable de la conversion de l'ARA en PGE2 et PGF2- $\alpha$  ayant eux un effet anti-adipogénique (Fujimori et al., 2014; Madsen et al., 2008b; Petersen et al., 2003b). De plus, il a été récemment démontré que l'ARA induisait l'expression du « Fos-Related Antigen-1 » (Fra-1) pour inhiber la différenciation adipocytaire des cellules 3T3-L1 et que cet effet était dépendant de son métabolite PGF2 $\alpha$  (Nikolopoulou et al., 2014). Cette complexité de l'effet de l'ARA a été encore mise en évidence lorsque la capacité pro-adipogénique de cet AG a été montrée comme dépendante des métabolites oxygénés générés à partir de la métabolisation de ce dernier, cette fois ci, par les LOXs (Shillabeer et al., 1998b) et particulièrement la LOX-3. Ces métabolites étaient capables d'activer l'élément clé de la différenciation adipocytaire « PPAR $\gamma$  » (Madsen et al., 2003b). Chez l'Homme, plusieurs études épidémiologiques ont pu mettre en évidence l'existence d'une corrélation entre le taux d'ARA au niveau du TAB et l'IMC ou le développement de l'obésité dans différentes populations (Garaulet et al., 2001; Savva et al., 2004; Williams et al., 2007). En plus, il a été démontré que le traitement des pré-adipocytes humains par l'ARA était responsable de la formation de gouttelettes lipidiques de grandes tailles au cours de l'adipogénèse (Polus et al., 2015).

#### 4.3.1 PGI2 et adipogénèse

Il a été démontré que la carbaprostacyline (cPGI2), analogue stable de PGI2, était capable d'induire une augmentation du taux d'AMPc intracellulaire et de mimer l'effet positif de l'ARA sur la différenciation des pré-adipocytes murins (Vassaux et al., 1992a). Cette voie est aussi bien présente *in vivo*, comme le démontre l'abolissement des effets d'un régime riche en LA (augmentation de la masse grasse épидидymale) chez des souris invalidées pour le récepteur IP (IP<sup>-/-</sup>) (Massiera et al., 2003). Ces données montrent que l'effet adipogénique de l'ARA est dû à sa métabolisation par les COXs en PGI2. Celui-ci va activer l'IP couplé à une protéine Gs activatrice de la voie de signalisation de l'adénylate cyclase/AMPc/PKA. Cette voie est responsable de l'induction de l'expression des gènes impliqués dans l'adipogénèse tel que C/EBPβ et C/EBPδ (Aubert et al., 2000b). Chez l'Homme la même situation est retrouvée, cPGI2 étant capable de remplacer l'isobutylméthylxanthine, responsable du maintien d'un taux élevé d'AMPc intracellulaire et indispensable à la différenciation des cellules mésenchymateuses humaines (Jia et al., 2012b).

Indépendamment de l'IP, des études ont montré que PGI2 était capable d'activer d'une manière intracrine plusieurs récepteurs appartenant à la famille des PPARs. Ceci induit l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la différenciation terminale des pré-adipocytes murins, parmi lesquels, la protéine adipocytaire de liaison aux AGs (FABP4) (Aubert et al., 1996; Hertz et al., 1996).

#### 4.3.2 PGE2 et adipogénèse

Au contraire de PGI2 qui exerce un effet positif bien décrit sur l'adipogénèse, PGE2 possède un effet plus complexe. Cette complexité revient: i) à la présence de quatre récepteurs membranaires différents capable de fixer cette PG avec des affinités variables (Kringelholz et al., 2013), ii) au profil d'expression de ces récepteurs selon le type de cellules et leurs degrés de différenciation, et iii) à la présence de trois enzymes de synthèse qui modulent sa production au sein des pré-adipocytes. Par exemple, le récepteur EP1 couplé à une protéine Gq induisant une voie de signalisation calcique et EP4 couplé à une protéine Gs activatrice de la voie de signalisation de l'AMPc, sont plus exprimés dans les pré-adipocytes

que dans les adipocytes murins matures. L'expression de l'EP3 couplé à une protéine Gi inhibitrice de la voie de signalisation de l'AMPc, est plus prononcée au cours de la différenciation adipocytaire murins et humains (Børglum et al., 1999; Michaud et al., 2014). Récemment, il a été montré que l'EP3 était indispensable pour la lutte contre l'augmentation de la masse du TAB épидidymal chez les souris nourries par un régime riche en lipides (Ceddia et al., 2015). Une étude corrélative entre l'expression des enzymes de synthèse de PGE2 et l'augmentation de la masse du TAB dans le cadre de l'obésité, a pu montrer que l'expression de la m-PGES1, mais pas celles des m-PGES2 et c-PGES, était inhibée dans le TAB sous cutané et épидidymal des souris obèses. De plus, le taux de PGE2 synthétisé au niveau du TAB était plus faible chez ces souris comparé aux souris minces. Ces observations permettent d'associer à PGE2 un rôle négatif sur le développement du TAB (Hétu and Riendeau, 2007).

Il a aussi été montré que la synthèse de PGE2, par la m-PGES1, dans les pré-adipocytes murins 3T3-L1 était capable d'inhiber la phase précoce de l'adipogénèse de ces cellules (Fujimori et al., 2012) ainsi que celle des fibroblastes embryonnaires murins dépendamment du récepteur EP4 (Inazumi et al., 2011; Tsuboi et al., 2004). Enfin, PGE2 est connu comme, inhibiteur de la lipolyse au niveau des adipocytes blancs matures chez l'Homme (Kather, 1981; Richelsen et al., 1991) et chez le rat, probablement par l'intermédiaire du récepteur EP3 (Strong et al., 1992; Vassaux et al., 1992a).

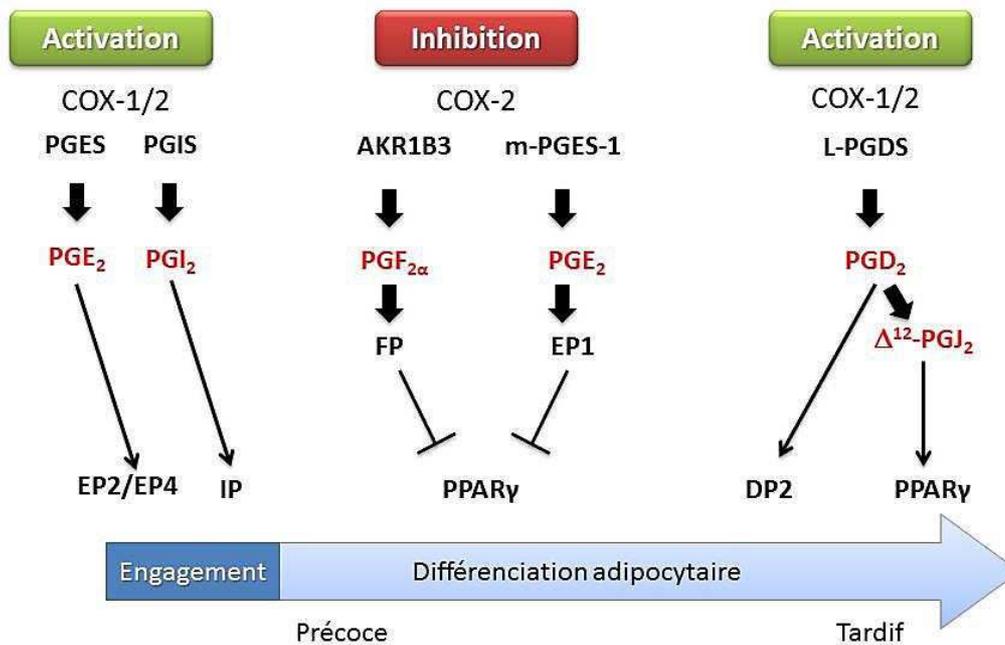
### **4.3.3 PGF2 $\alpha$ et adipogénèse**

Les principales enzymes de synthèse de PGF2 $\alpha$  dans les pré-adipocytes sont l'AKR1C1 et l'AKR1B3. Il a été démontré que l'inhibition de cette dernière au cours de l'adipogénèse entraînait l'augmentation d'expression des marqueurs adipogéniques tel que : FABP4, PPAR $\gamma$  et SCD (Fujimori et al., 2010). En effet, PGF2 $\alpha$  est considérée comme inhibiteur potentiel de l'adipogénèse. Cette PG *via* l'activation de son propre récepteur membranaire couplé à la protéine Gq, induit une augmentation du taux de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire. Ceci induit le système Ca<sup>2+</sup>/calcineurin/calmodulin responsable de l'inhibition de l'expression de plusieurs facteurs de transcription pro-adipogéniques tel que PPAR $\gamma$  et C/EBP $\alpha$  et ainsi de la différenciation des pré-adipocytes murins (Liu and Clipstone, 2007). Il a été ainsi démontré que l'effet inhibiteur

de PGF2 $\alpha$  sur la différenciation des pré-adipocytes était aussi dû à la voie FP/Ca<sup>2+</sup> intracellulaire mais cette fois ci en phosphorylant la kinase régulée par les signaux extracellulaires ERK1/2 et PPAR $\gamma$  (Reginato et al., 1998). Récemment, une nouvelle étude a montré que l'effet négatif de l'ARA sur la phase précoce de la différenciation des pré-adipocytes 3T3-L1 était dû à l'action de son métabolite PGF2 $\alpha$  *via* l'activation de l'expression de Fra-1 et de FABP4. La surexpression de Fra-1 a été démontrée par le même groupe de chercheurs comme inhibitrice de l'adipogenèse (Nikolopoulou et al., 2014). De manière étonnante, de nouvelles données ont montré qu'une expression élevée de FABP4 est capable d'induire la dégradation de PPAR $\gamma$  dans les adipocytes (Garin-Shkolnik et al., 2014), cela pouvant alors expliquer les résultats de Nikolopoulou et ses collaborateurs.

#### 4.3.4 PGD2 et adipogenèse

Comme indiqué précédemment, PGD2 a un temps de demi-vie de l'ordre de quelques secondes et est rapidement métabolisée en dérivés de PGJ2 tel que  $\Delta$ 12-PGJ2 et 15-désoxy- $\Delta$ 12,14 PGJ2. Alors que les PGs synthétisées physiologiquement ont besoin d'un second messager pour exercer leurs effets par l'intermédiaire de leurs récepteurs membranaires, le 15d-PGJ2 était le seul dérivé de PG à avoir été démontré comme ligand naturel du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  et activateur de la différenciation adipocytaire des fibroblastes de souris exprimant ce récepteur nucléaire (Forman et al., 1995). En addition, il a été montré que ce dérivé de PGD2 était synthétisé au cours de la maturation adipocytaire des adipocytes différenciés à partir des cellules 3T3-L1 (Mazid et al., 2006). Néanmoins, les concentrations de 15d-PGJ2 nécessaire pour activer PPAR $\gamma$  sont de l'ordre de 25-100  $\mu$ M loin des concentrations physiologiques. En effet, *in vivo* les concentrations de ce dérivé sont minimes et insuffisantes pour activer la différenciation adipocytaire par PPAR $\gamma$  (Fujimori, 2012). Finalement, il est difficile de déterminer *in vivo* si ce dérivé est synthétisé par les adipocytes ou bien transporté depuis les cellules qui le synthétisent jusqu'à l'adipocyte.



**Figure 35. Récapitulatif des effets des différentes prostaglandines sur l'adipogenèse.** Les prostaglandines sont représentées en rouge. La prostacycline (PGI<sub>2</sub>) et la prostaglandine E<sub>2</sub> induisent l'engagement et la première phase de l'adipogenèse, par l'intermédiaire de leurs récepteurs IP et EP2/EP4 respectivement. Les prostaglandines E<sub>2</sub> et F<sub>2α</sub> inhibent la différenciation adipocytaire en inhibant PPAR<sub>γ</sub>, par l'intermédiaire de leurs récepteurs FP et EP1. La prostaglandine D<sub>2</sub> induit l'adipogenèse soit via son récepteur DP2, soit en activant PPAR<sub>γ</sub> par son métabolite, le 12-delta prostaglandine J<sub>2</sub>



## OBJECTIFS

---

Au cours de la dernière décennie, la fréquence d'apparition de l'obésité et des maladies associées a considérablement augmentée. Si la quantité des lipides alimentaires est accusée, beaucoup d'études montrent l'importance de la qualité de ces lipides dans le développement du TA.

Les AGPIs  $\omega 6$  et leurs métabolites, essentiellement les prostaglandines, jouent un rôle très important dans l'organisme, mais sont aussi souvent associés à l'augmentation de l'IMC chez l'homme. Dans ces circonstances, l'objectif de ma thèse était d'étudier l'effet de l'ARA, de ses prostaglandines et du rapport  $\omega 6/\omega 3$ , sur la conversion des adipocytes blancs en adipocytes bruns. Cela afin de mieux comprendre leurs implications dans l'obésité et peut-être proposer une nouvelle approche pharmacologique et/ou nutritionnelle pour traiter ce problème de Santé Publique.



## **RESULTATS et DISCUSSIONS**

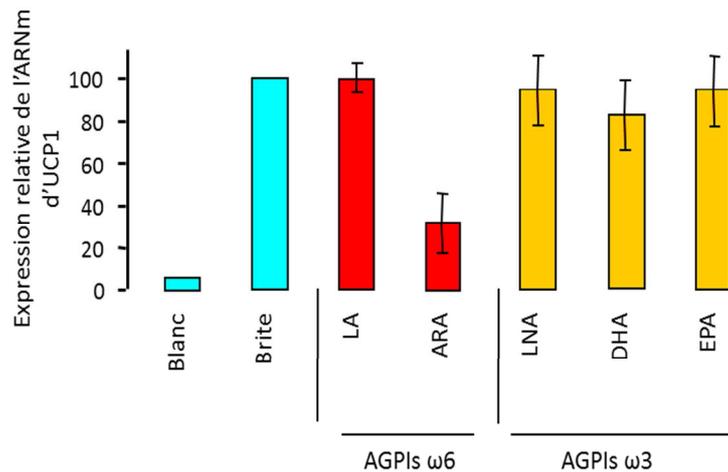
---



L'obésité résulte d'une rupture de la balance entre les apports et les dépenses énergétiques. A ce jour, à l'exception des patients présentant une obésité sévère qui subissent des chirurgies bariatriques, les différents traitements de l'obésité ne sont pas satisfaisants. Récemment, la caractérisation du tissu adipeux brun (TABr) fonctionnel chez l'homme adulte et la découverte de l'adipocyte brite ont permis aux chercheurs d'envisager de nouvelles approches thérapeutiques pour traiter l'obésité et les maladies associées. Une stratégie intéressante pour combattre cette maladie est le recrutement et l'induction de l'activité de ces adipocytes brites dans le TAB, présent en grande quantité chez ces patients. Cette méthode permettrait de rééquilibrer la balance énergétique en augmentant les dépenses énergétiques au sein du TAB par l'oxydation des acides gras et du glucose. Une stratégie encore plus intéressante serait de limiter le stockage des lipides par les adipocytes blancs et d'augmenter leur utilisation par les adipocytes brites en adaptant les apports nutritionnels, particulièrement en AGPIs. En effet, même si les recommandations nutritionnelles actuelles ont pris en considération l'insuffisance de l'apport en AGPIs  $\omega$ 3 par rapport à l'excès d'AGPIs  $\omega$ 6, le déséquilibre entre ces AGPIs a largement contribué à une élévation du nombre d'individus en surpoids et/ou obèses. Cela est dû au fait que ces AGPIs et leurs métabolites déclenchent différentes réponses biologiques et jouent un rôle important dans le développement du tissu adipeux, entre autre en contrôlant, directement ou indirectement, l'activité de PPAR $\gamma$ .

Alors que l'effet des AGPIs a surtout été étudié dans le contexte de l'adipogénèse blanche, mon projet a consisté à étudier les effets des différents AGPIs alimentaires sur la conversion des adipocytes blancs en adipocytes brites chez l'Homme. Cette étude est basée sur l'utilisation des cellules hMADS, isolées au sein de notre laboratoire et qui sont capables de se différencier en adipocytes blancs puis de se convertir en adipocytes brites sous l'effet de la rosiglitazone (agoniste de PPAR $\gamma$ ). Ainsi, le traitement des adipocytes issus des cellules hMADS par les différents AGPIs nous permet de déterminer si ces derniers étaient capables d'induire la conversion en adipocytes brites. Au contraire, le co-traitement AGPIs/rosiglitazone nous a permis d'étudier les effets inhibiteurs de ces AGPIs sur la conversion. Nous avons donc testé les effets du LA, de l'ARA, du LNA, de l'EPA et du DHA sur les adipocytes hMADS. Nos premiers résultats ont montré qu'aucun de ces AGPIs n'était

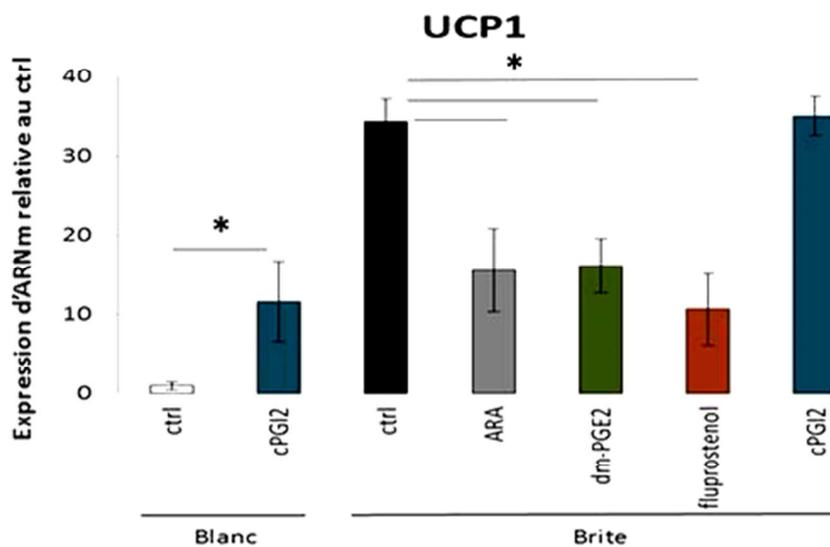
capable d'induire la conversion des adipocytes blancs en brites. Par contre, en présence de rosiglitazone, l'ARA inhibait l'expression d'UCP1 et donc la conversion des adipocytes blancs en adipocytes brites, alors que les AGPIs  $\omega 3$  ainsi que le LA ne provoquait pas d'effet sur cette conversion. (Figure 36)



**Figure 36. Expression relative de l'ARNm d'UCP1 des cellules traitées par les AGPIs.** L'ARNm est quantifié par PCR quantitative. Les résultats sont rapportés à l'expression de 36B4 et exprimés en valeur de  $2^{-\Delta CT}$ . Les résultats sont les moyennes de trois expériences différentes. AGPI: acide gras polyinsaturé, ARA: acide arachidonique, DHA: acide docosahexanoïque, EPA: acide éicosapentanoïque, LA: acide linoléique et LNA: acide  $\alpha$ -linoléique

Ces résultats sont très intéressants car 1) les niveaux d'ARA dans le tissu adipeux sont corrélés positivement avec l'indice de la masse corporelle (IMC) et les maladies métaboliques associées (Inoue et al., 2013; Savva et al., 2004; Williams et al., 2007) et 2) des résultats publiés précédemment ont démontré le rôle pro-adipogénique de cet AG *in vitro* et *in vivo* chez la souris (Ailhaud et al., 2006; Massiera et al., 2003). Notre hypothèse a alors été que la corrélation entre le taux d'ARA et l'IMC pouvait être due à la fois à une hyperplasie des adipocytes blancs et à une inhibition de la dépense énergétique par la limitation de la conversion de ces adipocytes blancs en adipocytes brites.

Nous avons donc essayé de mieux comprendre l'effet de l'ARA sur la conversion adipocytaire à la fois *in vitro* et *in vivo*. Nous avons démontré que l'effet de l'ARA sur la conversion des adipocytes blancs en brites était dû à sa métabolisation par les COXs, qui vont ainsi générer différentes PGs de la série 2 et la prostacycline. Dans un premier temps, nous avons ensuite étudié les effets de ces différents métabolites sur la conversion adipocytaire *in vitro* et nous avons montré que PGF2 $\alpha$  et PGE2, mais pas cPGI2, inhibaient l'expression d'UCP1 induite par la rosiglitazone et cela de manière comparable à l'ARA. Au cours de cette même étude, nous avons pu obtenir un autre résultat très intéressant, le traitement des adipocytes blancs par la carbaprostacycline (cPGI2, analogue stable de PGI2) induisait leur conversion en adipocytes brites. (Figure 37)



**Figure 37. Expression d'ARNm d'UCP1 des cellules traitées par les analogues des prostaglandines.** L'ARNm est quantifié par PCR quantitative. Les résultats sont rapportés à l'expression de 36B4 et exprimés en valeur de  $2^{-\Delta CT}$  puis ramenés à la valeur obtenue dans la condition contrôle. Les résultats sont les moyennes de trois expériences différentes. ARA :acide arachidonique (10 $\mu$ M), cPGI2 :carbaprostacycline (1 $\mu$ M), ctrl :contrôle, dm-PGE2 :diméthyl PGE2 (1 $\mu$ M), fluprostenol :agoniste du récepteur FP (10nM). \*=P<0.05

Un article important était publié et démontrait que cPGI2 était capable d'induire la différenciation adipocytaire brite et d'améliorer la réponse de ces cellules à une stimulation adrénergique par le norépinephrine (Vegiopoulos et al., 2010b).

Mon projet de thèse s'est alors construit sur la base de ces résultats et a consisté en la caractérisation des différentes voies de signalisation permettant à partir d'un même AG, l'ARA, d'induire mais aussi d'inhiber la conversion des adipocytes blancs en brites.

**La première partie des résultats** que je développerai sera consacrée à la caractérisation des mécanismes moléculaires permettant à cPGI2 d'induire la conversion des adipocytes blancs en adipocytes brites.

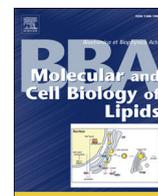
**Au cours de la deuxième partie**, je présenterai nos résultats concernant les PGs, et les voies de signalisation associées, impliquées dans l'effet inhibiteur de l'ARA sur la conversion adipocytaire, ainsi que la validation de l'effet de cet AG *in vivo* chez la souris.

Une des conclusions de nos travaux est que l'apport excessif d'ARA inhibe l'apparition d'adipocytes brites dans le TAB des souris. Comme nous l'avons déjà décrit, plus que la quantité des AGPIs alimentaires, la qualité de ces derniers est d'une grande importance. Nous avons ainsi voulu savoir si une supplémentation en AGPIs  $\omega 3$  dans l'alimentation, diminuant ainsi le rapport AGPIs  $\omega 6/\omega 3$ , pouvait neutraliser l'effet négatif de l'ARA sur l'apparition des adipocytes brites au sein du TAB. Les résultats que j'ai obtenus à ce propos seront développés **dans la discussion 2**.

## **Article 1:**

IP-receptor and PPARs trigger the conversion of  
human white to brite  
adipocyte induced by carbaprostacyclin





## IP-receptor and PPARs trigger the conversion of human white to brite adipocyte induced by carbaprostacyclin

Rayane A. Ghandour<sup>a,b,c</sup>, Maude Giroud<sup>a,b,c</sup>, Alexandros Vegiopoulos<sup>d</sup>, Stephan Herzig<sup>e,f,g,h</sup>, Gérard Ailhaud<sup>a,b,c</sup>, Ez-Zoubir Amri<sup>a,b,c,\*</sup>, Didier F. Pisani<sup>a,b,c,\*</sup>

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

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

<sup>c</sup> Inserm, iBV, U1091, Nice, France

<sup>d</sup> DKFZ Junior Group Metabolism and Stem Cell Plasticity, German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany

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

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

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

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

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 8 October 2015

Received in revised form 4 January 2016

Accepted 12 January 2016

Available online 14 January 2016

#### Keywords:

Prostacyclin

cPGI2

cAMP

Brown adipocyte

Obesity

UCP1

### ABSTRACT

Brite adipocytes recently discovered in humans are of considerable importance in energy expenditure by converting energy excess into heat. This property could be useful in the treatment of obesity, and nutritional aspects are relevant to this important issue. Using hMADS cells as a human cell model which undergoes a white to a brite adipocyte conversion, we had shown previously that arachidonic acid, the major metabolite of the essential nutrient  $\Omega$ 6-linoleic acid, plays a major role in this process. Its metabolites PGE2 and PGF2 alpha inhibit this process via a calcium-dependent pathway, whereas in contrast carbaprostacyclin (cPGI2), a stable analog of prostacyclin, activates white to brite adipocyte conversion. Herein, we show that cPGI2 generates via its cognate cell-surface receptor IP-R, a cyclic AMP-signaling pathway involving PKA activity which in turn induces the expression of UCP1. In addition, cPGI2 activates the pathway of nuclear receptors of the PPAR family, i.e. PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$ , which act separately from IP-R to up-regulate the expression of key genes involved in the function of brite adipocytes. Thus dual pathways are playing in concert for the occurrence of a browning process of human white adipocytes. These results make prostacyclin analogs as a new class of interesting molecules to treat obesity and associated diseases.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

White adipose tissue (WAT) stores and releases energy as lipids while brown adipose tissue (BAT) burns fat to produce heat by uncoupling the mitochondrial electron transport chain activity from ATP synthesis [1]. This energy dissipation is due to the unique expression of the uncoupling protein 1 (UCP1) in brown adipocyte mitochondria [2,3]. In addition to the thermogenic brown adipocytes located in BAT, WAT contains inducible thermogenic fat cells – called “brite” (“brown-in-white”) or “beige” adipocytes – which are able to metabolize fat and carbohydrates via non-shivering thermogenesis [4–7]. *In vivo* brite adipocytes appear in response to cold exposure, to chronic adrenergic stress or to high-fat diets and stem either from progenitors but mainly by direct conversion of mature white adipocytes [6,8,9]. During

the last decade, various laboratories have shown that healthy adult humans display islets of energy-dissipating thermogenic adipocytes of metabolic significance [10–14], which display the signature of either classical brown or brite adipocytes depending on the localization and the depth of the analyzed tissue [15–18]. As brown and brite adipocytes represent important candidates for controlling body weight, investigations on the regulation of brite adipocyte recruitment and activation in human are in demand, particularly from a nutritional point of view since quantitative and qualitative issues of dietary lipids are relevant to increased body weight [19].

We have recently shown that a metabolite arising from the essential  $\omega$ 6 linoleic acid (LA), i.e. arachidonic acid (ARA), inhibits the conversion of white to brite adipocytes [20]. The effect of ARA is mediated via cyclooxygenase (COX) activities leading to increased synthesis and release of inhibitory prostaglandins PGE2 and PGF2 $\alpha$ , and finally activation of an oscillatory calcium pathway [20]. Interestingly, *in vivo*, COX pathway has been shown to be crucial for the induction of brite adipocytes in 129Sv mice, a mouse strain resistant to develop obesity due to its high content of brown and brite adipocytes [21,22]. We had also shown

\* Corresponding authors at: iBV; Université de Nice Sophia-Antipolis, UMR7277 CNRS – UMR1091 INSERM; Faculté de Médecine; 28 Avenue de Valombrose, 06107 Nice Cedex 2, France.

E-mail addresses: [amri@unice.fr](mailto:amri@unice.fr) (E.-Z. Amri), [pisani@unice.fr](mailto:pisani@unice.fr) (D.F. Pisani).

earlier in rodents that ARA is active through prostacyclin synthesis and release to stimulate adipogenesis of white preadipocytes [23]. Prostacyclin acts through the IP-receptor (IP-R)/prostacyclin system, triggers cAMP production and activates the pro-adipogenic protein kinase A (PKA) pathway [24,25]. Both *ex vivo* and *in vivo* exposure of mouse white adipose tissue to carbaprostacyclin (cPGI<sub>2</sub>), a stable analog of prostacyclin, stimulates the formation of adipocytes within few day [23,26]. Moreover, ARA and some of its metabolites have been described *in vitro* as activators/agonists of peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) stimulating adipogenesis of white preadipocytes [27]. However, compared to rodents, the mechanism by which cPGI<sub>2</sub> favors the browning process of human white adipocytes remains largely unknown.

In the work described herein, we have investigated this process using a well described human cell model, *i.e.* hMADS cells [28,29]. We show that, unlike PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2</sub>α [20], cPGI<sub>2</sub> up-regulates UCP1 expression and leads to increased thermogenesis of hMADS adipocytes by enhancing proton leak and basal respiration. Our results show that the conversion of white to brite adipocytes implicates two signaling pathways activated respectively by the cell surface prostacyclin receptor IP-R and by nuclear receptors of the PPAR family, *i.e.* PPARα and PPARγ.

## 2. Material and methods

### 2.1. Reagents

Culture media and buffer solutions were purchased from Lonza Verviers (Verviers, Belgium), fetal bovine serum, insulin and trypsin from Invitrogen (CergyPontoise, France), hFGF2 from Peprotech (Neuilly sur Seine, France). cPGI<sub>2</sub>, CAY10441, GW9662, MRE269 and rosiglitazone were purchased from Cayman (BertinPharma, Montigny le bretonneux, France). All the other products, when not indicated, were from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

### 2.2. Cell culture

The establishment, characterization and culture protocols of hMADS cells have been described previously [28,30]. In the experiments reported herein hMADS-3 cells were used, originally isolated from the prepubic fat pad of a 4-month-old male. Cells were used between passages 14 and 20. Briefly, confluent cells were submitted to differentiation medium (DMEM/Ham's F12 media containing 10 µg/ml transferrin, 10 nM insulin, and 0.2 nM triiodothyronine) supplemented with 1 µM dexamethasone and 500 µM isobutyl-methylxanthine. Two days later, the medium was changed, dexamethasone and isobutyl-methylxanthine were omitted and 100 nM rosiglitazone was added for the indicated periods. Cells were treated between days 2 and 9 with rosiglitazone to enable white adipocyte differentiation to take place. After 5 days in its absence brite adipocyte conversion was induced by adding rosiglitazone between days 14 and 17. All compounds tested herein were added at day 14. Medium was changed every other day and cells were used at the indicated days.

Cytochrome C oxidase and Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activity assays as well as Oil Red O staining were performed as described previously [29,31].

### 2.3. Transfection of siRNAs

Transfection experiments were performed using HiPerfect (QIAGEN, Courtaboeuf, France) at days 12 and 14 of differentiation. Cells were incubated with a mixture containing HiPerfect and siRNA (20 nM) in DMEM. Four hours later, it was supplemented with F12 medium containing 20 µg/ml transferrin, 20 nM insulin, and 0.4 nM triiodothyronine. siRNA against human PPARα consisted in a pool of 3 target-

specific 19–25 nucleotides siRNAs designed to knock-down gene expression (Santa Cruz, Heidelberg, Germany).

### 2.4. Isolation and analysis of RNA

These procedures follow MIQE standard recommendations and were conducted as described previously [29]. Primer sequences are listed in Supplementary Table 1. Quantitative PCR (qPCR) was performed using SYBR qPCR premix Ex TaqII from Takara (Ozyme, Montigny-le-Bretonneux, France) and assays were run on a StepOnePlus ABI real-time PCR machine (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Boston). The expression of selected genes was normalized to that of 36B4 housekeeping gene and then quantified using the comparative-ΔCt method.

### 2.5. 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, 1× protease inhibitor cocktail and 1× Phosphostop mix (Roche Diagnostics, Meylan, France)). Protein concentration was evaluated by BCA assay according to manufacturer's recommendations (PIERCE, Thermo Scientific, France). Proteins were blotted using SDS-PAGE basic protocol. Primary antibody incubation was performed overnight at 4 °C (anti-UCP1, Calbiochem (Merk-Millipore, Molsheim, France) #662045, dilution 1:750; anti-β-tubulin, Sigma #T5201, dilution 1:2000; anti-perilipin, Acris Antibodies (Interchim, Montluçon, France) #BP5015, dilution 1:5000; anti-CREB, CellSignaling (Ozyme) #9197, dilution 1:500; and anti-phospho-CREB, CellSignaling #9190, dilution 1:500). Primary antibodies were detected with HRP-conjugated anti-rabbit or anti-mouse immunoglobulins (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) and goat anti-guinea pig immunoglobulins (SantaCruz). Detection was performed using Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Merk-Millipore). OD band intensities were evaluated using PCB as Software.

### 2.6. Mitochondrial respiration analysis

Oxygen consumption rate (OCR) of hMADS adipocytes was determined at day 17 using an XF24 Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience, Proteigene, Saint Marcel, France) and normalized by protein content (evaluated by BCA assay). Uncoupled and maximal OCR was determined using oligomycin (1.2 µM) and FCCP (1 µM), respectively. Rotenone and Antimycin A (1 µM each) were used to inhibit Complex I- and Complex III-dependent respiration, respectively. Parameters were measured for each individual well using the different value of OCR as previously described [32].

### 2.7. Mitochondrial DNA quantification

DNA was extracted using a DNA extraction kit (Macherey-Nagel EURL, Hoerdt, France). 2 ng of total DNA was used for qPCR analysis, and the mitochondrial DNA content was determined as the ratio of the DNA content of the NADH dehydrogenase subunit 1 gene (*Nd1*, mitochondrial DNA) to that of lipoprotein lipase gene (*Lpl*, a nuclear DNA).

### 2.8. Analysis of Ca<sup>++</sup> flux

hMADS cells were seeded in 4 well plates and differentiated until day 14 into adipocytes. Cells were incubated for 20 min at 37 °C with 5 µM of the fluorescent Ca<sup>++</sup> sensitive probe Quest Fluo-8 (Euromedex, Souffelweyersheim, France) in PBS supplemented with 2 mM CaCl<sub>2</sub> and 0.05% BSA. Cells were finally washed in PBS containing 2 mM CaCl<sub>2</sub> and installed on the stage of an inverted microscope maintained at 37 °C and illuminated with a xenon lamp through a dichroic filter (excitation 490 nm and emission over 510 nm). Digital images were recorded

every 5 s with a low light level camera (Photonic Science, St Etienne de St Geoirs, France) and processed for gray level analysis through imaging workbench software (v2.1).

### 2.9. Statistical analyses

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

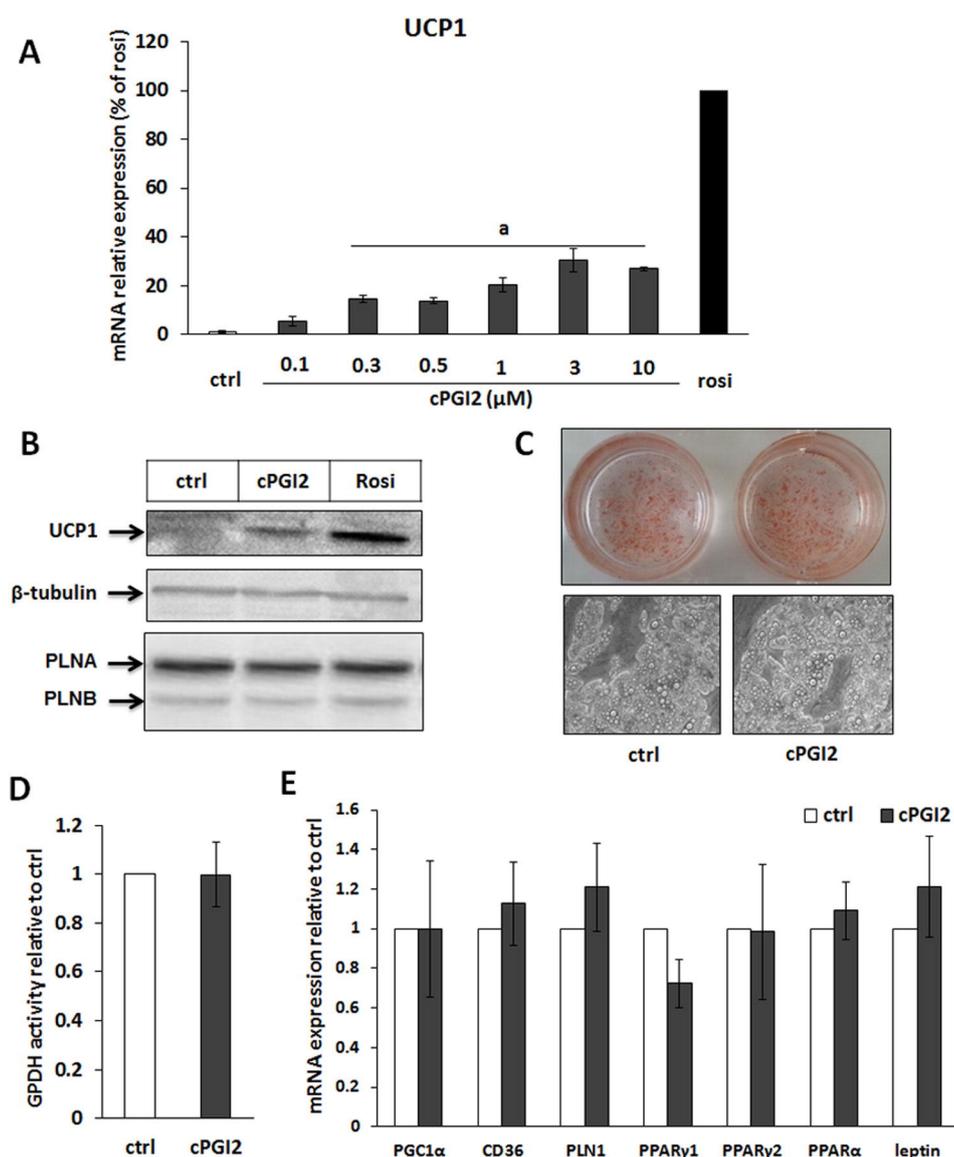
## 3. Results

### 3.1. cPGI2 induces the conversion of white to brite adipocytes

We have previously shown that rosiglitazone, a PPAR $\gamma$  specific agonist, was able to induce the conversion of hMADS white adipocytes into brite/beige adipocytes as shown by a strong expression of UCP1 [29]. In

order to test whether cPGI2 was able to substitute for rosiglitazone, hMADS cells first differentiated into white adipocytes in the presence of rosiglitazone from day 3 to day 9, as described in [Materials and methods](#) section, and then treated or not with increasing concentrations of cPGI2 between days 14 and 17. UCP1 mRNA expression was analyzed at day 17 as an indicator of the degree of white to brite adipocyte conversion. As shown in [Fig. 1A](#), UCP1 mRNA expression was induced in cPGI2-treated cells compared to untreated cells in a dose-dependent manner though at lower expression levels than those observed when rosiglitazone was present between days 14 and 17. cPGI2 at 1  $\mu$ M induced UCP1 expression, at both mRNA and protein levels ([Fig. 1A–B](#)), corresponding to 20–30% of the maximal effect obtained upon rosiglitazone treatment. This concentration was routinely used in subsequent experiments.

In order to exclude any adipogenic effect of cPGI2 that could be associated with UCP1 induction, we analyzed cellular and molecular markers associated with adipogenesis at day 17. As shown in [Fig. 1C](#), cells treated or not with cPGI2 harbored similar morphological differentiation (assessed by Oil red O staining and phase contrast microscopy). Furthermore, cPGI2 treatment did not affect glycerol-3-phosphate



**Fig. 1.** Effect of cPGI2 treatment on white to brite adipocyte conversion. hMADS cells were differentiated into white (ctrl) or brite (rosi) adipocytes, and treated or not with various doses (A) or with 1  $\mu$ M (B–E) cPGI2 under white adipocyte conditions. (A) UCP1 mRNA expression determined by RT-qPCR. (B) UCP1 and PLNA/B protein levels analyzed by Western blot.  $\beta$ -tubulin was used as loading control. (C) Oil red O staining of control and cPGI2 treated adipocytes and corresponding microscopic photomicrographs. (D) Measurement of GPDH activities and (E) mRNA expression of adipogenic markers were analyzed by RT-qPCR. Results are mean  $\pm$  SEM of 4 (A) and 6 (E) independent experiments. a:  $p < 0.05$  vs. ctrl.

dehydrogenase (GPDH) activity (Fig. 1D), Perilipin A and B protein levels (Fig. 1B) as well as mRNA expression of several adipogenic markers (Fig. 1E).

### 3.2. cPGI2 induces a functional brite adipocyte phenotype

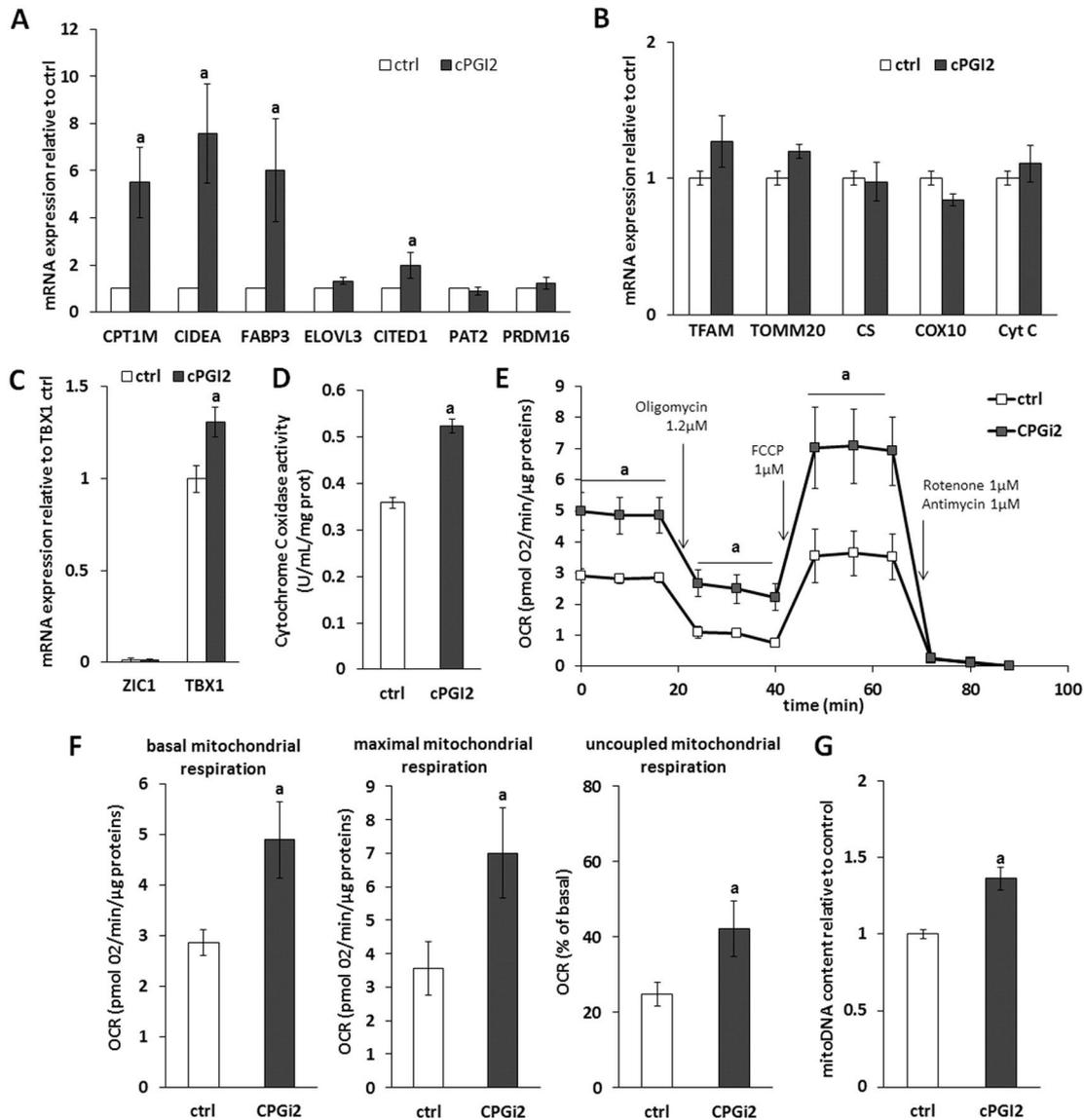
To further characterize the effect of cPGI2 on the white to brite adipocyte conversion, we analyzed the mRNA expression levels of several brite adipocyte and mitochondrial markers. In addition to UCP1, cPGI2-treated adipocytes expressed higher mRNA levels of classical brite/brown markers (CPT1M, CIDEA, FABP3 and CITED1) (Fig. 2A). By contrast, ELOVL3, PAT2 and PRDM16 mRNA expression, three other brite adipocyte markers, was not affected by cPGI2 (Fig. 2A). The brite adipocyte phenotype of the cells was confirmed by the expression of specific marker Tbx1 and by the fact that Zic1, a brown adipocyte specific marker, was barely detectable (Fig. 2C).

mRNA expression of mitochondrial markers was not changed by cPGI2 treatment as shown for the mitochondrial transcription factor TFAM, TOMM20 (an ubiquitous mitochondrial translocator), citrate synthase (CS), COX10 and cytochrome C (2 components of respiratory

chain complex IV) (Fig. 2B). However, a significant increase in the cytochrome C oxidase activity was found in cPGI2-treated adipocytes (Fig. 2D), suggesting a higher mitochondrial respiratory chain activity. In order to further characterize the mitochondrial status of hMADS brite adipocytes induced by cPGI2, oxygen consumption analysis was performed. As expected, cells display higher basal and maximal mitochondrial respiration rates, in line with the increased cytochrome C oxidase activity (Fig. 2E and F). Moreover, the uncoupled respiration was two-fold higher in cPGI2-treated compared to untreated adipocytes, demonstrating a functional UCP1 protein (Fig. 2F). The higher mitochondrial respiration can be related at least in part to increased mitochondrial adipocyte content, as mitochondrial DNA content was higher in cPGI2-induced brite compared to control adipocytes (Fig. 2G).

### 3.3. cPGI2 acts partially through the IP receptor

IP-R is a cell surface receptor coupled to Gs or Gq proteins [25]. We first demonstrated that intracellular  $Ca^{++}$  concentration is not altered in hMADS adipocytes upon cPGI2 treatment, differently to ionomycin treatment which induced a transient increase in intracellular  $Ca^{++}$



**Fig. 2.** Molecular and functional effects of cPGI2 on hMADS adipocytes. A and B illustrated the expression of brown/brite adipocyte and mitochondrial markers, respectively. (C) Expression of Zic1 and Tbx1 mRNA as specific marker of brown and brite adipocytes respectively. (D) Cytochrome c oxidase activity measurement. (E, F) Basal, maximal and uncoupled mitochondrial activities, in cPGI2-treated hMADS adipocytes, were evaluated by the determination of oxygen consumption rate (OCR). (G) Mitochondrial DNA content evaluated by qPCR using specific nuclear (*Lpl*) and mitochondrial (*Nd1*) DNA primers. Plots and histograms display mean  $\pm$  SEM, a:  $p < 0.05$  vs. ctrl, data are from 3 (D) or 6 (A–E, G) independent experiments.

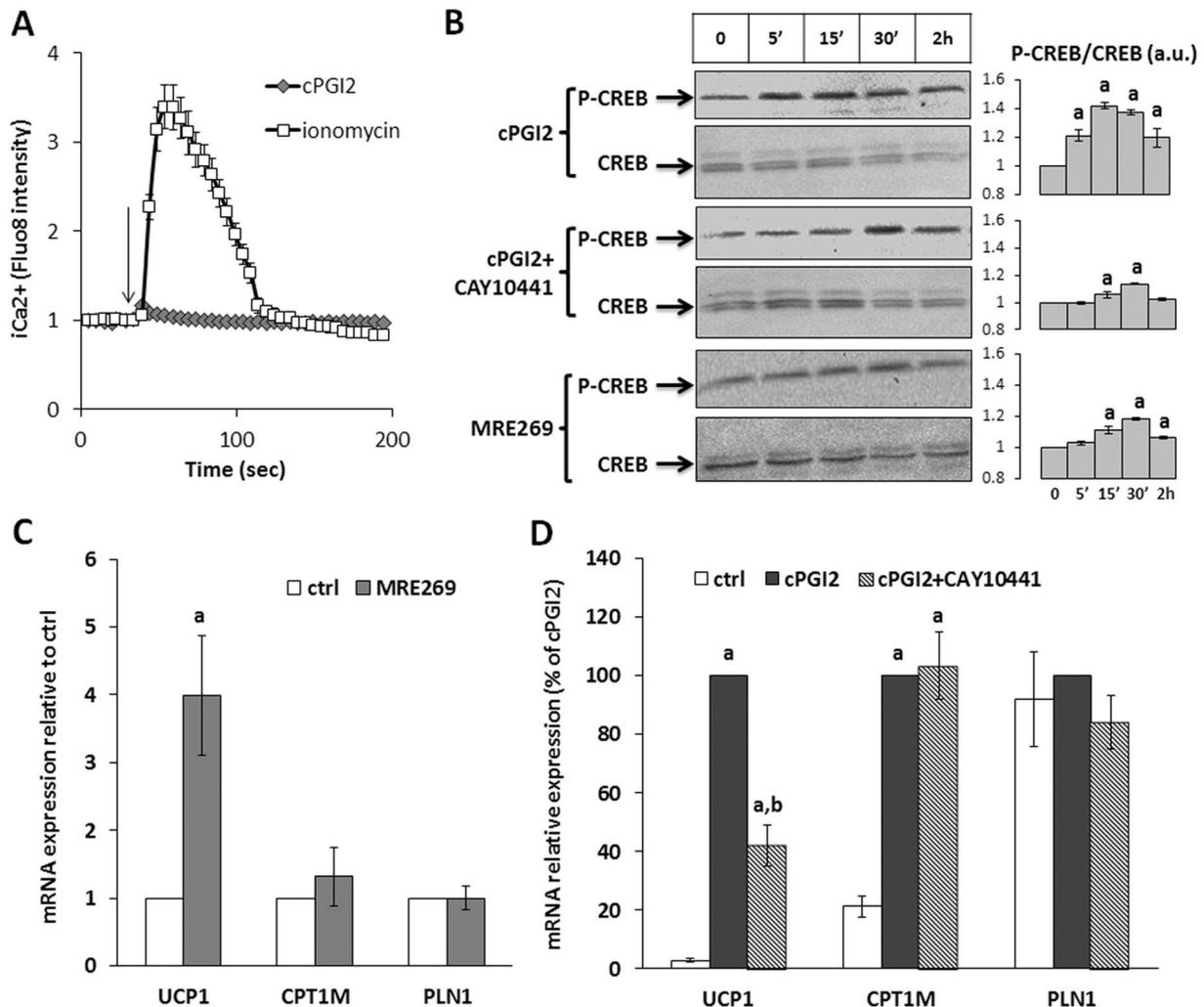
concentration (Fig. 3A). Also, we aimed to know whether other pathways could play a role. As shown in Fig. 3, PKA pathway was activated upon acute cPGI2 exposure. CREB protein, known to be a target of the cAMP/PKA signaling pathway, was phosphorylated within 5 min and the effect was maintained for at least 30 min (Fig. 3B). In the presence of CAY10441 (5  $\mu$ M), an antagonist of IP-R, phosphorylation of CREB was delayed and disappeared thereafter (Fig. 3B). To further characterize the involvement of IP-R in cPGI2-induced browning of hMADS adipocytes, MRE269 as a highly specific IP-R agonist was used instead of cPGI2. As expected, MRE269 at 1  $\mu$ M induced a time-dependent CREB phosphorylation with a maximal effect at 30 min (Fig. 3B). As shown in Fig. 3B, treatment of hMADS adipocytes between days 14 and 17 with MRE269 allowed an increased UCP1 mRNA expression. In addition, the IP-R antagonist CAY10441 significantly down-regulated UCP1 mRNA expression induced by cPGI2. In both cases, the expression of CPT1M and PLN1 mRNA remained unchanged (Fig. 3C and D).

Thus, it appears that the effect of the IP-R-activated pathway was confined to UCP1 expression, but not to that of genes associated to adipogenesis, likely due to the occurrence of a CREB responsive element in the UCP1 promoter [1]. Owing to the fact that the agonist MRE269

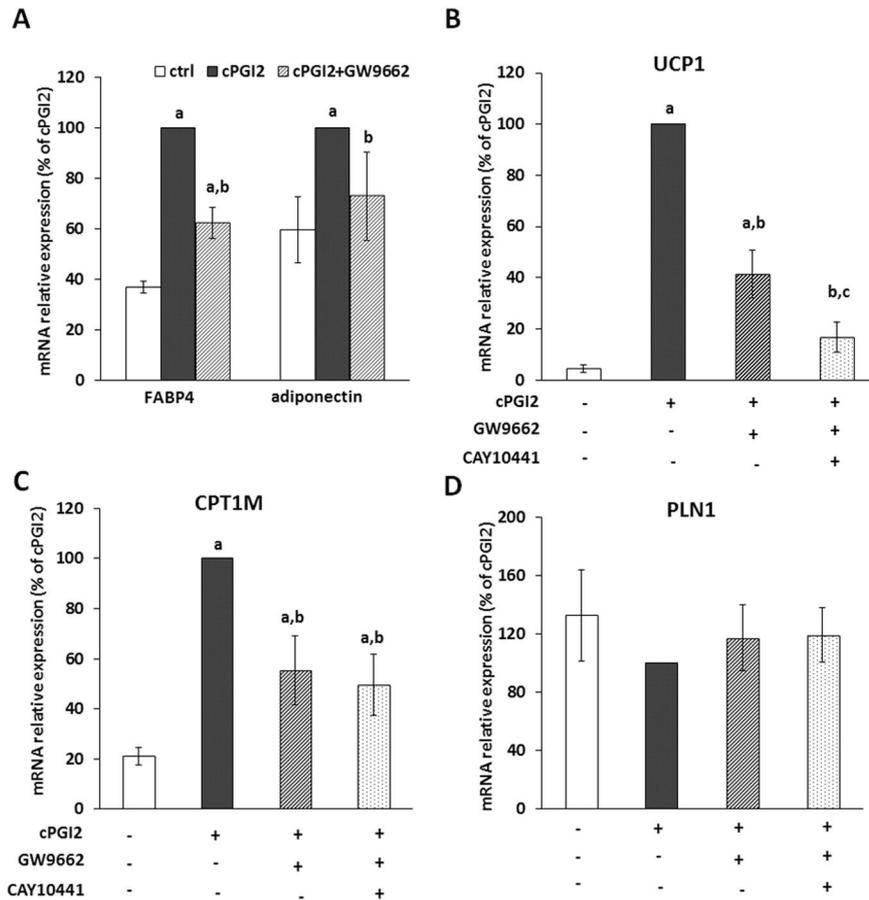
displayed only approximately 20% of the maximal cPGI2 effect on UCP1 expression and that the inhibitory effect of the antagonist CAY10441 on CREB phosphorylation was partial, these data strongly suggest that pathway(s) distinct from the IP-R signaling should be involved in the induction of UCP1 expression. This point was further investigated.

### 3.4. PPAR $\gamma$ and PPAR $\alpha$ are part of the cPGI2 signaling

cPGI2 treatment did not affect adipogenesis *per se* as the expression of adipogenic marker genes remained unaltered (Fig. 1E), excepted FABP4 and adiponectin (Fig. 4A) known to be PPAR $\gamma$  targets. To highlight a potential cPGI2-dependent activation of PPAR $\gamma$ , hMADS adipocytes were exposed, between days 14 and 17, to cPGI2 and GW9662 at 300 nM, a PPAR $\gamma$  antagonist. As expected, inhibition of PPAR $\gamma$  activity decreased mRNA expression of FABP4 and adiponectin due to cPGI2 treatment (Fig. 4A). Moreover, inclusion of the PPAR $\gamma$  antagonist significantly inhibited UCP1 and CPT1M mRNA expression induced by cPGI2 without affecting overall adipogenesis as shown by PLN1 expression (Fig. 4B, C and D respectively). Interestingly, when



**Fig. 3.** Role of IP-R in the effects of cPGI2. (A) Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration analyzed by live fluorimetry using a fluorescent sensitive  $\text{Ca}^{++}$  probe (Quest Fluo-8). hMADS adipocytes were treated with ionomycin (60 nM) and cPGI2 (1  $\mu$ M) at indicated time. (B) Kinetics of CREB protein phosphorylation, analyzed by Western blot, upon acute treatment of hMADS adipocytes with 1  $\mu$ M cPGI2 in the absence or in the presence of 5  $\mu$ M CAY10441 as an IP-R antagonist or treated only with 1  $\mu$ M MRE269 as an IP-R agonist. Histograms display ratio of band intensity quantification from 3 experiments for each condition. (C) hMADS adipocytes were treated or not with 1  $\mu$ M MRE269 between days 14 and 17; UCP1, CPT1M and PLN1 mRNA expression were analyzed by RT-qPCR. (D) hMADS adipocytes were treated or not with 5  $\mu$ M CAY10441 between days 14 and 17 in the presence of 1  $\mu$ M cPGI2. UCP1, CPT1M and PLN1 mRNA were analyzed by RT-qPCR. Results are mean  $\pm$  SEM of 3 (A, B, C) and 5 (D) independent experiments. a:  $p < 0.05$  vs. ctrl or time point 0 min and b:  $p < 0.05$  vs. cPGI2.



**Fig. 4.** Involvement of PPAR $\gamma$  in cPGI2-mediated effects. hMADS cells were treated between days 14 and 17 with 1  $\mu$ M cPGI2 in the absence or the presence of 0.3  $\mu$ M GW9662, a PPAR $\gamma$  antagonist or in the presence of 5  $\mu$ M CAY10441, an IP-R antagonist. FABP4, Adiponectin (A), UCP1, CPT1M and PLN1 (B, C and D) mRNA expression was analyzed by RT-qPCR. Results are mean  $\pm$  SEM of 5 independent experiments. a:  $p < 0.05$  vs. ctrl and b:  $p < 0.05$  vs. cPGI2.

cells were treated with both CAY10441 and GW9662, an additive effect of these antagonists on UCP1 mRNA expression was observed, but not for CPT1M mRNA expression (Fig. 4B and C).

To assess whether PPAR $\alpha$ , another member of the PPARs family, was also implicated, hMADS cells were transfected with 20 nM of siRNA control or siRNA against PPAR $\alpha$  at days 12 and 14. Using this strategy, PPAR $\alpha$  mRNA levels decreased by more than 70% at day 17 (Fig. 5A). This lower expression of PPAR $\alpha$  did not lead to a decrease in UCP1 mRNA (Fig. 5B) levels induced by cPGI2 treatment neither in PLN1 mRNA levels (Fig. 5C), in contrast to the decrease observed for CPT1M mRNA expression (Fig. 5D). Moreover, co-inhibition of PPAR $\gamma$  (using GW9662) activity and PPAR $\alpha$  expression (using siRNA) led to a stronger inhibition of CPT1M mRNA expression suggesting an additive role of both PPARs in cPGI2-mediated effects (Fig. 5D).

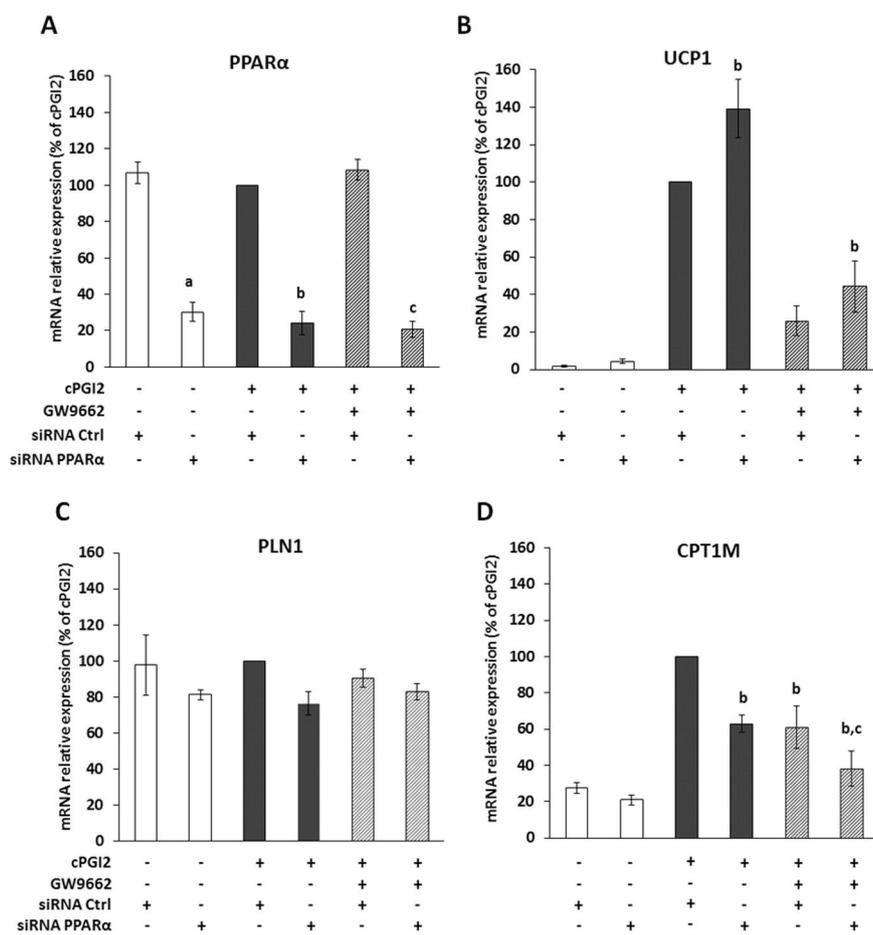
#### 4. Discussion

Prostacyclin is known as a major metabolite of ARA in adipose tissue. It activates its cognate receptor IP-R coupled to the stimulatory G protein (Gs) which in turn increases cAMP levels and activates PKA. When activated by cPGI2, IP-R signaling enhances the differentiation of white adipocyte precursor cells via the expression of C/EBP $\beta$  and C/EBP $\delta$ , both of which being critical for the progression of early phase of adipogenesis and the activation of PPAR $\gamma$  [23–25,33,34]. In addition to activating a plasma membrane receptor, prostacyclin can also signal through PPARs which in turn bind to specific peroxisome proliferator response elements (PPREs) in the promoter region of target genes to regulate their expression [35]. It is favored by the co-localization of

COX-2 and the prostacyclin synthase PGIS at the nuclear membrane [36]. PPARs activation by prostacyclin analogs, such as cPGI2, has been also involved in adipocyte differentiation process [37]. Moreover, it was demonstrated *in vitro* that treatment with cPGI2 of pre-adipocytes isolated from WAT led to increased expression of brite marker genes, in particular upon  $\beta$ -adrenergic stimulation [22,38,39].

Herein, we demonstrate that both IP-R and PPARs pathways can be activated in human white adipocytes by cPGI2 and cooperate to induce their conversion into brite adipocytes. This is shown by the acquisition of a brite phenotype at the molecular and functional levels. Interestingly, we demonstrate that this conversion is not due to the activation of a single pathway. First, cPGI2 able to bind to the cell surface receptor IP-R activates the cAMP/PKA/CREB pathway. CREB phosphorylation and its binding to cAMP response element (CRE) is known to trigger the transactivation of various promoters of adipogenic genes including UCP1 and DIO2 [1]. Second, we determine that cPGI2 is able to induce brite adipocyte phenotype through activation of PPAR $\gamma$  pathway. Assays combining IP-R and PPAR $\gamma$  antagonists demonstrate that these two pathways act independently in an additive manner. Both pathways trigger the expression of UCP1 by additive effects of CRE and PPRE-dependent transcriptional activities.

In addition, we show that PPAR $\alpha$  allowed only a partial acquisition of cPGI2-induced brite adipocyte phenotype. It is known that PPAR $\alpha$  signaling is implicated in the augmentation of the lipid oxidative capacity of brite adipocytes [40,41]. One of the key proteins of this system is the mitochondrial carnitine acyl transferase CPT1M. It has also been demonstrated that the expression of CPT1M gene is regulated at the transcriptional level by PPAR $\alpha$  in muscle cells [42] owing to the



**Fig. 5.** Involvement of PPAR $\alpha$  in the cPGI2-induced UCP1 expression. hMADS cells were differentiated into white adipocytes and transfected with 20 nM siRNA ctrl or against PPAR $\alpha$  at days 12 and 14. At day 14, cells were treated or not with 1  $\mu$ M cPGI2 in the absence or the presence of 0.3  $\mu$ M GW9662, a PPAR $\gamma$  antagonist. PPAR $\alpha$ , UCP1, PLN1 and CPT1M mRNA expression were analyzed by RT-qPCR. Results are mean of 4 independent experiments. a:  $p < 0.05$  vs. ctrl; b:  $p < 0.05$  vs. cPGI2 and c:  $p < 0.05$  vs. cPGI2 + GW9662.

presence of a PPRE in its promoter. In hMADS adipocytes, inhibition of PPAR $\alpha$  expression and of PPAR $\gamma$  activity decrease CPT1M expression in an additive manner. Interestingly, activation of PPAR $\gamma$  is able to induce the expression of various genes displaying a PPRE in their promoter (*i.e.* adiponectin, FABP4 and UCP1), which were not sensitive to PPAR $\alpha$ . This discrepancy could be due to the abundance and/or activation of specific co-factors allowing a selective binding to PPREs.

The *in vitro* capacities of carbaprostacyclin, *i.e.* recruitment of pre-adipocytes into brite adipogenesis and promotion of the conversion of mature white adipocytes into brite adipocytes, point out this product as a potential therapeutic compound in order to treat obesity and associated pathologies. Prostacyclin and its analogs display vasodilatation property as well as inhibition of platelet aggregation and are already extensively used in human clinic to treat hypertension [43]. Unfortunately, prostacyclin has a very short half-life and is metabolized rapidly into the less potent 6-Keto-PGF1 $\alpha$  [43] which represents an important limitation for its use *in vivo*. To overcome this challenge, many stable analogs of prostacyclin have been synthesized, such as eprostenol, iloprost and beraprost, with a longer half-life ( $\approx 1$  h) in mice and humans [43–45]. One of these drugs, beraprost sodium (BPS), which promotes a potent vasodilatory effect through activation of IP-R, has already been tested in obesity and diabetes context [46,47]. For example, BPS is reported to attenuate inflammation in diabetic patients [46]. Interestingly, chronic treatment with BPS of mice fed a high fat diet decreases plasma and liver triglycerides levels, and improves glucose metabolism and insulin resistance in association with reduction of inflammation of epididymal WAT [47]. Nevertheless, BPS-treated mice and rats do not

exhibit a decreased body weight, pointing out the limited effects of IP-R agonists [47,48]. However, IP-R null mice fed a high fat diet show a resistance to weight gain associated with decreased adipocyte number and increased adipocyte size [23]. Indeed, we and others have demonstrated that the browning potential of cPGI2 was mainly due to the activation of PPAR $\gamma$  pathway independently of IP-R activation [20,22,38,39]. This is likely due to a high cell-penetrating capacity of cPGI2 compared to other prostacyclin derivatives [49]. The development of a new class of prostacyclin analogs, such as treprostinil, displaying an extended half-life (4 h) and able to activate both IP-R and PPAR $\gamma$ , may open a new area to favor browning of white adipose tissue [50].

Herein, we demonstrate that carbaprostacyclin is able to induce the conversion of human white to brite adipocytes through the activation of dual signaling pathways as depicted in Fig. 6. We suggest the development of novel therapies targeting preferentially adipose tissue and based on the use of prostacyclin analogs highly potent to activate IP-R and PPARs pathways, in order to combat obesity and associated diseases *via* the recruitment and activation of thermogenic adipocytes.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbali.2016.01.007>.

#### Author contributions

The author(s) have made the following declarations about their contributions: Conceived and designed the experiments: DP, EZA. Performed the experiments: RAG, MG, AV, DFP. Analyzed the data: RAG, AV, SH, GA, DFP, EZA. Wrote the manuscript: RAG, GA, DFP, EZA.

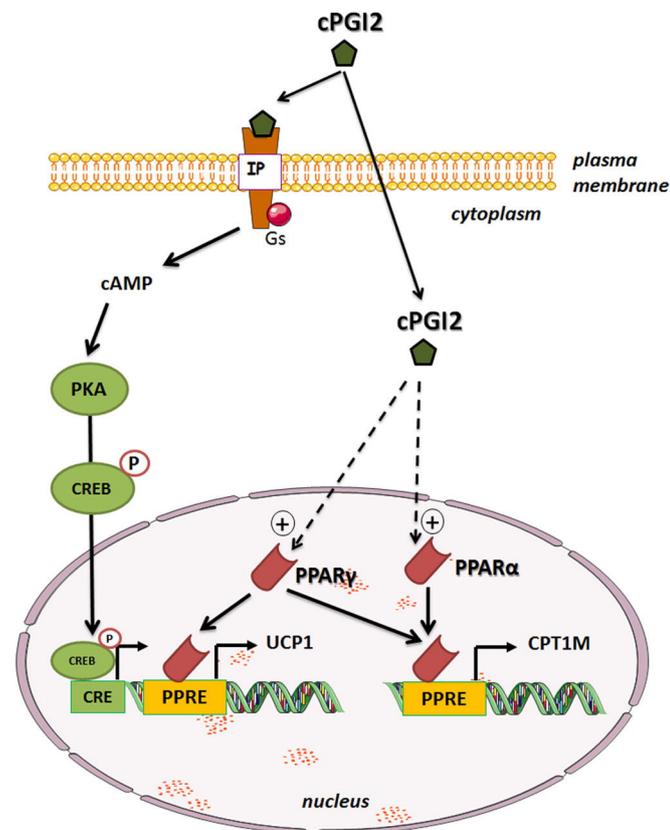


Fig. 6. Summary diagram of cPGI2 signaling pathways in hMADS adipocytes.

## Transparency document

The Transparency Document associated with this article can be found, in online version.

## Acknowledgments

This work was supported by CNRS, EU FP7 project DIABAT (HEALTH-F2-2011-278373) and Nutricia Research Foundation (“2011-25”). RAG is a recipient of a fellowship from the Association of Specialization and Scientific Orientation (Lebanon) and Ghazieh township (Lebanon).

## References

- [1] B. Cannon, J. Nedergaard, Brown adipose tissue: function and physiological significance, *Physiol. Rev.* 84 (2004) 277–359.
- [2] J. Nedergaard, V. Golozoubova, A. Matthias, A. Asadi, A. Jacobsson, B. Cannon, UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency, *Biochim. Biophys. Acta* 1504 (2001) 82–106.
- [3] A. Frontini, S. Cinti, Distribution and development of brown adipocytes in the murine and human adipose organ, *Cell Metab.* 11 (2010) 253–256.
- [4] N. Petrovic, T.B. Walden, I.G. Shabalina, J.A. Timmons, B. Cannon, J. Nedergaard, 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 (2010) 7153–7164.
- [5] D. Ricquier, B. Miroux, M. Larose, A.M. Cassard-Doulcier, F. Bouillaud, Endocrine regulation of uncoupling proteins and energy expenditure, *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 24 (Suppl. 2) (2000) S86–S88.
- [6] G. Barbatelli, I. Murano, L. Madsen, Q. Hao, M. Jimenez, K. Kristiansen, J.P. Giacobino, R. De Matteis, S. Cinti, 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 (2010) (E1244–E1253).
- [7] I.G. Shabalina, N. Petrovic, J.M. de Jong, A.V. Kalinovich, B. Cannon, J. Nedergaard, UCP1 in brite/beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic, *Cell Rep.* 5 (2013) 1196–1203.
- [8] Y.H. Lee, E.P. Mottillo, J.G. Granneman, Adipose tissue plasticity from WAT to BAT and in between, *Biochim. Biophys. Acta* 1842 (2014) 358–369.

- [9] M. Rosenwald, A. Perdikari, T. Rulicke, C. Wolfrum, Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes, *Nat. Cell Biol.* 15 (2013) 659–667.
- [10] A.M. Cypess, 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, C.R. Kahn, Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans, *N. Engl. J. Med.* 360 (2009) 1509–1517.
- [11] J. Nedergaard, T. Bengtsson, B. Cannon, Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293 (2007) E444–E452.
- [12] M. Saito, Y. Okamatsu-Ogura, M. Matsushita, K. Watanabe, T. Yoneshiro, J. Nio-Kobayashi, T. Iwanaga, M. Miyagawa, T. Kameya, K. Nakada, Y. Kawai, M. Tsujisaki, High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity, *Diabetes* 58 (2009) 1526–1531.
- [13] W.D. van Marken Lichtenbelt, J.W. Vanhommel, N.M. Smulders, J.M. Drossaerts, G.J. Kemerink, N.D. Bouvy, P. Schrauwen, G.J. Teule, Cold-activated brown adipose tissue in healthy men, *N. Engl. J. Med.* 360 (2009) 1500–1508.
- [14] K.A. Virtanen, M.E. Lidell, J. Orava, M. Heglund, R. Westergren, T. Niemi, M. Taittonen, J. Laine, N.J. Savisto, S. Enerback, P. Nuutila, Functional brown adipose tissue in healthy adults, *N. Engl. J. Med.* 360 (2009) 1518–1525.
- [15] A.M. Cypess, 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, Y.H. Tseng, Anatomical localization, gene expression profiling and functional characterization of adult human neck brown fat, *Nat. Med.* 19 (2013) 635–639.
- [16] N.Z. Jespersen, 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, C. Scheele, A classical brown adipose tissue mRNA signature partly overlaps with brite in the supraclavicular region of adult humans, *Cell Metab.* 17 (2013) 798–805.
- [17] L.Z. Sharp, K. Shinoda, H. Ohno, D.W. Scheel, E. Tomoda, L. Ruiz, H. Hu, L. Wang, Z. Pavlova, V. Gilsanz, S. Kajimura, Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells, *PLoS One* 7 (2012), e49452.
- [18] J. Wu, 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, B.M. Spiegelman, Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human, *Cell* 150 (2012) 366–376.
- [19] G. Ailhaud, F. Massiera, P. Weill, P. Legrand, J.M. Alessandri, P. Guesnet, Temporal changes in dietary fats: role of n-6 polyunsaturated fatty acids in excessive adipose tissue development and relationship to obesity, *Prog. Lipid Res.* 45 (2006) 203–236.
- [20] D.F. Pisani, 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, E.Z. Amri, The omega6-fatty acid, arachidonic acid, regulates the conversion of white to brite adipocyte through a prostaglandin/calcium mediated pathway, *Mol. Metab.* 3 (2014) 834–847.
- [21] L. Madsen, 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. Dorskeld, K. Kristiansen, UCP1 induction during recruitment of brown adipocytes in white adipose tissue is dependent on cyclooxygenase activity, *PLoS One* 5 (2010), e11391.
- [22] A. Vegiopoulos, 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, S. Herzig, Cyclooxygenase-2 controls energy homeostasis in mice by de novo recruitment of brown adipocytes, *Science* 328 (2010) 1158–1161.
- [23] F. Massiera, P. Saint-Marc, J. Seydoux, T. Murata, T. Kobayashi, S. Narumiya, P. Guesnet, E.Z. Amri, R. Negrel, G. Ailhaud, Arachidonic acid and prostacyclin signaling promote adipose tissue development: a human health concern? *J. Lipid Res.* 44 (2003) 271–279.
- [24] J. Aubert, P. Saint-Marc, N. Belmonte, C. Dani, R. Negrel, G. Ailhaud, Prostacyclin IP receptor up-regulates the early expression of C/EBPbeta and C/EBPdelta in preadipose cells, *Mol. Cell. Endocrinol.* 160 (2000) 149–156.
- [25] G. Vassaux, D. Gaillard, G. Ailhaud, R. Negrel, Prostacyclin is a specific effector of adipose cell differentiation. Its dual role as a cAMP- and Ca(2+)-elevating agent, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 11092–11097.
- [26] B. Jia, L. Madsen, R.K. Petersen, N. Techer, R. Kopperud, T. Ma, S.O. Dorskeld, G. Ailhaud, J. Wang, E.Z. Amri, K. Kristiansen, Activation of protein kinase A and exchange protein directly activated by cAMP promotes adipocyte differentiation of human mesenchymal stem cells, *PLoS One* 7 (2012), e34114.
- [27] A.K. Hihi, L. Michalik, W. Wahli, PPARs: transcriptional effectors of fatty acids and their derivatives, *Cell. Mol. Life Sci.* 59 (2002) 790–798.
- [28] C. Elabd, C. Chiellini, M. Carmona, J. Galitzky, O. Cochet, R. Petersen, L. Penicaud, K. Kristiansen, A. Bouloumie, L. Casteilla, C. Dani, G. Ailhaud, E.Z. Amri, Human multipotent adipose-derived stem cells differentiate into functional brown adipocytes, *Stem Cells* 27 (2009) 2753–2760.
- [29] D.F. Pisani, M. Djedaini, G.E. Beranger, C. Elabd, M. Scheideler, G. Ailhaud, E.Z. Amri, Differentiation of human adipose-derived stem cells into “brite” (brown-in-white) adipocytes, *Front. Endocrinol.* 2 (2011) 87 (Lausanne).
- [30] A.M. Rodriguez, C. Elabd, F. Delteil, J. Astier, C. Vernochet, P. Saint-Marc, J. Guesnet, A. Guezennec, E.Z. Amri, C. Dani, G. Ailhaud, Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315 (2004) 255–263.
- [31] R. Negrel, P. Grimaldi, G. Ailhaud, Establishment of preadipocyte clonal line from epididymal fat pad of ob/ob mouse that responds to insulin and to lipolytic hormones, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75 (1978) 6054–6058.
- [32] M.D. Brand, D.G. Nicholls, Assessing mitochondrial dysfunction in cells, *Biochem. J.* 435 (2011) 297–312.
- [33] G. Vassaux, D. Gaillard, C. Darimont, G. Ailhaud, R. Negrel, Differential response of preadipocytes and adipocytes to prostacyclin and prostaglandin E2: physiological implications, *Endocrinology* 131 (1992) 2393–2398.

- [34] J. Aubert, G. Ailhaud, R. Negrel, Evidence for a novel regulatory pathway activated by (carba)prostacyclin in preadipose and adipose cells, *FEBS Lett.* 397 (1996) 117–121.
- [35] B.M. Forman, J. Chen, R.M. Evans, 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 (1997) 4312–4317.
- [36] H. Lim, S.K. Dey, A novel pathway of prostacyclin signaling—hanging out with nuclear receptors, *Endocrinology* 143 (2002) 3207–3210.
- [37] R.P. Brun, P. Tontonoz, B.M. Forman, R. Ellis, J. Chen, R.M. Evans, B.M. Spiegelman, Differential activation of adipogenesis by multiple PPAR isoforms, *Genes Dev.* 10 (1996) 974–984.
- [38] I. Bayindir, R. Babaeikeshomi, S. Kocanova, I.S. Sousa, S. Lerch, O. Hardt, S. Wild, A. Bosio, K. Bystrycky, S. Herzig, A. Vegiopoulos, Transcriptional pathways in cPGI<sub>2</sub>-induced adipocyte progenitor activation for browning, *Front. Endocrinol.* 6 (2015) 129 (Lausanne).
- [39] K. Mossenbock, A. Vegiopoulos, A.J. Rose, T.P. Sijmonsma, S. Herzig, T. Schafmeier, Browning of white adipose tissue uncouples glucose uptake from insulin signaling, *PLoS One* 9 (2014), e110428.
- [40] C. Ribet, E. Montastier, C. Valle, V. Bezaire, A. Mazzucotelli, A. Mairal, N. Viguerie, D. Langin, Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha control of lipid and glucose metabolism in human white adipocytes, *Endocrinology* 151 (2010) 123–133.
- [41] B. Xue, A. Coulter, J.S. Rim, R.A. Koza, L.P. Kozak, Transcriptional synergy and the regulation of Ucp1 during brown adipocyte induction in white fat depots, *Mol. Cell Biol.* 25 (2005) 8311–8322.
- [42] A. Baldan, J. Relat, P.F. Marrero, D. Haro, Functional interaction between peroxisome proliferator-activated receptors-alpha and Mef-2C on human carnitine palmitoyltransferase 1beta (CPT1beta) gene activation, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) 4742–4749.
- [43] H. Olschewski, F. Rose, R. Schermuly, H.A. Ghofrani, B. Enke, A. Olschewski, W. Seeger, Prostacyclin and its analogues in the treatment of pulmonary hypertension, *Pharmacol. Ther.* 102 (2004) 139–153.
- [44] M. Hildebrand, Pharmacokinetics of iloprost and cicaprost in mice, *Prostaglandins* 44 (1992) 431–442.
- [45] M. Hildebrand, T. Staks, B. Nieuweboer, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cicaprost in healthy volunteers after oral administration of 5 to 20 micrograms, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 39 (1990) 149–153.
- [46] K. Fujiwara, A. Nagasaka, M. Nagata, K. Yamamoto, S. Imamura, N. Oda, Y. Sawai, N. Hayakawa, A. Suzuki, M. Itoh, A stable prostacyclin analogue reduces high serum TNF-alpha levels in diabetic patients, *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 112 (2004) 390–394.
- [47] E. Inoue, T. Ichiki, K. Takeda, H. Matsuura, T. Hashimoto, J. Ikeda, A. Kamiharaguchi, K. Sunagawa, Beraprost sodium, a stable prostacyclin analogue, improves insulin resistance in high-fat diet-induced obese mice, *J. Endocrinol.* 213 (2012) 285–291.
- [48] N. Sato, M. Kaneko, M. Tamura, H. Kurumatani, The prostacyclin analog beraprost sodium ameliorates characteristics of metabolic syndrome in obese Zucker (fatty) rats, *Diabetes* 59 (2010) 1092–1100.
- [49] T. Hatae, M. Wada, C. Yokoyama, M. Shimonishi, T. Tanabe, Prostacyclin-dependent apoptosis mediated by PPAR delta, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 46260–46267.
- [50] K. Laliberte, C. Arneson, R. Jeffs, T. Hunt, M. Wade, Pharmacokinetics and steady-state bioequivalence of treprostinil sodium (Remodulin) administered by the intravenous and subcutaneous route to normal volunteers, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 44 (2004) 209–214.



# Discussion 1

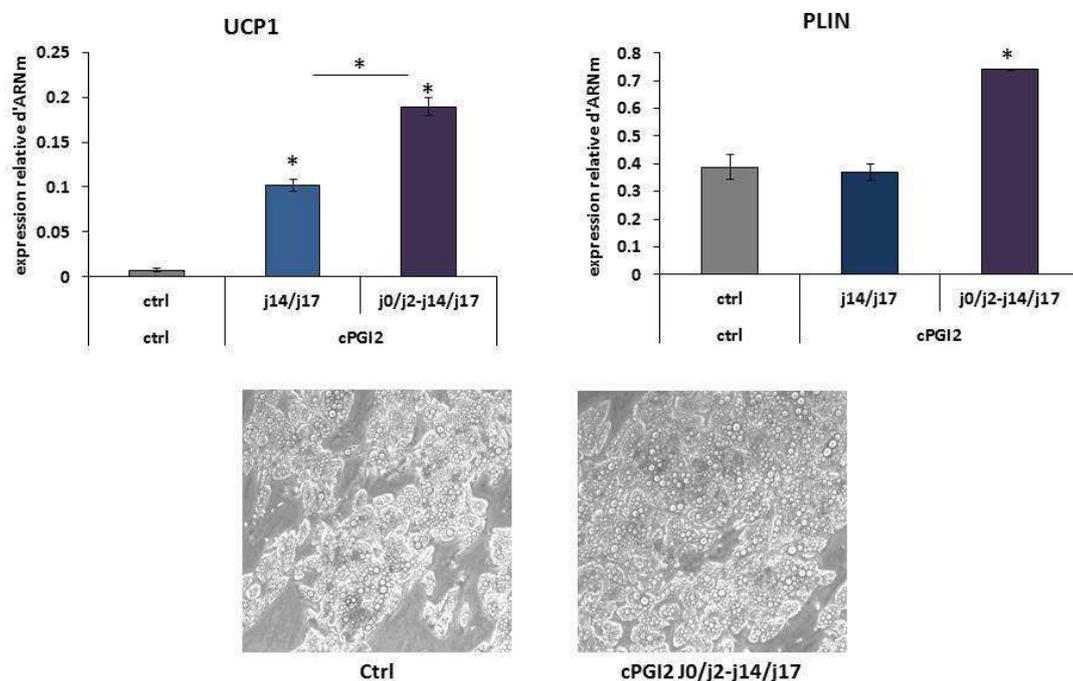
Au cours de ce travail, j'ai pu donc démontrer que cPGI2 était capable d'induire la conversion des adipocytes blancs en brites chez l'Homme. Cet effet est médié par la coopération de plusieurs voies de signalisation, dont le récepteur de surface IP et les récepteurs nucléaires PPARs. Ces résultats sont très intéressants d'un point de vue « pharmacologiques », mais posent toujours la question de leurs compatibilités avec les effets physiologiques de PGI2, du fait de sa demi-vie extrêmement courte. Le double effet, intra- et extracellulaire, de cPGI2 est rendu possible par sa stabilité et sa capacité de pénétrance dans la cellule. Pour PGI2, l'activation du récepteur IP ou des PPARs va être déterminée par la localisation sub-cellulaire de son enzyme de synthèse PGIS, respectivement si elle est proche de la membrane plasmique ou du noyau. On peut donc considérer que les effets de cPGI2 peuvent correspondre à ceux de PGI2 dans un contexte physiologique où la PGIS serait présente à ces 2 localisations.

Par le passé, l'équipe de Gérard Ailhaud a démontré que l'effet positif d'un régime alimentaire riche en AGPIs  $\omega 6$  sur le développement du TAB et sur l'hyperplasie adipocytaire était dû à l'action de PGI2 sur son récepteur IP. Ces résultats confirmaient des résultats encore antérieurs qui montraient que cPGI2 favorisait la différenciation adipocytaire des progéniteurs murins *in vitro* en agissant à la fois sur PPAR $\delta$  et sur le récepteur IP. Celui-ci, grâce à sa sous-unité Gs, active l'adénylate cyclase et induit ainsi une augmentation du taux de l'AMPc intracellulaire (Massiera et al., 2003; Négre et al., 1989). Les effets de l'AMPc et de PPAR $\delta$  sur la différenciation adipocytaire ont été ensuite confirmés dans les cellules hMADS dans une étude réalisée en collaboration avec l'équipe de Karsten Kristiansen (Jia et al., 2012b).

Plus récemment, l'équipe de Stephan Herzig démontrait que le traitement de souris 129SvJ par un agoniste des  $\beta 3$ -AR (connu pour activer le recrutement et l'activation des adipocytes bruns et brites) induisait l'expression de COX2 et la sécrétion de PGs au niveau du TA. Cette équipe associe l'augmentation de l'expression de COX2 à l'apparition des adipocytes brites au sein du TAB de cette souche de souris. Parmi ces PGs, le 6-Kéto-PGF1 $\alpha$  (dérivé stable de PGI2) était le plus sécrété en réponse à la stimulation adrénargique et cela

était accompagné par une augmentation de l'expression d'UCP1. Ils ont ensuite étudié l'effet de cPGI2 sur la différenciation adipocytaire brune *in vitro* et ont montré qu'un cours traitement par cPGI2 (3 heures) était capable d'induire l'expression d'UCP1, de PGC-1 $\alpha$ , de CPT1M et de PPAR $\alpha$  et d'améliorer la réponse des adipocytes à la norépinéphrine. Cet effet de cPGI2 était médié essentiellement par le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  (Vegiopoulos et al., 2010b). D'autre part ils ont démontré que l'expression d'UCP1 et de CPT1M induite par l'agoniste  $\beta$ 3-AR au niveau du TAB était atténuée en absence du récepteur IP. Pour eux, cette observation pourrait être due à une synergie entre les fonctions de l'IP et du  $\beta$ 3-AR. Une autre possibilité serait que l'absence de l'IP entraîne une diminution du nombre d'adipocytes différenciés et donc de cellules capables d'exprimer UCP1 et CPT1M, comme montré précédemment par notre laboratoire (Gaillard et al., 1989b; Massiera et al., 2003).

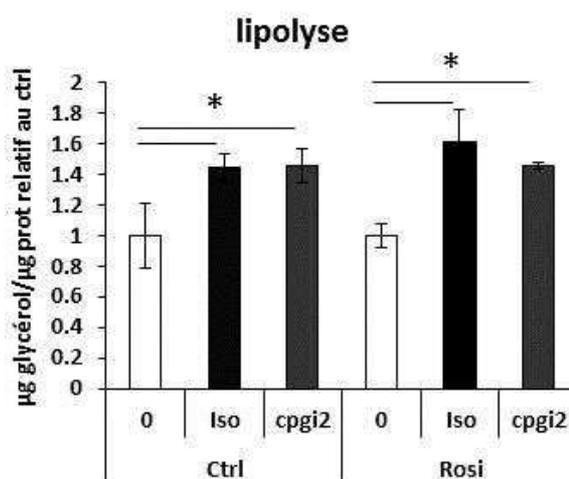
Au cours de mon travail de thèse, j'ai pu tester diverses fenêtres de traitement par cPGI2 des cellules hMADS (figure 38). Ces résultats ont montré que le traitement de ces cellules à l'engagement de la différenciation adipocytaire induisait la différenciation adipocytaire qu'elle soit blanche ou brune.



**Figure 38. Effet de cPGI2 sur la différenciation adipocytaire et l'expression d'UCP1.** Expression relative d'ARNm d'UCP1 et de PLIN des cellules hMADS traités par cPGI2 entre les jours (J) 14 et 17 ou entre les jours 0 et 2 puis les jours 14 et 17 de la différenciation. Le panneau inférieur représente les cellules hMADS en culture observées par microscopie optique. \*=P<0.05

De ce fait, les résultats obtenus par l'équipe de Stephan Herzig sont sans doute en partie dus à une augmentation du nombre des adipocytes différenciés et donc capables d'exprimer UCP1.

Dans l'article 1, nous démontrons que le traitement chronique (4 jours) des adipocytes hMADS par cPGI2 induit l'expression d'UCP1 et de CPT1M sans modifier celle de PGC-1 $\alpha$  et de PPAR $\alpha$ . De plus, et à l'inverse des résultats de Vegiopoulos et coll., nous avons aussi remarqué qu'un traitement aigue par cPGI2 des adipocytes blancs ou brites induit une faible augmentation de l'expression d'UCP1 et surtout une lipolyse similaire à celle induite par l'isoprotérenol (agoniste des  $\beta$ -ARs). cPGI2 n'induit donc pas juste l'expression des gènes des adipocytes brites mais aussi participe à la fonction de ces adipocytes. (Figure 39)



**Figure 39. Effet de la carbaprostacycline sur la lipolyse des cellules hMADS.** Dosage du glycérol présent dans le milieu de culture des cellules hMADS traités au jour 17 par l'isoprotérenol (agoniste des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques) (1 $\mu$ M) ou par cPGI2 (1 $\mu$ M) dans des conditions de différenciation blanche (ctrl) ou brite (rosi). Les résultats sont présentés en  $\mu$ g de glycérol/ $\mu$ g de protéine et rapportés aux conditions contrôle (0/ctrl ou 0/rosi) et représentent la moyenne des valeurs obtenues dans trois expériences différentes. \*= $P < 0.05$

Nos résultats à propos de l'implication de PPAR $\alpha$  dans l'effet de cPGI2 sont en accord avec ceux de Vegiopoulos. D'une manière étonnante, l'absence d'expression de ce récepteur nucléaire améliore l'expression d'UCP1 en réponse à cPGI2 *in vitro* chez l'homme et chez la souris. PPAR $\alpha$  n'est donc pas impliqué dans l'expression d'UCP1 induite par cPGI2 et son absence pourrait par exemple mobiliser cPGI2 vers un autre PPAR, capable lui d'induire

l'expression d'UCP1, dans ce cas PPAR $\gamma$ . Par contre, nous montrons que PPAR $\gamma$  et PPAR $\alpha$  coopèrent pour induire l'expression de CPT1M, grâce à la présence d'un PPRE au niveau du promoteur de ce gène (Liu et al., 2007). En effet, CPT1M est responsable de l'alimentation des mitochondries en AGs et il est donc impliqué dans une des principales fonctions des adipocytes brites : l'oxydation des AGs. Nos résultats sont soutenus par l'étude de Lee et al qui montrent que l'oxydation des AGs est induite par PPAR $\alpha$  dans les cellules hMADS (Lee et al., 2011). Il a été démontré que cPGI2 induit la mobilisation de PPAR $\alpha$  du compartiment cytoplasmique vers le noyau (Chen et al., 2009). Cette observation pourrait expliquer le mécanisme d'action qui permet à cPGI2 d'induire l'expression de CPT1M.

Dans le cadre d'un travail collaboratif avec l'équipe d'Alexander Vegiopoulos, nous avons montré de manière étonnante que cPGI2 était capable d'induire la voie de signalisation JAK/STAT, et que celle-ci est importante pour l'engagement des préadipocytes issus du TAB dans la différenciation brite (manuscrit en cours de préparation), le lien entre cPGI2 et la voie JAK restant à déterminer. A l'inverse, cette voie JAK/STAT présente un effet inhibiteur quand les cellules sont déjà engagées dans l'adipogenèse. Vu la multiplicité des voies de signalisation induite par cPGI2 au sein des adipocytes, il serait intéressant de déterminer s'il existe des cross-talk entre ces voies au cours de la conversion des adipocytes blancs en brites.

**D'un point de vue thérapeutique**, PGI2 possède des effets anti-thrombotique, anti-inflammatoires et vasodilatateurs importants. De ce fait, plusieurs analogues stables de PGI2 sont commercialisés et utilisés par exemple dans le traitement de l'hypertension artérielle pulmonaire chez l'homme. Parmi ces analogues, on distingue l'epoprosténol, le béraprost sodium, l'iloprost et la treprostinil. Vu sa durée de demi-vie relativement longue et son mode d'administration orale (O'Connell et al., 2016), il semble que le béraprost sodium (BPS) soit l'analogue le plus approprié à un traitement chronique chez l'homme.

Plusieurs études ont été faites chez les rongeurs démontrant un rôle thérapeutique du BPS. Il a été démontré que ce dernier améliore la tolérance au glucose et la sensibilité du TAB à l'insuline chez des rats obèses et des souris nourries par un régime riche en lipides

(Inoue et al., 2012; Sato et al., 2010). D'une manière intéressante, le traitement des rats obèses par le BPS induisait une augmentation de la température corporelle (Sato et al., 2010). Les auteurs supposent que cette augmentation de température est due à l'amélioration de la circulation sanguine suite au traitement par le BPS. Mais, connaissant l'effet de cPGI2 sur les adipocytes bruns et la conversion des adipocytes blancs en brites, nous pouvons supposer que l'augmentation de la température suite au traitement des rats par le BPS peut être due à la formation et/ou l'activation des adipocytes thermogéniques bruns et/ou brites.

Récemment, Minami et al. ont démontré que le BPS permet de lutter contre les métastases des cancers pulmonaires par le recrutement des péricytes au niveau de la tumeur (Minami et al., 2015). Etant donné que les adipocytes brites proviennent des cellules périvasculaires (Vishvanath et al., 2015b), il serait donc intéressant de déterminer si le BPS est capable de recruter les péricytes du TAB et ainsi induire l'apparition d'adipocytes brites. Récemment, une étude a permis de cibler le traitement par le BPS en utilisant la technologie des nanoparticules, ceci permettrait de cibler spécifiquement le TAB et ainsi éviter de potentiels effets secondaires (Akagi et al., 2016).

Ces données ouvrent une perspective intéressante dans le traitement de l'obésité en utilisant le BPS comme recruteur de préadipocytes « brites » et activateur de ces adipocytes au niveau du TAB de l'Homme.



## **Article 2:**

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





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

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

## ABSTRACT

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

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

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

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

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

## 1. INTRODUCTION

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

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

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

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

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

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

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

a precursor of  $\omega 3$  eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA). These very long-chain PUFAs trigger a variety of biological responses and are required for a healthy development. Prostaglandin (PGI<sub>2</sub>) and other prostaglandins of the 2 series (PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2</sub> $\alpha$ ) are prostanoids synthesized from ARA and are involved in the differentiation, maturation and function of white adipocytes. PGI<sub>2</sub> triggers adipocyte differentiation *in vitro* [15] and *in vivo* [16,17], while PGF<sub>2</sub> $\alpha$  behaves as a strong inhibitor [18,19]. The role of PGE<sub>2</sub> is more controversial, as it has been described to inhibit or to promote adipogenesis [20,21], and is likely due to the diversity of its receptors able to modulate differently both Ca<sup>++</sup> and cAMP-dependent pathways [22].

During the last decade, dietary recommendations have taken into account the insufficient intake of  $\omega 3$  PUFAs and the excess of  $\omega 6$  PUFAs which is correlated with overweight/obesity [23,24]. Interestingly, high  $\omega 6/\omega 3$  ratios are positively associated with adiposity of infants at 3 and 4 years of age [25,26]. ARA levels correlate positively with body mass index (BMI) and the associated metabolic syndrome [27–30]. Diets with higher  $\omega 6/\omega 3$  ratio result in higher arachidonic acid and lower EPA + DHA levels in plasma and adipose tissue and enhance ARA availability to synthesize PGs of the 2 series in adipose tissue.

Since brite/brown adipocytes appear absent from obese patients [8], we therefore sought to analyze the possible role of  $\omega 6$  ARA and its metabolites in human brown/brite adipocyte development and functions. Herein, we show a potent inhibitory effect of ARA on white to brown adipocyte conversion of hMADS cells. ARA inhibits the expression of UCP1 and leads to a decrease in the thermogenic capacity of hMADS adipocytes characterized by a lower mitochondrial activity and basal oxygen consumption. The effect of ARA is mediated *via* cyclooxygenase activities leading to increased synthesis and release of PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2</sub> $\alpha$ . Thorough analysis of the role of PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2</sub> $\alpha$  demonstrate that the ARA/prostaglandin/calcium pathway is responsible of impairing the browning process. Finally, we show that supplementing mice with an ARA-enriched diet leads to increased synthesis of both prostaglandins while lowering the occurrence of inducible brite adipocytes upon stimulation of the recruitment by  $\beta 3$ -adrenergic receptor agonist.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Animals

The experiments were conducted in accordance with the French and European regulations (directive 2010/63/EU) for the care and use of research animals and were approved by local experimentation committees (Nice University and Ciepal Azur: protocol NCE-2012-57). Ten-week-old C57Bl/6J RccHsd female mice were from Harlan and maintained at constant temperature (21  $\pm$  2 °C) and 12:12-hour light–dark cycles, with *ad libitum* access to diet and water. Mice were fed for 4 weeks with ARA- or oleic acid (OA)-supplemented diet. Chronic  $\beta$ -adrenergic receptor stimulation was carried the last week of the diet by daily intra-peritoneal injections of CL316,243 (1 mg/kg/day in saline solution). Control mice were injected with vehicle only. Standard chow diets (ref. 2016, Harlan Lab., WI, USA) were enriched with 11 g/Kg of oleate–ethyl–ester or arachidonate–ethyl–ester (Harlan Lab., WI, USA, Nu-Chek-Prep, MIN, US) and 5 g/Kg of Safflower Oil to favor dispersion of ethyl esters in the diet. Blood, interscapular BAT (iBAT) and inguinal subcutaneous WAT (scWAT) were sampled and used for different analysis. Histology, protein and RNA extracts as well as further analysis are described in [Supplemental procedures](#).

### 2.2. hMADS cell culture

The establishment and characterization of hMADS cells have been described in Refs. [13,31–33]. In the experiments reported herein

hMADS-3 cells were used and came originally from the prepubic fat pad of a 4-month-old male. Cells were used between passages 14 and 25, and all experiments have been performed at least 3 times using different cultures. Cells were seeded at a density of 5000 cells/cm<sup>2</sup> in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% FBS, 15 mM Hepes, 2.5 ng/ml hFGF2, 60  $\mu$ g/ml penicillin, and 50  $\mu$ g/ml streptomycin. hFGF2 was removed when cells reached confluence. Cells were triggered for differentiation at day 2 post-confluence (designated as day 0) in DMEM/Ham's F12 media supplemented with 10  $\mu$ g/ml transferrin, 10 nM insulin, 0.2 nM triiodothyronine, 1  $\mu$ M dexamethasone and 500  $\mu$ M isobutyl-methylxanthine. Three days later, the medium was changed (dexamethasone and isobutyl-methylxanthine omitted) and 100 nM rosiglitazone were added. At day 9 rosiglitazone was withdrawn to enable white adipocyte differentiation (R3–9) but again included between days 14 and 17 to promote white to brite adipocyte conversion (R3–9/14–17). Media were changed every other day and cells used at day 17. Fatty acids and prostaglandins were bound to BSA (0.04% for 15 min at 37 °C) prior to inclusion to culture media. Analysis of secreted prostanoids was performed at day 17 after incubation of the cells for 10 min in fresh culture media. PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub> $\alpha$  and 6-keto-PGF<sub>1</sub> $\alpha$  were quantified by EIA following manufacturer's instructions (Cayman, BertinPharma, Montigny le Bretonneux, France). Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activity measurements and Oil Red O staining were performed as described previously in Ref. [34]. Immunostaining, *Cytochrome c oxidase activity* measurements, protein and RNA extracts preparation and further analyses are described in [Supplemental procedures](#).

### 2.3. Prostanoid quantification *in vivo* by mass spectrometry analysis

All tissues were snap-frozen with liquid nitrogen immediately after collection and stored at –80 °C until extraction. For extraction, each frozen adipose tissue was crushed with a FastPrep<sup>®</sup>-24 Instrument (MP Biomedical) in 500  $\mu$ L of HBSS (Invitrogen) and 5  $\mu$ L of internal standard (Deuterium labeled compounds). After 2 crush cycles (6.5 m/s, 30 s), 20  $\mu$ L were withdrawn for protein quantification and 300  $\mu$ L of cold methanol (MeOH) were added. After centrifugation at 900 g for 15 min at 4 °C, supernatants were transferred into 2 ml 96-well deep plates and diluted in H<sub>2</sub>O to 2 ml. Samples were then submitted to solid phase extraction (SPE) using HRX 96-well plate (50 mg/well, Macherey Nagel) pretreated with MeOH (2 ml) and equilibrated with 10% MeOH (2 ml). After sample application, extraction plate was washed with 10% MeOH (2 ml). After drying under aspiration, lipid mediators were eluted with 2 ml of MeOH. Prior to LC-MS/MS analysis, samples were evaporated under nitrogen gas and reconstituted in 10  $\mu$ L of MeOH.

LC-MS/MS analyses of prostanoids were performed as previously described in Ref. [35]. Briefly, lipid mediators were separated on a Zorbax SB-C18 column (2.1 mm, 50 mm, 1.8  $\mu$ m) using Agilent 1290 Infinity HPLC system coupled to an ESI-triple quadrupole G6460 mass spectrometer (Agilent Technologies). Data were acquired in Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode with optimized conditions (ion optics and collision energy). Peak detection, integration and quantitative analysis were done using Mass Hunter Quantitative analysis software (Agilent Technologies) based on calibration lines built with commercially available prostanoid standards (Cayman Chemicals).

### 2.4. Measurement of oxygen consumption

Oxygen consumption was measured using polarometric technique. Briefly, differentiated cells were introduced in a closed chamber

(containing 1.5–2 ml of air-saturated culture medium) and oxygen level was measured using a Clark electrode (YSI53, USA). Decrease of oxygen in the chamber was monitored as a function of time using a Powerlab 8/35 acquisition system (AD instruments, UK).

### 2.5. Analysis of $\text{Ca}^{++}$ flux

hMADS cells were seeded in 4 well plates and differentiated until day 17 into brite adipocytes (all results presented herein were reproduced with day 14 adipocytes and day 17 white adipocytes). Cells were incubated for 20 min at 37 °C with 5  $\mu\text{M}$  of the fluorescent  $\text{Ca}^{++}$  sensitive probe Quest Fluo-8 (Euromedex) in PBS supplemented with 2 mM  $\text{CaCl}_2$  and 0.05% BSA. Cells were finally washed in PBS containing 2 mM  $\text{CaCl}_2$  or in  $\text{Ca}^{++}$ -free PBS and installed on the stage of an inverted microscope maintained at 37 °C and illuminated with a xenon lamp through a dichroic filter (excitation 490 nm and emission over 510 nm). Digital images were recorded every 5 s with a low light level camera (Photonic Science) and processed for grey level analysis through imaging workbench software (v2.1).

### 2.6. Statistical analysis

Data are expressed as mean values  $\pm$  sem and are analyzed using the 2-tailed Student's *t* test. Differences were considered statistically significant at  $p \leq 0.01$ .

## 3. RESULTS

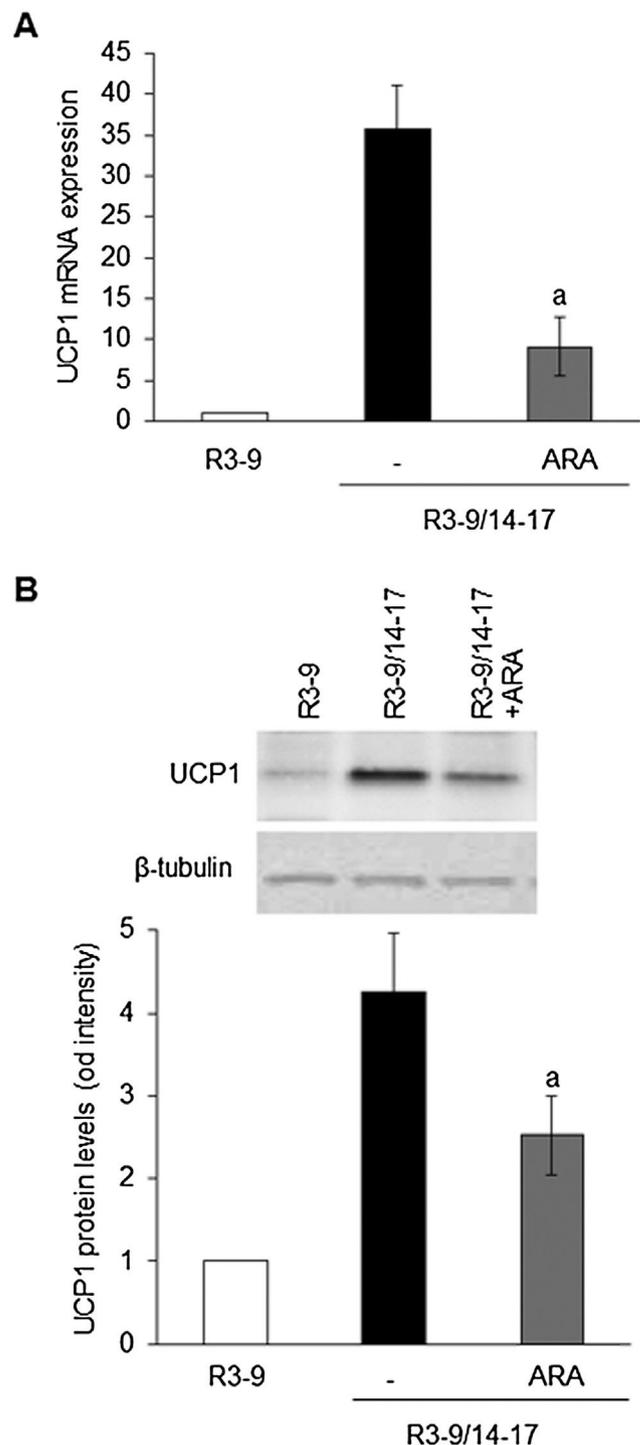
### 3.1. Differential effect of $\omega 6$ PUFAs on white and brite adipocyte differentiation

hMADS cells were differentiated after 17 days into white (rosiglitazone treatment between days 3 and 9, R3–9) or brite (rosiglitazone treatment between days 3 and 9 and then between days 14 and 17, R3–9/14–17) adipocytes according to our published protocol [13,14] and treated or not with ARA between days 14 and 17. At the end of this treatment, UCP1 mRNA and protein levels were assessed. As shown in Figure 1A, ARA strongly inhibited UCP1 mRNA expression in cells acquiring the brite phenotype. This decrease in UCP1 expression was confirmed at the protein level (Figure 1B). Of note, using the same protocol, linoleic acid did not modulate UCP1 mRNA expression (data not shown).

In contrast to the effect on UCP1 gene expression, ARA treatment did not affect adipogenesis *per se*. Oil Red O staining, GPDH activity perilipin immunostaining and expression of various gene markers were not altered whereas a slight inhibitory effect was observed on adiponectin (ADPQ) and fatty acid binding protein 4 (FABP4) mRNA expression (Figure 2A–D). It appeared that ARA inhibits the expression of UCP1 and other PPAR $\gamma$ -target genes (such as ADPQ and FABP4) during brite adipocyte formation without affecting overall adipogenesis.

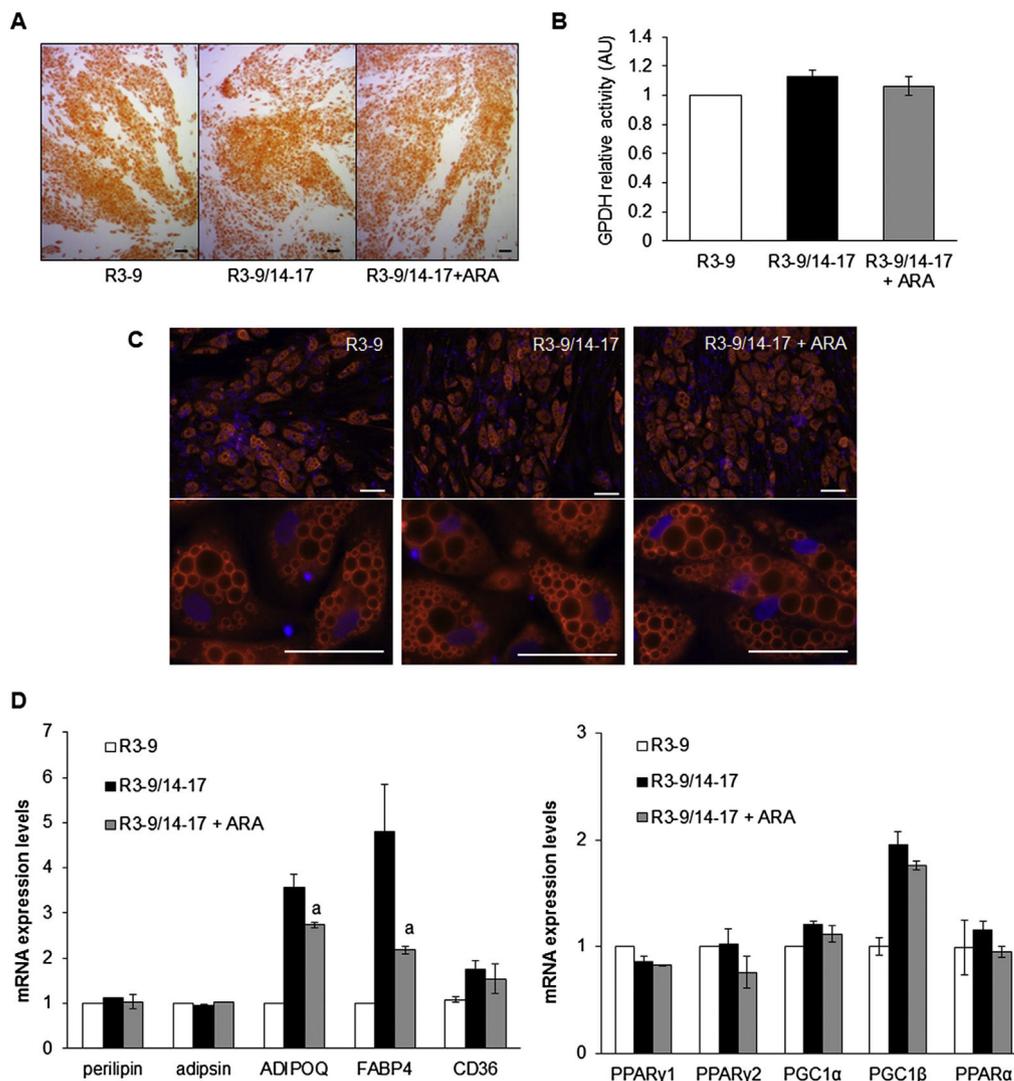
### 3.2. ARA inhibits the UCP1-associated function but not mitochondrialogenesis

In order to further characterize ARA effects on the brite phenotype, we analyzed mRNA expression of several classical brite and mitochondrial markers. There was a significant decrease of FABP3 expression (a fatty acid binding protein preferentially expressed in brown adipocyte and promoted by PPAR $\gamma$ ), a trend of non-significant decrease of CPT1-M and CIDEA expression, and no variation for PRDM16, ELOVL3, PAT2 and P2RX5 mRNA expression. Other mitochondrial markers (associated or not to the brite adipocyte phenotype) were not affected by ARA treatment (Figure 3A). TIMM23 (a specific transporter of the inner mitochondrial membrane) immunostaining showed no difference in the mitochondrial content of cells treated or not with ARA (Figure 3B) leading to similar maximal oxygen consumption (Figure 3C). ARA-



**Figure 1:** Differential effect of ARA on white to brite adipocyte conversion. hMADS cells were differentiated into white (R3–9) or brite (R3–9/14–17) adipocytes, and treated or not between days 14 and 17 with 10  $\mu\text{M}$  ARA. (A) UCP1 mRNA expression determined by RT-qPCR and (B) UCP1 protein level analyzed by Western blot (whole cell lysates, 80  $\mu\text{g}/\text{lane}$ ).  $\beta$ -tubulin was used as loading control. Histograms represent mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. a:  $p < 0.01$  vs R3–9/14–17.

induced inhibition of UCP1 was accompanied by a significant reduction in the basal oxygen consumption (Figure 3C) reflecting the reduction in UCP1 uncoupling activity. Similarly, Cytochrome c oxidase activity was significantly reduced in ARA-treated brite mitochondria (Figure 3D). Due to the reduced uncoupling activity of UCP1 in ARA-



**Figure 2:** hMADS cells were maintained in the presence of 100 nM rosiglitazone from day 3 to day 9 (R3–9) or further exposed to rosiglitazone from day 14 to day 17 (R3–9/14–17) in the absence or presence of 10  $\mu$ M ARA. Oil red O staining (A) and GPDH activity measurements (B) were carried out. (C) Immunodetection of perilipin (in red) was performed at day 17 and nuclei were counterstained with DAPI (in blue). (D) mRNA expression of adipogenic markers was determined by RT-qPCR. Histograms represent mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. a:  $p < 0.01$  vs R3–9/14–17. Scale: 20  $\mu$ m.

treated cells, mitochondrial complex IV activity was decreased through a regulation of Cytochrome c oxidase activity, in order to reach an oxidative phosphorylation activity equivalent to that of white adipocytes [36]. Collectively, these data demonstrate that ARA did not affect mitochondriogenesis *per se* whereas it inhibited mitochondrial activity associated with UCP1 expression.

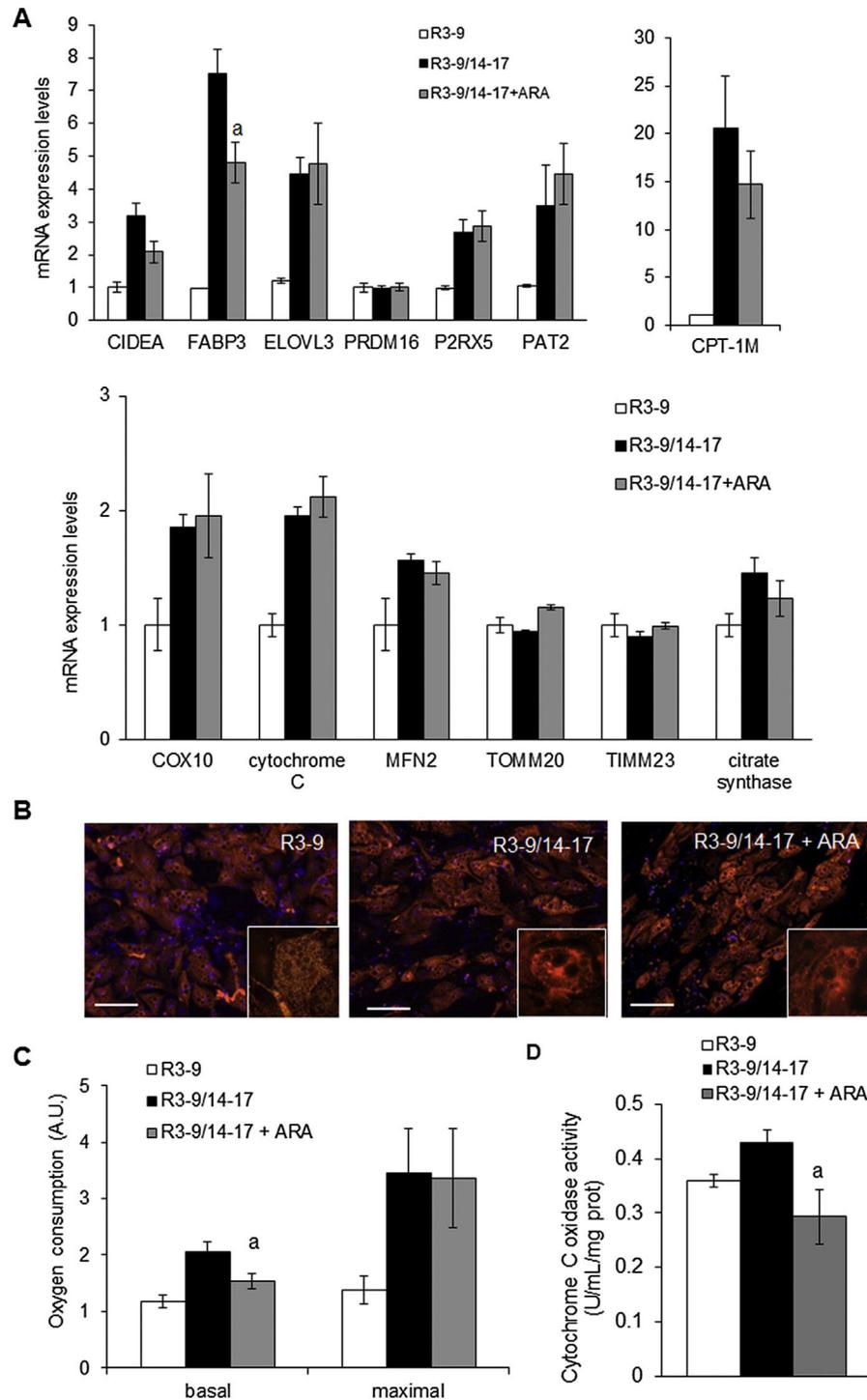
### 3.3. ARA inhibitory effect is mediated through cyclooxygenase activity

As early steps of ARA metabolism are mediated through cyclooxygenase activity, we analyzed involvement of cyclooxygenase 1 (COX-1) and 2 (COX-2). As shown in Figure 4A, COX-1 and COX-2 mRNA are expressed in hMADS adipocytes and their expression increased upon ARA treatment with a stronger effect on COX-2 mRNA. In order to determine whether COX activities were involved in the effects of ARA on brite adipocyte differentiation, indomethacin, a non-selective COX inhibitor, and celecoxib, a specific COX-2 inhibitor, were used. Clearly, both inhibitors were able to reverse the ARA

inhibitory effect on UCP1 mRNA expression (Figure 4B) as well as that on FABP4 and ADPQ mRNA expression (Figure 4C). Of note, COX-2 mRNA expression was also regulated by COX inhibitors (Figure 4C), favoring the existence of an auto-regulatory loop. The expression of PPAR $\gamma$  (both PPAR $\gamma$ 1 and PPAR $\gamma$ 2), adipsin and perilipin were not affected by ARA and COX inhibitors (Figure 4C).

### 3.4. Prostaglandins E2 and F2 $\alpha$ but not prostacyclin mediate the ARA inhibitory effect

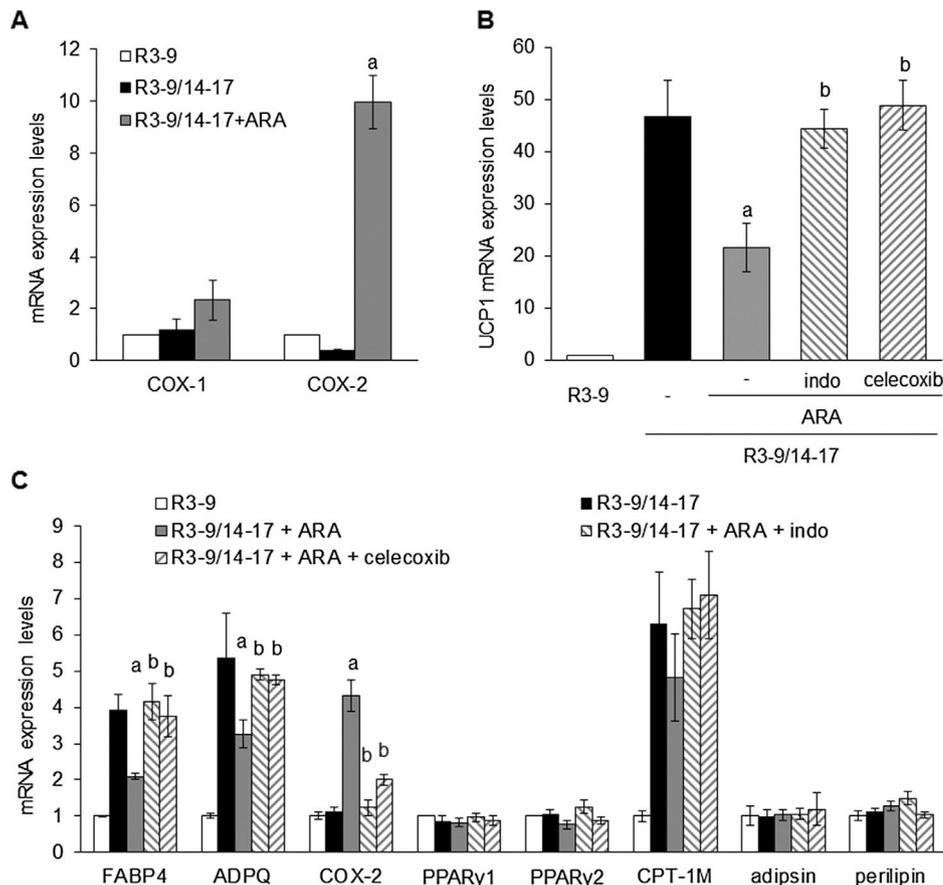
The conversion of ARA to PGH2 *via* the COX pathway leads to the synthesis of prostaglandins through a variety of prostaglandin synthases. Genes encoding for main prostaglandin synthases (PTGES1 and 2, AKR1B1, AKR1C3, CBR1, PTGIS and PTGDS) are expressed in hMADS adipocytes (data not shown) and were not significantly modulated by ARA except for PGI2 synthase (PTGIS) (Supplemental Figure 1). Expression of PTGIS decreased upon ARA treatment. This inhibitory effect involves COX activity as it was prevented in the presence of COX inhibitors (Supplemental Figure 1).



**Figure 3:** Changes in the brite phenotype of ARA-treated cells. hMADS cells were maintained in the presence of 100 nM rosiglitazone and treated or not from day 14 to day 17 with 10 μM ARA. Rosiglitazone-untreated cells were used as control. (A) Brown (*CPT-1M* and *CIDEA*) and mitochondrial markers (*COX10*, *CYTC*, *MFN2*, *TOMM20* and *TIMM23*) mRNA expression were analyzed by RT-qPCR. (B) Mitochondria content analyzed by immunodetection of TIMM23 (red). Nuclei were counterstained with DAPI (blue). (C) Basal (untreated cells) and maximal (FCCP-treated cells) oxygen consumption levels measured in resuspended cells with an oxygraphic probe. (D) Cytochrome c oxidase activity was measured. Histograms represent mean ± SEM of 3 (A and D) or 4 (C) independent experiments. a:  $p < 0.01$  vs R3–9/14–17. Scale: 20 μm.

Under ARA treatment, differentiated brite adipocytes were able to synthesize and secrete PGE2 and PGF2α (Figure 5A). Despite the down-regulation of PTGIS gene expression, cells were not altered in their ability to synthesize PGI2 as shown by measurement of its stable

secreted metabolite 6-keto-PGF1α (Figure 5A). As expected, the synthesis of these prostaglandins was dependent on COX-2 activity, evidenced by the inhibition of secreted PGF2α, PGE2 and 6-keto-PGF1α in the presence of celecoxib (Figure 5A).

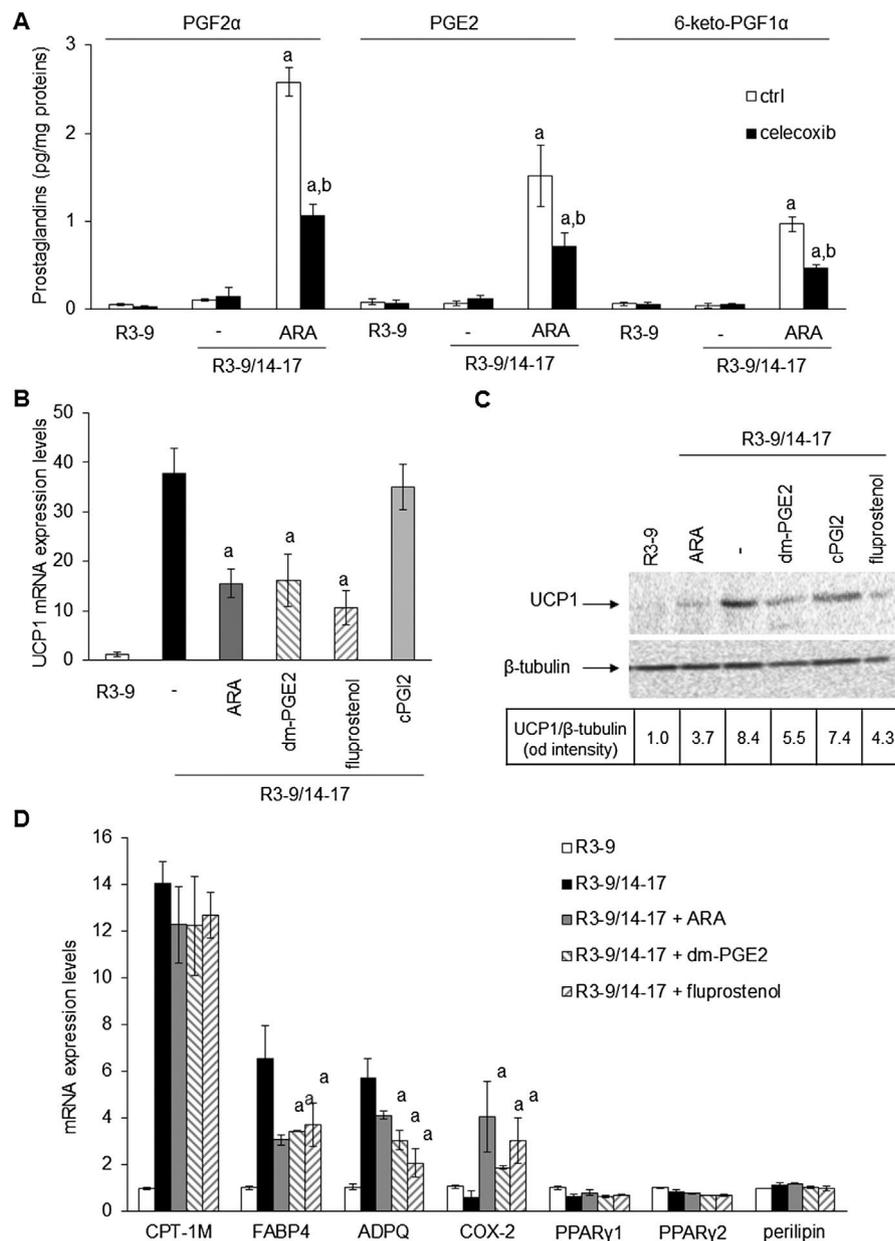


**Figure 4:** Cyclooxygenases drive ARA effect in hMADS cells. (A) Cyclooxygenases (COX-1 and COX-2) mRNA expression assessed by RT-qPCR in cells exposed to 100 nM rosiglitazone and treated or not with 10  $\mu$ M ARA between days 14 and 17. Untreated cells were used as control. (B) and (C) hMADS adipocytes were treated with 100 nM rosiglitazone and 10  $\mu$ M ARA supplemented or not with 1  $\mu$ M indomethacin (indo) or 100 nM celecoxib. mRNA expression of various adipogenic markers was analyzed by RT-qPCR. Histograms represent mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. a:  $p < 0.01$  vs R3-9/14-17; b:  $p < 0.01$  vs R3-9/14-17 + ARA.

In order to determine whether these prostaglandins were indeed responsible of the ARA inhibitory effect on UCP1 expression, specific prostaglandin receptor ligands were used. The 16,16-dimethyl-PGE2 (dm-PGE2), a stable analog of PGE2 which binds to its cognate receptors EP1-4 as well as two agonists of the PGF $2\alpha$  receptor FP, *i.e.* fluprostenol and latanoprost, were able to inhibit, in a dose dependent manner, UCP1 expression at the mRNA and protein levels (Figure 5B, Supplemental Figure 1B,C). The effects of dm-PGE2 and fluprostenol on other gene expression were similar to those observed in the presence of ARA (Figure 4D) except for PTGIS expression, which was significantly inhibited only by dm-PGE2 (Supplemental Figure 1A). ARA is a precursor of prostacyclin in hMADS cells (Figure 5A) but its stable analog cPGI2 fails to inhibit UCP1 mRNA expression (Figure 5B). As previously described in other cells [37], cPGI2 was able to replace rosiglitazone in order to induce UCP1 mRNA expression. As found under rosiglitazone treatment, ARA inhibits this cPGI2 effect (Supplemental Figure 1D). Interestingly, cPGI2 and rosiglitazone did not induce additive effect (Figure 5B), and seem to have a common pathway as cPGI2 was unable to reverse the ARA-induced inhibition of UCP1 mRNA expression under rosiglitazone treatment (Supplemental Figure 1D). Altogether, these results indicated that ARA modulated the acquisition of the brite adipocyte phenotype in hMADS cells through the release of PGE2 and PGF $2\alpha$ .

**3.5. ARA, PGE2 and PGF $2\alpha$  trigger intracellular calcium oscillations**

PGF $2\alpha$  and PGE2 receptors (FP and EP1 respectively) are known to be coupled to Gq and intra-cellular calcium signaling. Thus we assessed the possible effects of ARA and various prostaglandin receptor ligands on the changes of intracellular calcium levels in hMADS adipocytes. As shown in Figure 5A, ARA, dm-PGE2 and fluprostenol were able to trigger an intracellular calcium concentration ( $i[Ca^{++}]$ ) rise in brite adipocytes. This first rise was followed by oscillation of  $i[Ca^{++}]$ , with sustained frequency and intensity during at least 20 min (Figure 6A and Supplementary videos 1 and 2). LA and cPGI2, which were not effective in inhibiting UCP1 mRNA expression, did not induce  $i[Ca^{++}]$  fluxes (Figure 6B).  $i[Ca^{++}]$  oscillations displayed by hMADS adipocytes were dependent on both external and internal pools of  $Ca^{++}$ . In the absence of extracellular calcium ARA failed to induce  $i[Ca^{++}]$  increase while addition of external calcium restored calcium oscillations (Supplemental Figure 2A). Moreover,  $i[Ca^{++}]$  oscillations were completely abolished by the addition of thapsigargin (a non-competitive inhibitor of sarco-endoplasmic reticulum  $Ca^{++}$  ATPases) or EGTA (Supplemental Figure 2B,C). These  $i[Ca^{++}]$  oscillations likely reflect the classical profile of Calcium-induced Calcium-release (CICR) phenomenon. The Calcium Release Activated Calcium (CRAC) mechanism might be excluded since the addition of the TRP inhibitor (SKF96365) showed no effect on the ARA-induced calcium oscillations (Supplemental Figure 2C).

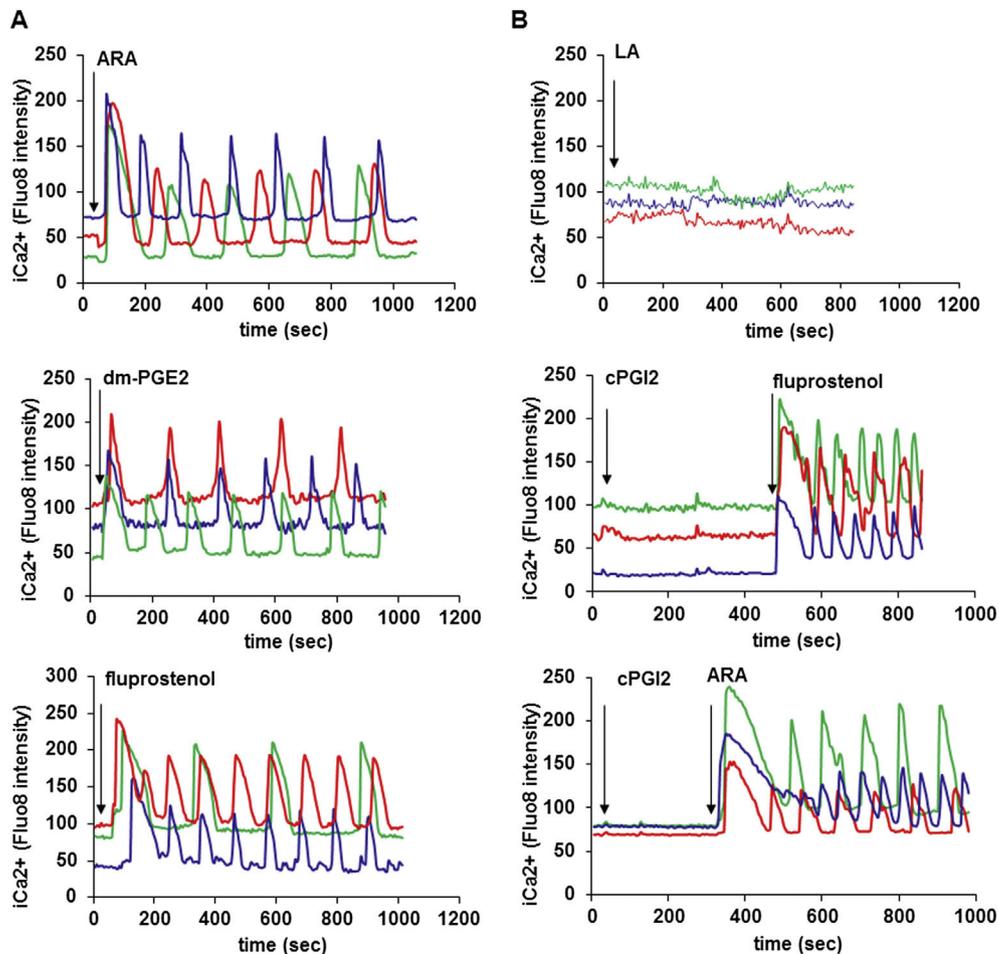


**Figure 5:** Prostaglandins drive ARA effects on brite adipogenesis. hMADS cells were treated or not with 100 nM rosiglitazone from day 14 to day 17. (A) Rosiglitazone-treated cells were exposed to 10  $\mu$ M ARA in the presence or not of 100 nM celecoxib for the 3 days. After a last change PGF2 $\alpha$ , PGE2 and 6-keto-PGF1 $\alpha$  were quantified from culture medium after 10 min incubation by EIA. (B) *UCP1* mRNA expression analyzed by RT-qPCR or (C) *UCP1* protein level assessed by Western blotting (whole cell lysates, 80  $\mu$ g/lane,  $\beta$ -tubulin was used as loading control) in rosiglitazone-treated cells exposed to 10  $\mu$ M ARA, 1  $\mu$ M 16,16-dm-PGE2 (dm-PGE2), 10 nM fluprostenol (agonist of PGF2 $\alpha$  receptor) or 1  $\mu$ M cPGI2 (stable analog of PGI2). (D) Effects of ARA, dm-PGE2 and fluprostenol on others mRNA expressions analyzed by RT-qPCR. Untreated cells were used as control. Histograms represent mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. a:  $p < 0.01$  vs R3-9/14-17; b:  $p < 0.01$  vs R3-9/14-17 + ARA.

PGE2 and cPGI2 are known to activate cAMP dependent pathway. In hMADS adipocytes, EP4 (PGE2 receptor) mRNA levels were up-regulated by ARA treatment (Supplemental Figure 2F). In this situation, EP4 would generate a cAMP compensatory pathway. Disruption of this pathway, using a specific EP4 inhibitor (AH23848), led to a stronger inhibition of *UCP1* mRNA expression in response to ARA treatment (Supplemental Figure 2G). This compensatory effect was not associated with modulation of  $i[Ca^{++}]$  fluxes, as treatment with cAMP-elevating agents such as 8-bromo-cAMP or cPGI2 did not affect these oscillations (Supplemental Figure 2D,E).

### 3.6. Inhibition of *UCP1* gene expression is mediated by a $Ca^{++}$ /ERK signaling pathway

In order to obtain more insights into the mechanisms involved in ARA and PGs-induced inhibition of *UCP1* gene expression, we focused our interest on the use of fluprostenol since its effects were mediated mainly through the cell surface FP receptor *via* Gq protein. As expected, decreasing extracellular  $Ca^{++}$  availability by EGTA was able to reverse fluprostenol-induced inhibition of *UCP1* mRNA expression without affecting adipogenesis as shown by unaltered perilipin mRNA expression (Figure 7A).

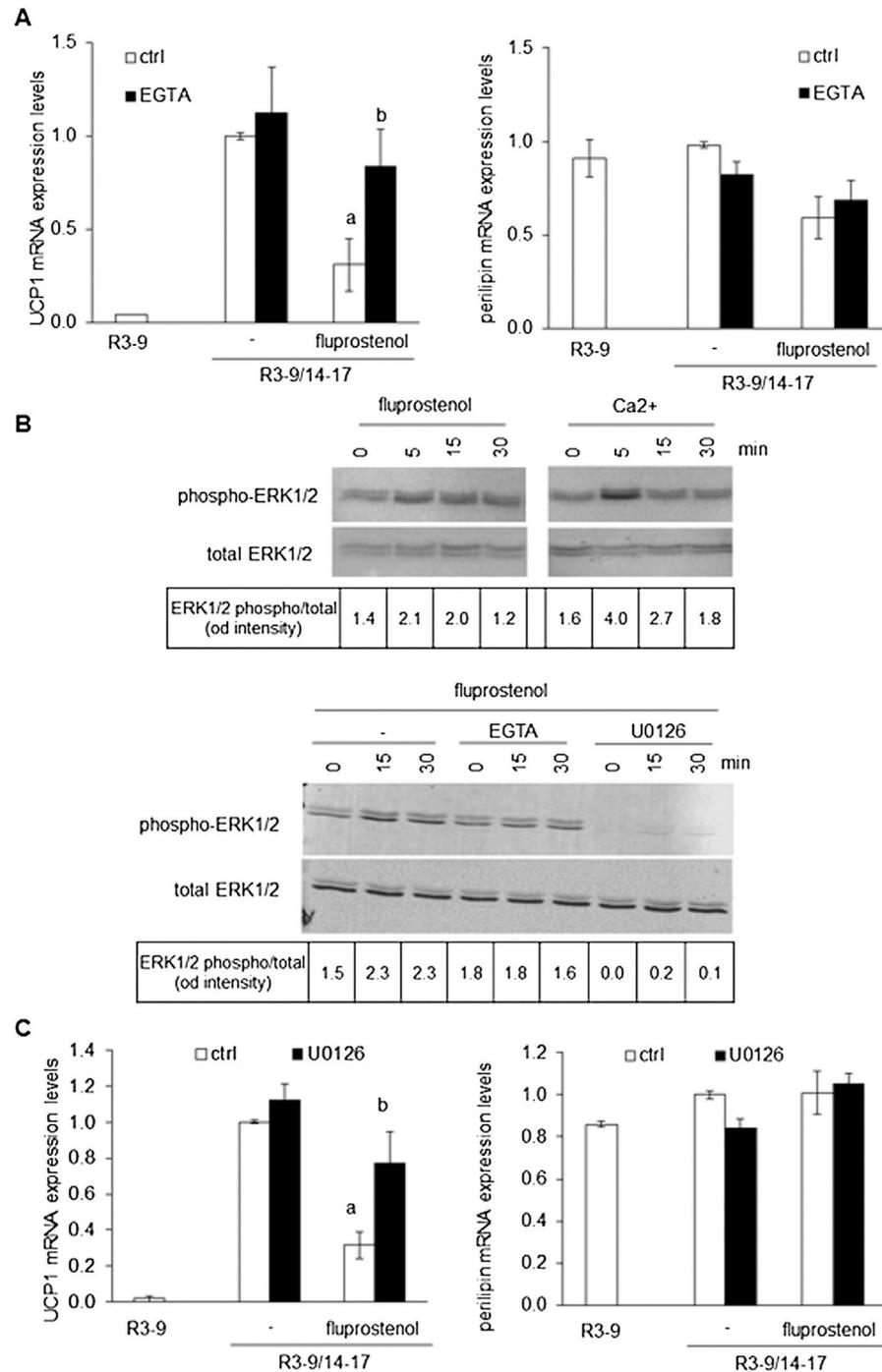


**Figure 6:** Intra-cellular  $\text{Ca}^{++}$  oscillations are induced by ARA and its metabolites. hMADS cells were differentiated into brite adipocytes in the presence rosiglitazone and incubated 15 min with a fluorescent sensitive  $\text{Ca}^{++}$  probe (Quest Fluo-8). Cells were analyzed by live fluorimicroscopy. (A) 100  $\mu\text{M}$  ARA, 10  $\mu\text{M}$  dm-PGE2 and 100 nM fluprostenol induce a transitory increase of  $\text{i}[\text{Ca}^{++}]$ , followed by  $\text{i}[\text{Ca}^{++}]$  oscillations with a sustained frequency and intensity. (B) 100  $\mu\text{M}$  LA and 10  $\mu\text{M}$  cPGI2 did not trigger  $\text{i}[\text{Ca}^{++}]$  rise. Each track represents integrated imaging of an individual cell. These data are representative of 5 independent experiments (10–50 cells recorded in each experiment).

It has been demonstrated in various cell types including pre-adipocytes that fluprostenol was able, *via* FP receptor, to activate the ERK pathway and to inhibit PPAR activity [16]. As shown in Figure 6B, fluprostenol induced a transient increase in ERK1/2 phosphorylation. Addition of CaCl<sub>2</sub> to hMADS adipocytes, pre-incubated for 10 min in  $\text{Ca}^{++}$  free media, induced a similar transient phosphorylation of ERK1/2 (Figure 7B). As expected, pretreatment with EGTA or U0126, a widely used MEK/ERK inhibitor, abolished fluprostenol-induced ERK1/2 phosphorylation (Figure 7B). A chronic treatment with U0126 during the conversion of white to brite hMADS adipocytes between days 14 and 17 did not affect UCP1 mRNA induction and adipogenesis (as assessed by perilipin gene expression) but was able to reverse the inhibitory effect of fluprostenol (Figure 7C). Altogether, these data strongly suggest that inhibition of the conversion of white to brite adipocytes by ARA is a multi-step process involving the synthesis and secretion of prostaglandins PGF<sub>2</sub> $\alpha$  and PGE<sub>2</sub>. The signaling pathway appears to implicate, with respect to PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , its binding to the cognate FP receptor,  $\text{i}[\text{Ca}^{++}]$  oscillations and ERK phosphorylation leading in turn to a lower PPAR $\gamma$  activity characterized by a decreased expression of PPAR $\gamma$ -target genes, such as ADPQ, FABP4 and UCP1.

### 3.7. ARA-enriched diet inhibits the recruitment of brite adipocytes induced by a chronic treatment with $\beta$ 3-adrenergic receptor agonist

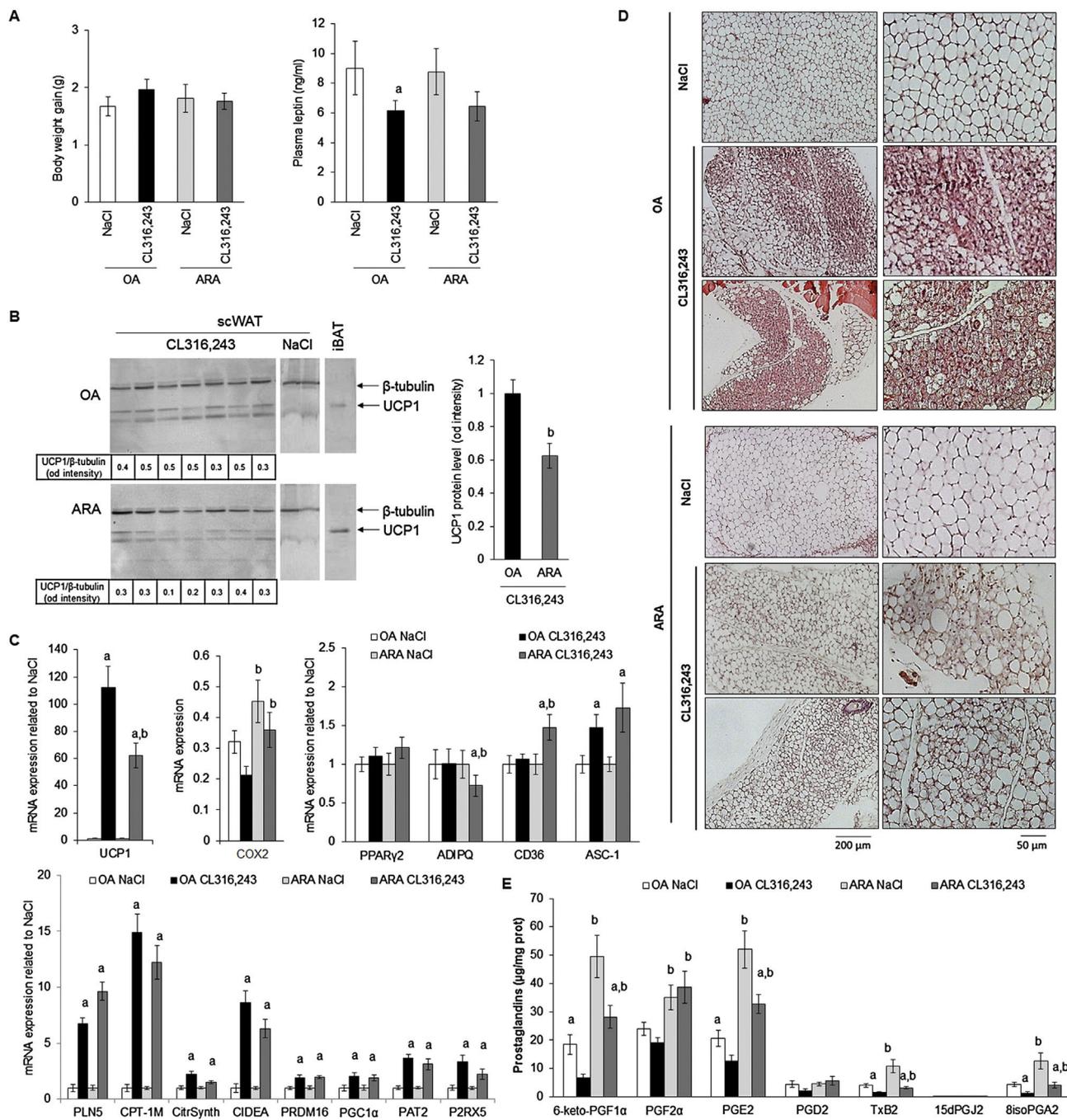
We aimed to investigate *in vivo* whether prostaglandin synthesis induced by ARA supply can attenuate  $\beta$ -adrenergic-induced UCP1 expression in WAT. For that purpose, we fed C57BL/6 mice a standard diet supplemented with ARA (arachidonate ethyl ester 1.1% w/w) for 4 weeks. We used as a control mice fed an isocaloric diet based on oleic acid (OA) enrichment (oleate ethyl ester 1.1% w/w), since OA does not induce prostaglandin synthesis and does not affect UCP1 expression in hMADS cells (data not shown). As expected, ARA or OA supplementations neither induce weight gain nor modify leptin plasma levels (Figure 8A). In order to investigate the ARA effects on brite adipocyte formation in white adipose tissue, ARA or OA-fed mice received during the last week a  $\beta$ 3-adrenergic receptor agonist CL316,243 (1 mg/kg/day) or vehicle. Mice fed ARA-supplemented diet display a defective induction of “browning”. Indeed, molecular analysis of subcutaneous WAT (scWAT) showed an impaired increase of UCP1 mRNA and protein expression upon CL316,243 treatment in ARA-compared to OA-supplemented diet (Figure 8B,C). Histological analysis showed clearly a defect in the formation of multilocular adipocytes characterized by a low lipid droplet content and representative of activated brite/beige



**Figure 7:** A Ca<sup>++</sup>/ERK pathway is involved in the inhibition of white to brite adipocyte conversion. (A–C) hMADS cells were treated or not with 100 nM rosiglitazone from day 14 to day 17. Rosiglitazone-treated cells were exposed or not to 10 nM fluprostenol. Unstimulated brite (R3–9/14–17) cells were used as control. (A) *UCP1* and *Perilipin* mRNA expression analyzed by RT-qPCR in the absence or presence of 300 μM EGTA. (B) Upper panel: hMADS adipocytes deprived of Ca<sup>++</sup> for 48 h in DMEM/BSA 0.5% and then exposed to 2 mM CaCl<sub>2</sub> or 10 nM fluprostenol. Lower panel: deprived hMADS adipocytes pretreated for 10 min with 300 μM EGTA or 10 μM U0126, and then stimulated with 10 nM fluprostenol. Cells were lysed at the indicated times and analyzed by western blotting (whole cell lysate, 25 μg protein/line). Values correspond to ERK1/2 phosphorylated vs ERK1/2 total protein intensity ratio evaluated with fluorescent signal quantification. (C) *UCP1* and *Perilipin* mRNA expression analyzed by RT-qPCR in the absence or presence of 10 μM U0126. Histograms represent mean ± SEM of 3 independent experiments. a: *p* < 0.01 vs R3–9/14–17; b: *p* < 0.01 vs R3–9/14–17 + fluprostenol.

adipocytes (Figure 8D). Despite the limited browning found in ARA-fed mice, we detected an increased expression of brown/brite adipocyte markers CPT1-M, CIDEA, PLN5 PRDM16, PGC1α, PAT2 and P2RX5 mRNA as well as of the mitochondrial content marker Citrate Synthase

(Figure 8C). Contrasted results were obtained for white adipocyte markers mRNA expression; PPARγ2, CD36 and ASC-1 mRNA increase with ARA-enriched diet differently to ADPQ mRNA which decrease as previously found *in vitro* with ARA treatment (Figures 2 and 8C).



**Figure 8:** Impact of ARA metabolites production in scWAT on inducible brite adipocytes formation. 10-week-old C57BL/6RccHsd female mice fed standard diet supplemented with ARA or OA for 4 weeks. During the fourth week, mice subdivided in two groups, a first group was treated with CL316,243 and the second group with vehicle (NaCl). (A) Body weight gain between week 1 and 4 and plasma leptin levels were determined. (B) UCP1 protein level was assessed in scWAT (40  $\mu$ g/lane).  $\beta$ -tubulin was used as loading control and iBAT protein extract (4  $\mu$ g/lane) as UCP1 positive control. (C) UCP1, COX-2 and representative white and brite adipocyte markers mRNA were determined in scWAT by RT-qPCR. (D) Representative histological sections (4  $\mu$ m, paraffin-embedded, HES staining) of scWAT from different treatment are shown. (E) Prostaglandin amounts were measured by LC-MS/MS in scWAT of each group of mice. Histograms represent means  $\pm$  SEM of 8–12 mice per group. a:  $p < 0.01$  vs NaCl group and b:  $p < 0.01$  vs OA group.

In order to assess whether ARA effect could be extended to all UCP1-expressing cells, *i.e.* brown adipocytes *per se*, the status of UCP1 was analyzed in interscapular BAT (iBAT). Mice fed ARA-supplemented diet and treated with CL316,243 displayed a lower content of UCP1 mRNA compared to control mice (Supplemental Figure 3A), despite the fact that histology analysis, *i.e.* the pattern of lipid droplets, was comparable whatever the diet (Supplemental Figure 3B).

ARA-supplemented diet enhanced COX-2 mRNA expression (Figure 8C), suggesting changes in the levels of ARA metabolites within scWAT (Figure 8E). Quantification of ARA metabolites has been performed on scWAT and iBAT. Among these metabolites, 6-keto-PGF1 $\alpha$ , PGE2 and PGF2 $\alpha$  are the most represented prostaglandins found in both tissues and, as expected, were increased in mice fed ARA-supplemented diet compared to mice fed OA-supplemented diet. Of

note, chronic treatment with CL316,243 led to a significant decrease of 6-keto-PGF1 $\alpha$  and PGE2 levels in mice fed either diet, in contrast to PGF2 $\alpha$  levels. Interestingly, PGD2 levels were not significantly altered by either diet or treatment and its metabolites 15dPGJ2, a reported PPAR $\gamma$  ligand, was not detected even after CL316,243 treatment. TxB2 and 8isoPGA2, two others ARA COX-derived prostanoids, were detected and their levels exhibited parallel patterns with respect to diets and to chronic CL316,243 treatment. As these prostanoids have not been clearly identified as adipocyte products they might be synthesized and secreted by other cell types present within adipose tissue. Similar observations were obtained for prostanoid levels in iBAT compared to scWAT of mice fed ARA- and OA-supplemented diet, in agreement with the ARA effect on UCP1 gene expression observed in both tissues (Supplemental Figure 3A vs 3C).

#### 4. DISCUSSION

The recent discovery of thermogenic competent adipocytes in adult healthy humans has opened new therapeutic perspectives for the treatment of obesity and type 2 diabetes which aim at increasing energy expenditure by enhancing the formation and activation of brown/brite adipocytes. However, in parallel to developing new treatments, it is of utmost interest to assess in humans the impact of dietary lipids on the conversion of white to brown adipocytes. This issue is highly relevant to body weight regulation since, besides the quantitative importance of hypercaloric high-fat diets leading to WAT excess, the qualitative importance of  $\omega$ 6 poly-unsaturated fatty acids in favoring weight gain has been established in rodents and suggested in recent studies in infants [23,24]. In the present work, we described a potential additional deleterious effect of  $\omega$ 6 fatty acids on the regulation of body weight. ARA treatment of hMADS adipocytes inhibits UCP1 mRNA expression during the acquisition of a brite phenotype and thus decreases oxygen consumption. Indeed, UCP1 induces an over-activity of mitochondria to compensate the increase in the uncoupling process between oxygen consumption and ATP synthesis. By contrast, ARA does not modulate mitochondriogenesis and maximal respiratory capacity of brite adipocytes. Whereas it has been reported that ARA increased DNA synthesis in differentiating preadipocytes [38], ARA treatment of hMADS cells does not modulate DNA synthesis when ARA-treatment was applied on differentiated cells (data not shown). hMADS adipocytes display the complete machinery to metabolize ARA into PGs of the 2 series and were able to respond to PGs in an autocrine/paracrine manner. In these cells, PGs mediate the ARA effect as specific inhibition of COX-2 activity blunted these effects. Among secreted PGs in response to ARA treatment, PGI2 and PGE2 have been described to induce white to brite adipocyte conversion [37,39,40]. In hMADS cells, cPGI2 neither up-regulated UCP1 expression nor was able to reverse the inhibitory effect of ARA while dm-PGE2 inhibited UCP1 expression under rosiglitazone treatment. Furthermore, ARA appeared to inhibit PTGIS expression via the COX pathway, which could then favor PGF2 $\alpha$  and PGE2 effects at the expense of PGI2, leading to inhibition of the browning process of white adipocytes. Endocannabinoid metabolism by COX-2 [41] represents another pathway linking ARA to its inhibitory effect of UCP1 expression, especially via the prostaglandins analogs, PG-glycerol esters and PG-ethanolamides, which are able to activate the same prostaglandin receptors. Interestingly, monoacylglycerol lipase (MGL) and fatty acid amide hydrolase (FAAH) mRNA expression, which encode for enzymes involved in the hydrolysis of endocannabinoids (N-arachidonylethanolamine and 2-arachidonoylglycerol) in ARA, and presumably decreasing their availability, are increased under brite

conditions (R3—9/14—17 in vitro and under CL316,243 treatment in vivo). If our results are correlated to a decrease in enzyme activities, it is tempting to assume that a decrease in endocannabinoid levels will favor brite adipocyte recruitment under physiological conditions. Nevertheless, expression of cannabinoid receptors 1 and 2 in vivo, and FAAH and MGL in vivo and in vitro, was not affected by ARA treatment (Supplemental Figure 4) suggesting a minor role, if any, of endocannabinoids in ARA effect. Further experiments determining the levels on endocannabinoids and using pharmacological tools will shed light on the mechanisms involved in brite adipocyte recruitment. Disequilibrium between  $\omega$ 6 and  $\omega$ 3 polyunsaturated fatty acid metabolites could be involved in ARA-inhibitory effect. Lipoxygenase derived metabolites from DHA, such as resolvin D1 and D2, do not seem to be involved, as they were not detected in BAT. Moreover, resolvin D2 was detected in scWAT and its level was not affected in animals fed by ARA enriched diet (data not shown).

Extracellular PGE2 is able to bind to various receptors with different affinities [42]. hMADS adipocytes express three PGE2 receptors, *i.e.* EP1, EP2 and EP4 (Supplemental Figure 2F) allowing PGE2 to promote cAMP signaling (*via* EP2 and EP4 receptors) and Ca<sup>++</sup> signaling (*via* EP1 receptor). In these cells, 16,16-dm-PGE2 induced a dose dependent inhibition of UCP1 mRNA expression, with a maximum effect at 5  $\mu$ M while it activated  $i$ [Ca<sup>++</sup>] oscillations. Thus, we assume that ARA-derived PGE2 bound to the low-affinity EP1 receptor as well as to the FP receptor. It is worth noticing that PGE2 was able to promote white to brown/brite conversion at lower concentrations *via* its high-affinity EP4 receptor while inhibiting this process at higher concentrations *via* its low-affinity EP1 receptor (in this study). Indeed, activation of these two opposite pathways in hMADS adipocytes are in agreement with the potent inhibitory effect of high doses of 16,16-dm-PGE2 in the presence of a specific EP4 receptor antagonist when compared to 16,16-dm-PGE2 alone (Supplemental Figure 2G).

ARA also induced synthesis and secretion of PGF2 $\alpha$  in hMADS adipocytes. This PG bound to its cognate FP receptor and inhibited the “browning” process as shown with two highly specific agonists, fluprostenol and latanoprost. Interestingly, ARA, fluprostenol and high concentrations of 16,16-dm-PGE2 were able to induce sustained  $i$ [Ca<sup>++</sup>] oscillations. It is known that human mesenchymal stem cells and preadipocytes displayed spontaneous  $i$ [Ca<sup>++</sup>] oscillations by contrast to mature adipocytes [43,44]. However, transient  $i$ [Ca<sup>++</sup>] flux controls early and late steps of human adipocyte differentiation [21,45] whereas in rodents, a potential regulation of glucose uptake by a non-canonical  $i$ [Ca<sup>++</sup>] oscillation implicates this pathway in adipocyte metabolism [46,47]. Moreover, TRPV4 as a potent Ca<sup>++</sup> channel appears as an important player in the browning process [48].

Herein, we described for the first time the occurrence of  $i$ [Ca<sup>++</sup>] oscillations in the conversion of human white to brown adipocytes. Our data show that intracellular storage depletion was the first step of the ARA-mediated UCP1 inhibition, though the mechanism of extracellular Ca<sup>++</sup> entry remained unknown. Two mechanisms could be proposed, *i.e.* i) a voltage-dependent calcium channel (CaV), induced by membrane depolarization or ii) a store-operated calcium channel (SOCE) induced by reticulum depletion as several CaV, STIM, ORAI and TRPC proteins were expressed by hMADS adipocytes (data not shown). However, neither membrane depolarization (by addition of high KCl concentrations, data not shown) nor the use of SKF96365 (a non-specific inhibitor of SOCE) were able to inhibit  $i$ [Ca<sup>++</sup>] oscillations (Figure S3C). Cross-talk between Ca<sup>++</sup> and cAMP signaling has been reported. It is known that cAMP signaling is highly important for white and brown adipocytes, whereas cAMP levels have been shown to reduce or delay Ca<sup>++</sup> oscillations [49]. Interestingly, in hMADS

adipocytes, neither 8-Br-cAMP nor cPGI<sub>2</sub> were able to modulate  $[Ca^{++}]$  oscillations (Supplemental Figure 2D,E).

ARA, fluprostenol and 16,16-dm-PGE<sub>2</sub> inhibited specifically UCP1, FABP4 and ADIPOQ mRNA expression which have been reported to be PPAR $\gamma$  target genes, strongly suggesting a specific inhibitory effect of PG-mediated pathway *via* PPAR $\gamma$  activity. It is known that Ca<sup>++</sup> signaling controlled early and late steps of adipogenesis through inhibition of PPAR $\gamma$  expression and the involvement of Ca<sup>++</sup>/calcineurin pathway [18,50–52]. Our data rule out this possibility as treatment with FK506 (a specific calcineurin inhibitor), was unable to reverse the inhibition of UCP1 expression in the presence of ARA or PGs (data not shown). PGF<sub>2</sub> $\alpha$  has been reported to activate Ca<sup>++</sup> signaling and to induce PPAR $\gamma$  phosphorylation and thus its inactivation [16]. ERK1/2 signaling pathway appeared to be involved in this phenomenon in adenocarcinoma cells in which PGF<sub>2</sub> $\alpha$  *via* Gq/Ca<sup>++</sup> signaling allowed phosphorylation of ERK1/2 which in turn led to PPAR $\gamma$  degradation through the ubiquitin/proteasome pathway [53,54]. In a similar way, inhibition of ERK1/2 phosphorylation in hMADS adipocytes reversed the fluprostenol-induced inhibition of UCP1 mRNA. As extracellular Ca<sup>++</sup> and fluprostenol induced a transient phosphorylation of ERK1/2, our results are in favor of a mechanism involving a “PG- > Ca<sup>++</sup>- > ERK1/2- > PPAR $\gamma$ - > UCP1” pathway in controlling the conversion of white to brite adipocytes.

*In vivo*, COX pathway has been shown to be crucial for the induction of brite adipocytes in 129Sv mice, a strain resistant to obesity due to a high content in brown and brite adipocytes [37,40]. In C57BL/6 mice, a strain sensitive to high fat diets, a recent report describes in contrast an opposite role of the COX pathway. Indeed, inhibition of COX-1 and -2 by indomethacin in mice fed high fat diet prevents weight gain, partly due to enhanced recruitment of brite adipocytes in scWAT [55]. Our data obtained with C57BL/6 mice fed an ARA-supplemented diet are in agreement with this observation as increased prostanoid levels were associated with impairment of brite adipocyte formation. Moreover, chronic stimulation of the  $\beta$ 3-adrenergic pathway in mice fed OA-supplemented diet induces a significant decrease of prostaglandins and prostacyclin levels, making unlikely the involvement of prostanoids in brite adipogenesis (Figure 8E). It is tempting to postulate that a strong but transient induction of prostanoids occurs within the first days of CL316,243 treatment and cold exposure [37,40,56] and is important for the induction of brown/brite adipocyte differentiation. However, a chronic excess in prostaglandins, due to a lipid supply change, leads to an inhibition of this differentiation and of UCP1 thermogenic activity.

## 5. CONCLUSION

Collectively, our data demonstrate the specific nutrient regulation of the browning process in WAT by  $\omega$ 6 ARA in addition to its role in stimulating the formation of white adipocytes. In aggregate, prevention of excessive consumption of  $\omega$ 6 fatty acids appears suitable as disequilibrium of polyunsaturated fatty acid metabolism may contribute to excessive adipose tissue development.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

The author(s) have made the following declarations about their contributions: Conceived and designed the experiments: D.P., E.Z.A. Performed the experiments: D.P., R.G., G.B., P.L.F., J.C.C., M.D., M.G., M.T., C.D., E.Z.A. Analyzed the data: D.P., R.G., P.L.F., A.V., M.T., C.D., S.H., D.L., G.A., E.Z.A. Contributed reagents/materials/analysis tools: J.B.M., M.T., C.D. Wrote the manuscript: D.P., D.L., G.A., E.Z.A.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors greatly acknowledge of IRCAN Animal core facility. This work was supported by CNRS, EU FP7 project DIABAT (HEALTH-F2-2011-278373), French Agence Nationale de la Recherche (ANR-10-BLAN-1105 miRBAT), Nutricia Research Foundation (“2011–25”) and Société Française de Nutrition (2012 Research Prize).

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare having no conflict of interest.

## APPENDIX A. SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmet.2014.09.003>.

## REFERENCES

- [1] Cannon, B., Nedergaard, J., 2004. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiological Reviews* 84:277–359.
- [2] Feldmann, H.M., Golozoubova, V., Cannon, B., Nedergaard, J., 2009. UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. *Cell Metabolism* 9: 203–209.
- [3] Petrovic, N., Walden, T.B., Shabalina, I.G., Timmons, J.A., Cannon, B., Nedergaard, J., 2010. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 285:7153–7164.
- [4] Ishibashi, J., Seale, P., 2010. Medicine. Beige can be slimming. *Science* 328: 1113–1114.
- [5] Wang, Q.A., Tao, C., Gupta, R.K., Scherer, P.E., 2013. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nature Medicine* 19:1338–1344.
- [6] Cinti, S., 2009. Transdifferentiation properties of adipocytes in the adipose organ. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 297: E977–E986.
- [7] Rosenwald, M., Perdikari, A., Rulicke, T., Wolfrum, C., 2013. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nature Cell Biology* 15:659–667.
- [8] Cypess, A.M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A.B., et al., 2009. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *New England Journal of Medicine* 360:1509–1517.
- [9] Nedergaard, J., Bengtsson, T., Cannon, B., 2007. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 293:E444–E452.
- [10] van Marken Lichtenbelt, W.D., Vanhommerig, J.W., Smulders, N.M., Drossaerts, J.M., Kemerink, G.J., Bouvy, N.D., et al., 2009. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *New England Journal of Medicine* 360: 1500–1508.
- [11] Virtanen, K.A., Lidell, M.E., Orava, J., Heglund, M., Westergren, R., Niemi, T., et al., 2009. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *New England Journal of Medicine* 360:1518–1525.
- [12] Zingaretti, M.C., Crosta, F., Vitali, A., Guerrieri, M., Frontini, A., Cannon, B., et al., 2009. The presence of UCP1 demonstrates that metabolically active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue. *FASEB Journal* 23:3113–3120.
- [13] Elabd, C., Chiellini, C., Carmona, M., Galitzky, J., Cochet, O., Petersen, R., et al., 2009. Human multipotent adipose-derived stem cells differentiate into functional brown adipocytes. *Stem Cells* 27:2753–2760.

- [14] Pisani, D.F., Djedaini, M., Beranger, G.E., Elabd, C., Scheideler, M., Ailhaud, G., et al., 2011. Differentiation of human adipose-derived stem cells into "Brite" (Brown-in-White) adipocytes. *Frontiers in Endocrinology* 2:87.
- [15] Negrel, R., Gaillard, D., Ailhaud, G., 1989. Prostacyclin as a potent effector of adipose-cell differentiation. *Biochemical Journal* 257:399–405.
- [16] Reginato, M.J., Krakow, S.L., Bailey, S.T., Lazar, M.A., 1998. Prostaglandins promote and block adipogenesis through opposing effects on peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Journal of Biological Chemistry* 273:1855–1858.
- [17] Massiera, F., Saint-Marc, P., Seydoux, J., Murata, T., Kobayashi, T., Narumiya, S., et al., 2003. Arachidonic acid and prostacyclin signaling promote adipose tissue development: a human health concern? *Journal of Lipid Research* 44:271–279.
- [18] Liu, L., Clipstone, N.A., 2007. Prostaglandin F2alpha inhibits adipocyte differentiation via a G alpha q-calcium-calciueurin-dependent signaling pathway. *Journal of Cellular Biochemistry* 100:161–173.
- [19] Ueno, T., Fujimori, K., 2011. Novel suppression mechanism operating in early phase of adipogenesis by positive feedback loop for enhancement of cyclooxygenase-2 expression through prostaglandin F2alpha receptor mediated activation of MEK/ERK-CREB cascade. *FEBS Journal* 278:2901–2912.
- [20] Vassaux, G., Gaillard, D., Darimont, C., Ailhaud, G., Negrel, R., 1992. Differential response of preadipocytes and adipocytes to prostacyclin and prostaglandin E2: physiological implications. *Endocrinology* 131:2393–2398.
- [21] Mater, M.K., Pan, D., Bergen, W.G., Jump, D.B., 1998. Arachidonic acid inhibits lipogenic gene expression in 3T3-L1 adipocytes through a prostanoid pathway. *Journal of Lipid Research* 39:1327–1334.
- [22] Borglum, J.D., Pedersen, S.B., Ailhaud, G., Negrel, R., Richelsen, B., 1999. Differential expression of prostaglandin receptor mRNAs during adipose cell differentiation. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* 57:305–317.
- [23] Ailhaud, G., Massiera, F., Weill, P., Legrand, P., Alessandri, J.M., Guesnet, P., 2006. Temporal changes in dietary fats: role of n-6 polyunsaturated fatty acids in excessive adipose tissue development and relationship to obesity. *Progress in Lipid Research* 45:203–236.
- [24] Muhlhauser, B.S., Ailhaud, G.P., 2013. Omega-6 polyunsaturated fatty acids and the early origins of obesity. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity* 20:56–61.
- [25] Donahue, S.M., Rifas-Shiman, S.L., Gold, D.R., Jouni, Z.E., Gillman, M.W., Oken, E., 2011. Prenatal fatty acid status and child adiposity at age 3 y: results from a US pregnancy cohort. *American Journal of Clinical Nutrition* 93:780–788.
- [26] Moon, R.J., Harvey, N.C., Robinson, S.M., Ntani, G., Davies, J.H., Inskip, H.M., et al., 2013. Maternal plasma polyunsaturated fatty acid status in late pregnancy is associated with offspring body composition in childhood. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 98:299–307.
- [27] Inoue, K., Kishida, K., Hirata, A., Funahashi, T., Shimomura, I., 2013. Low serum eicosapentaenoic acid/arachidonic acid ratio in male subjects with visceral obesity. *Nutrition & Metabolism (Lond)* 10:25.
- [28] Savva, S.C., Chadigeorgiou, C., Hatzis, C., Kyriakakis, M., Tsimbinos, G., Tornaritis, M., et al., 2004. Association of adipose tissue arachidonic acid content with BMI and overweight status in children from Cyprus and Crete. *British Journal of Nutrition* 91:643–649.
- [29] Williams, E.S., Baylin, A., Campos, H., 2007. Adipose tissue arachidonic acid and the metabolic syndrome in Costa Rican adults. *Clinical Nutrition* 26:474–482.
- [30] Claria, J., Nguyen, B.T., Madenci, A.L., Ozaki, C.K., Serhan, C.N., 2013. Diversity of lipid mediators in human adipose tissue depots. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 304:C1141–C1149.
- [31] Rodriguez, A.M., Elabd, C., Delteil, F., Astier, J., Vernochet, C., Saint-Marc, P., et al., 2004. Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 315:255–263.
- [32] Rodriguez, A.M., Pisani, D., Dechesne, C.A., Turc-Carel, C., Kurzenne, J.Y., Wdziekonski, B., et al., 2005. Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *Journal of Experimental Medicine* 201:1397–1405.
- [33] Zaragosi, L.E., Ailhaud, G., Dani, C., 2006. Autocrine fibroblast growth factor 2 signaling is critical for self-renewal of human multipotent adipose-derived stem cells. *Stem Cells* 24:2412–2419.
- [34] Negrel, R., Grimaldi, P., Ailhaud, G., 1978. Establishment of preadipocyte clonal line from epididymal fat pad of ob/ob mouse that responds to insulin and to lipolytic hormones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75:6054–6058.
- [35] Le Faouder, P., Baillif, V., Spreadbury, I., Motta, J.P., Rousset, P., Chene, G., et al., 2013. LC-MS/MS method for rapid and concomitant quantification of pro-inflammatory and pro-resolving polyunsaturated fatty acid metabolites. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 932:123–133.
- [36] Klingenspor, M., Ivemeyer, M., Wiesinger, H., Haas, K., Heldmaier, G., Wiesner, R.J., 1996. Biogenesis of thermogenic mitochondria in brown adipose tissue of Djungarian hamsters during cold adaptation. *Biochemical Journal* 316(Pt 2):607–613.
- [37] Vegiopoulos, A., Muller-Decker, K., Strzoda, D., Schmitt, I., Chichelnitskiy, E., Ostertag, A., et al., 2010. Cyclooxygenase-2 controls energy homeostasis in mice by de novo recruitment of brown adipocytes. *Science* 328:1158–1161.
- [38] Garcia, B., Martinez-de-Mena, R., Obregon, M.J., 2012. Arachidonic acid stimulates DNA synthesis in brown preadipocytes through the activation of protein kinase C and MAPK. *Biochimica et Biophysica Acta* 1821:1309–1315.
- [39] Garcia-Alonso, V., Lopez-Vicario, C., Titos, E., Moran-Salvador, E., Gonzalez-Periz, A., Rius, B., et al., 2013. Coordinate functional regulation between microsomal prostaglandin synthase-1 (mPGES-1) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in the conversion of white-to-brown adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 288:28230–28242.
- [40] Madsen, L., Pedersen, L.M., Lillefosse, H.H., Fjaere, E., Bronstad, I., Hao, Q., et al., 2010. UCP1 induction during recruitment of brown adipocytes in white adipose tissue is dependent on cyclooxygenase activity. *PLoS One* 5:e11391.
- [41] Alhouayek, M., Muccioli, G.G., 2014. COX-2-derived endocannabinoid metabolites as novel inflammatory mediators. *Trends in Pharmacological Sciences* 35:284–292.
- [42] Kringelholm, S., Simonsen, U., Bek, T., 2013. Dual effect of prostaglandins on isolated intraocular porcine ciliary arteries. *Acta Ophthalmologica* 91:498–504.
- [43] Hu, R., He, M.L., Hu, H., Yuan, B.X., Zang, W.J., Lau, C.P., et al., 2009. Characterization of calcium signaling pathways in human preadipocytes. *Journal of Cellular Physiology* 220:765–770.
- [44] Kawano, S., Shoji, S., Ichinose, S., Yamagata, K., Tagami, M., Hiraoka, M., 2002. Characterization of Ca(2+) signaling pathways in human mesenchymal stem cells. *Cell Calcium* 32:165–174.
- [45] Shi, H., Halvorsen, Y.D., Ellis, P.N., Wilkison, W.O., Zemel, M.B., 2000. Role of intracellular calcium in human adipocyte differentiation. *Physiological Genomics* 3:75–82.
- [46] Hardy, R.W., Ladenson, J.H., Hruska, K.A., Jiwa, A.H., McDonald, J.M., 1992. The effects of extracellular calcium and epinephrine on cytosolic-free calcium in single rat adipocytes. *Endocrinology* 130:3694–3702.
- [47] Turovsky, E.A., Turovskaya, M.V., Dolgacheva, L.P., Zinchenko, V.P., Dynnik, V.V., 2013. Acetylcholine promotes Ca2+ and NO-oscillations in adipocytes implicating Ca2+→NO→cGMP→cADP-ribose→Ca2+ positive feedback loop—modulatory effects of norepinephrine and atrial natriuretic peptide. *PLoS One* 8:e63483.
- [48] Ye, L., Kleiner, S., Wu, J., Sah, R., Gupta, R.K., Banks, A.S., et al., 2012. TRPV4 is a regulator of adipose oxidative metabolism, inflammation, and energy homeostasis. *Cell* 151:96–110.

- [49] Tertyshnikova, S., Yan, X., Fein, A., 1998. cGMP inhibits IP3-induced Ca<sup>2+</sup> release in intact rat megakaryocytes via cGMP- and cAMP-dependent protein kinases. *Journal of Physiology* 512(Pt 1):89–96.
- [50] Chen, Y.Y., Lee, M.H., Hsu, C.C., Wei, C.L., Tsai, Y.C., 2012. Methyl cinnamate inhibits adipocyte differentiation via activation of the CaMKK2-AMPK pathway in 3T3-L1 preadipocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60:955–963.
- [51] Fujimori, K., Ueno, T., Nagata, N., Kashiwagi, K., Aritake, K., Amano, F., et al., 2010. Suppression of adipocyte differentiation by aldo-keto reductase 1B3 acting as prostaglandin F<sub>2</sub>alpha synthase. *Journal of Biological Chemistry* 285: 8880–8886.
- [52] Neal, J.W., Clipstone, N.A., 2002. Calcineurin mediates the calcium-dependent inhibition of adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Journal of Biological Chemistry* 277:49776–49781.
- [53] Jabbour, H.N., Sales, K.J., Boddy, S.C., Anderson, R.A., Williams, A.R., 2005. A positive feedback loop that regulates cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin F<sub>2</sub>alpha synthesis via the F-series-prostanoid receptor and extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathway. *Endocrinology* 146:4657–4664.
- [54] Floyd, Z.E., Stephens, J.M., 2002. Interferon-gamma-mediated activation and ubiquitin-proteasome-dependent degradation of PPARgamma in adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 277:4062–4068.
- [55] Fjaere, E., Aune, U.L., Roen, K., Keenan, A.H., Ma, T., Borkowski, K., et al., 2014. Indomethacin treatment prevents high fat diet-induced obesity and insulin resistance but not glucose intolerance in C57BL/6J mice. *Journal of Biological Chemistry* 289:16032–16045.
- [56] Lee, Y.H., Petkova, A.P., Granneman, J.G., 2013. Identification of an adipogenic niche for adipose tissue remodeling and restoration. *Cell Metabolism* 18: 355–367.

## Discussion 2

Dans l'article 2, nous avons démontré l'effet inhibiteur de l'ARA, et donc de la voie des COXs, sur la conversion des adipocytes blancs en adipocytes bruns *in vitro* et *in vivo* chez l'Homme et la souris. Nos résultats semblent être en désaccord avec les données de la littérature (Madsen et al., 2010b; Vegiopoulos et al., 2010b). Cependant une analyse approfondie des résultats et des modèles utilisés permet de mieux interpréter les différences de conclusions. Ces différences de conclusion sur le rôle de la voie des COXs pouvaient être dues aux différences entre les modèles murins et cellulaires utilisées. En plus de la différence d'espèce, le rôle de cette voie dans le développement du TAB semble vraiment dépendant du fond génétique. En effet, les travaux de Vegiopoulos et de Madsen étaient basés sur l'utilisation de souris 129Sv, qui est une souche résistante à l'obésité (Vegiopoulos et al., 2010b). Dans ces études, les auteurs démontraient que l'induction de l'expression d'UCP1 au niveau du TAB des souris 129Sv était dépendante de l'activité des COXs (Madsen et al., 2010b). De manière intéressante, l'équipe de Lise Madsen démontre quelques années plus tard que la voie des COXs possède un effet inhibiteur sur le recrutement des adipocytes bruns en utilisant cette fois des souris C57BL/6, une souche plutôt sensible à la prise de poids. Dans ce travail, ils montrent que l'inhibition de l'activité des COXs par l'indométacine limite le développement de l'obésité chez ces souris quand elles sont soumises à un régime riche en lipide et en sucre, et que ceci était entre autre dû à une augmentation du recrutement des adipocytes bruns dans le TAB (Fjære et al., 2014). Cette observation est en accord avec nos propres résultats obtenus chez les souris C57BL/6, où l'induction du brunissage du TAB par un agoniste des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques est accompagné par une inhibition de l'expression et de l'activité de COX2 (article n.2).

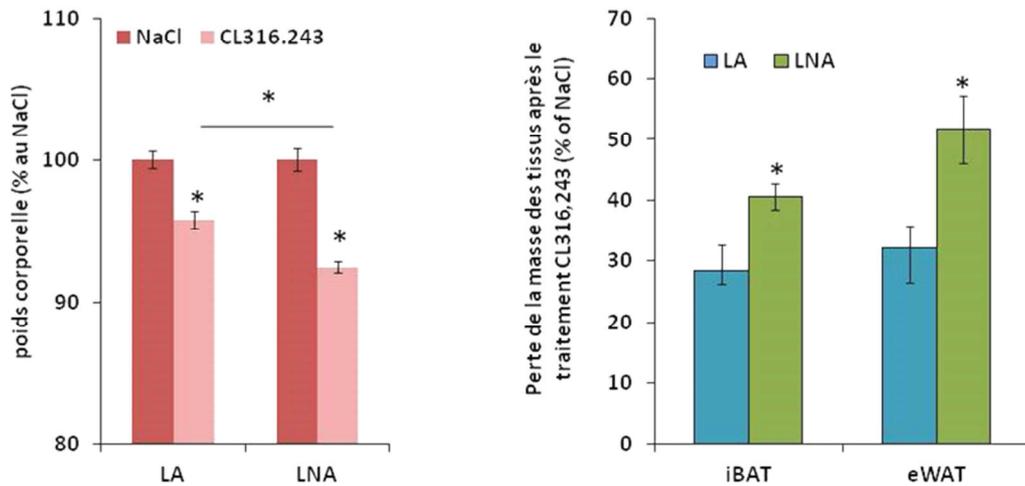
A la suite de ce travail, et connaissant l'existence de plusieurs niveaux de compétition entre les AGPIs  $\omega 6$  et  $\omega 3$ , nous avons voulu étudier si une supplémentation alimentaire en LNA, EPA et DHA pouvait contrebalancer l'effet inhibiteur des AGPIs  $\omega 6$ , sur le recrutement et la fonction des adipocytes bruns et bruns. Dans ce but, nous avons réalisé une expérience dans laquelle deux groupes de souris (C57BL/6J) mâles âgés de six semaines ont été soumis, pour 12 semaines, à un régime alimentaire standard contenant environ 4% de lipides

supplémenté par 1.5% de lipides contenant des proportions variables d'esters éthyliques d'AG (LA, LNA, DHA et EPA) de telle sorte à obtenir un ratio  $\omega_6/\omega_3$  de **4** (répondant aux recommandations nutritionnelles avec supplémentation en EPA et DHA) et de **30** (représentant le ratio déséquilibré trouvé dans plusieurs aliments sans supplémentation en EPA et DHA). Dans les deux cas, les régimes sont isocaloriques et la quantité totale de lipides correspond à 16% de l'apport énergétique. Parmi cet apport en lipides, celui du LA est fixe et seul l'apport en AGPIs  $\omega_3$  (LNA, EPA et DHA) est variable entre les deux régimes. L'ajustement de la quantité de lipides est fait par l'ester d'acide oléique, du fait que ce dernier est incapable de moduler la synthèse des éicosanoïdes.

### Composition des régimes

- 1- ratio  $\omega_6/\omega_3 = 30$  : régime standard 2016 Harlan (LA 2.5% et LNA 0.1%) + ester éthylique LA 0.5% + ester éthylique d'OA 0.7% (total AGI de 3.3%).
- 2- ratio  $\omega_6/\omega_3 \approx 4$  : régime standard 2016 Harlan (LA 2.5% et LNA 0.1%) + ester éthylique LA 0.5% + ester éthylique LNA 0.54% + ester éthylique EPA 0.08% + ester éthylique DHA 0.08% (total AGI d'environ 3.3%).

Après 11 semaines de régime, à thermoneutralité, la moitié des souris de chaque groupe ont été traitées une semaine par un agoniste des récepteurs  $\beta_3$ -adrénergiques (CL312,243 à 1mg/Kg/jours, injections intrapéritoniale), ou par le véhicule seul (NaCl 0.9%). L'activation des récepteurs  $\beta_3$ -adrénergiques sert à stimuler l'apparition des adipocytes bruns au sein du TAB et pour activer le TABr. Au cours de l'expérience, aucune différence ni de prise de poids, ni de prise alimentaire n'a été détectée. Par contre, après la dernière semaine de traitement, une diminution du poids corporel a été observée entre les groupes traités par le véhicule et ceux traités par le CL312,243. Cette diminution est due à l'activation des voies  $\beta$ -adrénergiques qui activent la thermogénèse dans les adipocytes bruns et bruns. Cette activation amène à la consommation des AGs stockés dans ces adipocytes, puis des AGs stockés dans les tissus périphériques tel que le TAB intra-abdominal. Cette consommation en AGs est confirmée par la diminution de la masse des TABr et TAB épидидymaire suite au traitement des souris par le CL312,243. (Figure 40)



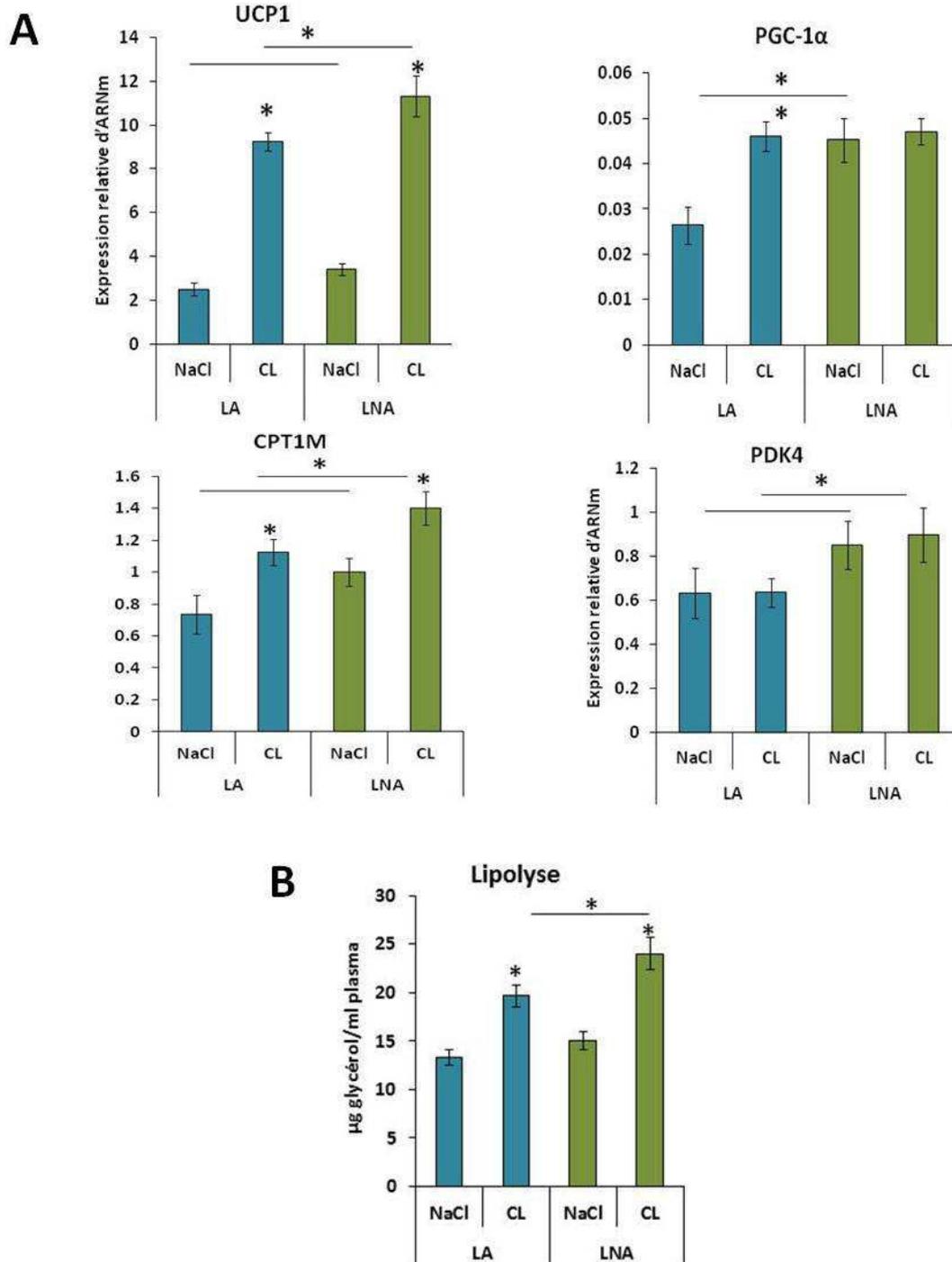
**Figure 40. Poids corporel et perte de la masse des dépôts adipeux des groupes de souris nourries par un régime riche en LA ou en LNA et traités ou pas par le CL316,243.** A gauche : Le poids corporel des souris est représenté en considérant la moyenne des poids des souris traités par le NaCl de chaque groupe comme 100. A droite : la perte de la masse des dépôts adipeux interscapulaire (iBAT) et épидидymaire (eWAT) suite au traitement des souris par le CL316,243. Les résultats représentent la moyenne de 12 souris différentes et  $*=P<0.05$ .

D'une manière intéressante, nous avons constaté que cette perte de poids corporelle et de la masse des TA était plus importante chez le groupe de souris nourrit par le régime riche en LNA (faible ratio  $\omega_6/\omega_3$ ). Ce résultat pourrait être expliqué par une activité thermogénique plus importante chez les souris nourries avec le régime alimentaire le plus équilibré en AGPIs.

Pour évaluer l'effet des deux régimes alimentaires sur le recrutement et l'activation des adipocytes bruns et bruns, nous avons réalisé une analyse moléculaire et histologique du TAB SC et du TABr interscapulaire. A l'inverse de nos attentes, aucune différence n'est remarquée au niveau du TAB SC entre les deux groupes de régime. Par contre, nous avons constaté des différences remarquables au niveau du TABr interscapulaire, avec une augmentation de l'expression d'UCP1 chez les souris nourries par le régime riche en LNA et que ce soit en présence ou en absence d'une stimulation par le CL316,243. Cette augmentation d'UCP1 est accompagnée par une augmentation du phénotype oxydatif du TABr, caractérisé par l'augmentation de l'expression de PGC1 $\alpha$ , CPT1M et PDK4 (**figure 41**). L'ensemble de ces données est caractéristique d'une augmentation de la consommation en

AGs du TABr et corrèle bien avec la plus grande diminution de la masse de ce tissu. Un autre paramètre est en accord avec l'activité accrue du TABr, il s'agit des taux de glycérol plasmatique caractéristiques de l'activité lipolytique des TA. Ces taux de glycérol sont plus importants, comme attendu dans les groupes traités par le CL316,243 comparé à ceux traités par le NaCl, mais aussi plus importants chez les souris nourries par le régime à faible ratio  $\omega 6/\omega 3$  (**figure 41**).

De plus, l'analyse histologique des tissus confirme que le TABr des souris nourries par le régime avec un ratio AGPIs  $\omega 6/\omega 3$  de 4 présente des adipocytes bruns plus actifs que celui des souris nourries par le régime où le ratio  $\omega 6/\omega 3$  est de 30. Ces adipocytes sont caractérisés par des vésicules lipidiques de plus petite taille (**figure 42**). Cette observation présente dans les conditions basales, est encore plus remarquable dans les conditions activées par le CL316,243. Afin de valider ces observations, des marquages immunohistochimiques de la PLIN et de l'UCP1 demeurent néanmoins nécessaires.



**Figure 41. Effet des différents régimes alimentaires sur l'expression des gènes au niveau du tissu adipeux brun et sur la lipolyse chez la souris.** A : Expression relative de l'ARNm d'UCP1, PGC-1α CPT1M et PDK4 mesurée par PCR quantitative. Les résultats sont rapportés à l'expression de 36B4 et exprimés en valeur de  $2^{-\Delta CT}$  (moyenne +/- SEM, n=12, \*=P<0.05). B-Lipolyse mesurée par le taux de glycérol plasmatique et représenté en  $\mu\text{g}$  glycérol/ml plasma. (moyenne +/- SEM, n=12, \*=P<0.05).

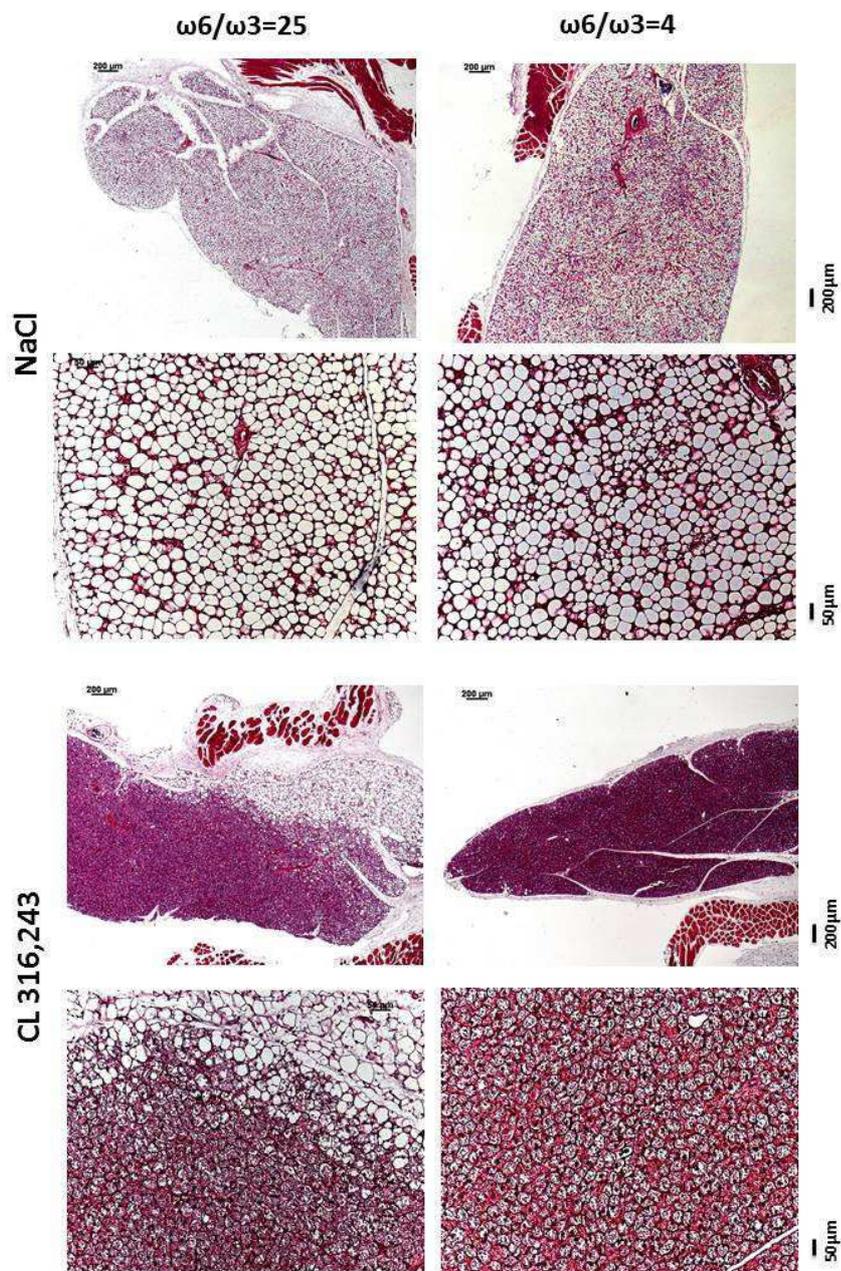


Figure 42. Analyse histologique du tissu adipeux brun des souris nourries par un régime riche en LA ou en LNA traitées ou pas par le CL316,243. Coupes histologiques du TABr colorées par l'éosine/hématoxyline et observées par microscopie optique

Nous avons montré précédemment que l'effet inhibiteur de l'ARA  $\omega 6$  sur la conversion des adipocytes blancs en brites *in vitro* et *in vivo* est du essentiellement à son métabolite PGF2 $\alpha$  et en partie à PGE2, secrétées au niveau du TAB SC des souris nourries par un régime riche en ARA. En outre, nous avons vu précédemment qu'il existe une compétition entre les AGPIs  $\omega 3$  et  $\omega 6$  à différents niveaux y compris celui des enzymes de synthèse des éicosanoïdes (voir chapitre 7 : notion de compétition entre les AGPIs). En plus, il a été démontré que les AGPIs  $\omega 3$  diminuent l'inflammation induite par les PGs issus des AGPIs  $\omega 6$  dans le cadre de l'obésité (Itariu et al., 2012; Kalupahana et al., 2011).

De ce fait, une supplémentation alimentaire en AGPIs  $\omega 3$  sans modification de la quantité des AGPIs  $\omega 6$ , en d'autre terme un régime avec un bas ratio  $\omega 6/\omega 3$ , pourrait altérer le métabolisme des AGPIs  $\omega 6$  et moduler ainsi le taux et le type d'éicosanoïdes synthétisés au niveau du TA. Afin de savoir si l'effet du régime riche en LNA sur l'activation du TABr est dû à une modification des éicosanoïdes, et des autres métabolites oxygénés des AGs, synthétisés au niveau de ce tissu, une analyse métabolomique des TABr des deux groupes de souris est en cours de réalisation.

Les résultats, encore incomplets, de cette étude démontrent qu'un régime riche en AGPIs  $\omega 3$ , où le ratio  $\omega 6/\omega 3$  respecte les recommandations nutritionnelles, permet d'améliorer l'activité du TABr, et donc suppose d'une meilleure résistance à la prise de poids.

En conclusion, l'ensemble de nos résultats concernant l'ARA  $\omega 6$  montrent que l'effet de cet AG sur le développement de l'obésité chez l'homme comme chez les rongeurs, ne se limite pas à l'activation de l'adipogenèse qui se reflète par une hyperplasie adipocytaire, mais aussi à son effet inhibiteur de la conversion des adipocytes blancs en brites. Cette inhibition déséquilibre d'autant plus la balance énergétique car elle correspond à une diminution de l'utilisation des TGs en faveur de leur stockage, ce qui se traduit par une hypertrophie du TA. Cet effet des AGPIs  $\omega 6$  et plus particulièrement de l'ARA ainsi que l'effet du ratio  $\omega 6/\omega 3$  dans le cadre de l'obésité seront discutés dans la revue qui suit et qui est sous presse au journal francophone « Obésité ».



**Revue:**

**Acide arachidonique et prostaglandines: impact sur la formation des adipocytes blancs, bruns et brites.**



# Acide arachidonique et prostaglandines : impact sur la formation des adipocytes blancs, bruns et brites/beiges

## Arachidonic acid and prostaglandins: impact on white, brown and brite/beige adipocyte formation

R. A. Ghandour · D. F. Pisani · E.-Z. Amri

© Lavoisier SAS 2016

**Résumé** Les adipocytes blancs stockent et libèrent l'énergie à la demande alors que les adipocytes brites (ou beiges) et bruns la dissipent sous forme de chaleur. Nous décrivons ici les effets de l'acide arachidonique (ARA) et de ses métabolites sur la formation de ces adipocytes, en mettant en avant la complexité et la dualité de ces effets. Ces données démontrent l'importance de la biodisponibilité de l'ARA dans la biologie du tissu adipeux et les pathologies qui lui sont associées.

**Mots clés** Acides gras · Prostacycline · PGF2 $\alpha$  · PGE2 · Adipogenèse

**Abstract** White adipocytes store and release energy upon request whereas brown and brite (or beige) adipocytes dissipate it as heat. Herein, we describe the effects of arachidonic acid (ARA) and its metabolites on the formation of white and brites adipocytes, highlighting the complexity and duality of these effects. These observations demonstrate the importance of the bioavailability of ARA in the adipose tissue biology and its associated diseases.

**Keywords** Fatty acids · Prostacyclin · PGF2 $\alpha$  · PGE2 · Adipogenesis

## Introduction

L'obésité résulte d'un déséquilibre de la balance énergétique dans laquelle l'augmentation des apports énergétiques est accompagnée par une diminution de leurs dépenses. Le tissu adipeux représente un acteur majeur dans le contrôle de cette homéostasie. Au cours des dernières décennies, une relation entre la qualité des acides gras polyinsaturés provenant de l'alimentation et l'obésité a pu être mise en évidence et montre l'importance d'étudier leurs effets sur la biologie du tissu adipeux [1].

## Adipocytes thermogéniques et obésité

L'organe adipeux peut être divisé en deux types de tissus: le tissu adipeux blanc (TAB) et le tissu adipeux brun (TABr). Les adipocytes blancs du TAB stockent les lipides sous forme de triglycérides et vont pouvoir libérer les acides gras sous certains stimuli, tel lors d'un jeûne, pour servir de substrat énergétique à d'autres tissus. Par contre, le TABr, composé d'adipocytes bruns possédant une activité thermogénique, régule la température corporelle en dissipant les lipides et les glucides sous forme de chaleur et joue ainsi un rôle important dans la dépense d'énergie. Ce processus de thermogenèse est dû principalement à la présence et à l'activité de la protéine découplante UCP1 [2]. Cette protéine est cruciale pour la dépense d'énergie car elle dissipe le gradient de protons mitochondrial et permet ainsi de découpler l'activité de la chaîne respiratoire de la synthèse d'ATP. Pour compenser la diminution d'activité de l'ATP-synthase qui en résulte, la mitochondrie augmente son activité de phosphorylation oxydative et donc d'utilisation de substrats énergétiques. L'accroissement des activités enzymatiques mitochondriales va alors entraîner la production de chaleur caractérisant la fonction thermogénique des adipocytes bruns.

R. A. Ghandour · D. F. Pisani · E.-Z. Amri (✉)  
Univ. Nice Sophia Antipolis, iBV, UMR 7277, 06100 Nice,  
France; Faculté de Médecine ; 28 av. de Valombrose 06107 Nice  
cedex 2, France  
e-mail : amri@unice.fr

CNRS, iBV UMR 7277, 06100 Nice, France

Inserm, iBV, U1091, 06100 Nice, France

Chez les rongeurs, chez qui le TABr est bien décrit depuis longtemps, il a été montré que l'expression et l'activité d'UCP1 sont induites en réponse à une exposition au froid par stimulation de la voie  $\beta$ -adrénergique (thermogenèse non frissonnante en réponse au froid), ou après la prise alimentaire (thermogenèse postprandiale). Chez l'homme, on pensait que le TABr n'était présent que chez le nouveau-né et que sa contribution était négligeable dans la dépense énergétique chez l'adulte. Au cours de la dernière décennie, plusieurs laboratoires ont montré que les adultes sains présentent des îlots d'adipocytes bruns thermogéniques avec un réel impact métabolique [3]. L'activité de ces adipocytes, mise en évidence par une exposition au froid et mesurée par absorption de 18F-fluorodeoxyglucose (PET-Scan), est reliée de manière inverse à l'indice de masse corporelle (IMC) [4-7]. Ces observations sont en accord avec d'autres données récentes qui indiquent que l'absence d'adipocytes bruns est un facteur favorisant le développement de l'obésité non seulement chez les rongeurs, mais également chez l'homme [6,8].

Sous certaines conditions, on observe au sein du TAB, plus particulièrement le TAB sous-cutané, la présence d'adipocytes thermogéniques appelés adipocytes brites (« brown in white ») ou beiges. Ces adipocytes brites, tout comme les adipocytes bruns, sont en mesure d'utiliser des lipides et des glucides pour participer à la thermogenèse non frissonnante [9-12]. À l'inverse des adipocytes bruns déjà présents dans le TABr et inactifs à la thermoneutralité (28-30°C pour la souris), les adipocytes brites semblent être absents dans ces mêmes conditions et doivent être recrutés puis activés pour participer à la thermogenèse. Ces adipocytes brites recrutés peuvent provenir à la fois de la différenciation de progéniteurs présents au sein du tissu, ou de la conversion/transdifférenciation des adipocytes blancs matures en adipocytes brites (Fig. 1). L'identification des progéniteurs des adipocytes brites reste encore controversée. Ces progéniteurs pourraient être les mêmes que ceux des adipocytes blancs et l'engagement dans la voie de différenciation serait alors différent, ou ils pourraient être distincts et correspondre à ceux des préadipocytes bruns en présentant un progéniteur embryonnaire commun avec les cellules musculaires [13]. La conversion des adipocytes blancs matures semble quant à elle responsable de la formation d'une grande partie des adipocytes brites et reste un phénomène réversible (Fig. 1) [9,14-15]. Une étude récente pourrait concilier les différentes voies (conversion vs. différenciation) de formation des adipocytes brites ainsi caractérisés. En effet, Vishvanath et al. démontrent que lors d'une exposition au froid, le recrutement des adipocytes brites dans le tissu adipeux sous-cutané de souris se fait en deux vagues distinctes [16]. Lors de la deuxième semaine d'exposition au froid, il y a un recrutement d'adipocytes brites qui proviennent de la différenciation de progéniteurs adipocytaires PDGFR $\beta$ <sup>pos</sup>/ZFP423<sup>pos</sup>,

apparentés aux péricytes de la paroi endothéliale. Ce phénomène n'a pas été observé lors de la première semaine d'exposition au froid. Les adipocytes brites apparaissant à ce moment-là pourraient alors provenir de la conversion d'adipocytes blancs matures. Il y aurait donc une première réponse au froid où les adipocytes blancs se convertissent rapidement en adipocytes brites puis, si l'exposition se prolonge, une mobilisation de précurseurs « brites » afin d'augmenter la réponse thermogénique.

Indépendamment de leur origine, ces adipocytes brites peuvent jouer un rôle très important dans la lutte contre l'obésité, comme cela est déjà démontré chez la souris où leur recrutement au niveau du TAB sous-cutané augmente la capacité de l'animal à lutter contre la prise de poids et les désordres métaboliques associés [17]. Chez l'homme, en se basant sur leur signature moléculaire établie chez les rongeurs, on retrouve à la fois des adipocytes bruns mais aussi des adipocytes brites selon leur localisation anatomique [18-20]. De plus, les données obtenues à partir de cultures primaires en utilisant des précurseurs provenant du TAB humain montrent clairement la capacité des adipocytes blancs obtenus *in vitro* à se convertir en adipocytes brites fonctionnels [21].

En résumé, ces données permettent d'explorer de nouvelles voies thérapeutiques basées sur l'utilisation des adipocytes thermogéniques bruns et brites comme acteurs clés dans la modulation de la dépense énergétique, *via* l'utilisation accrue de lipides et de glucides, et donc dans le contrôle de la masse corporelle [22].

## Acides gras polyinsaturés essentiels et obésité

Les lipides d'origine alimentaire sont la source des acides gras polyinsaturés (AGPI) essentiels tels que l'acide linoléique  $\omega$ 6 (LA), précurseur de l'acide arachidonique (ARA), et l'acide  $\alpha$ -linoléique  $\omega$ 3 (LNA), précurseur de l'acide docosahexaénoïque (DHA) et l'acide eicosapentaénoïque (EPA). Au cours des dernières décennies, la disponibilité de ces acides gras a évolué en même temps que l'offre alimentaire et il a été démontré que leur impact sur la santé humaine ne dépend pas uniquement de leur quantité, mais surtout de la qualité de cet apport, particulièrement en relation avec les proportions en AGPI  $\omega$ 6 et  $\omega$ 3 [1,23]. Alors que la quantité d'AGPI  $\omega$ 6 dans l'alimentation quotidienne a augmenté avec l'industrialisation représentant actuellement près de 85 % de la totalité des apports en AGPI, la consommation d'AGPI  $\omega$ 3 n'a pas varié, voire même diminué. L'impact physiologique de ces changements a longtemps été ignoré jusqu'à ce que des études chez les rongeurs aient montré entre autres que 1) un régime alimentaire riche en AGPI  $\omega$ 6 et pauvre en  $\omega$ 3 induisait un surpoids [24] et que 2) l'exposition périnatale à un régime alimentaire riche en

AGPI  $\omega 6$  induisait une accumulation progressive de la masse grasse corporelle au cours des générations [25]. De la même manière que chez la souris, des études épidémiologiques chez l'homme ont pu mettre en évidence une relation étroite entre la présence de niveaux élevés d'AGPIs  $\omega 6$  dans le lait maternel et l'obésité infantile d'une part [23,26], et une corrélation positive entre le contenu spécifique en ARA du TAB et l'IMC d'autre part [27]. Enfin, il a été montré qu'une alimentation riche en AGPI  $\omega 6$ , et donc ayant un rapport  $\omega 6/\omega 3$  élevé, constituait un facteur de risque de développement des maladies cardiovasculaires, auto-immunes et de certains cancers [28]. Par ailleurs, les AGPI  $\omega 6$  et  $\omega 3$  sont métabolisés, entre autres dans le tissu adipeux, en éicosanoïdes respectivement pro- et anti-inflammatoires. L'obésité pouvant être associée à une inflammation chronique de bas grade du TAB, représentant un facteur de risque important du diabète de type 2, il devient alors évident d'établir une relation entre l'apport en AGPI et le statut inflammatoire du TAB. L'ensemble de ces données sont en faveur de l'existence d'un lien de causalité entre la qualité/quantité des AGPI et le développement de l'obésité.

L'ARA est un des AGPI  $\omega 6$  les plus importants dans l'homéostasie énergétique ainsi que dans la mise en place de l'inflammation. En effet, cet acide gras est un précurseur majeur d'éicosanoïdes au sein du tissu adipeux (Fig. 2). Sa métabolisation par les voies cyclooxygénases (COX-1 et -2) va permettre la synthèse de prostanoides, tels que des prostaglandines, de la prostacycline et des thromboxanes, tandis qu'il va être métabolisé en leucotriènes *via* la voie des lipoxygénases (5- et 15-LOX). L'ensemble de ces métabolites joue un rôle important dans le statut inflammatoire, mais aussi dans le développement du TAB. Les prostaglandines de la série 2 sont particulièrement intéressantes car, en plus de leurs caractéristiques pro-inflammatoires, elles sont impliquées dans divers aspects de l'adipogenèse et de la fonction des adipocytes.

### Acide arachidonique et formation d'adipocytes blancs

Il a été montré que le traitement des préadipocytes murins Ob1771 par l'ARA  $\omega 6$ , mais pas par les AGPI  $\omega 3$ , induisait leur différenciation adipocytaire [29,30]. L'effet pro-adipogénique de l'ARA était dû à un ou plusieurs de ses métabolites puisque l'utilisation d'inhibiteurs de cyclooxygénases bloquait l'effet positif sur la formation d'adipocytes. Cette observation a été confirmée par le fait que le traitement de ces préadipocytes par la carbaprostacycline (cPGI2), un analogue stable de la prostacycline, mimait l'effet de l'ARA. La carbaprostacycline est capable, entre autre, d'activer son récepteur membranaire IP-R qui est couplé à une protéine Gs activatrice de la voie PKA (Figs 2, 3). Il a pu être montré que

l'ARA et la cPGI2 induisaient une élévation du taux intracellulaire d'AMPc dans les préadipocytes en voie de différenciation représentant un événement clé dans l'initiation de la différenciation adipocytaire [31]. En conclusion, l'effet pro-adipogénique de l'ARA était dû à sa métabolisation, par les cyclooxygénases, en prostacycline capable d'activer son propre récepteur membranaire IP-R; cette interaction conduisait à une élévation des niveaux d'AMPc intracellulaire permettant *in fine* l'expression de gènes responsables de l'adipogenèse (Fig 3) [29-31]. Il est à noter que PGI2, comme le  $\Delta 5$ -PGJ2 [32] qui est un métabolite de PGD2, est capable de lier et d'activer les récepteurs nucléaires de la famille des PPARs et plus particulièrement PPAR $\gamma$  qui est considéré comme le régulateur le plus important de l'adipogenèse. Cette capacité pourrait alors être impliquée dans les effets pro-adipogéniques de l'ARA.

Les effets pro-adipogéniques de l'ARA et de son métabolite cPGI2 ont pu être validés chez l'Homme en utilisant des modèles cellulaires comme les cellules souches mésenchymateuses issues du tissu adipeux de donneurs jeunes sains, les cellules hMADS (human Multipotent Adipose Derived Stem). Ces cellules sont capables de se différencier, entre autres, en adipocytes blancs fonctionnels et nécessitent une augmentation des niveaux d'AMPc dans les 2 premiers jours de différenciation [33]. Cette augmentation des niveaux d'AMPc est induite grâce à l'utilisation dans les milieux de cultures d'un inhibiteur des phosphodiésterases, le 3-isobutyl-1-méthylxanthine (IBMX). L'induction de la différenciation adipocytaire par l'ARA et son métabolite est due là aussi à l'augmentation du taux d'AMPc intracellulaire [34]. Ce contrôle de la différenciation adipocytaire par l'ARA est en fait complexe. En effet, des études basées sur la lignée murine 3T3-L1 montrent que l'effet des AGPIs  $\omega 6$  peut être pro- ou anti-adipogénique selon les taux d'AMPc intracellulaire [35]. En présence d'un niveau basal d'AMPc, l'ARA produit un effet pro-adipogénique en élevant le niveau d'AMPc. Par contre, si les niveaux d'AMPc sont déjà élevés, comme par exemple dans le cas d'un régime riche en protéine, on observe une augmentation de l'expression et de l'activité des cyclooxygénases et ainsi la synthèse de prostaglandines anti-adipogéniques telles que PGE2 et PGF2 $\alpha$  [35,36]. PGF2 $\alpha$  est capable d'activer son récepteur membranaire FP couplé à une sous-unité Gq (Fig 2). Cette activation génère un signal calcique intracellulaire capable d'activer la calcineurine, une phosphatase connue pour inhiber l'expression de PPAR $\gamma$  (Fig 4) [37]. Une seconde voie d'inhibition a été décrite récemment dans des préadipocytes murins 3T3-L1 [38]. Le traitement aigu de ces cellules avec de l'ARA induit la synthèse et la sécrétion de PGF2 $\alpha$  qui va activer la voie FP-R/calcium/PKC et ensuite la voie MAPK ERK1/2. L'activation de ces voies de signalisation a pour effet d'induire la surexpression du facteur de transcription Fos-related antigen-1 (Fra-1) qui va être responsable de l'inhibition de

l'adipogenèse, certainement en diminuant comme décrit précédemment l'activité de PPAR $\gamma$  (Fig 4) [38].

PGE2 est un médiateur de nombreux aspects de la différenciation et de la fonction adipocytaire. Cette prostaglandine peut activer un ou plusieurs de ses propres récepteurs (EP1, EP2, EP3 et EP4) de manière dose dépendante (Fig 2) [39]. L'interaction avec ses différents récepteurs permet l'induction de signaux intracellulaires différents. Les récepteurs EP2 et EP4, qui ont la plus grande affinité pour PGE2, sont couplés à des protéines Gs activatrices de la voie PKA, alors que le récepteur EP3, couplé à une protéine Gi inhibitrice de l'activité adényl-cyclase, va donc inhiber cette voie. Le récepteur EP1, qui possède la moins bonne affinité pour PGE2, est quant à lui couplé à une protéine Gq capable d'induire des élévations de la concentration en calcium intracellulaire. Par conséquent, les effets de PGE2 sur l'adipogenèse restent variés et opposés car ils sont strictement liés

- i) à sa concentration
- ii) à l'expression de ses récepteurs et
- iii) aux types cellulaires [40].

Par exemple, dans les préadipocytes, PGE2 active ses récepteurs EP2 et EP4 et ainsi induit la voie PKA pour initier l'adipogenèse, alors que dans les adipocytes différenciés, PGE2, par le biais du récepteur EP3, inhibe cette voie et donc la lipolyse induite par l'activation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques [41].

Il est à noter que la voie des cyclooxygénases n'est pas la seule voie impliquée dans le contrôle de l'adipogenèse. En effet, la métabolisation de l'ARA au sein de l'adipocyte par la voie des lipoxygénases (5-LOX ou 15-LOX) permet aussi de moduler plusieurs étapes de la différenciation adipocytaire [42,43].

### Acide arachidonique et recrutement des adipocytes brites

Le recrutement des adipocytes brites intervient essentiellement dans le TAB sous-cutané après, par exemple, un traitement prolongé avec un agoniste des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, le CL316,243 [9]. Pour étudier la relation entre ce recrutement et l'apport en AGPIs  $\omega$ 6, et plus particulièrement les métabolites de l'ARA, des souris C57Bl/6J ont été nourries avec un régime standard (5,5 % lipides) enrichi en ARA (1,1 %), et cela pendant 4 semaines. Lors de la dernière semaine du régime alimentaire, les souris ont été traitées quotidiennement avec du CL316,243. Dans ces conditions iso-lipidiques iso-énergétiques, l'inclusion de l'ARA dans l'alimentation a altéré le recrutement des adipocytes brites dans le TAB sous-cutané par rapport à des souris nourries avec un régime standard, démontrant l'effet inhibiteur direct de l'ARA [44]. Comme prévu, la supplémentation

en ARA augmente les niveaux des écosanoïdes dans le TAB des souris non traitées, et plus particulièrement des prostaglandines de la série 2 et de la prostacycline. Par contre, la stimulation chronique de la voie  $\beta$ 3-adrénergique chez ces souris induit une diminution globale des taux d'écosanoïdes, excepté celui de PGF2 $\alpha$  qui est maintenu à un niveau élevé après le traitement. Ces résultats sont en faveur de l'implication de cette prostaglandine dans l'effet inhibiteur de l'ARA sur le recrutement des adipocytes brites [44].

Fait très intéressant chez les souris 129Sv (une souche résistante à l'obésité en raison d'un nombre élevée en adipocytes bruns et brite), l'activation de la voie des cyclooxygénases semble cruciale pour le recrutement des adipocytes brites [45,46]. Par contre, un rôle opposé de la même voie a été décrit récemment chez des souris C57Bl/6J (une souche sensible aux régimes riches en graisses) [47]. Dans ce dernier cas, lorsque les souris ont été nourries avec un régime riche en graisses, l'inhibition de l'activité cyclooxygénase limite la prise de poids, ce qui est dû, en partie, au recrutement d'adipocytes brites dans le TAB sous-cutané [47]. Les données obtenues avec la même souche de souris C57Bl/6 nourries avec un régime supplémenté en ARA sont en accord avec cette dernière observation [44]. Ces résultats démontrent à nouveau toute la complexité des effets des AGPIs, certainement dépendant des métabolites générés au sein du TAB.

Pour mieux comprendre les effets de l'ARA sur le recrutement des adipocytes brites, nous avons réalisé une étude *in vitro* en utilisant les cellules hMADS, capables de se différencier en adipocytes blancs puis de se convertir en adipocytes brites sous l'action de la rosiglitazone (agoniste de PPAR $\gamma$ ) [21,48]. Le traitement des adipocytes hMADS par de l'ARA empêche le phénomène de conversion des adipocytes blancs en adipocytes brites. Cette effet est caractérisé par une inhibition de l'expression du gène UCP1, de l'activité mitochondriale et de la consommation d'oxygène [44]. L'effet de l'ARA est dépendant de l'activité des cyclooxygénases qui engendrent la synthèse de différentes prostaglandines parmi lesquelles, PGE2 et PGF2 $\alpha$ . L'étude des effets de ces dernières montre que ces prostaglandines activent leurs récepteurs membranaires, respectivement EP1 et EP2, pour induire des variations oscillatoires des concentrations en calcium intracellulaire. Ces oscillations calciques sont responsables de la phosphorylation des MAPK ERK1/2, connue pour induire la phosphorylation et la dégradation de la protéine PPAR $\gamma$  [49]. En l'occurrence, cette cascade d'évènements inhibe la conversion des adipocytes blancs en adipocytes brites (Fig 4).

Par ailleurs, il a été démontré que cPGI2 était capable d'induire le recrutement des adipocytes brites à la fois en favorisant la différenciation des progéniteurs et la conversion des adipocytes blancs (Fig 3) [44,46]. L'engagement des préadipocytes dans la voie de différenciation en

adipocytes brites serait dépendante du récepteur IP et pourrait mettre en jeu des réorganisations du cytosquelette et/ou de la chromatine [46,50]. De même, l'effet de cPGI2 sur la conversion des adipocytes blancs en brites est dépendant des voies faisant intervenir des variations des niveaux d'AMPc [44].

Au final, l'ensemble de ces résultats obtenus *in vitro*, démontre la multiplicité des effets induits par les différents métabolites de l'ARA et laisse à penser que la régulation des enzymes de synthèse des prostaglandines est cruciale pour l'induction d'une voie donnée. Par exemple, il est intéressant de remarquer que l'ARA inhibe spécifiquement l'expression de PTGIS (l'enzyme responsable de la synthèse de la prostacycline) dans les adipocytes hMADS, favorisant ainsi la synthèse et la sécrétion de PGF2 $\alpha$  et de PGE2 qui vont alors activer leurs récepteurs FP, EP1 et EP3. Ensemble, ces activations associées à l'inhibition de la synthèse de PGI2 vont induire une voie de signalisation calcique et inhiber la voie de signalisation impliquant l'AMPc. La résultante va alors être l'inhibition de la conversion des adipocytes blancs en bruns.

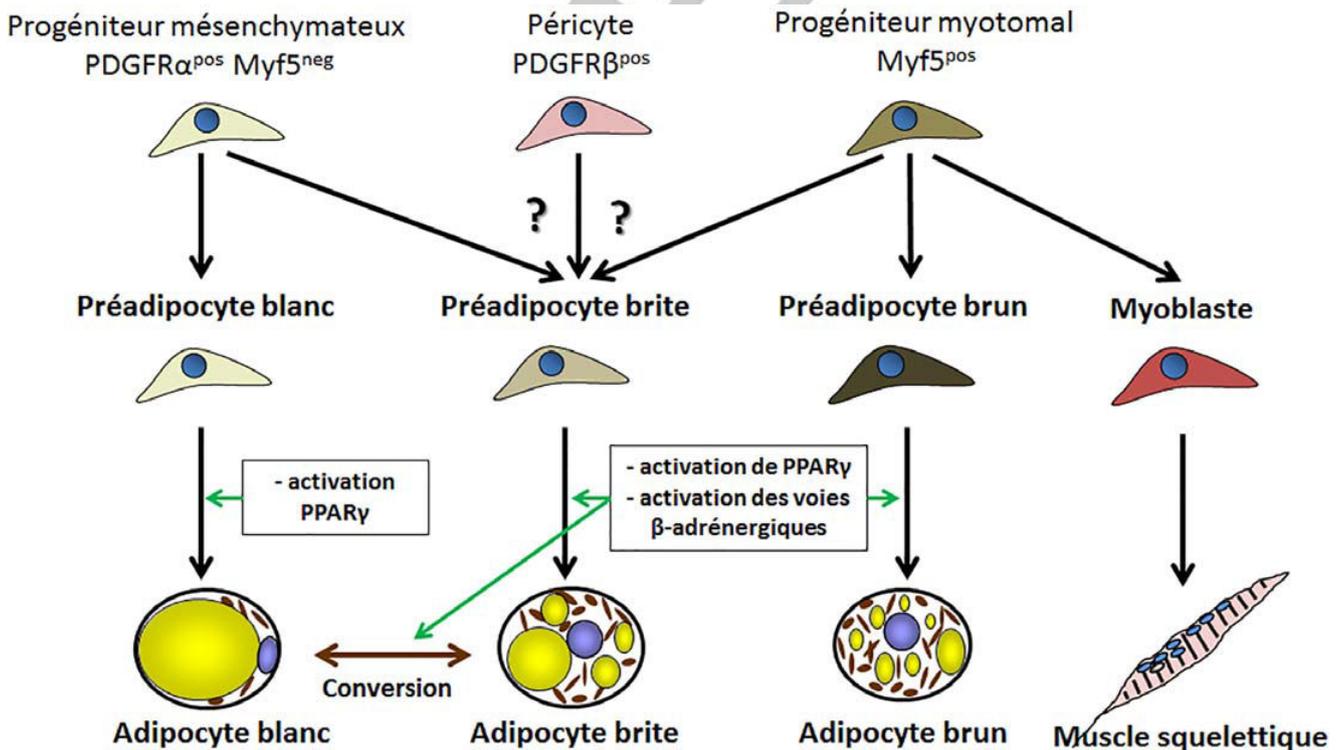
### Conclusion

Au cours des quatre dernières décennies, de profondes modifications quantitatives et qualitatives des apports en lipides alimentaires ont eu lieu, avec une augmentation des apports en AGPI  $\omega 6$  et une diminution en AGPI  $\omega 3$ . Le tissu adipeux étant le tissu principal de stockage et de métabolisation des acides gras, ces modifications ont donc entraîné une élévation importante du rapport ARA/(DHA+EPA) au niveau du tissu adipeux, conduisant à son tour à une accumulation des métabolites de l'ARA. Par conséquent, ce déséquilibre en AGPI semble avoir entraîné :

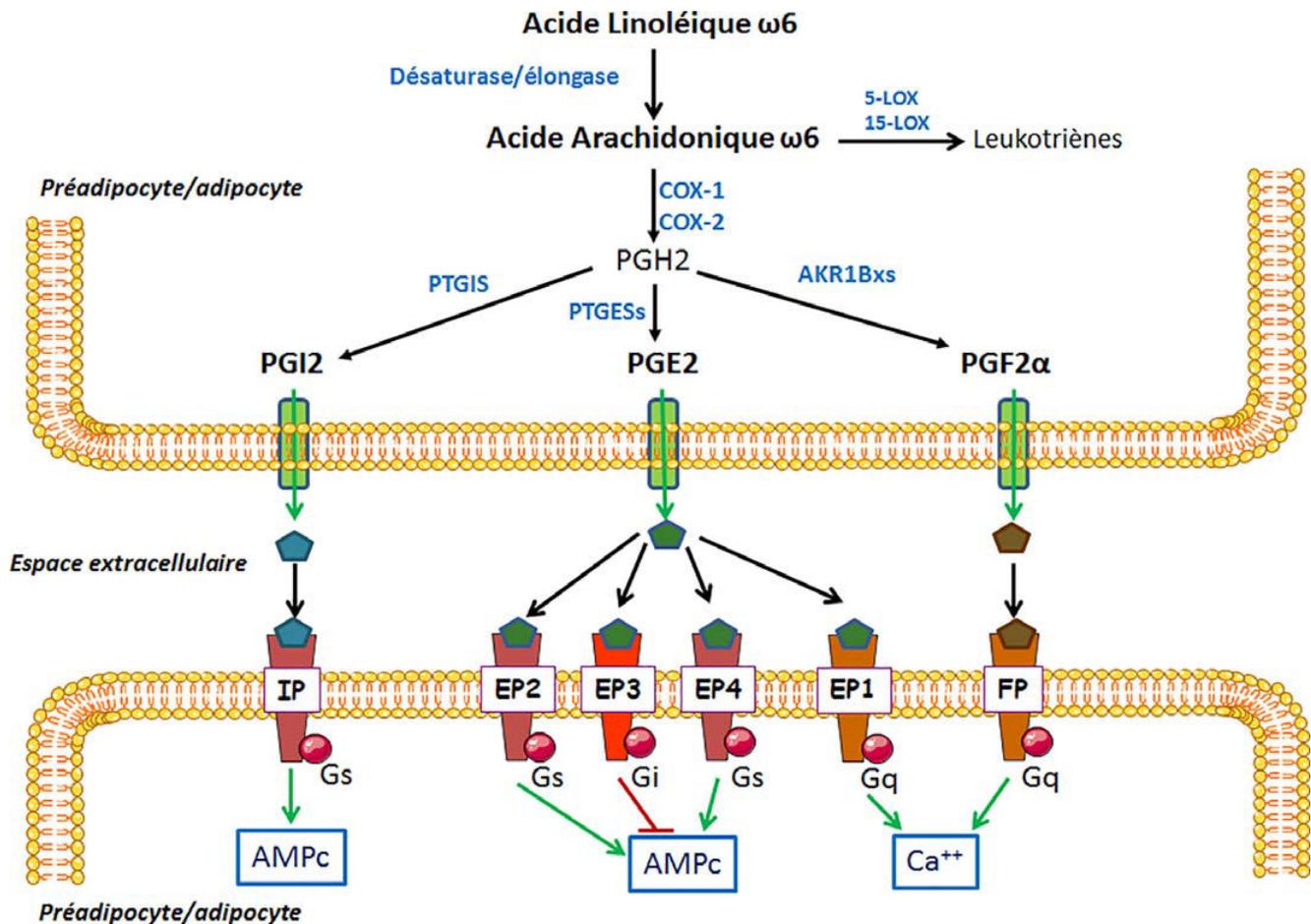
- une induction de la formation des cellules adipeuses blanches ( $\square$  stockage d'énergie) et
- une inhibition du recrutement des adipocytes brites ( $\square$  dépense d'énergie).

Quand elle est associée à une augmentation de la sédentarité et de la consommation de matières grasses, cette élévation du rapport AGPI  $\omega 6/\omega 3$  représente alors un nouveau facteur de risque contribuant au surpoids et à l'obésité et aux désordres métaboliques qui y sont associés.

Des études ciblant la réduction du rapport AGPI  $\omega 6/\omega 3$  devraient permettre de rééquilibrer l'homéostasie énergétique. En effet, une augmentation de l'apport en AGPI  $\omega 3$ , associée à une diminution en AGPI  $\omega 6$ , pourrait contribuer à



**Fig. 1** Représentation schématique des différentes voies de différenciation des adipocytes blancs, brites et bruns. ( $^{pos}$  : positive ;  $^{neg}$  : négative ; PDGFR, platelet-derived growth factor ; Myf5, myogenic factor 5 ; PPAR $\gamma$ , peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ )



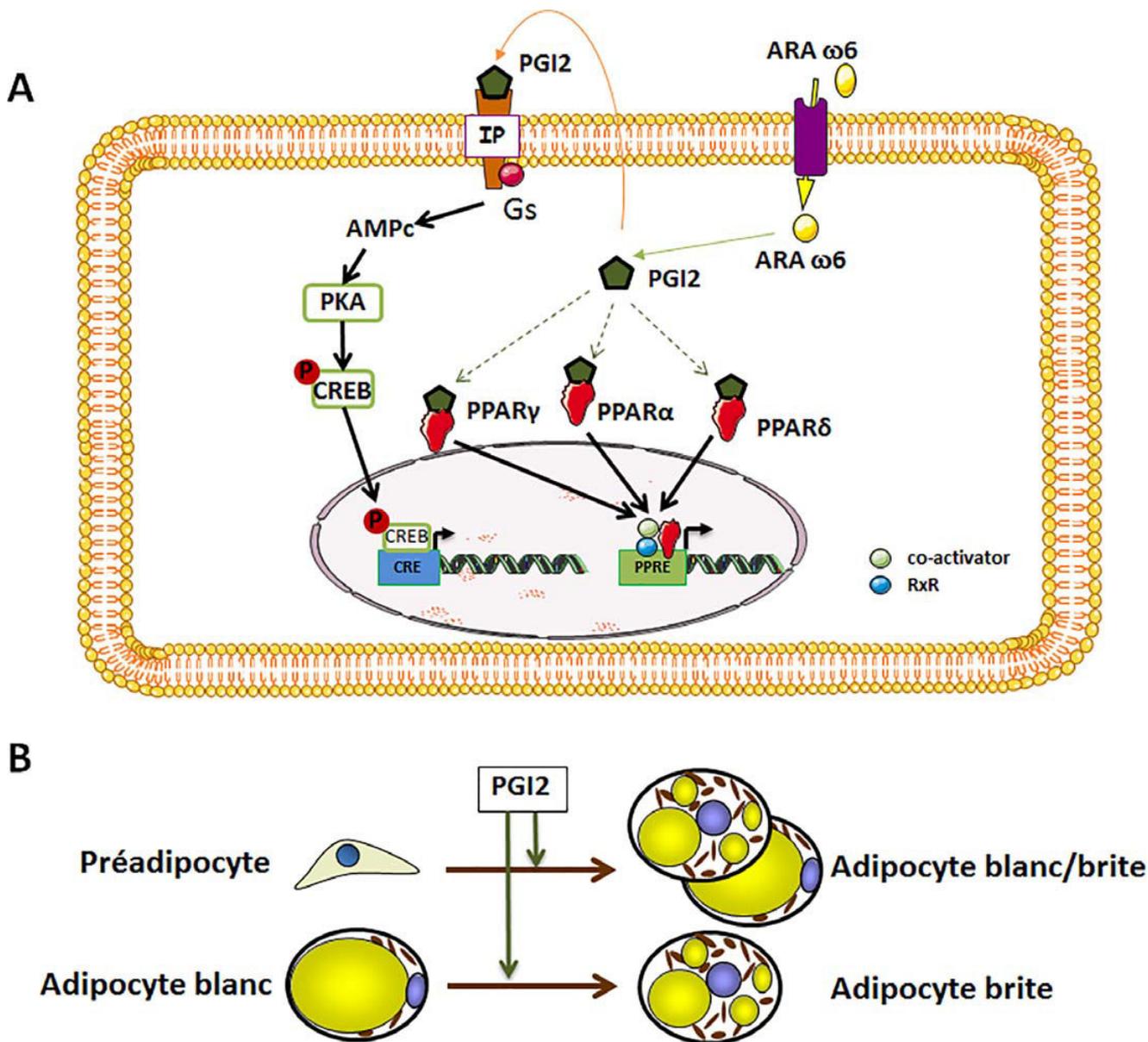
**Fig. 2** Voies de synthèse des éicosanoïdes à partir de l'acide linoléique et effets sur leurs récepteurs. Les enzymes sont présentées en bleu (COX, cyclooxygénase ; LOX, lipoxygénase, AKR1, acyl-keto reductase 1 ; PTGIS, prostacycline synthase ; PTGES, prostaglandine E2 synthase ; IP, récepteur de la prostacycline ; EP, récepteur de la PGE2 ; FP, récepteur de PGF2α ; G(s,i,q), sous-unités α de la protéine G). Seules les éicosanoïdes discutés dans cette revue sont présents

limiter les voies pro-adipogéniques, d'une part, et à augmenter le recrutement des adipocytes bruns, d'autre part. Cela permettrait alors de lutter contre l'obésité et les maladies associées.

**Liens d'intérêts :** Texte à venir

## Références

- Muhlhauser BS, Ailhaud GP (2013) Omega-6 polyunsaturated fatty acids and the early origins of obesity. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 20:56–61
- Enerback S, Jacobsson A, Simpson EM, et al (1997) Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature* 387:90–4
- Virtanen KA, van Marken Lichtenbelt WD, Nuutila P (2013) Brown adipose tissue functions in humans. *Biochim Biophys Acta* 1831:1004–8
- Cypess AM, Lehman S, Williams G, et al (2009) Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med* 360:1509–17
- Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B (2007) Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293:E444–52
- van Marken Lichtenbelt WD, Vanhomerig JW, Smulders NM, et al (2009) Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med* 360:1500–8
- Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, et al (2009) Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med* 360:1518–25
- Feldmann HM, Golozubova V, Cannon B, et al (2009) UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. *Cell Metab* 9:203–9
- Barbatelli G, Murano I, Madsen L, et al (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:E1244–53
- Petrovic N, Walden TB, Shabalina IG, et al (2010) Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-

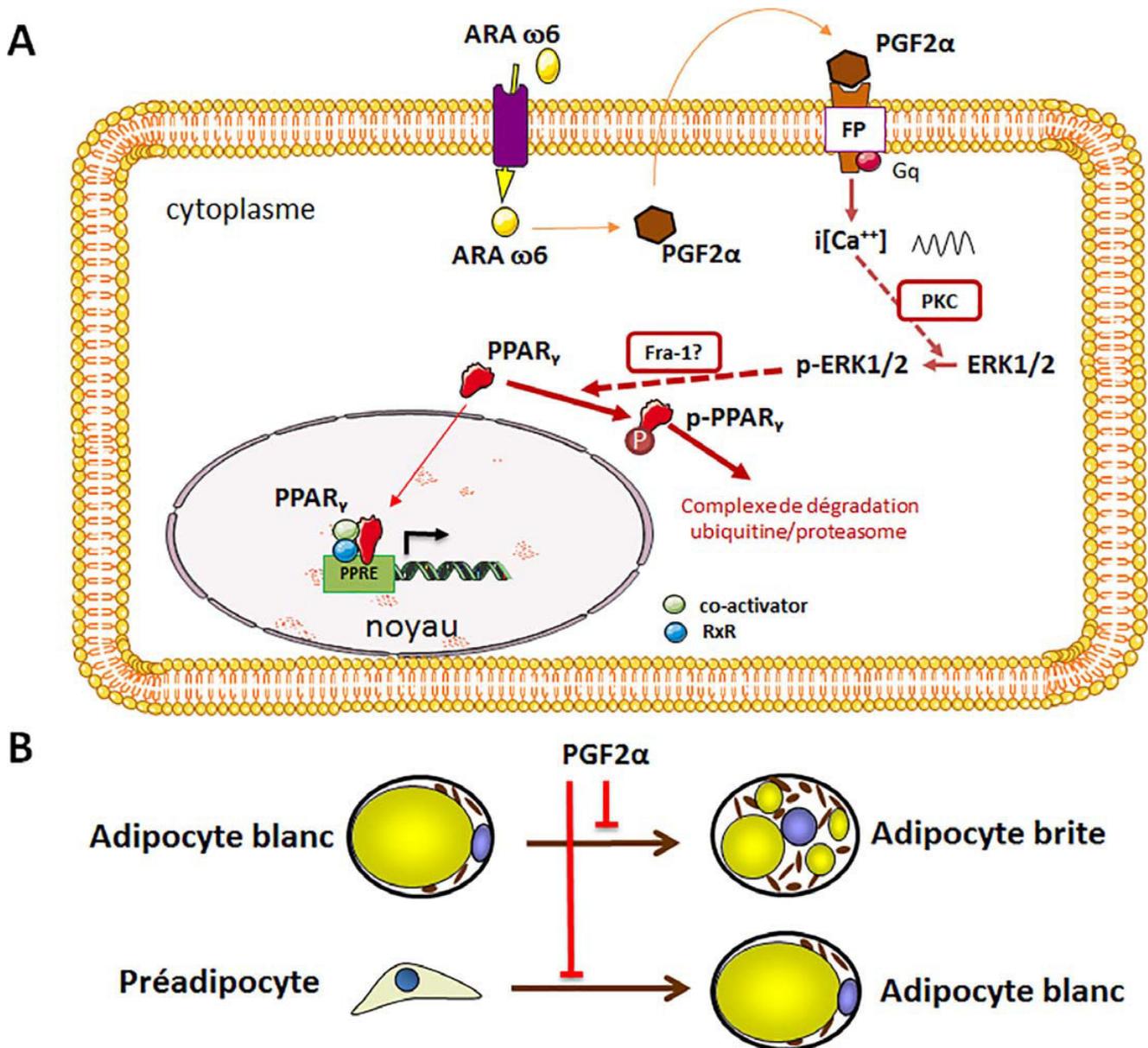


**Fig. 3** (A) Schématisation des voies de signalisation induites par la prostacycline (PGI2) et (B) effet sur l'engagement des préadipocytes dans la différenciation adipocytaire et sur la conversion des adipocytes blancs en adipocytes brites. (ARA, acide arachidonique ; IP, récepteur de la prostacycline ; PKA, protéine kinase A ; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor ; PPRE, PPAR response element ; CRE, cAMP response element ; CREB, CRE-binding protein ; RXR, retinoid X receptor ; Gs, sous-unités α-s de la protéine G)

containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem* 285:7153–64

11. Shabalina IG, Petrovic N, de Jong JM, et al (2013) UCP1 in brite/beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic. *Cell Rep* 5:1196–203
12. Ricquier D, Bouillaud F (2000) Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance. *J Physiol* 529 Pt 1:3–10
13. Rosenwald M, Wolfrum C (2014) The origin and definition of brite versus white and classical brown adipocytes. *Adipocyte* 3:4–9

14. Lee YH, Petkova AP, Konkar AA, et al (2015) Cellular origins of cold-induced brown adipocytes in adult mice. *FASEB J* 29:286–99
15. Rosenwald M, Perdikari A, Rulicke T, et al (2013) Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat Cell Biol* 15:659–67
16. Vishvanath L, MacPherson KA, Hepler C, et al (2015) Pdgfrbeta Mural Preadipocytes Contribute to Adipocyte Hyperplasia Induced by High-Fat-Diet Feeding and Prolonged Cold Exposure in Adult Mice. *Cell Metab*
17. Bartelt A, Bruns OT, Reimer R, et al (2011) Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat Med* 17:200–5



**Fig. 4** (A) Schématisation des voies de signalisation induites par PGF2 $\alpha$  et (B) effet sur l'engagement des préadipocytes et sur la conversion des adipocytes blancs en adipocytes brites. (ARA, acide arachidonique ; FP, récepteur de PGF2 $\alpha$  ; PKC, protéine kinase C ; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor ; PPRE, PPAR response element ; RXR, rétinoïd X récepteur, FRA-1, Fos-related antigen-1 ; ERK, Extracellular signal-regulated kinases ; i[Ca<sup>2+</sup>], concentration intracellulaire de calcium ; Gq, sous-unités  $\alpha$ -q de la protéine G)

18. Jespersen NZ, Larsen TJ, Peijs L, et al (2013) A classical brown adipose tissue mRNA signature partly overlaps with brite in the supraclavicular region of adult humans. *Cell Metab* 17:798–805
19. Sharp LZ, Shinoda K, Ohno H, et al (2012) Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells. *PLoS ONE* 7:e49452
20. Wu J, Bostrom P, Sparks LM, et al (2012) Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* 150:366–76
21. Pisani DF, Djedaini M, Beranger GE, et al (2011) Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells into “Brite” (Brown-in-White) Adipocytes. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2:87
22. Langin D (2010) Recruitment of brown fat and conversion of white into brown adipocytes: strategies to fight the metabolic complications of obesity? *Biochim Biophys Acta* 1801:372–6
23. Ailhaud G, Massiera F, Weill P, et al (2006) Temporal changes in dietary fats: role of n-6 polyunsaturated fatty acids in excessive adipose tissue development and relationship to obesity. *Prog Lipid Res* 45:203–36
24. Javadi M, Everts H, Hovenier R, et al (2004) The effect of six different C18 fatty acids on body fat and energy metabolism in mice. *Br J Nutr* 92:391–9
25. Massiera F, Barbry P, Guesnet P, et al (2010) A Western-like fat diet is sufficient to induce a gradual enhancement in fat mass over generations. *J Lipid Res* 51:2352–61

26. Ailhaud G, Guesnet P (2004) Fatty acid composition of fats is an early determinant of childhood obesity: a short review and an opinion. *Obes Rev* 5:21–6
27. Savva SC, Chadjigeorgiou C, Hatzis C, et al (2004) Association of adipose tissue arachidonic acid content with BMI and overweight status in children from Cyprus and Crete. *Br J Nutr* 91:643–9
28. Simopoulos AP (2002) The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother* 56:365–79
29. Gaillard D, Negrel R, Lagarde M, et al (1989) Requirement and role of arachidonic acid in the differentiation of pre-adipose cells. *Biochem J* 257:389–97.
30. Massiera F, Saint-Marc P, Seydoux J, et al (2003) Arachidonic acid and prostacyclin signaling promote adipose tissue development: a human health concern? *J Lipid Res* 44:271–9
31. Aubert J, Saint-Marc P, Belmonte N, et al (2000) Prostacyclin IP receptor up-regulates the early expression of C/EBPbeta and C/EBPdelta in preadipose cells. *Mol Cell Endocrinol* 160:149–56.
32. Forman BM, Tontonoz P, Chen J, et al (1995) 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* 83:803–12
33. Rodriguez AM, Elabd C, Delteil F, et al (2004) Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 315:255–63
34. Jia B, Madsen L, Petersen RK, et al (2012) Activation of protein kinase a and exchange protein directly activated by cAMP promotes adipocyte differentiation of human mesenchymal stem cells. *PLoS ONE* 7:e34114
35. Madsen L, Pedersen LM, Liaset B, et al (2008) cAMP-dependent signaling regulates the adipogenic effect of n-6 polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem* 283:7196–205
36. Petersen RK, Jorgensen C, Rustan AC, et al (2003) Arachidonic acid-dependent inhibition of adipocyte differentiation requires PKA activity and is associated with sustained expression of cyclooxygenases. *J Lipid Res* 16:16
37. Liu L, Clipstone NA (2007) Prostaglandin F2alpha inhibits adipocyte differentiation via a G alpha q-calcium-calciurein-dependent signaling pathway. *J Cell Biochem* 100:161–73
38. Nikolopoulou E, Papacleovoulou G, Jean-Alphonse F, et al (2014) Arachidonic acid-dependent gene regulation during preadipocyte differentiation controls adipocyte potential. *J Lipid Res* 55:2479–90
39. Kringelholt S, Simonsen U, Bek T (2013) Dual effect of prostaglandins on isolated intraocular porcine ciliary arteries. *Acta Ophthalmol* 91:498–504
40. Borglum JD, Pedersen SB, Ailhaud G, et al (1999) Differential expression of prostaglandin receptor mRNAs during adipose cell differentiation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 57:305–17.
41. Vassaux G, Gaillard D, Darimont C, et al (1992) Differential response of preadipocytes and adipocytes to prostacyclin and prostaglandin E2: physiological implications. *Endocrinology* 131:2393–8.
42. Madsen L, Petersen RK, Sorensen MB, et al (2003) Adipocyte differentiation of 3T3-L1 preadipocytes is dependent on lipoxigenase activity during the initial stages of the differentiation process. *Biochem J* 375:539–49
43. Shillabeer G, Kumar V, Tibbo E, et al (1998) Arachidonic acid metabolites of the lipoxigenase as well as the cyclooxygenase pathway may be involved in regulating preadipocyte differentiation. *Metabolism* 47:461–6.
44. Pisani DF, Ghandour RA, Beranger GE, et al (2014) The omega6-fatty acid, arachidonic acid, regulates the conversion of white to brite adipocyte through a prostaglandin/calcium mediated pathway. *Mol Metab* 3:834–47
45. Madsen L, Pedersen LM, Lillefosse HH, et al (2010) UCP1 induction during recruitment of brown adipocytes in white adipose tissue is dependent on cyclooxygenase activity. *PLoS ONE* 5:e11391
46. Vegiopoulos A, Muller-Decker K, Strzoda D, et al (2010) Cyclooxygenase-2 controls energy homeostasis in mice by de novo recruitment of brown adipocytes. *Science* 328:1158–61
47. Fjaere E, Aune UL, Roen K, et al (2014) Indomethacin Treatment Prevents High Fat Diet-induced Obesity and Insulin Resistance but Not Glucose Intolerance in C57BL/6J Mice. *J Biol Chem* 289:16032–45
48. Elabd C, Chiellini C, Carmona M, et al (2009) Human multipotent adipose-derived stem cells differentiate into functional brown adipocytes. *Stem Cells* 27:2753–60
49. Yang H, Cheng J, Song Z, et al (2013) The anti-adipogenic effect of PGRN on porcine preadipocytes involves ERK1,2 mediated PPARgamma phosphorylation. *Mol Biol Rep* 40:6863–72
50. Bayindir I, Babaeikishomi R, Kocanova S, et al (2015) Transcriptional Pathways in cPGI2-Induced Adipocyte Progenitor Activation for Browning. *Front Endocrinol (Lausanne)* 6:129



## **CONCLUSION**

---



Les AGPIs de types  $\omega_6$  et  $\omega_3$  sont deux familles d'acides gras apportées par l'alimentation et indispensables au bon fonctionnement de l'organisme. Par exemple, le LA est le précurseur des AGPIs de type  $\omega_6$  dont l'ARA est le plus important. Cet AG doit son importance à ses médiateurs lipidiques oxygénés, essentiellement les prostaglandines, qui régulent plusieurs fonctions de l'organisme.

Les agences de sécurité alimentaire ont défini des apports journaliers pour ces AGPIs avec un ratio AGPIs  $\omega_6/\omega_3 = 4$ , ce qui définit un équilibre entre ces deux types d'AGs. Néanmoins, un déséquilibre dans l'apport de ces AGPIs est observé dans la consommation alimentaire actuelle et semble être associé à plusieurs maladies métaboliques. Plus particulièrement, un fort apport en LA  $\omega_6$ , avec un faible apport en AGPIs  $\omega_3$  a été relié au surpoids et à l'obésité, qui se définit par une augmentation de la masse du TAB de l'individu.

En outre, une corrélation entre cette augmentation du TAB et le taux d'ARA tissulaire a été détectée. Une des perspectives pour traiter l'obésité est de convertir les adipocytes blancs, spécialisés dans le stockage et la libération de l'énergie, en adipocytes bruns fonctionnels responsables de la dissipation de cette énergie sous forme de chaleur.

L'objectif principal du travail effectué durant les 3 années de mon doctorat consistait à étudier l'effet de l'ARA et de ses métabolites sur la conversion des adipocytes blancs en bruns. Ce travail a permis de démontrer que l'ARA via ses métabolites, les prostaglandines E2 et F2 $\alpha$ , est capable d'inhiber cette conversion adipocytaire et donc certainement de favoriser l'apparition du surpoids et de l'obésité. A l'inverse, mes travaux montraient que la carbaprostacycline qui est un analogue stable de la prostacycline (PGI2), métabolite de l'ARA, semble être capable de lutter contre l'obésité en favorisant l'apparition des adipocytes bruns *in vitro*. Il est intéressant de noter que plusieurs analogues stables de PGI2 sont utilisés cliniquement dans le traitement de l'hypertension artérielle pulmonaire. Il sera donc très intéressant, en plus de caractériser leur effet *in vitro*, d'étudier de manière plus précise les effets que pourraient avoir ces analogues sur la thermogénèse et la perte de poids chez les individus recevant ce type de traitement.

Nos résultats concernant l'effet d'un équilibre entre les AGPIs  $\omega 6$  et  $\omega 3$  sur les conséquences néfastes d'un fort ratio  $\omega 6/\omega 3$  chez les souris non-obèses, nous a permis d'assigner un rôle réparateur de cet équilibre au moins sur l'activité du TABr. Plusieurs démarches expérimentales restent néanmoins à envisager, comme tester l'effet de cet équilibre entre les différents types d'AGPIs dans un cadre où les souris sont déjà obèses.

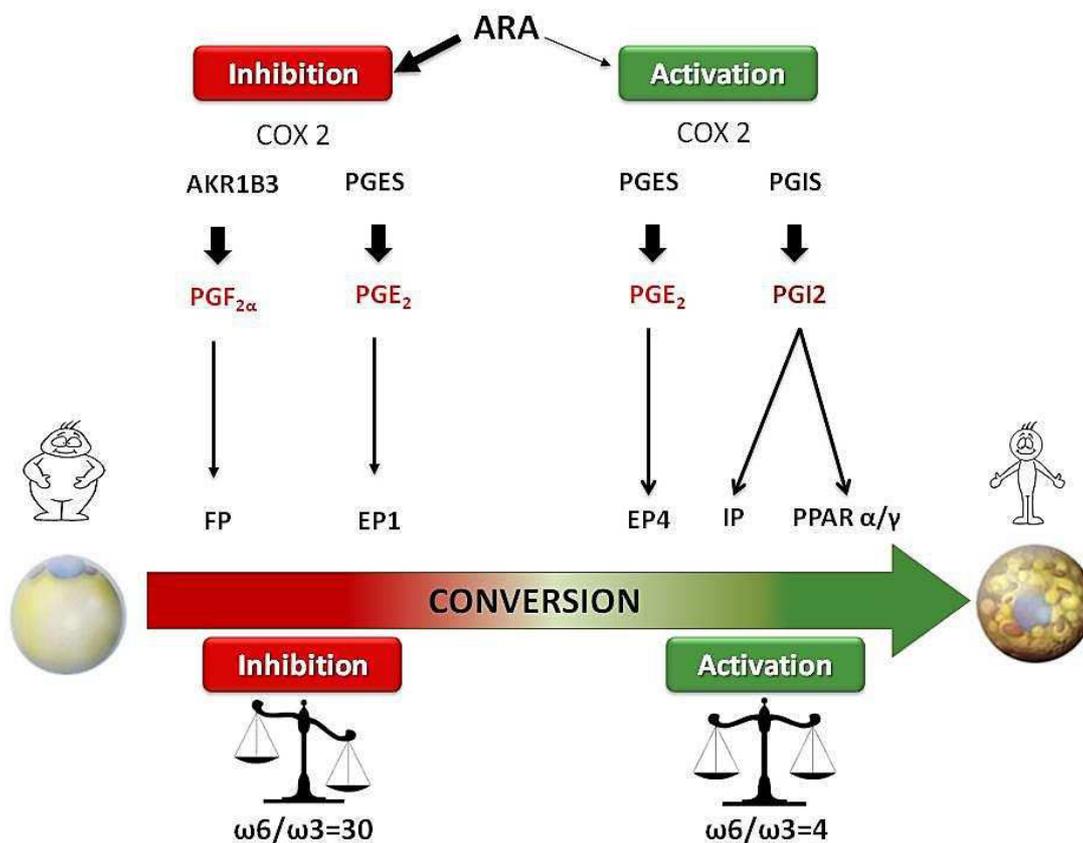


Figure 43. Schéma récapitulatif des effets des AGPIs  $\omega 6$  et  $\omega 3$  sur la conversion des adipocytes blancs en brites.

En conclusion, mon travail de thèse aura permis de mieux caractériser les effets complexes de l'ARA et de ses métabolites oxygénés sur la conversion des adipocytes blancs en brites. De plus, les résultats obtenus permettent de proposer de nouvelles pistes pharmacologiques et nutritionnelles pour limiter la prise de poids chez l'Homme en utilisant les capacités thermogéniques des adipocytes brites.

## Références Bibliographiques

---

- Ahmed, K., S. Tunaru, and S. Offermanns, 2009, GPR109A, GPR109B and GPR81, a family of hydroxy-carboxylic acid receptors: *Trends Pharmacol Sci*, v. 30, p. 557-62.
- Ailhaud, G., P. Grimaldi, and R. Négrel, 1992, Cellular and molecular aspects of adipose tissue development: *Annu Rev Nutr*, v. 12, p. 207-33.
- Ailhaud, G., and P. Guesnet, 2004, Fatty acid composition of fats is an early determinant of childhood obesity: a short review and an opinion: *Obes Rev*, v. 5, p. 21-6.
- Ailhaud, G., P. Guesnet, and S. C. Cunnane, 2008, An emerging risk factor for obesity: does disequilibrium of polyunsaturated fatty acid metabolism contribute to excessive adipose tissue development?: *Br J Nutr*, v. 100, p. 461-70.
- Ailhaud, G., F. Massiera, P. Weill, P. Legrand, J. M. Alessandri, and P. Guesnet, 2006, Temporal changes in dietary fats: role of n-6 polyunsaturated fatty acids in excessive adipose tissue development and relationship to obesity: *Prog Lipid Res*, v. 45, p. 203-36.
- Akagi, S., K. Nakamura, H. Matsubara, M. Kondo, D. Miura, T. Matoba, K. Egashira, and H. Ito, 2016, Intratracheal administration of prostacyclin analog-incorporated nanoparticles ameliorates the development of monocrotaline and sugen/hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension: *J Cardiovasc Pharmacol*.
- 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*, v. 5, p. 8889.
- Amri, E. Z., B. Bertrand, G. Ailhaud, and P. Grimaldi, 1991, Regulation of adipose cell differentiation. I. Fatty acids are inducers of the aP2 gene expression: *J Lipid Res*, v. 32, p. 1449-56.
- 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*, v. 270, p. 2367-71.
- ANSES, 2011, Actualisation des apports nutritionnels conseillés pour les acides gras: rapport d'expertise collective.
- Aron-Wisnewsky, J., J. Tordjman, C. Poitou, F. Darakhshan, D. Hugol, A. Basdevant, A. Aissat, M. Guerre-Millo, and K. Clément, 2009, Human adipose tissue macrophages: m1 and m2 cell surface markers in subcutaneous and omental depots and after weight loss: *J Clin Endocrinol Metab*, v. 94, p. 4619-23.
- Arsenijevic, D., H. Onuma, C. Pecqueur, S. Raimbault, B. S. Manning, B. Miroux, E. Couplan, M. C. Alves-Guerra, M. Gubern, R. Surwit, F. Bouillaud, D. Richard, S. Collins, and D. Ricquier, 2000, Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production: *Nat Genet*, v. 26, p. 435-9.
- Atherton, P. J., and B. E. Phillips, 2013, Greek goddess or Greek myth: the effects of exercise on irisin/FNDC5 in humans: *J Physiol*, v. 591, p. 5267-8.
- Aubert, J., G. Ailhaud, and R. Négrel, 1996, Evidence for a novel regulatory pathway activated by (carba)prostacyclin in preadipose and adipose cells: *FEBS Lett*, v. 397, p. 117-21.
- Aubert, J., P. Saint-Marc, N. Belmonte, C. Dani, R. Négrel, and G. Ailhaud, 2000a, Prostacyclin IP receptor up-regulates the early expression of C/EBPbeta and C/EBPdelta in preadipose cells: *Mol Cell Endocrinol*, v. 160, p. 149-56.
- Aubert, J., P. Saint-Marc, N. Belmonte, C. Dani, R. Négrel, and G. Ailhaud, 2000b, Prostacyclin IP receptor up-regulates the early expression of C/EBPbeta and C/EBPdelta in preadipose cells: *Mol Cell Endocrinol*, v. 160, p. 149-56.
- Azzu, V., C. Affourtit, E. P. Breen, N. Parker, and M. D. Brand, 2008, Dynamic regulation of uncoupling protein 2 content in INS-1E insulinoma cells: *Biochim Biophys Acta*, v. 1777, p. 1378-83.

- Badin, P. M., C. Loubière, M. Coonen, K. Louche, G. Tavernier, V. Bourlier, A. Mairal, A. C. Rustan, S. R. Smith, D. Langin, and C. Moro, 2012, Regulation of skeletal muscle lipolysis and oxidative metabolism by the co-lipase CGI-58: *J Lipid Res*, v. 53, p. 839-48.
- Ballard, F. J., R. W. Hanson, and G. A. Leveille, 1967, Phosphoenolpyruvate carboxykinase and the synthesis of glyceride-glycerol from pyruvate in adipose tissue: *J Biol Chem*, v. 242, p. 2746-50.
- 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*, v. 298, p. E1244-53.
- Barquissau, V., D. Beuzelin, D. Pisani, G. Béranger, A. Mairal, A. Montagner, B. Roussel, G. Tavernier, M. Marques, C. Moro, H. Guillou, E. Amri, and D. Langin, 2016, White-to-brite conversion in human adipocytes promotes metabolic reprogramming towards fatty acid anabolic and catabolic pathways: *Molecular Metabolism*.
- 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*, v. 17, p. 200-5.
- Bastie, C., D. Holst, D. Gaillard, C. Jehl-Pietri, and P. A. Grimaldi, 1999, Expression of peroxisome proliferator-activated receptor PPARdelta promotes induction of PPARgamma and adipocyte differentiation in 3T3C2 fibroblasts: *J Biol Chem*, v. 274, p. 21920-5.
- Bayindir, I., R. Babaeikeshomi, S. Kocanova, I. S. Sousa, S. Lerch, O. Hardt, S. Wild, A. Bosio, K. Bystricky, S. Herzig, and A. Vegiopoulos, 2015, Transcriptional Pathways in cPGI2-Induced Adipocyte Progenitor Activation for Browning: *Front Endocrinol (Lausanne)*, v. 6, p. 129.
- Bazan, N. G., 2005, Neuroprotectin D1 (NPD1): a DHA-derived mediator that protects brain and retina against cell injury-induced oxidative stress: *Brain Pathol*, v. 15, p. 159-66.
- Bederman, I. R., S. Foy, V. Chandramouli, J. C. Alexander, and S. F. Previs, 2009, Triglyceride synthesis in epididymal adipose tissue: contribution of glucose and non-glucose carbon sources: *J Biol Chem*, v. 284, p. 6101-8.
- Berndt, J., N. Klötting, S. Kralisch, P. Kovacs, M. Fasshauer, M. R. Schön, M. Stumvoll, and M. Blüher, 2005, Plasma visfatin concentrations and fat depot-specific mRNA expression in humans: *Diabetes*, v. 54, p. 2911-6.
- Bezaire, V., A. Mairal, C. Ribet, C. Lefort, A. Girousse, J. Jocken, J. Laurencikiene, R. Anesia, A. M. Rodriguez, M. Ryden, B. M. Stenson, C. Dani, G. Ailhaud, P. Arner, and D. Langin, 2009, Contribution of adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase to lipolysis in hMADS adipocytes: *J Biol Chem*, v. 284, p. 18282-91.
- Bianco, A. C., and J. E. Silva, 1988, Cold exposure rapidly induces virtual saturation of brown adipose tissue nuclear T3 receptors: *Am J Physiol*, v. 255, p. E496-503.
- 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*, v. 134, p. 2283-92.
- Bordicchia, M., D. Liu, E. Z. Amri, G. Ailhaud, P. Dessì-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*, v. 122, p. 1022-36.
- Borel, Maquart, L. Peuch, Randoux, Gillery, Bellon, and Monboisse, 1997, *Biochimie dynamique*.
- Borglum, J. D., S. B. Pedersen, G. Ailhaud, R. Negrel, and B. Richelsen, 1999, Differential expression of prostaglandin receptor mRNAs during adipose cell differentiation: *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, v. 57, p. 305-17.
- Boström, P., J. Wu, M. P. Jedrychowski, A. Korde, L. Ye, J. C. Lo, K. A. Rasbach, E. A. Boström, J. H. Choi, J. Z. Long, S. Kajimura, M. C. Zingaretti, B. F. Vind, H. Tu, S. Cinti, K. Højlund, 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*, v. 481, p. 463-8.
- Bouchard, C., L. Pérusse, Y. C. Chagnon, C. Warden, and D. Ricquier, 1997, Linkage between markers in the vicinity of the uncoupling protein 2 gene and resting metabolic rate in humans: *Hum Mol Genet*, v. 6, p. 1887-9.
- Brasaemle, D. L., 2007, Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis: *J Lipid Res*, v. 48, p. 2547-59.
- Brenner, R. R., and R. O. Peluffo, 1966, Effect of saturated and unsaturated fatty acids on the desaturation in vitro of palmitic, stearic, oleic, linoleic, and linolenic acids: *J Biol Chem*, v. 241, p. 5213-9.
- Brun, R. P., P. Tontonoz, B. M. Forman, R. Ellis, J. Chen, R. M. Evans, and B. M. Spiegelman, 1996, Differential activation of adipogenesis by multiple PPAR isoforms: *Genes Dev*, v. 10, p. 974-84.
- Bukowiecki, L., A. J. Collet, N. Folley, G. Guay, and L. Jahjah, 1982, Brown adipose tissue hyperplasia: a fundamental mechanism of adaptation to cold and hyperphagia: *Am J Physiol*, v. 242, p. E353-9.
- Burr, G. O., and M. M. Burr, 1973, Nutrition classics from *The Journal of Biological Chemistry* 82:345-67, 1929. A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet: *Nutr Rev*, v. 31, p. 248-9.
- Børghlum, J. D., S. B. Pedersen, G. Ailhaud, R. Nègre, and B. Richelsen, 1999, Differential expression of prostaglandin receptor mRNAs during adipose cell differentiation: *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, v. 57, p. 305-17.
- Calder, P. C., 2006, n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases: *Am J Clin Nutr*, v. 83, p. 1505S-1519S.
- Cannon, B., and J. Nedergaard, 2004, Brown adipose tissue: function and physiological significance: *Physiol Rev*, v. 84, p. 277-359.
- Cao, W., A. V. Medvedev, K. W. Daniel, and S. Collins, 2001, beta-Adrenergic activation of p38 MAP kinase in adipocytes: cAMP induction of the uncoupling protein 1 (UCP1) gene requires p38 MAP kinase: *J Biol Chem*, v. 276, p. 27077-82.
- Carter, E. A., A. A. Bonab, V. Hamrahi, J. Pitman, D. Winter, L. J. Macintosh, E. M. Cyr, K. Paul, J. Yerxa, W. Jung, R. G. Tompkins, and A. J. Fischman, 2011, Effects of burn injury, cold stress and cutaneous wound injury on the morphology and energy metabolism of murine brown adipose tissue (BAT) in vivo: *Life Sci*, v. 89, p. 78-85.
- Cassard-Doulcier, A. M., C. Gelly, F. Bouillaud, and D. Ricquier, 1998, A 211-bp enhancer of the rat uncoupling protein-1 (UCP-1) gene controls specific and regulated expression in brown adipose tissue: *Biochem J*, v. 333 ( Pt 2), p. 243-6.
- Ceddia, R. P., D. Lee, M. F. Maulis, B. A. Carboneau, D. W. Threadgill, G. Poffenberger, G. Milne, K. L. Boyd, A. C. Powers, O. P. McGuinness, M. Gannon, and R. M. Breyer, 2015, The PGE2 EP3 Receptor Regulates Diet-Induced Adiposity in Male Mice: *Endocrinology*, p. en20151693.
- Cederberg, A., L. M. Grønning, B. Ahrén, K. Taskén, P. Carlsson, and S. Enerbäck, 2001, FOXC2 is a winged helix gene that counteracts obesity, hypertriglyceridemia, and diet-induced insulin resistance: *Cell*, v. 106, p. 563-73.
- Chen, H. H., T. W. Chen, and H. Lin, 2009, Prostacyclin-induced peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  translocation attenuates NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  activation after renal ischemia-reperfusion injury: *Am J Physiol Renal Physiol*, v. 297, p. F1109-18.
- Chen, J. K., J. Capdevila, and R. C. Harris, 2001, Cytochrome p450 epoxygenase metabolism of arachidonic acid inhibits apoptosis: *Mol Cell Biol*, v. 21, p. 6322-31.
- Cinti, S., 2005, The adipose organ: *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, v. 73, p. 9-15.

- Cinti, S., 2009, Transdifferentiation properties of adipocytes in the adipose organ: *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 297, p. E977-86.
- Cinti, S., 2011, Between brown and white: novel aspects of adipocyte differentiation: *Ann Med*, v. 43, p. 104-15.
- Coburn, C. T., F. F. Knapp, 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*, v. 275, p. 32523-9.
- Collins, S., 2011,  $\beta$ -Adrenoceptor Signaling Networks in Adipocytes for Recruiting Stored Fat and Energy Expenditure: *Front Endocrinol (Lausanne)*, v. 2, p. 102.
- Cowley, M. A., J. L. Smart, M. Rubinstein, M. G. Cerdán, 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*, v. 411, p. 480-4.
- Crisan, M., S. Yap, L. Casteilla, C. W. Chen, M. Corselli, T. S. Park, G. Andriolo, B. Sun, B. Zheng, L. Zhang, C. Norotte, P. N. Teng, J. Traas, R. Schugar, B. M. Deasy, S. Badyrak, H. J. Buhring, J. P. Giacobino, L. Lazzari, J. Huard, and B. Péault, 2008, A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs: *Cell Stem Cell*, v. 3, p. 301-13.
- Cunnane, S. C., 2003, Problems with essential fatty acids: time for a new paradigm?: *Prog Lipid Res*, v. 42, p. 544-68.
- 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*, v. 360, p. 1509-17.
- Cypess, A. M., L. S. Weiner, C. Roberts-Toler, E. Franquet Elía, 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  $\beta$ 3-adrenergic receptor agonist: *Cell Metab*, v. 21, p. 33-8.
- Dallinga-Thie, G. M., A. J. Zonneveld-de Boer, L. C. van Vark-van der Zee, R. van Haperen, T. van Gent, H. Jansen, R. De Crom, and A. van Tol, 2007, Appraisal of hepatic lipase and lipoprotein lipase activities in mice: *J Lipid Res*, v. 48, p. 2788-91.
- de Souza, R. J., A. Mente, A. Maroleanu, A. I. Cozma, V. Ha, T. Kishibe, E. Uleryk, P. Budylowski, H. Schünemann, J. Beyene, and S. S. Anand, 2015, Intake of saturated and trans unsaturated fatty acids and risk of all cause mortality, cardiovascular disease, and type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of observational studies: *BMJ*, v. 351, p. h3978.
- Descombes, P., and U. Schibler, 1991, A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA: *Cell*, v. 67, p. 569-79.
- DF, P., D. O, H. C, and A. Ez, 2015, Visfatin expression analysis in association with recruitment and activation of human and rodents brown and brite adipocytes: adipocyte.
- Divakaruni, A. S., and M. D. Brand, 2011, The regulation and physiology of mitochondrial proton leak: *Physiology (Bethesda)*, v. 26, p. 192-205.
- DL, N., and C. MM, 2005, Lipid biosynthesis. In: principles of biochemistry: New York, W.H. Freeman and company.
- D'Andrea, S., H. Guillou, S. Jan, D. Catheline, J.-N. Thibault, M. Bouriel, V. Rioux, and P. Legrand, 2002, The same rat Delta6-desaturase not only acts on 18- but also on 24-carbon fatty acids in very-long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis: *Biochemistry journal*, v. 364, p. 49-55.
- Echtay, K. S., 2007, Mitochondrial uncoupling proteins--what is their physiological role?: *Free Radic Biol Med*, v. 43, p. 1351-71.
- 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*, v. 274, p. 7946-51.

- 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, 2009a, Human multipotent adipose-derived stem cells differentiate into functional brown adipocytes: *Stem Cells*, v. 27, p. 2753-60.
- Elabd, C., C. Chiellini, M. Carmona, J. Galitzky, O. Cochet, R. Petersen, L. Pénicaud, K. Kristiansen, A. Bouloumié, L. Casteilla, C. Dani, G. Ailhaud, and E. Z. Amri, 2009b, Human multipotent adipose-derived stem cells differentiate into functional brown adipocytes: *Stem Cells*, v. 27, p. 2753-60.
- 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*, v. 361, p. 342-8.
- Ellis, J. M., J. L. Frahm, L. O. Li, and R. A. Coleman, 2010, Acyl-coenzyme A synthetases in metabolic control: *Curr Opin Lipidol*, v. 21, p. 212-7.
- Elmqvist, J. K., C. Bjørbaek, R. S. Ahima, J. S. Flier, and C. B. Saper, 1998, Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain: *J Comp Neurol*, v. 395, p. 535-47.
- Enerbäck, 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*, v. 387, p. 90-4.
- Farmer, S. R., 2006, Transcriptional control of adipocyte formation: *Cell Metab*, v. 4, p. 263-73.
- 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*, v. 9, p. 203-9.
- Filippatos, T. D., C. S. Derdemezis, D. N. Kiortsis, A. D. Tselepis, and M. S. Elisaf, 2007, Increased plasma levels of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in obese and overweight patients with metabolic syndrome: *J Endocrinol Invest*, v. 30, p. 323-6.
- Fjaere, E., U. L. Aune, K. Roen, A. H. Keenan, T. Ma, K. Borkowski, D. M. Kristensen, G. W. Novotny, T. Mandrup-Poulsen, B. D. Hudson, G. Milligan, Y. Xi, J. W. Newman, F. G. Haj, B. Liaset, K. Kristiansen, and L. Madsen, 2014, Indomethacin Treatment Prevents High Fat Diet-induced Obesity and Insulin Resistance but Not Glucose Intolerance in C57BL/6J Mice: *J Biol Chem*, v. 289, p. 16032-16045.
- Fjære, E., U. L. Aune, K. Røen, A. H. Keenan, T. Ma, K. Borkowski, D. M. Kristensen, G. W. Novotny, T. Mandrup-Poulsen, B. D. Hudson, G. Milligan, Y. Xi, J. W. Newman, F. G. Haj, B. Liaset, K. Kristiansen, and L. Madsen, 2014, Indomethacin treatment prevents high fat diet-induced obesity and insulin resistance but not glucose intolerance in C57BL/6J mice: *J Biol Chem*, v. 289, p. 16032-45.
- 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*, v. 83, p. 803-12.
- Forner, F., C. Kumar, C. A. Luber, T. Fromme, M. Klingenspor, and M. Mann, 2009, Proteome differences between brown and white fat mitochondria reveal specialized metabolic functions: *Cell Metab*, v. 10, p. 324-35.
- Foufelle, F., and P. Ferré, 2002, New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c: *Biochem J*, v. 366, p. 377-91.
- Foufelle, F., and P. Ferré, 2013, Mécanisme de stockage et de synthèse des acides gras et des triglycérides dans le tissu adipeux blanc, *in* Springer, ed., *Physiologie et physiopathologie du tissu adipeux*.

- Foufelle, F., B. Gouhot, J. P. Pégorier, D. Perdereau, J. Girard, and P. Ferré, 1992, Glucose stimulation of lipogenic enzyme gene expression in cultured white adipose tissue. A role for glucose 6-phosphate: *J Biol Chem*, v. 267, p. 20543-6.
- Franckhauser, S., S. Muñoz, A. Pujol, A. Casellas, E. Riu, P. Otaegui, B. Su, and F. Bosch, 2002, Increased fatty acid re-esterification by PEPCK overexpression in adipose tissue leads to obesity without insulin resistance: *Diabetes*, v. 51, p. 624-30.
- Frontini, A., and S. Cinti, 2010, Distribution and development of brown adipocytes in the murine and human adipose organ: *Cell Metab*, v. 11, p. 253-6.
- 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: *Biochim Biophys Acta*, v. 1831, p. 950-9.
- Fujimori, K., 2012, Prostaglandins as PPAR $\gamma$  Modulators in Adipogenesis: *PPAR Res*, v. 2012, p. 527607.
- Fujimori, K., T. Ueno, N. Nagata, K. Kashiwagi, K. Aritake, F. Amano, and Y. Urade, 2010, Suppression of adipocyte differentiation by aldo-keto reductase 1B3 acting as prostaglandin F $2\alpha$  synthase: *J Biol Chem*, v. 285, p. 8880-6.
- Fujimori, K., M. Yano, H. Miyake, and H. Kimura, 2014, Termination mechanism of CREB-dependent activation of COX-2 expression in early phase of adipogenesis: *Mol Cell Endocrinol*, v. 384, p. 12-22.
- Fujimori, K., M. Yano, and T. Ueno, 2012, Synergistic suppression of early phase of adipogenesis by microsomal PGE synthase-1 (PTGES1)-produced PGE2 and aldo-keto reductase 1B3-produced PGF $2\alpha$ : *PLoS One*, v. 7, p. e44698.
- Gaillard, D., R. Negrel, M. Lagarde, and G. Ailhaud, 1989a, Requirement and role of arachidonic acid in the differentiation of pre-adipose cells: *Biochem J*, v. 257, p. 389-97.
- Gaillard, D., R. Négre, M. Lagarde, and G. Ailhaud, 1989b, Requirement and role of arachidonic acid in the differentiation of pre-adipose cells: *Biochem J*, v. 257, p. 389-97.
- Garaulet, M., F. Pérez-Llamas, M. Pérez-Ayala, P. Martínez, F. S. de Medina, F. J. Tebar, and S. Zamora, 2001, Site-specific differences in the fatty acid composition of abdominal adipose tissue in an obese population from a Mediterranean area: relation with dietary fatty acids, plasma lipid profile, serum insulin, and central obesity: *Am J Clin Nutr*, v. 74, p. 585-91.
- Garin-Shkolnik, T., A. Rudich, G. S. Hotamisligil, and M. Rubinstein, 2014, FABP4 attenuates PPAR $\gamma$  and adipogenesis and is inversely correlated with PPAR $\gamma$  in adipose tissues: *Diabetes*, v. 63, p. 900-11.
- Garlid, K. D., M. Jabůrek, and P. Jezek, 1998, The mechanism of proton transport mediated by mitochondrial uncoupling proteins: *FEBS Lett*, v. 438, p. 10-4.
- Gesta, S., Y. H. Tseng, and C. R. Kahn, 2007, Developmental origin of fat: tracking obesity to its source: *Cell*, v. 131, p. 242-56.
- Ghoshal, S., D. B. Trivedi, G. A. Graf, and C. D. Loftin, 2011, Cyclooxygenase-2 deficiency attenuates adipose tissue differentiation and inflammation in mice: *J Biol Chem*, v. 286, p. 889-98.
- Gnad, T., S. Scheibler, I. von Kügelgen, C. Scheele, A. Kilić, A. Glöde, L. S. Hoffmann, L. Reverte-Salisa, P. Horn, S. Mutlu, A. El-Tayeb, M. Kranz, W. Deuther-Conrad, P. Brust, M. E. Lidell, M. J. Betz, S. Enerbäck, J. Schrader, G. G. Yegutkin, C. E. Müller, and A. Pfeifer, 2014, Adenosine activates brown adipose tissue and recruits beige adipocytes via A2A receptors: *Nature*, v. 516, p. 395-9.
- 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*, v. 282, p. 5726-35.
- Gray, S., M. W. Feinberg, S. Hull, C. T. Kuo, M. Watanabe, S. Sen-Banerjee, A. DePina, R. Haspel, and M. K. Jain, 2002, The Krüppel-like factor KLF15 regulates the insulin-sensitive glucose transporter GLUT4: *J Biol Chem*, v. 277, p. 34322-8.

- Guennoun, A., M. Kazantzis, R. Thomas, M. Wabitsch, D. Tews, K. Seetharama Sastry, M. Abdelkarim, V. Zilberfarb, A. D. Strosberg, and L. Chouchane, 2015, Comprehensive molecular characterization of human adipocytes reveals a transient brown phenotype: *J Transl Med*, v. 13, p. 135.
- Guerra, C., R. A. Koza, H. Yamashita, K. Walsh, and L. P. Kozak, 1998, Emergence of brown adipocytes in white fat in mice is under genetic control. Effects on body weight and adiposity: *J Clin Invest*, v. 102, p. 412-20.
- Guesnet, 2005, Les rôles physiologiques majeurs exercés par les acides gras polyinsaturés (AGPI): *OCL*, v. 12, p. 333-343.
- Guillou, H., D. Zadavec, P. G. Martin, and A. Jacobsson, 2010, The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice: *Prog Lipid Res*, v. 49, p. 186-99.
- Haider, D. G., K. Schindler, G. Schaller, G. Prager, M. Wolzt, and B. Ludvik, 2006, Increased plasma visfatin concentrations in morbidly obese subjects are reduced after gastric banding: *J Clin Endocrinol Metab*, v. 91, p. 1578-81.
- 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-1 $\alpha$  regulates the expression of the lipid droplet protein CIDEA: *Mol Cell Biol*, v. 28, p. 6785-95.
- 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*, v. 58, p. 889-99.
- Hamm, J. K., B. H. Park, and S. R. Farmer, 2001, A role for C/EBP $\beta$  in regulating peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity during adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes: *J Biol Chem*, v. 276, p. 18464-71.
- 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*, v. 5, p. 10275.
- 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*, v. 29, p. 1393-8.
- Harms, M., and P. Seale, 2013, Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential: *Nat Med*, v. 19, p. 1252-63.
- Heaton, J. M., 1972, The distribution of brown adipose tissue in the human: *J Anat*, v. 112, p. 35-9.
- Henegar, C., J. Tordjman, V. Achard, D. Lacasa, I. Cremer, M. Guerre-Millo, C. Poitou, A. Basdevant, V. Stich, N. Viguerie, D. Langin, P. Bedossa, J. D. Zucker, and K. Clement, 2008, Adipose tissue transcriptomic signature highlights the pathological relevance of extracellular matrix in human obesity: *Genome Biol*, v. 9, p. R14.
- Hertz, R., I. Berman, D. Keppler, and J. Bar-Tana, 1996, Activation of gene transcription by prostacyclin analogues is mediated by the peroxisome-proliferators-activated receptor (PPAR): *Eur J Biochem*, v. 235, p. 242-7.
- Hildebrand, M., 1992, Pharmacokinetics of iloprost and cicaprost in mice: *Prostaglandins*, v. 44, p. 431-42.
- Hildebrand, M., T. Staks, and B. Nieuweboer, 1990, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cicaprost in healthy volunteers after oral administration of 5 to 20 micrograms: *Eur J Clin Pharmacol*, v. 39, p. 149-53.
- Hirasawa, A., T. Hara, S. Katsuma, T. Adachi, and G. Tsujimoto, 2008, Free fatty acid receptors and drug discovery: *Biol Pharm Bull*, v. 31, p. 1847-51.
- Holman, 1970, Biological activities of polyunsaturated fatty acids: *Prog Chem fats lipids IX*, p. 607-82.
- Hu, E., P. Liang, and B. M. Spiegelman, 1996, AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity: *J Biol Chem*, v. 271, p. 10697-703.

- Hu, F., M. Wang, T. Xiao, B. Yin, L. He, W. Meng, M. Dong, and F. Liu, 2015, miR-30 promotes thermogenesis and the development of beige fat by targeting RIP140: *Diabetes*, v. 64, p. 2056-68.
- Hunt, C. R., J. H. Ro, D. E. Dobson, H. Y. Min, and B. M. Spiegelman, 1986, Adipocyte P2 gene: developmental expression and homology of 5'-flanking sequences among fat cell-specific genes: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 83, p. 3786-90.
- Hétu, P. O., and D. Riendeau, 2007, Down-regulation of microsomal prostaglandin E2 synthase-1 in adipose tissue by high-fat feeding: *Obesity (Silver Spring)*, v. 15, p. 60-8.
- Inazumi, T., N. Shirata, K. Morimoto, H. Takano, E. Segi-Nishida, and Y. Sugimoto, 2011, Prostaglandin E<sub>2</sub>-EP4 signaling suppresses adipocyte differentiation in mouse embryonic fibroblasts via an autocrine mechanism: *J Lipid Res*, v. 52, p. 1500-8.
- INGALLS, A. M., M. M. DICKIE, and G. D. SNELL, 1950, Obese, a new mutation in the house mouse: *J Hered*, v. 41, p. 317-8.
- Inoue, E., T. Ichiki, K. Takeda, H. Matsuura, T. Hashimoto, J. Ikeda, A. Kamiharaguchi, and K. Sunagawa, 2012, Beraprost sodium, a stable prostacyclin analogue, improves insulin resistance in high-fat diet-induced obese mice: *J Endocrinol*, v. 213, p. 285-91.
- Inoue, K., K. Kishida, A. Hirata, T. Funahashi, and I. Shimomura, 2013, Low serum eicosapentaenoic acid / arachidonic acid ratio in male subjects with visceral obesity: *Nutr Metab (Lond)*, v. 10, p. 25.
- Iqbal, J., and M. M. Hussain, 2009, Intestinal lipid absorption: *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 296, p. E1183-94.
- Itariu, B. K., M. Zeyda, E. E. Hochbrugger, A. Neuhofer, G. Prager, K. Schindler, A. Bohdjalian, D. Mascher, S. Vangala, M. Schranz, M. Krebs, M. G. Bischof, and T. M. Stulnig, 2012, Long-chain n-3 PUFAs reduce adipose tissue and systemic inflammation in severely obese nondiabetic patients: a randomized controlled trial: *Am J Clin Nutr*, v. 96, p. 1137-49.
- IUPAC-IUB, 1977, Commission on Biochemical Nomenclature (CBN). The nomenclature of lipids. Recommendations, 1976., v. 79: *Eur J Biochem*.
- Jacobsson, A., M. Mühleisen, B. Cannon, and J. Nedergaard, 1994, The uncoupling protein thermogenin during acclimation: indications for pretranslational control: *Am J Physiol*, v. 267, p. R999-1007.
- Javadi, M., H. Everts, R. Hovenier, S. Kocsis, A. E. Lankhorst, A. G. Lemmens, J. T. Schonewille, A. H. Terpstra, and A. C. Beynen, 2004, The effect of six different C18 fatty acids on body fat and energy metabolism in mice: *Br J Nutr*, v. 92, p. 391-9.
- Jespersen, N. Z., T. J. Larsen, L. Peijs, S. Daugaard, 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*, v. 17, p. 798-805.
- Jia, B., L. Madsen, R. K. Petersen, N. Techer, R. Kopperud, T. Ma, S. O. Døskeland, G. Ailhaud, J. Wang, E. Z. Amri, and K. Kristiansen, 2012a, Activation of protein kinase A and exchange protein directly activated by cAMP promotes adipocyte differentiation of human mesenchymal stem cells: *PLoS ONE*, v. 7, p. e34114.
- Jia, B., L. Madsen, R. K. Petersen, N. Techer, R. Kopperud, T. Ma, S. O. Døskeland, G. Ailhaud, J. Wang, E. Z. Amri, and K. Kristiansen, 2012b, Activation of protein kinase A and exchange protein directly activated by cAMP promotes adipocyte differentiation of human mesenchymal stem cells: *PLoS One*, v. 7, p. e34114.
- Jo, S. J., W. W. Choi, E. S. Lee, J. Y. Lee, H. S. Park, D. W. Moon, H. C. Eun, and J. H. Chung, 2011, Temporary increase of PPAR- $\gamma$  and transient expression of UCP-1 in stromal vascular fraction isolated human adipocyte derived stem cells during adipogenesis: *Lipids*, v. 46, p. 487-94.

- Joffin, N., A. M. Jaubert, J. Bamba, R. Barouki, P. Noirez, and C. Forest, 2015, Acute induction of uncoupling protein 1 by citrulline in cultured explants of white adipose tissue from lean and high-fat-diet-fed rats: *Adipocyte*, v. 4, p. 129-34.
- Jump, D. B., S. Tripathy, and C. M. Depner, 2013, Fatty acid-regulated transcription factors in the liver: *Annu Rev Nutr*, v. 33, p. 249-69.
- 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*, v. 116, p. 1784-92.
- Kahn, B. B., T. Alquier, D. Carling, and D. G. Hardie, 2005, AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism: *Cell Metab*, v. 1, p. 15-25.
- 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*, v. 460, p. 1154-8.
- 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*, v. 22, p. 1397-409.
- Kalupahana, N. S., K. J. Claycombe, and N. Moustaid-Moussa, 2011, (n-3) Fatty acids alleviate adipose tissue inflammation and insulin resistance: mechanistic insights: *Adv Nutr*, v. 2, p. 304-16.
- Karbiener, M., D. F. Pisani, A. Frontini, L. M. Oberreiter, E. Lang, A. Vegiopoulos, K. Mössenböck, G. A. Bernhardt, T. Mayr, F. Hildner, J. Grillari, G. Ailhaud, S. Herzig, S. Cinti, E. Z. Amri, and M. Scheideler, 2014, MicroRNA-26 family is required for human adipogenesis and drives characteristics of brown adipocytes: *Stem Cells*, v. 32, p. 1578-90.
- Kather, H., 1981, Effects of prostaglandin E2 on adenylate cyclase activity and lipolysis in human adipose tissue: *Int J Obes*, v. 5, p. 659-63.
- Kazak, L., E. T. Chouchani, M. P. Jedrychowski, B. K. Erickson, K. Shinoda, P. Cohen, R. Vetrivelan, G. Z. Lu, D. Laznik-Bogoslavski, S. C. Hasenfuss, S. Kajimura, S. P. Gygi, and B. M. Spiegelman, 2015, A creatine-driven substrate cycle enhances energy expenditure and thermogenesis in beige fat: *Cell*, v. 163, p. 643-55.
- Kazantzis, M., and A. Stahl, 2012, Fatty acid transport proteins, implications in physiology and disease: *Biochim Biophys Acta*, v. 1821, p. 852-7.
- Kim, J. B., H. M. Wright, M. Wright, and B. M. Spiegelman, 1998, ADD1/SREBP1 activates PPARgamma through the production of endogenous ligand: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 95, p. 4333-7.
- Kim, M., T. Goto, R. Yu, K. Uchida, M. Tominaga, Y. Kano, N. Takahashi, and T. Kawada, 2015, Fish oil intake induces UCP1 upregulation in brown and white adipose tissue via the sympathetic nervous system: *Sci Rep*, v. 5, p. 18013.
- Klingenspor, M., M. Ivemeyer, H. Wiesinger, K. Haas, G. Heldmaier, and R. J. Wiesner, 1996, Biogenesis of thermogenic mitochondria in brown adipose tissue of Djungarian hamsters during cold adaptation: *Biochem J*, v. 316 ( Pt 2), p. 607-13.
- Knauf, C., J. Rieusset, M. Foretz, P. D. Cani, M. Uldry, M. Hosokawa, E. Martinez, M. Bringart, A. Waget, S. Kersten, B. Desvergne, S. Gremlich, W. Wahli, J. Seydoux, N. M. Delzenne, B. Thorens, and R. Burcelin, 2006, Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-null mice have increased white adipose tissue glucose utilization, GLUT4, and fat mass: Role in liver and brain: *Endocrinology*, v. 147, p. 4067-78.
- Koh, Y. J., B. H. Park, J. H. Park, J. Han, I. K. Lee, J. W. Park, and G. Y. Koh, 2009, Activation of PPAR gamma induces profound multilocularization of adipocytes in adult mouse white adipose tissues: *Exp Mol Med*, v. 41, p. 880-95.
- Kooijman, S., Y. Wang, E. T. Parlevliet, M. R. Boon, D. Edelschaap, G. Snaterse, H. Pijl, J. A. Romijn, and P. C. Rensen, 2015, Central GLP-1 receptor signalling accelerates plasma clearance of

- triacylglycerol and glucose by activating brown adipose tissue in mice: *Diabetologia*, v. 58, p. 2637-46.
- Kremmyda, L. S., E. Tvrzicka, B. Stankova, and A. Zak, 2011, Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease: a review. part 2: fatty acid physiological roles and applications in human health and disease: *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, v. 155, p. 195-218.
- Kringelholz, S., U. Simonsen, and T. Bek, 2013, Dual effect of prostaglandins on isolated intraocular porcine ciliary arteries: *Acta Ophthalmol*, v. 91, p. 498-504.
- Lafontan, M., and D. Langin, 2009, Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue: *Prog Lipid Res*, v. 48, p. 275-97.
- Langin, D., 2006, Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome: *Pharmacol Res*, v. 53, p. 482-91.
- Langin, D., 2010, Recruitment of brown fat and conversion of white into brown adipocytes: strategies to fight the metabolic complications of obesity?: *Biochim Biophys Acta*, v. 1801, p. 372-6.
- Lavialle, M., and S. Layé, 2010, Acides gras poly-insaturés (oméga 3, oméga 6) et fonctionnement du système nerveux central, *Innovations Agronomiques* 10, p. 25-42.
- Lechner, S., M. C. Mitterberger, M. Mattesich, and W. Zwerschke, 2013, Role of C/EBP $\beta$ -LAP and C/EBP $\beta$ -LIP in early adipogenic differentiation of human white adipose-derived progenitors and at later stages in immature adipocytes: *Differentiation*, v. 85, p. 20-31.
- Lee, G. H., R. Proenca, J. M. Montez, K. M. Carroll, J. G. Darvishzadeh, J. I. Lee, and J. M. Friedman, 1996, Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice: *Nature*, v. 379, p. 632-5.
- Lee, J. Y., H. Hashizaki, T. Goto, T. Sakamoto, N. Takahashi, and T. Kawada, 2011, Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  enhances fatty acid oxidation in human adipocytes: *Biochem Biophys Res Commun*, v. 407, p. 818-22.
- Lee, J. Y., N. Takahashi, M. Yasubuchi, Y. I. Kim, H. Hashizaki, M. J. Kim, T. Sakamoto, T. Goto, and T. Kawada, 2012a, Triiodothyronine induces UCP-1 expression and mitochondrial biogenesis in human adipocytes: *Am J Physiol Cell Physiol*, v. 302, p. C463-72.
- Lee, P., M. M. Swarbrick, and K. K. Ho, 2013, Brown adipose tissue in adult humans: a metabolic renaissance: *Endocr Rev*, v. 34, p. 413-38.
- Lee, S. S., T. Pineau, J. Drago, E. J. Lee, J. W. Owens, D. L. Kroetz, P. M. Fernandez-Salguero, H. Westphal, and F. J. Gonzalez, 1995, Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators: *Mol Cell Biol*, v. 15, p. 3012-22.
- 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 J*, v. 29, p. 286-99.
- Lee, Y. H., A. P. Petkova, E. P. Mottillo, and J. G. Granneman, 2012b, In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by  $\beta$ 3-adrenoceptor activation and high-fat feeding: *Cell Metab*, v. 15, p. 480-91.
- Legrand, P., 2013, Nouvelle approche pour les recommandations nutritionnelles en lipides: *OCL*, v. 20.
- Legrand, P., D. Catheline, V. Rioux, and G. Durand, 2002, Lauric acid is desaturated to 12:1n-3 by hepatocytes and rat liver homogenates: *Lipids*, v. 37, p. 569-72.
- 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. Enerbäck, 2013, Evidence for two types of brown adipose tissue in humans: *Nat Med*, v. 19, p. 631-4.
- Liesa, M., and O. S. Shirihai, 2013, Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure: *Cell Metab*, v. 17, p. 491-506.
- Lim, H., and K. S. Dey, 2002, A novel pathway of prostacyclin signaling-hanging out with nuclear receptors: *Endocrinology*, v. 143(9), p. 3207-3210.

- Liu, H. Y., G. Zheng, H. Zhu, and G. Woldegiorgis, 2007, Hormonal and nutritional regulation of muscle carnitine palmitoyltransferase I gene expression in vivo: *Arch Biochem Biophys*, v. 465, p. 437-42.
- Liu, J., A. Divoux, J. Sun, J. Zhang, K. Clément, 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*, v. 15, p. 940-5.
- Liu, L., and N. A. Clipstone, 2007, Prostaglandin F2alpha inhibits adipocyte differentiation via a G alpha q-calcium-calcineurin-dependent signaling pathway: *J Cell Biochem*, v. 100, p. 161-73.
- Lo, K. A., and L. Sun, 2013, Turning WAT into BAT: a review on regulators controlling the browning of white adipocytes: *Biosci Rep*, v. 33.
- Lockie, S. H., K. M. Heppner, N. Chaudhary, J. R. Chabenne, D. A. Morgan, C. Veyrat-Durebex, G. Ananthakrishnan, F. Rohner-Jeanrenaud, D. J. Drucker, R. DiMarchi, K. Rahmouni, B. J. Oldfield, M. H. Tschöp, and D. Perez-Tilve, 2012, Direct control of brown adipose tissue thermogenesis by central nervous system glucagon-like peptide-1 receptor signaling: *Diabetes*, v. 61, p. 2753-62.
- Loft, A., I. Forss, M. S. Siersbæk, 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 PPAR $\gamma$  superenhancers: *Genes Dev*, v. 29, p. 7-22.
- Loftus, T. M., and M. D. Lane, 1997, Modulating the transcriptional control of adipogenesis: *Curr Opin Genet Dev*, v. 7, p. 603-8.
- 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, E. D. Rosen, and B. M. Spiegelman, 2014, A smooth muscle-like origin for beige adipocytes: *Cell Metab*, v. 19, p. 810-20.
- Louet, J. F., G. Hayhurst, F. J. Gonzalez, J. Girard, and J. F. Decaux, 2002, The coactivator PGC-1 is involved in the regulation of the liver carnitine palmitoyltransferase I gene expression by cAMP in combination with HNF4 alpha and cAMP-response element-binding protein (CREB): *J Biol Chem*, v. 277, p. 37991-8000.
- Louet, J. F., and B. W. O'Malley, 2007, Coregulators in adipogenesis: what could we learn from the SRC (p160) coactivator family?: *Cell Cycle*, v. 6, p. 2448-52.
- Ma, S., H. Yu, Z. Zhao, Z. Luo, J. Chen, Y. Ni, R. Jin, L. Ma, P. Wang, Z. Zhu, J. Zhong, D. Liu, B. Nilius, and Z. Zhu, 2011, Activation of the cold-sensing TRPM8 channel triggers UCP1-dependent thermogenesis and prevents obesity: *Journal of Molecular Cell Biology*, v. 0, 1-9.
- Madsen, L., L. M. Pedersen, B. Liaset, T. Ma, R. K. Petersen, S. van den Berg, J. Pan, K. Muller-Decker, E. D. Dulsner, R. Kleemann, T. Kooistra, S. O. Doskeland, and K. Kristiansen, 2008a, cAMP-dependent signaling regulates the adipogenic effect of n-6 polyunsaturated fatty acids: *J Biol Chem*, v. 283, p. 7196-205.
- Madsen, L., L. M. Pedersen, B. Liaset, T. Ma, R. K. Petersen, S. van den Berg, J. Pan, K. Müller-Decker, E. D. Dulsner, R. Kleemann, T. Kooistra, S. O. Døskeland, and K. Kristiansen, 2008b, cAMP-dependent signaling regulates the adipogenic effect of n-6 polyunsaturated fatty acids: *J Biol Chem*, v. 283, p. 7196-205.
- 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, 2010a, UCP1 induction during recruitment of brown adipocytes in white adipose tissue is dependent on cyclooxygenase activity: *PLoS ONE*, v. 5, p. e11391.
- 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. Døskeland, and K. Kristiansen, 2010b, UCP1

- induction during recruitment of brown adipocytes in white adipose tissue is dependent on cyclooxygenase activity: *PLoS One*, v. 5, p. e11391.
- Madsen, L., R. K. Petersen, M. B. Sorensen, C. Jorgensen, P. Hallenborg, L. Pridal, J. Fleckner, E. Z. Amri, P. Krieg, G. Furstenberger, R. K. Berge, and K. Kristiansen, 2003a, Adipocyte differentiation of 3T3-L1 preadipocytes is dependent on lipoxygenase activity during the initial stages of the differentiation process: *Biochem J*, v. 375, p. 539-49.
- Madsen, L., R. K. Petersen, M. B. Sørensen, C. Jørgensen, P. Hallenborg, L. Pridal, J. Fleckner, E. Z. Amri, P. Krieg, G. Furstenberger, R. K. Berge, and K. Kristiansen, 2003b, Adipocyte differentiation of 3T3-L1 preadipocytes is dependent on lipoxygenase activity during the initial stages of the differentiation process: *Biochem J*, v. 375, p. 539-49.
- Malki, S., F. Declosmenil, A. Farhat, B. Moniot, F. Poulat, and B. Boizet-Bonhoure, 2008, la prostaglandine D2 nouveaux rôles dans la gonade embryonnaire et pathologique: *Med.Sci (paris)*, v. 24(2), p. 177-184.
- Massiera, F., P. Barbry, P. Guesnet, A. Joly, S. Luquet, C. Moreilhon-Brest, T. Mohsen-Kanson, E. Z. Amri, and G. Ailhaud, 2010, A Western-like fat diet is sufficient to induce a gradual enhancement in fat mass over generations: *J Lipid Res*, v. 51, p. 2352-61.
- Massiera, F., P. Saint-Marc, J. Seydoux, T. Murata, T. Kobayashi, S. Narumiya, P. Guesnet, E. Z. Amri, R. Negrel, and G. Ailhaud, 2003, Arachidonic acid and prostacyclin signaling promote adipose tissue development: a human health concern?: *J Lipid Res*, v. 44, p. 271-9.
- Matusue, K., J. Peters, and F. J. Gonzalez, 2004, PPAR $\beta/\delta$  potentiates PPAR $\gamma$ -stimulated adipocyte differentiation: *FASEB J.*, v. 18, p. 1477-1479.
- Mattsson, C. L., R. I. Csikasz, E. Chernogubova, D. L. Yamamoto, H. T. Hogberg, E. Z. Amri, D. S. Hutchinson, and T. Bengtsson, 2011,  $\beta_1$ -Adrenergic receptors increase UCP1 in human MADS brown adipocytes and rescue cold-acclimated  $\beta_3$ -adrenergic receptor-knockout mice via nonshivering thermogenesis: *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 301, p. E1108-18.
- Mazid, M. A., A. A. Chowdhury, K. Nagao, K. Nishimura, M. Jisaka, T. Nagaya, and K. Yokota, 2006, Endogenous 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) synthesized by adipocytes during maturation phase contributes to upregulation of fat storage: *FEBS Lett*, v. 580, p. 6885-90.
- 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. Seppänen-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*, v. 54, p. 1706-16.
- Michaud, A., N. Lacroix-Pépin, M. Pelletier, M. Daris, L. Biertho, M. Fortier, and A. Tchernof, 2014, Expression of genes related to prostaglandin synthesis or signaling in human subcutaneous and omental adipose tissue: depot differences and modulation by adipogenesis: mediators of inflammation, v. 2014:451620. doi: 10.1155/2014/451620.
- Mickael, K., 2014, [themedicalbiochemistrypage.org](http://themedicalbiochemistrypage.org).
- Minami, Y., T. Sasaki, H. Bochimoto, J. Kawabe, S. Endo, Y. Hira, T. Watanabe, S. Okumura, N. Hasebe, and Y. Ohsaki, 2015, Prostaglandin I2 analog suppresses lung metastasis by recruiting pericytes in tumor angiogenesis: *Int J Oncol*, v. 46, p. 548-54.
- 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 Krüppel-like factor 15 (KLF15) in transcriptional regulation of adipogenesis: *J Biol Chem*, v. 280, p. 12867-75.
- Moustaid, N., R. S. Beyer, and H. S. Sul, 1994, Identification of an insulin response element in the fatty acid synthase promoter: *J Biol Chem*, v. 269, p. 5629-34.

- 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*, v. 277, p. 41925-30.
- Muhlhausler, B. S., and G. P. Ailhaud, 2013, Omega-6 polyunsaturated fatty acids and the early origins of obesity: *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, v. 20, p. 56-61.
- Muhlhausler, B. S., R. Cook-Johnson, M. James, D. Miljkovic, E. Duthoit, and R. Gibson, 2010, Opposing effects of omega-3 and omega-6 long chain polyunsaturated Fatty acids on the expression of lipogenic genes in omental and retroperitoneal adipose depots in the rat: *J Nutr Metab*, v. 2010.
- Myers, M. G., R. L. Leibel, R. J. Seeley, and M. W. Schwartz, 2010, Obesity and leptin resistance: distinguishing cause from effect: *Trends Endocrinol Metab*, v. 21, p. 643-51.
- Nedergaard, J., T. Bengtsson, and B. Cannon, 2007, Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans: *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 293, p. E444-52.
- 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*, v. 480, p. 104-8.
- Nicholls, D. G., and R. M. Locke, 1984, Thermogenic mechanisms in brown fat: *Physiol Rev*, v. 64, p. 1-64.
- Nikolopoulou, E., G. Papacleovoulou, F. Jean-Alphonse, G. Grimaldi, M. G. Parker, A. C. Hanyaloglu, and M. Christian, 2014, Arachidonic acid-dependent gene regulation during preadipocyte differentiation controls adipocyte potential: *J Lipid Res*, v. 55, p. 2479-90.
- Niu, S. L., D. C. Mitchell, S. Y. Lim, Z. M. Wen, H. Y. Kim, N. Salem, and B. J. Litman, 2004, Reduced G protein-coupled signaling efficiency in retinal rod outer segments in response to n-3 fatty acid deficiency: *J Biol Chem*, v. 279, p. 31098-104.
- Négre, R., D. Gaillard, and G. Ailhaud, 1989, Prostacyclin as a potent effector of adipose-cell differentiation: *Biochem J*, v. 257, p. 399-405.
- Nübel, T., and D. Ricquier, 2006, Respiration under control of uncoupling proteins: Clinical perspective: *Horm Res*, v. 65, p. 300-10.
- O'Connell, C., D. Amar, A. Boucly, L. Savale, X. Jaïs, M. C. Chaumais, D. Montani, M. Humbert, G. Simonneau, and O. Sitbon, 2016, Comparative Safety and Tolerability of Prostacyclins in Pulmonary Hypertension: *Drug Saf*.
- Obregon, M. J., 2014, Adipose tissues and thyroid hormones: *Front Physiol*, v. 5, p. 479.
- Oh, D. Y., S. Talukdar, E. J. Bae, T. Imamura, H. Morinaga, W. Fan, P. Li, W. J. Lu, S. M. Watkins, and J. M. Olefsky, 2010, GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects: *Cell*, v. 142, p. 687-98.
- Olsen, J. M., M. Sato, O. S. Dallner, A. L. Sandström, 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*, v. 207, p. 365-74.
- 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*, v. 6, p. 33-42.
- Park, B. O., R. Ahrends, and M. N. Teruel, 2012, Consecutive positive feedback loops create a bistable switch that controls preadipocyte-to-adipocyte conversion: *Cell Rep*, v. 2, p. 976-90.
- Park, J. Y., M. H. Pillinger, and S. B. Abramson, 2006, Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases: *Clin Immunol*, v. 119, p. 229-40.
- Payne, V. A., W. S. Au, C. E. Lowe, S. M. Rahman, J. E. Friedman, S. O'Rahilly, and J. J. Rochford, 2010, C/EBP transcription factors regulate SREBP1c gene expression during adipogenesis: *Biochem J*, v. 425, p. 215-23.
- Pecqueur, C., M. C. Alves-Guerra, C. Gelly, C. Levi-Meyrueis, E. Couplan, S. Collins, D. Ricquier, F. Bouillaud, and B. Miroux, 2001, Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation: *J Biol Chem*, v. 276, p. 8705-12.

- Peier, A. M., A. Moqrich, A. C. Hergarden, A. J. Reeve, D. A. Andersson, G. M. Story, T. J. Earley, I. Dragoni, P. McIntyre, S. Bevan, and A. Patapoutian, 2002, A TRP channel that senses cold stimuli and menthol: *Cell*, v. 108, p. 705-15.
- Peters, S. J., 2003, Regulation of PDH activity and isoform expression: diet and exercise: *Biochem Soc Trans*, v. 31, p. 1274-80.
- Petersen, R. K., C. Jorgensen, A. C. Rustan, L. Froyland, K. Muller-Decker, G. Furstenberger, R. K. Berge, K. Kristiansen, and L. Madsen, 2003a, Arachidonic acid-dependent inhibition of adipocyte differentiation requires PKA activity and is associated with sustained expression of cyclooxygenases: *J Lipid Res*, v. 16, p. 16.
- Petersen, R. K., C. Jørgensen, A. C. Rustan, L. Frøyland, K. Muller-Decker, G. Furstenberger, R. K. Berge, K. Kristiansen, and L. Madsen, 2003b, Arachidonic acid-dependent inhibition of adipocyte differentiation requires PKA activity and is associated with sustained expression of cyclooxygenases: *J Lipid Res*, v. 44, p. 2320-30.
- 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*, v. 285, p. 7153-64.
- Pisani, D. F., G. E. Beranger, A. Corinus, M. Giroud, R. A. Ghandour, J. Altirriba, J. C. Chambard, N. M. Mazure, S. Bendahhou, C. Durantou, J. F. Michiels, A. Frontini, F. Rohner-Jeanrenaud, S. Cinti, M. Christian, J. Barhanin, and E. Z. Amri, 2015, The K<sup>+</sup> channel TASK1 modulates  $\beta$ -adrenergic response in brown adipose tissue through the mineralocorticoid receptor pathway: *FASEB J*.
- 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)*, v. 2, p. 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. Durantou, 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*, v. 3, p. 834-47.
- Polus, A., B. Kiec-Wilk, U. Razny, A. Gielicz, G. Schmitz, and A. Dembinska-Kiec, 2015, Influence of dietary fatty acids on differentiation of human stromal vascular fraction preadipocytes: *Biochim Biophys Acta*, v. 1851, p. 1146-55.
- Postic, C., R. Dentin, P. D. Denechaud, and J. Girard, 2007, ChREBP, a transcriptional regulator of glucose and lipid metabolism: *Annu Rev Nutr*, v. 27, p. 179-92.
- Powell, W. S., 2003, 15-Deoxy-delta12,14-PGJ2: endogenous PPARgamma ligand or minor eicosanoid degradation product?: *J Clin Invest*, v. 112, p. 828-30.
- 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*, v. 92, p. 829-39.
- Péterfy, M., O. Ben-Zeev, H. Z. Mao, D. Weissglas-Volkov, B. E. Aouizerat, C. R. Pullinger, P. H. Frost, J. P. Kane, M. J. Malloy, K. Reue, P. Pajukanta, and M. H. Doolittle, 2007, Mutations in LMF1 cause combined lipase deficiency and severe hypertriglyceridemia: *Nat Genet*, v. 39, p. 1483-7.
- 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*, v. 17, p. 562-74.
- Rauch, J. C., and J. S. Hayward, 1969, Topography and vascularization of brown fat in a small nonhibernator (deer mouse, *Peromyscus maniculatus*): *Can J Zool*, v. 47, p. 1301-14.
- Regina, B. M., 2005, Cyclooxygenase: Past, present and future. A tribute to John R. Vane (1927–2004): *Journal of Thermal Biology*, v. 31, p. 208-219.

- Reginato, M. J., S. L. Krakow, S. T. Bailey, and M. A. Lazar, 1998, Prostaglandins promote and block adipogenesis through opposing effects on peroxisome proliferator-activated receptor gamma: *J Biol Chem*, v. 273, p. 1855-8.
- Revollo, J. R., A. Körner, K. F. Mills, A. Satoh, T. Wang, A. Garten, B. Dasgupta, Y. Sasaki, C. Wolberger, R. R. Townsend, J. Milbrandt, W. Kiess, and S. Imai, 2007, Nampt/PBEF/Visfatin regulates insulin secretion in beta cells as a systemic NAD biosynthetic enzyme: *Cell Metab*, v. 6, p. 363-75.
- Richelsen, B., S. B. Pedersen, T. Møller-Pedersen, and J. F. Bak, 1991, Regional differences in triglyceride breakdown in human adipose tissue: effects of catecholamines, insulin, and prostaglandin E2: *Metabolism*, v. 40, p. 990-6.
- Ricquier, D., and F. Bouillaud, 2000, Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance: *J Physiol*, v. 529 Pt 1, p. 3-10.
- 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*, v. 73, p. 577-83.
- Ricquier, D., M. Nechad, and G. Mory, 1982, Ultrastructural and biochemical characterization of human brown adipose tissue in pheochromocytoma: *J Clin Endocrinol Metab*, v. 54, p. 803-7.
- Rim, J. S., and L. P. Kozak, 2002, Regulatory motifs for CREB-binding protein and Nfe2l2 transcription factors in the upstream enhancer of the mitochondrial uncoupling protein 1 gene: *J Biol Chem*, v. 277, p. 34589-600.
- 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*, v. 315, p. 255-63.
- Rodriguez, A. M., D. Pisani, C. A. Dechesne, C. Turc-Carel, J. Y. Kurzenne, B. Wdziekonski, A. Villageois, C. Bagnis, J. P. Breittmayer, H. Groux, G. Ailhaud, and C. Dani, 2005, Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse: *J Exp Med*, v. 201, p. 1397-405.
- Rosen, E. D., 2016, Burning Fat by Bugging the System: *N Engl J Med*, v. 374, p. 885-7.
- Rosen, E. D., and O. A. MacDougald, 2006, Adipocyte differentiation from the inside out: *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 7, p. 885-96.
- Rosen, E. D., and B. M. Spiegelman, 2000, Molecular regulation of adipogenesis: *Annu Rev Cell Dev Biol*, v. 16, p. 145-71.
- Rosenwald, M., A. Perdikari, T. Rulicke, and C. Wolfrum, 2013a, Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes: *Nat Cell Biol*, v. 15, p. 659-67.
- Rosenwald, M., A. Perdikari, T. Rulicke, and C. Wolfrum, 2013b, Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes: *Nat Cell Biol*, v. 15, p. 659-67.
- Rosenwald, M., and C. Wolfrum, 2014, The origin and definition of brite versus white and classical brown adipocytes: *Adipocyte*, v. 3, p. 4-9.
- Rossato, M., M. Granzotto, V. Macchi, A. Porzionato, L. Petrelli, A. Calcagno, J. Vencato, D. De Stefani, V. Silvestrin, R. Rizzuto, F. Bassetto, R. De Caro, and R. Vettor, 2014, Human white adipocytes express the cold receptor TRPM8 which activation induces UCP1 expression, mitochondrial activation and heat production: *Mol Cell Endocrinol*, v. 383, p. 137-46.
- Rothwell, N. J., and M. J. Stock, 1979, A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis: *Nature*, v. 281, p. 31-5.
- Rowland, A. F., D. J. Fazakerley, and D. E. James, 2011, Mapping insulin/GLUT4 circuitry: *Traffic*, v. 12, p. 672-81.
- 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*, v. 58, p. 1526-31.

- 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*, v. 16, p. 348-62.
- Sato, N., M. Kaneko, M. Tamura, and H. Kurumatani, 2010, The prostacyclin analog beraprost sodium ameliorates characteristics of metabolic syndrome in obese Zucker (fatty) rats: *Diabetes*, v. 59, p. 1092-100.
- Savva, S. C., C. Chadjigeorgiou, C. Hatzis, M. Kyriakakis, G. Tsimbinos, M. Tornaritis, and A. Kafatos, 2004, Association of adipose tissue arachidonic acid content with BMI and overweight status in children from Cyprus and Crete: *Br J Nutr*, v. 91, p. 643-9.
- Schoonjans, K., L. Gelman, C. Haby, M. Briggs, and J. Auwerx, 2000, Induction of LPL gene expression by sterols is mediated by a sterol regulatory element and is independent of the presence of multiple E boxes: *J Mol Biol*, v. 304, p. 323-34.
- Schoonjans, K., J. Peinado-Onsurbe, A. M. Lefebvre, R. A. Heyman, M. Briggs, S. Deeb, B. Staels, and J. Auwerx, 1996, PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene: *EMBO J*, v. 15, p. 5336-48.
- Schwab, J. M., N. Chiang, M. Arita, and C. N. Serhan, 2007, Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes: *Nature*, v. 447, p. 869-74.
- Schweiger, M., M. Paar, C. Eder, J. Brandis, E. Moser, G. Gorkiewicz, S. Grond, F. P. Radner, I. Cerk, I. Cornaciu, M. Oberer, S. Kersten, R. Zechner, R. Zimmermann, and A. Lass, 2012, G0/G1 switch gene-2 regulates human adipocyte lipolysis by affecting activity and localization of adipose triglyceride lipase: *J Lipid Res*, v. 53, p. 2307-17.
- Scimè, 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*, v. 2, p. 283-95.
- Seale, P., B. Bjork, W. Yang, S. Kajimura, S. Chin, S. Kuang, A. Scimè, 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*, v. 454, p. 961-7.
- 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*, v. 6, p. 38-54.
- Semenkovich, C. F., M. Wims, L. Noe, J. Etienne, and L. Chan, 1989, Insulin regulation of lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocytes is mediated at posttranscriptional and posttranslational levels: *J Biol Chem*, v. 264, p. 9030-8.
- Sengenès, C., C. Moro, J. Galitzky, M. Berlan, and M. Lafontan, 2005, [Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human fat cells]: *Med Sci (Paris)*, v. 21 Spec No, p. 29-33.
- Serhan, C. N., N. Chiang, and T. E. Van Dyke, 2008, Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators: *Nat Rev Immunol*, v. 8, p. 349-61.
- Serhan, C. N., J. Dalli, R. A. Colas, J. W. Winkler, and N. Chiang, 2015, Protectins and maresins: New pro-resolving families of mediators in acute inflammation and resolution bioactive metabolome: *Biochim Biophys Acta*, v. 1851, p. 397-413.
- Serhan, C. N., M. Hamberg, and B. Samuelsson, 1984, Lipoxins: novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 81, p. 5335-9.
- 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*, v. 5, p. 1196-203.
- Shaikh, S. R., A. C. Dumauld, A. Castillo, D. LoCascio, R. A. Siddiqui, W. Stillwell, and S. R. Wassall, 2004, Oleic and docosahexaenoic acid differentially phase separate from lipid raft molecules: a comparative NMR, DSC, AFM, and detergent extraction study: *Biophys J*, v. 87, p. 1752-66.

- 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*, v. 7, p. e49452.
- 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*, v. 297, p. E10-8.
- Shillabeer, G., V. Kumar, E. Tibbo, and D. C. Lau, 1998a, Arachidonic acid metabolites of the lipoxygenase as well as the cyclooxygenase pathway may be involved in regulating preadipocyte differentiation: *Metabolism*, v. 47, p. 461-6.
- Shillabeer, G., V. Kumar, E. Tibbo, and D. C. Lau, 1998b, Arachidonic acid metabolites of the lipoxygenase as well as the cyclooxygenase pathway may be involved in regulating preadipocyte differentiation: *Metabolism*, v. 47, p. 461-6.
- Shrago, E., T. Spennetta, and E. Gordon, 1969, Fatty acid synthesis in human adipose tissue: *J Biol Chem*, v. 244, p. 2761-6.
- Sidossis, L., and S. Kajimura, 2015, Brown and beige fat in humans: thermogenic adipocytes that control energy and glucose homeostasis: *J Clin Invest*, v. 125, p. 478-86.
- SILVERMAN, W. A., A. ZAMELIS, J. C. SINCLAIR, and F. J. AGATE, 1964, WARM NAP OF THE NEWBORN: *Pediatrics*, v. 33, p. 984-7.
- Simopoulos, A. P., 2002, The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids: *Biomed Pharmacother*, v. 56, p. 365-79.
- 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*, v. 282, p. 32424-32.
- SMITH, R. E., and R. J. HOCK, 1963, Brown fat: thermogenic effector of arousal in hibernators: *Science*, v. 140, p. 199-200.
- Smorlesi, A., A. Frontini, A. Giordano, and S. Cinti, 2012, The adipose organ: white-brown adipocyte plasticity and metabolic inflammation: *Obes Rev*, v. 13 Suppl 2, p. 83-96.
- Soderhjelm, L., H. F. Wiese, and R. T. Holman, 1970, The role of polyunsaturated acids in human nutrition and metabolism: *Prog Chem fats lipids IX*, p. 555-85.
- Soupene, E., and F. A. Kuypers, 2008, Mammalian long-chain acyl-CoA synthetases: *Exp Biol Med (Maywood)*, v. 233, p. 507-21.
- Spector, A. A., X. Fang, G. D. Snyder, and N. L. Weintraub, 2004, Epoxyeicosatrienoic acids (EETs): metabolism and biochemical function: *Prog Lipid Res*, v. 43, p. 55-90.
- Spiegelman, B. M., and J. S. Flier, 1996, Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture: *Cell*, v. 87, p. 377-89.
- Spinnler, R., T. Gorski, K. Stolz, S. Schuster, A. Garten, A. G. Beck-Sickinger, M. A. Engelse, E. J. de Koning, A. Körner, W. Kiess, and K. Maedler, 2013, The adipocytokine Nampt and its product NMN have no effect on beta-cell survival but potentiate glucose stimulated insulin secretion: *PLoS One*, v. 8, p. e54106.
- Strong, P., R. A. Coleman, and P. P. Humphrey, 1992, Prostanoid-induced inhibition of lipolysis in rat isolated adipocytes: probable involvement of EP3 receptors: *Prostaglandins*, v. 43, p. 559-66.
- 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*, v. 103, p. 17450-5.
- 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*, v. 13, p. 958-65.
- Svensson, P. A., K. Lindberg, J. M. Hoffmann, M. Taube, M. J. Pereira, T. Mohsen-Kanson, A. L. Hafner, M. Rizell, J. Palming, C. Dani, and M. K. Svensson, 2014, Characterization of brown adipose tissue in the human perirenal depot: *Obesity (Silver Spring)*, v. 22, p. 1830-7.
- Tanaka, T., N. Yoshida, T. Kishimoto, and S. Akira, 1997, Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene: *EMBO J*, v. 16, p. 7432-43.

- Tartaglia, L. A., M. Dembski, X. Weng, N. Deng, J. Culpepper, R. Devos, G. J. Richards, L. A. Campfield, F. T. Clark, J. Deeds, C. Muir, S. Sanker, A. Moriarty, K. J. Moore, J. S. Smutko, G. G. Mays, E. A. Wool, C. A. Monroe, and R. I. Tepper, 1995, Identification and expression cloning of a leptin receptor, *OB-R: Cell*, v. 83, p. 1263-71.
- Teodoro, J. S., P. Zouhar, P. Flachs, K. Bardova, P. Janovska, A. P. Gomes, F. V. Duarte, A. T. Varela, A. P. Rolo, C. M. Palmeira, and J. Kopecký, 2014, Enhancement of brown fat thermogenesis using chenodeoxycholic acid in mice: *Int J Obes (Lond)*, v. 38, p. 1027-34.
- Thonberg, H., J. M. Fredriksson, J. Nedergaard, and B. Cannon, 2002, A novel pathway for adrenergic stimulation of cAMP-response-element-binding protein (CREB) phosphorylation: mediation via alpha1-adrenoceptors and protein kinase C activation: *Biochem J*, v. 364, p. 73-9.
- Tontonoz, P., E. Hu, J. Devine, E. G. Beale, and B. M. Spiegelman, 1995, PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene: *Mol Cell Biol*, v. 15, p. 351-7.
- Tsuboi, H., Y. Sugimoto, T. Kainoh, and A. Ichikawa, 2004, Prostanoid EP4 receptor is involved in suppression of 3T3-L1 adipocyte differentiation: *Biochem Biophys Res Commun*, v. 322, p. 1066-72.
- 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*, v. 54, p. 3358-70.
- Tvrzicka, E., L. S. Kremmyda, B. Stankova, and A. Zak, 2011, Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease--a review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions: *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, v. 155, p. 117-30.
- Twig, G., and O. S. Shirihai, 2011, The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy: *Antioxid Redox Signal*, v. 14, p. 1939-51.
- Tzamelis, I., H. Fang, M. Ollero, H. Shi, J. K. Hamm, P. Kievit, A. N. Hollenberg, and J. S. Flier, 2004, Regulated production of a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand during an early phase of adipocyte differentiation in 3T3-L1 adipocytes: *J Biol Chem*, v. 279, p. 36093-102.
- 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*, v. 360, p. 1500-8.
- Vassaux, G., D. Gaillard, C. Darimont, G. Ailhaud, and R. Negrel, 1992a, Differential response of preadipocytes and adipocytes to prostacyclin and prostaglandin E2: physiological implications: *Endocrinology*, v. 131, p. 2393-8.
- Vassaux, G., D. Gaillard, C. Darimont, G. Ailhaud, and R. Negrel, 1992b, Differential response of preadipocytes and adipocytes to prostacyclin and prostaglandin E2: physiological implications: *Endocrinology*, v. 131, p. 2393-8.
- Vegiopoulos, A., K. Müller-Decker, D. Strzoda, I. Schmitt, E. Chichelnitskiy, A. Ostertag, M. Berriel Diaz, J. Rozman, M. Hrabec de Angelis, R. M. Nusing, C. W. Meyer, W. Wahli, M. Klingenspor, and S. Herzig, 2010a, Cyclooxygenase-2 controls energy homeostasis in mice by de novo recruitment of brown adipocytes: *Science*, v. 328, p. 1158-61.
- Vegiopoulos, A., K. Müller-Decker, D. Strzoda, I. Schmitt, E. Chichelnitskiy, A. Ostertag, M. Berriel Diaz, J. Rozman, M. Hrabec de Angelis, R. M. Nusing, C. W. Meyer, W. Wahli, M. Klingenspor, and S. Herzig, 2010b, Cyclooxygenase-2 controls energy homeostasis in mice by de novo recruitment of brown adipocytes: *Science*, v. 328, p. 1158-61.
- Vergnes, L., R. Chin, S. G. Young, and K. Reue, 2011, Heart-type fatty acid-binding protein is essential for efficient brown adipose tissue fatty acid oxidation and cold tolerance: *J Biol Chem*, v. 286, p. 380-90.

- Vidal-Puig, A. J., D. Grujic, C. Y. Zhang, T. Hagen, O. Boss, Y. Ido, A. Szczepanik, J. Wade, V. Mootha, R. Cortright, D. M. Muoio, and B. B. Lowell, 2000, Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice: *J Biol Chem*, v. 275, p. 16258-66.
- Villarroya, F., and A. Vidal-Puig, 2013, Beyond the sympathetic tone: the new brown fat activators: *Cell Metab*, v. 17, p. 638-43.
- 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, 2009a, Functional brown adipose tissue in healthy adults: *N Engl J Med*, v. 360, p. 1518-25.
- Virtanen, K. A., M. E. Lidell, J. Orava, M. Heglind, R. Westergren, T. Niemi, M. Taittonen, J. Laine, N. J. Savisto, S. Enerbäck, and P. Nuutila, 2009b, Functional brown adipose tissue in healthy adults: *N Engl J Med*, v. 360, p. 1518-25.
- Virtanen, K. A., W. D. van Marken Lichtenbelt, and P. Nuutila, 2013, Brown adipose tissue functions in humans: *Biochim Biophys Acta*, v. 1831, p. 1004-8.
- Vishvanath, L., K. A. MacPherson, C. Hepler, Q. A. Wang, M. Shao, S. B. Spurgin, M. Y. Wang, C. M. Kusminski, T. S. Morley, and R. K. Gupta, 2015a, Pdgfr $\beta$  Mural Preadipocytes Contribute to Adipocyte Hyperplasia Induced by High-Fat-Diet Feeding and Prolonged Cold Exposure in Adult Mice: *Cell Metab*.
- Vishvanath, L., K. A. MacPherson, C. Hepler, Q. A. Wang, M. Shao, S. B. Spurgin, M. Y. Wang, C. M. Kusminski, T. S. Morley, and R. K. Gupta, 2015b, Pdgfr $\beta$ (+) Mural Preadipocytes Contribute to Adipocyte Hyperplasia Induced by High-Fat-Diet Feeding and Prolonged Cold Exposure in Adult Mice: *Cell Metab*.
- Vitali, A., I. Murano, M. C. Zingaretti, A. Frontini, D. Ricquier, and S. Cinti, 2012, The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes: *J Lipid Res*, v. 53, p. 619-29.
- Vosselman, M. J., J. Hoeks, B. Brans, H. Pallubinsky, E. B. Nascimento, A. A. van der Lans, E. P. Broeders, F. M. Mottaghy, P. Schrauwen, and W. D. van Marken Lichtenbelt, 2015, Low brown adipose tissue activity in endurance-trained compared with lean sedentary men: *Int J Obes (Lond)*, v. 39, p. 1696-702.
- Wan, Z., A. B. Thrush, M. Legare, B. C. Frier, L. N. Sutherland, D. B. Williams, and D. C. Wright, 2010, Epinephrine-mediated regulation of PDK4 mRNA in rat adipose tissue: *Am J Physiol Cell Physiol*, v. 299, p. C1162-70.
- 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, 2008a, Liver X receptor alpha is a transcriptional repressor of the uncoupling protein 1 gene and the brown fat phenotype: *Mol Cell Biol*, v. 28, p. 2187-200.
- Wang, N. D., M. J. Finegold, A. Bradley, C. N. Ou, S. V. Abdelsayed, M. D. Wilde, L. R. Taylor, D. R. Wilson, and G. J. Darlington, 1995, Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice: *Science*, v. 269, p. 1108-12.
- Wang, Y., K. S. Lam, M. H. Yau, and A. Xu, 2008b, Post-translational modifications of adiponectin: mechanisms and functional implications: *Biochem J*, v. 409, p. 623-33.
- Watanabe, K., 2011, Recent reports about enzymes related to the synthesis of prostaglandin (PG) F(2) (PGF(2 $\alpha$ ) and 9 $\alpha$ , 11 $\beta$ -PGF(2)): *J Biochem*, v. 150, p. 593-6.
- Watanabe, M., S. M. Houten, C. Matakai, M. A. Christoffolete, B. W. Kim, H. Sato, N. Messaddeq, J. W. Harney, O. Ezaki, T. Kodama, K. Schoonjans, A. C. Bianco, and J. Auwerx, 2006, Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation: *Nature*, v. 439, p. 484-9.
- Westerterp, K. R., 2004, Diet induced thermogenesis: *Nutr Metab (Lond)*, v. 1, p. 5.
- 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: *EMBO J*, v. 33, p. 418-36.
- Williams, E. S., A. Baylin, and H. Campos, 2007, Adipose tissue arachidonic acid and the metabolic syndrome in Costa Rican adults: *Clin Nutr*, v. 26, p. 474-82.
- Winkler, E., and M. Klingenberg, 1994, Effect of fatty acids on H<sup>+</sup> transport activity of the reconstituted uncoupling protein: *J Biol Chem*, v. 269, p. 2508-15.
- Wright, J., and L. Agius, 1983, Fatty acid synthesis and ketone body utilization by brown adipose tissue of the rat. Response to cold or nutritional state?: *Biochim Biophys Acta*, v. 753(2):244-8.
- 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*, v. 150, p. 366-76.
- Wu, Q., A. M. Ortegon, B. Tsang, H. Doege, K. R. Feingold, and A. Stahl, 2006, FATP1 is an insulin-sensitive fatty acid transporter involved in diet-induced obesity: *Mol Cell Biol*, v. 26, p. 3455-67.
- Wu, Z., P. Puigserver, U. Andersson, C. Zhang, G. Adelmant, V. Mootha, A. Troy, S. Cinti, B. Lowell, R. C. Scarpulla, and B. M. Spiegelman, 1999a, Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1: *Cell*, v. 98, p. 115-24.
- Wu, Z., E. D. Rosen, R. Brun, S. Hauser, G. Adelmant, A. E. Troy, C. McKeon, G. J. Darlington, and B. M. Spiegelman, 1999b, Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity: *Mol Cell*, v. 3, p. 151-8.
- Yamauchi, T., J. Kamon, Y. Minokoshi, Y. Ito, H. Waki, S. Uchida, S. Yamashita, M. Noda, S. Kita, K. Ueki, K. Eto, Y. Akanuma, P. Froguel, F. Foufelle, P. Ferre, D. Carling, S. Kimura, R. Nagai, B. B. Kahn, and T. Kadowaki, 2002, Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase: *Nat Med*, v. 8, p. 1288-95.
- Yang, H., J. Cheng, Z. Song, X. Li, Z. Zhang, Y. Mai, W. Pang, X. Shi, and G. Yang, 2013, The anti-adipogenic effect of PGRN on porcine preadipocytes involves ERK1,2 mediated PPARgamma phosphorylation: *Mol Biol Rep*, v. 40, p. 6863-72.
- 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*, v. 9, p. 168-81.
- 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, 2004, Selective disruption of PPARgamma 2 impairs the development of adipose tissue and insulin sensitivity: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 101, p. 10703-8.
- Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold, and J. M. Friedman, 1994, Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue: *Nature*, v. 372, p. 425-32.
- Zietak, M., and L. P. Kozak, 2015, Bile acids induce uncoupling protein 1-dependent thermogenesis and stimulate energy expenditure at thermoneutrality in mice: *Am J Physiol Endocrinol Metab*, p. ajpendo.00485.2015.
- Zingaretti, M. C., F. Crosta, A. Vitali, M. Guerrieri, A. Frontini, B. Cannon, J. Nedergaard, and S. Cinti, 2009, The presence of UCP1 demonstrates that metabolically active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue: *FASEB J*, v. 23, p. 3113-20.

## **ANNEXES**

---



## Liste des publications supplémentaires

---



## Article 1

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

**FASEB Journal.** 2016 Feb; 30(2):909-22.

Pisani DF, Beranger GE, Corinus A, Giroud M, Ghandour RA, Altirriba J, Chambard JC, Mazure N, Bendahhou S, Duranton C, Michiels JF, Frontini A, Rohner-Jean renaud F, Cinti S, Christian M, Barhanin J and Amri EZ.

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



## Article 2

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

**Adipocytes.** 2015; ISSN: 2162-3945

Pisani DF, Dumortier O, Beranger GE, Casamento V, Ghandour RA, Giroud M, Gautier N, Balaguer T, Chambard JC, Virtanen KA, Nuutila P, Niemi T, Taittonen M, Van Obberghen E, Hinault C and Amri EZ.

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



## Article 3

### **Jak-TGFbeta crosstalk controls adipocyte progenitor commitment to thermogenic differentiation**

#### **Soumis.**

Rohollah Babaeikelishomi, Irina Meln, Rayane A. Ghandour, Irem Bayindir-Buchhalter, Adrian T. Billeter, Julia Marx, Sarah Lerch, Damir Kronic, Jan Mauer, Yun-Hee Lee, F. Thomas Wunderlich, Jens C. Brüning, Lars Fischer, Beat P. Müller-Stich, Ez-Zoubir Amri, Stephan Herzig, Alexandros Vegiopoulos.

**ABSTRACT.** The signaling pathways controlling the de novo recruitment of metabolically beneficial thermogenic adipocytes from progenitor cells are largely unknown. Recent partly contradictory reports have implicated Janus kinases (Jak) or upstream cytokines in the regulation of the thermogenic conversion of white fat and thermogenesis. However, the underlying mechanisms and the function of Jak kinases in adipocyte progenitors have not been addressed. Here we show that Jak signaling has opposing outcomes on thermogenic gene expression in immature progenitors versus committed adipocytes, namely stimulatory and inhibitory, respectively. Jak1/2 activity was required for the activation and thermogenic commitment of mouse and human progenitors from white fat. Jak kinases inhibited TGFbeta-Srf signaling at the Tgfbeta receptor level through Stat3 at the onset of differentiation, thereby permitting the induction of thermogenic genes. Importantly, this newly identified pathway crosstalk was acutely induced in adipose tissue following in vivo beta3-adrenergic stimulation. Our results reveal a novel dual role of Jak kinases in thermogenic differentiation and are relevant for proposed therapeutic strategies targeting Jak activity for the enhancement of thermogenic capacity in metabolic diseases.



## Article 4

### **Morphologic and molecular mitochondrial adaptations during human white to brite adipocyte conversion**

**Soumis.**

Didier F Pisani, Valentin Barquissau, Jean-Claude Chambard, Diane Beuzelin, Rayane A Ghandour, Maude Giroud, Aline Mairal, Sophie Pagnotta, Saverio Cinti, Dominique Langin and Ez-Zoubir Amri.

**ABSTRACT.** Thermogenic adipocytes (*i.e.* brown or “brite” adipocytes when 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 adipocytes treated with PPAR $\alpha$  or PPAR $\gamma$  agonists as a cell model of white to brite adipocyte conversion. We found that human brite adipocytes, compared to the white ones, displayed higher amount of mitochondria associated to an increased mitochondrial metabolism and uncoupled 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 of human white to thermogenic competent brite adipocytes.



## Article 5

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

**Soumis.**

Maude Giroud, Michael Karbiener, Didier F. Pisani, Rayane A. Ghandour, Guillaume Beranger, Kirsi A. Virtanen, Dominique Langin, Marcel Scheideler and Ez-Zoubir Amri.

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



## Article 6

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

Maude Giroud, Didier F. Pisani, Michael Karbiener, Valentin Barquiseau, Rayane A. Ghandour, Daniel Tews, Pamela Fischer-Posovszky, Jean-Claude Chambard, Uwe Knippschild, Tarja Niemi, Markku Taittonen, Pirjo Nuutila, Martin Wabitsch, Stephan Herzig, Kirsi A. Virtanen, Dominique Langin, Marcel Scheideler and Ez-Zoubir Amri.

#### **Soumis.**

**ABSTRACT.** In rodents and humans, besides brown adipose tissue (BAT), islands of thermogenic adipocytes, termed “brite” (brown-in-white) adipocytes, emerge within white adipose tissue (WAT) after cold exposure or  $\beta$ 3-adrenoceptor stimulation. microRNAs are novel modulators of adipose tissue development and function. Using human multipotent adipose derived stem cells, we identified miR-125b-5p, which expression decreased upon brite adipocyte formation. In humans and rodents, miR-125b-5p expression was lower in BAT than in WAT. *In vitro*, overexpression and knockdown of miR-125b-5p, respectively, decreased and increased mitochondrial biogenesis. miR-125b-5p levels were downregulated in subcutaneous WAT and BAT upon  $\beta$ 3-adrenergic receptor stimulation. *In vivo*, miR-125b-5p mimic and LNA inhibitor injections in WAT, respectively, inhibited and increased  $\beta$ 3-adrenoceptor-mediated induction of UCP1 and mitochondrial brite adipocyte marker expression and mitochondriogenesis. Collectively, our results demonstrate that miR-125b-5p plays an important role in the repression of brite adipocyte function by modulating oxygen consumption and mitochondrial gene expression.



## Liste des présentations orales

---



## **Congrès National**

- Congrès annuelle de l'Association Française d'Etude et de Recherche sur l'Obésité (AFERO), Dijon, janvier 2014. **Contrôle de la conversion des adipocytes blancs en adipocytes bruns par une voie métabolique de l'acide arachidonique.**

## **Congrès internationaux**

- 21<sup>ème</sup> Congrès Européen de l'obésité (ECO 2014), Sofia-Bulgarie, Mai 2014. **Regulation of the conversion of white to brown adipocytes by arachidonic acid metabolic pathway.**

- 21<sup>ème</sup> Conférence Scientifique Internationale du LAAS « Horizon 2020 : Avancées Scientifiques et Technologiques », Beyrouth-Liban, Avril 2015. **Regulation of the conversion of white to brown adipocytes by arachidonic acid metabolic pathway.**

- 13<sup>ème</sup> Congrès : Euro Fed Lipid, Florence-Italie, septembre 2015. **Regulation of the conversion of white to brown adipocytes by arachidonic acid metabolic pathway.**





