



HAL
open science

Implication des dommages à l'ADN et de la voie p53 dans l'adipocyte dans le développement des maladies métaboliques lors de l'obésité

Bastien Vergoni

► **To cite this version:**

Bastien Vergoni. Implication des dommages à l'ADN et de la voie p53 dans l'adipocyte dans le développement des maladies métaboliques lors de l'obésité. Sciences agricoles. Université Côte d'Azur, 2017. Français. NNT : 2017AZUR4090 . tel-01690405

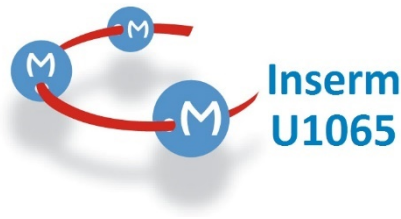
HAL Id: tel-01690405

<https://theses.hal.science/tel-01690405>

Submitted on 23 Jan 2018

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.



École doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé de Nice (ED85)

Thèse de doctorat

Présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en Sciences
de l'Université Côte d'Azur - UFR Sciences

Spécialité : interactions cellulaires et moléculaires

Présentée et soutenue par **Bastien VERGONI**

**Implication des dommages à l'ADN et de la voie p53 dans
l'adipocyte dans le développement des maladies métaboliques lors
de l'obésité**

Soutenue le 23 octobre 2017 au Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M)

Dirigée par **Mireille CORMONT**

Devant le jury composé de :

Dr Christian DANI
Dr Coralie SENGENES
Dr Jean-Sébastien ANNICOTTE
Dr Mireille CORMONT

Président du jury
Rapporteur
Rapporteur
Directrice de thèse

Remerciements :

J'aimerais tout d'abord remercier l'ensemble du jury. Merci au docteur Christian Dani d'avoir accepté de présider mon jury de thèse ainsi qu'aux docteurs Coralie Sengenès et Jean-Sébastien Annicotte d'en être les rapporteurs.

Bien entendu un immense merci à ma directrice de thèse, Mireille, de m'avoir fait confiance dès le master. Tu as su m'accompagner et me former et as été le garant d'une rigueur nécessaire pour recadrer mon esprit souvent vagabond. Je te suis reconnaissant pour tout ce que j'ai pu apprendre et comprendre durant ma thèse et suis conscient du rôle central que tu as joué dans celle-ci.

Un grand merci à l'ensemble de l'équipe 7 pour l'ambiance agréable et conviviale qui règne au sein du laboratoire. Merci au chef, Jean-François, de m'avoir accepté dans l'équipe. Merci à tous ceux qui ont partagé le même bureau que moi : Jérôme, Jean-François, Gwen, Sofia. Merci aussi aux pensionnaires des autres bureaux : Sophie, Fred, Stephan, Lisa, Karine, Aurélie, Stéphanie, Kathiane, Mounia... Merci aussi aux anciens de l'équipe : Faustine, Fabienne, Zied, Mansour, Franck, PJ...

Un mot supplémentaire pour Jérôme, dont les qualités tant humaines que scientifiques me font penser que tu auras été ma plus belle rencontre lors de cette thèse. Merci à la fois pour tous ces moments de rires, mais aussi pour toutes les fois où j'ai pu clairement discuter de mes doutes en sachant que tu n'hésiterais pas à me dire si j'étais dans le faux. Et ça c'est le signe d'un vrai ami.

Une pensée pour nos masters et nos masters-médecins, et à tous ceux qui ont passé par le module 4, qu'il a été de bonne guerre d'opprimer (chacun son tour !) : Marine, Johanna, Elodie, Marie-Astrid... Une autre pensée spéciale à tous les doctorants avec qui j'ai partagé ces 3 années : Manon, Elodie, Emilie, Robin, Elsa, Cynthia, Deborah... Aussi à tous ceux du module 4 et des autres modules : Philippe, Déborah, Stéphanie, Stoyan, Rodolphe, Laurent, Nedra, Najla, Zoheir...

Merci à toutes les personnes autour de moi, en dehors de la science, tous ceux de « pentecôtes », parrain, marraine, le gang kangourou et tous les membres des différentes associations dont j'ai pu faire partie.

Je finirais par remercier ma famille : mes parents, ma grand-mère, ma sœur, mon frère, mon beau-frère, ma belle-sœur... Un immense merci à Alison, tu as été essentielle pour que cette thèse voit le jour.

En hommage à tous ces adipocytes que j'ai pu malmener.



May the fat be with you

Table des matières

ABREVIATION.....	3
RESUME.....	7
I. L'OBESITE.....	10
a. Définition.....	10
b. Prévalence.....	10
c. Causes environnementales de l'obésité.....	10
d. Cause génétique de l'obésité.....	11
e. Conséquences de l'obésité.....	11
f. Traitements de l'obésité.....	13
II. LES TISSUS ADIPEUX.....	16
a. Le tissu adipeux blanc.....	16
i. Les adipocytes blancs.....	17
1. Fonctions métaboliques de l'adipocyte blanc.....	17
2. Fonctions sécrétoires.....	20
ii. Les pré-adipocytes.....	21
iii. Les cellules du système vasculaire.....	22
iv. Les cellules immunitaires.....	23
b. Le tissu adipeux brun.....	24
c. Tissu adipeux beige.....	25
III. ALTERATION DES FONCTIONS DES TISSUS ADIPEUX LORS DE L'OBESITE ET IMPLICATION DANS LE DEVELOPPEMENT DE LA RESISTANCE A L'INSULINE.....	25
a. Pathogenèse de la résistance à l'insuline lors de l'obésité.....	25
i. Défaut d'expansion des tissus adipeux, lipotoxicité, et résistance à l'insuline.....	25
ii. Inflammation des tissus adipeux et résistance à l'insuline.....	26
iii. Perte de fonction des tissus adipeux bruns et beiges et résistance à l'insuline.....	27
b. Altérations des fonctions des tissus adipeux blancs lors de l'obésité.....	27
i. Dans les adipocytes.....	27
1. 1. Transport de glucose, lipogenèse, et lipolyse.....	27
2. Fonction endocrine.....	29
ii. Dans les pré-adipocytes.....	30
iii. Dans le compartiment vasculaire.....	30
iv. Dans le compartiment des cellules immunitaires.....	31
1. Les macrophages.....	32

2.	Les neutrophiles	32
3.	Les lymphocytes B	33
4.	Les cellules NK, ILC1 et ILC2, et MAIT.....	33
5.	Les lymphocytes T	34
IV.	CAUSES DES DYSFONCTIONS ET DE L'INFLAMMATION DES TISSUS ADIPEUX LORS DE L'OBESITE 35	
a.	Origine intestinale de l'inflammation des tissus adipeux	35
b.	Origine centrale de l'inflammation tissus adipeux.....	36
c.	Origine adipocytaire de l'inflammation des tissus adipeux	37
i.	Stress oxydatif dans le TA, inflammation et résistance à l'insuline	37
ii.	Stress du réticulum endoplasmique, dysfonctions et inflammation du TA	38
iii.	Hypoxie, dysfonctions et inflammation du TA	39
V.	P53.....	41
a.	Fonctions de p53	41
b.	Activation de p53.....	42
c.	P53 et métabolisme cellulaire	44
d.	P53 et maladies métaboliques	49
1.	P53 : protecteur ou inducteur des maladies métaboliques ?	50
2.	P53 et hépatocytes.....	51
3.	P53 et cellule β - pancréatiques	52
4.	P53 et cellules endothéliales.....	52
5.	P53 et tissu adipeux.....	52
e.	Rôle de TP63 et TP73 dans le développement des maladies métaboliques.....	53
	ARTICLE : DNA Damage and the Activation of the p53 Pathway Mediate Alterations in Metabolic and Secretory Functions of Adipocytes.....	56
	RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES : DNA Damage and the Activation of the p53 Pathway Mediate Alterations in Metabolic and Secretory Functions of Adipocytes.....	70
	DISCUSSION	80
	PERSPECTIVES.....	93
	BIBLIOGRAPHIE.....	96

ABREVIATION

8-OHdG : 8-Oxo-2'-désoxyguanosine
A1-R: récepteur A1 de l'adénosine
ABHD5 : Alpha/Beta-Hydrolase Homain-Containing Protein 5
ACC :acetyl CoA carboxylase
Acetyl-CoA : Acetyl-CoEnzyme A
AdCM : Adipocyte Conditioned Medium – Milieu Conditionné d'Adopocyte
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
AMPc : Adénosine MonoPhosphate Cyclique
ANRIL : Antisense Non-Coding RNA in the INK4 locus
AP1 : Activator Protein 1
ARN : Acide RiboNucléique
ATF6 : Activating Transcription Factor 6
ATGL : Adipose Triglyceride Lipase
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP : Adénosine TriPhosphate
ATR : Ataxia-Telangiectasia, Rad3-related protein
BMP : bone morphogenic protein
C/EBP : CCAAT-enhancer-binding proteins
CAR : Coxsackie and adenovirus receptor
Cavin1 / Cavin2 : caveolae associated protein 1 / 2
CCL 2 / 5 / 7 : Chemokine (C-C motif) ligand 2 / 5 / 7
CD8 / CD31 / CD45 : cluster de différenciation 8, 31, 45...
Cdk 4 / 6 : Cyclin-Dependent Kinase 4 / 6
Cdkn2a b : Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A / B
CHK 1 / 2 : Checkpoint kinase 1 / 2
CHOP : C/EBP Homologous Protein
ChREBP : carbohydrate response element binding protein
COX : Complexe cytochrome C Oxydase

CSM : Cellules Souches Mésenchymateuses
CXCL1 Chemokine (C-X-C motif) ligand 1
DAG : DiAcylGlycérol;
DAPI : 4',6-DiAmidino-2-PhénylIndole
EGF : Epidermal Growth Factor
EP3-R : récepteur 3 de la prostaglandine E
ERK : Extracellular signal-regulated kinases
FABP4 : Fatty Acid Binding Protein 4
FAHFA : Fatty Acid esters of Hydroxyl Fatty Acids
FASN : Fatty Acid Synthase
FGF-B : Basic Fibroblast Growth Factor
FSP27 : Fat Specific Protein 27
FSV : Fraction Stroma-Vasculaire
GAMT : GuanidinoAcétate MéthylTransférase
GIP : Glucose-dependent Insulinotropic Peptide
Glp-1 : Glucagon-like Peptide-1
GLS2 : Glutaminase 2
GluT4 : Glucose Transporter 4
GMPc : Guanosine MonoPhosphate cyclique
GOS2 : G0/G1 switch gene 2
H₂A_X : histones H2A, membre X
HFD : High Fat Diet – Régime riche en graisse
HIF-1 : Hypoxia inducible Factor 1
HM74A : ou NIACR1 - Niacin receptor 1
HSL : Hormone Sensitive Lipase
IFN γ : interféron γ
IgG : immunoglobuline G
IKK β : inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta
IL 1 β / 4 / 5 / 10 / 13 / 17a / 33 : interleukine 1 β / 4 / 5 / 10 / 13 / 17a / 33
ILC2 : Innate Lymphoid Cell 2
IMC : Indice de Masse Corporelle

IRE-1 : Inositol-Requiring Enzyme 1
IRS1 / 2 : Insulin Receptor Substrate
JNK : c-Jun N-terminal Kinase
Keap1 : Kelch-like ECH-associated protein 1
KLF 2 / 5 / 15 : Kruppel Like Factor 2 / 5 / 15
LDH : Lactate DéHydrogénase
MAG : MonoAcylGlycérol
MAIT : Innate Mucosal-Associated Invariant T
MAP Kinase ou MAPK : Mitogen-Activated Protein kinase
MDM2 : Mouse Double Minute 2 Homolog
MGL : MonoAcylGlycerol Lipase
Myf5 : Myogenic Factor 5
NAFLD : Non-Alcoholic Fatty Liver Disease
NASH : Non-Alcoholic SteatoHepatitis
NCR1 : Natural Cytotoxicity Triggering Receptor 1
ND : Normal Diet – Régime Normal
NLRP3 : NOD-Like Receptor family, Pyrin domain containing 3
Nox4 : NADPH oxidase 4
Nrf2 : Nuclear Factor (erythroid-derived 2) -like 2
PARK2 : parkine
PAX7 : protéine paired box 7
PCSK1 : Proprotein-Convertase Subtilisin/Kexin type-1a
PDE3B : PhosphoDiEstérase 3B
PDH : pyruvate déshydrogénase
PDK 1 / 2 : Pyruvate Déshydrogénase kinase 1 / 2
PERK : Protein Kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase
PET : Positron Emission Tomography
PI3P : PhosphatIdylinositol-3-Phosphate
PKA : Protéine Kinase A
PKB : Protéine Kinase B
PKG : Protéine Kinase G

PLN1 : Périlipine

PPAR γ : Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma

PTEN : Phosphatase and TENSin homolog

PTRF = Cavin1 : Polymerase I and transcript release factor

PUFA : Polyunsaturated fatty acids

RANTES = CCL5 : (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted

RBP4 : Retinol Binding Protein 4

RE : Réticulum Endoplasmique

RI: Récepteur de l'Insuline

ROS : Reactive Oxygen Species

RT-PCR : Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction

SCD1 : Stearoyl CoA Desaturase 1

SCO1/2 : Synthesis of Cytochrome c Oxidase 1/2

SIRT6 : Sirtuin 6

SREBP1c : Sterol regulatory element-binding protein

TA : Tissu Adipeux

TG : TriacylGlycérol / TriGlycéride;

Th 1 / 2 / 17 : T helper 1 / 2 / 17

TNF α : tumor necrosis factor α

Treg : T régulateurs

UCP-1 : Uncoupling Protein 1

UPR : Unfolded Protein Response

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

β -AR: récepteur β adrénergique

RESUME

Le tissu adipeux (TA) joue un rôle majeur dans les maladies métaboliques induites par l'obésité. L'activation de l'anti-oncogène p53 dans l'adipocyte a été impliquée dans le développement de la résistance à l'insuline lors de l'obésité. Cependant, les causes et les conséquences de cette activation étaient encore inconnues.

Nos travaux montrent que, chez des souris obèses, le niveau d'oxydation de l'ADN est plus élevé et la longueur des télomères réduite dans le TA épидидymaire. Nous observons également une augmentation des dommages à l'ADN dans les adipocytes. Ces dommages à l'ADN provoquent l'activation de la voie de réponse aux dommages à l'ADN puisque nous avons observé une activation de la voie p53 (stabilisation de la protéine et expression d'une cible p21). De manière intéressante, nous avons démontré que les dommages à l'ADN et l'activation de la voie p53 dans les adipocytes sont des événements précoces lors du développement de l'obésité qui pourraient être la conséquence d'une augmentation également précoce du stress oxydatif dans le tissu adipeux et les adipocytes. De plus, l'augmentation des dommages à l'ADN et l'activation de p53 dans les adipocytes précèdent l'inflammation du tissu adipeux et la résistance à l'insuline systémique.

Nous apportons également des arguments en faveur d'un **ROLE CAUSAL DES DOMMAGES A L'ADN et de L'ACTIVATION DE P53 DANS L'ADIPOCYTE** dans le développement de **L'INFLAMMATION DU TISSU ADIPEUX ET LA RESISTANCE A L'INSULINE ADIPOCYTAIRE**. In vitro, nous montrons que la création expérimentale de dommages à l'ADN avec de la doxorubicine et l'activation pharmacologique de p53 avec l'inhibiteur de l'ubiquitine ligase Mdm2, la nutline3a, dans des adipocytes humains et murins en culture inhibent la signalisation insulinique, le transport de glucose et la translocation de Glut4 stimulés par l'insuline. Ils perturbent également l'activité sécrétoire des adipocytes. En particulier, le sécrétome de ces adipocytes possède une activité chimioattractive pour les neutrophiles et les macrophages. Des résultats préliminaires indiquent qu'il pourrait également affecter les préadipocytes en perturbant leur survie et leur différenciation en

adipocytes. In vivo, l'injection de doxorubicine à des souris provoque l'infiltration de neutrophiles et de macrophages dans le TA, l'inflammation du TA, et la résistance à l'insuline adipocytaire.

Nous montrons également une induction précoce du locus CDKN2A dans le TA lors de l'obésité. Ce locus code pour p16INK4A, un inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines CDK4/6, et p19ARF, un inhibiteur de Mdm2. Nous confirmons que la surexpression de p19ARF dans des adipocytes en culture permet la stabilisation de p53 et étudions actuellement l'impact de l'absence de p19ARF dans les adipocytes in vivo dans le développement des maladies métaboliques lors de l'obésité.

En résumé, nos travaux démontrent que les dommages à l'ADN observés précocement dans les adipocytes lors du développement de l'obésité ont le potentiel de déclencher des signaux dépendants de p53 impliqués dans l'altération du métabolisme adipocytaire et de sa fonction sécrétoire conduisant à une inflammation du TA, un dysfonctionnement des adipocytes, et la résistance à l'insuline.

INTRODUCTION

I. L'OBESITE

a. Définition

L'obésité est définie comme un développement excessif du tissu adipeux présentant un risque pour la santé. En cause, un déséquilibre de la balance énergétique en faveur de l'apport calorique plutôt que de la dépense énergétique.

Chez l'adulte, le moyen le plus simple d'évaluer le niveau d'obésité d'une personne est de se baser sur l'IMC ou indice de masse corporelle.

$$IMC = \frac{\text{poids (kg)}}{\text{taille (m)}^2}$$

Un IMC considéré comme normal est compris entre 18,5 et 25. En dessous de 18,5, l'IMC indique une minceur excessive alors qu'au-dessus de 25, une personne est en surpoids. On considère une personne obèse à partir d'un IMC de 30. L'IMC donne toutefois une indication approximative car il ne correspond pas forcément au même degré d'adiposité d'un individu à l'autre.

b. Prévalence

La prévalence de l'obésité dans le monde a triplé au cours des 30 dernières années passant de 200 millions d'adultes obèses en 1980 à plus de 600 millions en 2014, soit un adulte sur 11 (Ng et al., 2014; ObEpi-Roche, 2012). L'obésité touche à la fois les adultes et les enfants de pays développés ou non. Dès 1997, l'OMS liste l'obésité parmi les maladies chroniques.

c. Causes environnementales de l'obésité

Cet accroissement de l'obésité mondiale est principalement dû aux facteurs influençant notre comportement alimentaire et notre activité physique tels que des facteurs environnementaux, psychologiques, ou génétiques. Nous pouvons citer comme exemple l'augmentation de la consommation d'aliments très caloriques riches en glucides et en lipides et le manque d'activité physique lié à l'évolution des modes de transports, du travail de plus en plus sédentaire, et de l'urbanisation croissante.

d. Cause génétique de l'obésité

Des études portant sur des milliers de jumeaux démontrent que 40 à 70% de la variabilité interindividuelle dans la prévalence de l'obésité est génétique (Froguel and Boutin, 2001). Il existe plusieurs formes d'obésité, celles liées à une mutation sur un gène (monogénique) ou celles dues à des mutations sur plusieurs gènes (polygénique). L'obésité monogénique ne concerne que 5% des cas mais est responsable des formes les plus sévères. L'exemple le plus connu est la mutation du gène de la leptine (Friedman et al., 1991) dont la protéine du même nom contrôle la satiété. Les obésités polygéniques sont des formes plus modérées pour lesquelles l'impact des gènes est grandement dépendant de l'environnement. De manière intéressante, les principaux organes exprimant des gènes de prédisposition à l'obésité sont le cerveau et le tissu adipeux (Meyre and Froguel, 2012).

e. Conséquences de l'obésité

L'obésité cause un réel problème de santé publique à l'échelle mondiale car elle augmente le risque de développer des maladies chroniques telles que des pathologies cardiovasculaires, certains cancers, des problèmes articulaires, ou les maladies métaboliques dont le diabète de type 2 (World Cancer Research Fund and American Institute for Cancer Research, 2007; World Health Organization, 2014).

A l'origine des maladies cardio-métaboliques liées à l'obésité se trouve la résistance à l'insuline, c'est-à-dire un défaut d'action de l'insuline, la seule hormone hypoglycémiante de l'organisme, dans ces tissus cibles dont les principaux sont le foie, le tissu adipeux et les muscles, squelettiques, lisses, et cardiaques. Les effets métaboliques de l'insuline sur ces différents organes cibles sont schématisés dans la **Figure 1**. On observe ainsi une inhibition de la voie de réponse à l'insuline dans ses tissus cibles, dont les principaux mécanismes sont résumés dans la **Figure 2**. Au vu de l'incidence et des conséquences de l'obésité, il est donc nécessaire de trouver des solutions à la fois préventives et palliatives pour lutter contre l'obésité et ses conséquences sur la santé.

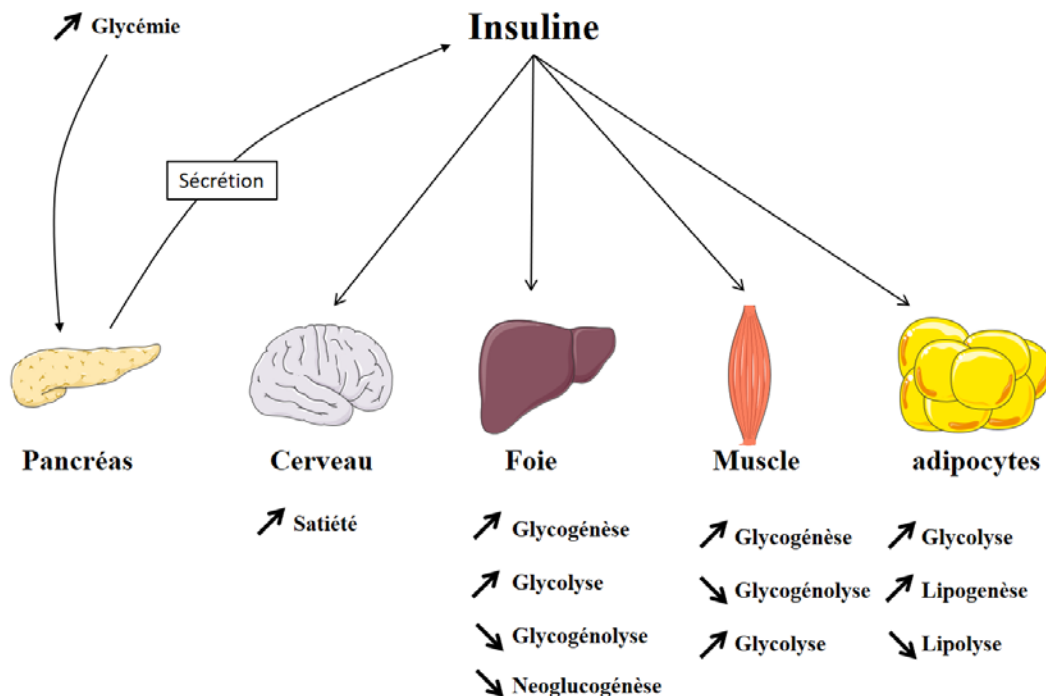


Figure 1. Action métabolique de l'insuline dans ses principaux organes cibles. L'insuline est sécrétée dans le sang par les cellules β pancréas en réponse à une hyperglycémie. Les récepteurs à l'insuline sont retrouvés sur de nombreux organes tels que le cerveau, le foie, le muscle et les adipocytes. L'action de l'insuline étant hypoglycémiante, elle aura pour effet d'activer toutes les voies permettant le stockage comme la glycogénèse, le transport de glucose, la lipogénèse, et la glycolyse. A l'inverse l'insuline inhibe tous les processus qui conduisent à une hyperglycémie: la satiété qui diminue l'apport calorique exogène, le déstockage de glucose (glycogénolyse) et la synthèse *de novo* de glucose (néoglucogénèse) (Grossman, 1986; Sonksen and Sonksen, 2000).

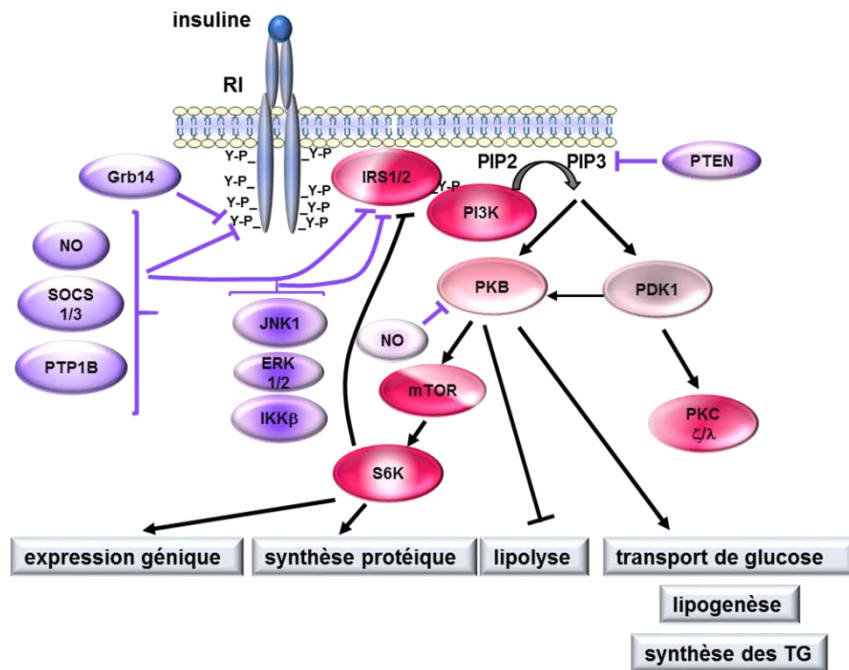


Figure 2. Mécanismes responsables des défauts de signalisation insulinaire dans l'adipocyte lors de l'obésité. L'insuline se fixe sur son récepteur, un hétérodimère formé de deux sous-unités α extracellulaires et de deux sous-unités β transmembranaires, et stimule sa phosphorylation sur des résidus de tyrosine. Ceci permet la phosphorylation des substrats majeurs du récepteur de l'insuline, IRS1 et IRS2, le recrutement d'une PI3 kinase qui produira du PIP3 nécessaire à l'activation de la PKB. L'activation de la PKB est requise pour les effets métaboliques de l'insuline. L'insuline stimule également la voie des MAP kinases ERKs non représentée sur la figure. En violet, les protéines ou facteurs augmentés lors de l'obésité qui perturbent la signalisation insulinaire (d'après Tanti et al. 2013a).

f. Traitements de l'obésité

Pour traiter le surpoids, le meilleur moyen reste de rééquilibrer la balance énergétique : faire plus de sport pour augmenter la dépense énergétique, manger mieux (plus de fibres, moins de lipides et de glucides) et/ou manger moins afin de diminuer l'apport énergétique. Un soutien psychologique peut être conseillé pour accompagner le retour aux bonnes habitudes alimentaires.

Lorsque l'on parle d'obésité (IMC>30) ou que le surpoids est accompagné de complications cardio-métaboliques, seules deux solutions médicales peu invasives, en plus des recommandations comportementales, peuvent être envisagées *via* des traitements médicamenteux (**Tableau 2**). Ces traitements, qui restent cependant loin d'être totalement efficaces, doivent être accompagnés d'un régime très strict et sont accompagnés d'effets indésirables non négligeables. De nombreux traitements ont été mis sur le marché et retirés suite aux effets indésirables bien plus lourds que les effets curatifs. On pense par exemple aux « coupe-faim » (anorexigènes) de la famille des amphétamines, qui entraînaient une pharmacodépendance et des problèmes cardiaques. De plus, l'obésité étant souvent

accompagnée de comorbidité(s), il est aussi important d'accompagner le traitement de l'obésité par un traitement de ou des comorbidités (non détaillé ici).

Médicament	Prescription	Action	Effets indésirables
Orlistat (Xénical®)	Obésité	Réduit de 30% l'absorption des triglycérides alimentaires qui sont excrétés dans les selles	Hépatotoxicité
Liraglutide (Sadenxa®)	Obésité ou surpoids avec une comorbidité	Agoniste de GLP-1 : Stimule la satiété par action analogue à 97% à celle de l'incrétine (stimule la sécrétion d'insuline et inhibe celle du glucagon).	Nausées, vomissements, diarrhées, hypoglycémie

Tableau 2. Les traitements médicamenteux de l'obésité et leurs effets indésirables.

D'autres traitements plus invasifs et plus ou moins réversibles, les chirurgies bariatriques, ont démontré leurs effets thérapeutiques sur l'obésité et les maladies métaboliques (Colquitt et al., 2014; Laferrère et al., 2007). La chirurgie bariatrique est réservée aux personnes souffrant d'obésité morbide ou souffrant d'obésité et présentant une ou plusieurs complications métaboliques. Elle a pour but de diminuer l'apport énergétique par restriction de l'absorption alimentaire. Les trois principales chirurgies bariatriques sont l'anneau gastrique, la gastrectomie longitudinale, et le court-circuit gastrique (**Tableau 3**). De manière intéressante, de nombreuses études récentes démontrent les bienfaits de la chirurgie bariatrique non pas engendrés par la perte de poids mais principalement dus à la chirurgie gastro-intestinale elle-même (Anhê et al., 2017; Rubino and Cummings, 2012). Un des principaux changements viendrait des incrétines GLP-1 (glucagon-like peptide-1) et GIP (glucose-dependent insulinotropic peptide), hormones gastro-intestinales qui stimulent la sécrétion d'insuline lorsque la glycémie est trop élevée (Rubino and Cummings, 2012). Les acides biliaires joueraient aussi un rôle important: une augmentation de sécrétion des acides biliaires dans l'intestin est observée après une chirurgie bariatrique, entraînant une amélioration de la satiété, du métabolisme du cholestérol et des lipides, du métabolisme énergétique et une augmentation de sécrétion des incrétines (Penney et al., 2015). La modification de la taille de l'estomac augmente fortement le pH gastrique ainsi que celui du duodénum

remodelant le microbiote intestinal (O'May et al., 2005) qui, de pair avec les acides biliaires, améliorent la sensibilité à l'insuline (Rubino and Cummings, 2012). Une amélioration nette est observable chez les patients atteints de diabète de type 2, de syndrome métabolique, de NASH (« non-alcoholic steatohepatitis ») et les patients présentant des risques cardiovasculaires au point de parler parfois de « chirurgie métabolique » plutôt que de chirurgie bariatrique. Ces résultats mettent en évidence le rôle de l'estomac et de l'intestin sur les maladies cardio-métaboliques et ouvrent des possibilités de traitements basés sur le mimétisme des effets de la chirurgie, sans les inconvénients de la chirurgie.

	Anneau gastrique	Gastrectomie longitudinale	Court-circuit gastrique
Opération	Pose d'un anneau autour de la jonction entre l'œsophage et l'estomac	Ablation des 2/3 de l'estomac	Réduction du volume de l'estomac et modification du circuit alimentaire
Mode d'actions	Restriction de l'absorption et sensation de satiété	Restriction de l'absorption et diminution du taux de la ghréline (hormone stimulant l'appétit).	Restriction de l'absorption, malabsorption, diminution de la ghréline
Effets indésirables	Glissement et migration de l'anneau, reflux gastrique et œsophagique	Opération non réversible	Forte carence alimentaire, opération non réversible

Tableau 3. Les principales chirurgies bariatriques

Mieux comprendre les mécanismes responsables des complications cardio-métaboliques de l'obésité permettrait à terme de développer de nouvelles thérapies plus efficaces et d'augmenter le niveau de vie des patients.

Dans la partie introduction de cette thèse, je m'efforcerai de décrire les données de la littérature montrant que l'obésité est responsable de perturbations des fonctions physiologiques du tissu adipeux (TA), qui se répercutent sur différents organes comme le muscle et le foie, conduisant au développement de la résistance à l'insuline.

II. LES TISSUS ADIPEUX

Il existe plusieurs types de tissus adipeux qui diffèrent par leur morphologie, leur localisation, et les fonctions des adipocytes qui les constituent : le TA blanc, brun, et beige. En plus de leur rôle dans l'homéostasie gluco-lipidique que je vais décrire dans les paragraphes suivants, les tissus adipeux participent aussi à l'isolation thermique et à la protection des organes contre les chocs mécaniques.

a. Le tissu adipeux blanc

Le TA blanc représente la quasi-totalité du TA et est l'organe principal de stockage des lipides du corps. On distingue le TA viscéral et le TA sous-cutané par leur localisation mais aussi par un métabolisme différent. Le tissu adipeux viscéral a un métabolisme plus élevé. Il se situe dans la cavité viscérale dans trois dépôts principaux, omental, rétropéritonéal et gonadal. Le tissu adipeux sous-cutané se situe dans l'ensemble de la peau, dans l'hypoderme, avec des zones plus denses de dépôts au niveau abdominal, glutéal et fémoral (**Figure 3**).

Les TA sont principalement composés d'adipocytes, mais contiennent également d'autres types cellulaires nécessaires à leurs fonctions et à l'homéostasie du tissu dont les pré-adipocytes, les cellules immunitaires, et les cellules endothéliales. Cet ensemble de cellules est appelé la Fraction Stroma-Vasculaire (FSV).

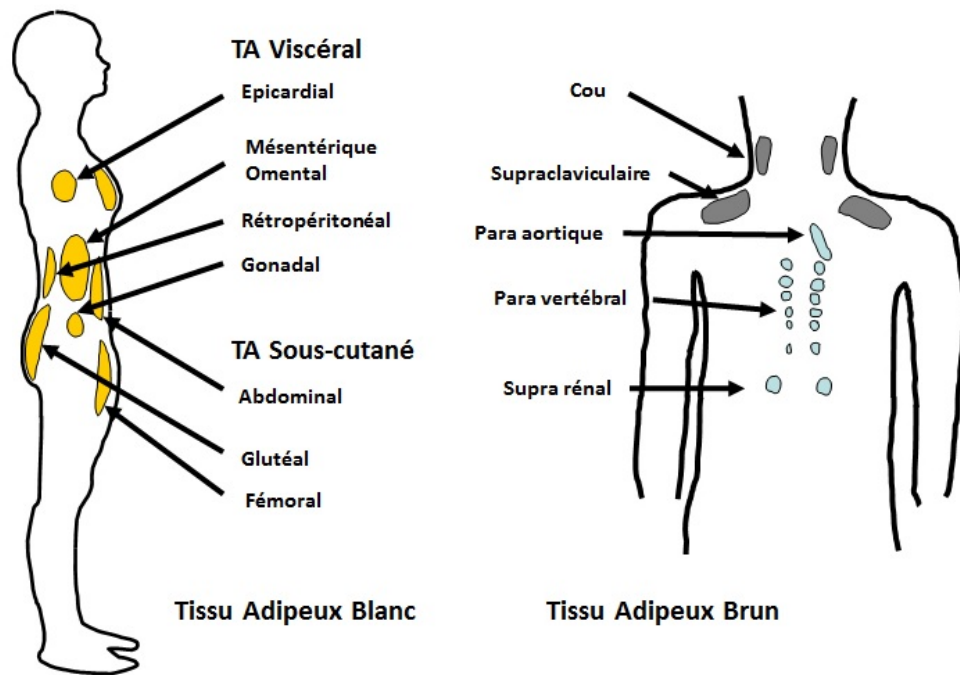


Figure 3. Zones de dépôt du tissu adipeux blanc et brun chez l'adulte. Les dépôts de tissu adipeux blanc viscéral sont retrouvés au niveau omental, rétropéritonéal et gonadal, alors que les dépôts de tissu adipeux sous cutané se trouvent niveau abdominal, glutéal et fémoral. Les dépôts de tissu adipeux brun se trouvent dans la nuque, sur la clavicule et tout au long de la colonne vertébrale. D'après (Awada et al., 2013).

i. Les adipocytes blancs

1. Fonctions métaboliques de l'adipocyte blanc

Les adipocytes blancs ont un diamètre cellulaire généralement compris entre 50 et 180 μm (Lafontan and Langin, 2009). L'adipocyte blanc est une cellule différenciée qui, par définition, a perdu sa capacité à proliférer (Björntorp et al., 1971). Il est majoritairement constitué d'une unique gouttelette lipidique qui occupe la plus grande partie de l'espace cytosolique repoussant le noyau en périphérie. La gouttelette lipidique est constituée de triglycérides (TG) entourés par une monocouche membranaire de phospholipides. L'adipocyte participe au contrôle de l'homéostasie gluco-lipidique de par ces capacités à stocker l'énergie (glucose et lipide) sous forme de TG en situation postprandiale et à libérer cette énergie en situation de jeûne grâce à la lipolyse, mais aussi grâce à sa fonction endocrine. L'insuline contrôle la plupart des fonctions adipocytaires (**Figure 1**).

Dans l'adipocyte, l'insuline provoque la translocation des transporteurs de glucose Glut4 depuis un compartiment intracellulaire de séquestration vers la membrane plasmique. Cette étape et le métabolisme du glucose sont requis pour permettre la transformation du glucose en acides gras, appelée

lipogénèse, car ils permettent l'activation des facteurs de transcriptions ChREBP α et ChREBP β (carbohydrate response element binding protein) nécessaires à la transcription des enzymes de la lipogénèse ACC (acetyl CoA carboxylase), FASN (fatty acid synthase), SCD1 (stearoyl Coa desaturase 1) (Herman et al., 2012; Kaddai et al., 2007). L'activité de l'ACC est également contrôlée positivement par l'insuline et négativement par le glucagon et l'adrénaline mis en jeu lors du jeûne.

L'insuline favorise également la synthèse des triglycérides à partir de trois acides gras produits lors de la lipogénèse ou des acides gras alimentaires, et d'un glycérol. L'insuline contrôle la dernière étape de la synthèse de triglycérides en activant la triglycéride synthase mais favorise également la synthèse des triglycérides en augmentant la quantité des substrats pour la réaction. Le glycérol est produit lors de la glycolyse qui est stimulée par l'insuline grâce à l'augmentation du flux de glucose. Comme déjà vu, des acides gras sont produits par la lipogénèse stimulée par l'insuline. L'insuline augmente également le flux d'acides gras en d'une part stimulant l'expression et la sécrétion de la LPL (lipoprotéine lipase) qui va permettre l'hydrolyse des TG contenus dans les lipoprotéines circulantes et d'autre part en favorisant leur transport grâce à l'augmentation d'expression et la translocation de transporteurs d'acides gras (Czech, 2002).

En situation de jeûne, l'adipocyte libère des acides gras grâce à la lipolyse qui consiste en la dégradation des triglycérides en successivement diacylglycérol, monoacylglycérol, et acide gras plus glycérol (Lafontan and Langin, 2009). La lipolyse nécessite trois enzymes, ATGL (« adipose triglyceride lipase »), HSL (« hormone sensitive lipase »), MGL (« monoacylglycerol lipase ») mais également des protéines de la surface de la gouttelette lipidique qui participent au contrôle de la fonction des lipases. L'activité de HSL est stimulée principalement par les catécholamines présentes lors du jeûne et inhibée par l'insuline en situation postprandiale (**Figure 4**).

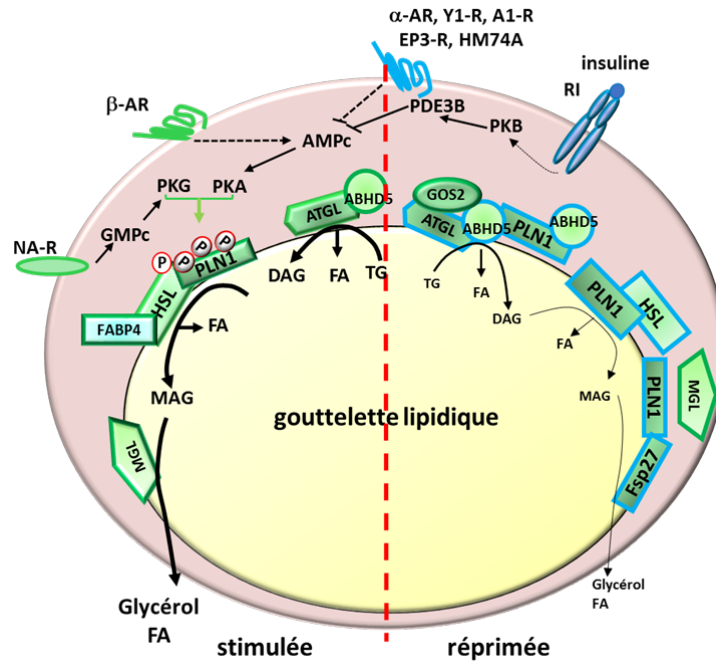


Figure 4. Représentation schématique du contrôle de la lipolyse en condition physiologique.

L'accessibilité des enzymes contrôlant la lipolyse aux TG de la gouttelette lipidique est favorisée par l'augmentation des concentrations intracellulaires en GMPc et AMPc. Elle est inhibée par des médiateurs diminuant les concentrations d'AMP cyclique (AMPc) qui en utilisent des récepteurs à 7 domaines transmembranaires (en bleu) inhibant l'adénylate cyclase ou comme l'insuline en stimulant une la phosphodiesterase 3B (PDE3B) qui dégrade l'AMPc en AMP. Les protéines de la surface de la gouttelette lipidique participent au contrôle de l'accessibilité des enzymes de la lipolyse au TG. La périlipine, PLN1, est ancrée à la surface de la gouttelette lipidique grâce à des domaines hydrophobes et réprime ainsi la lipolyse en séquestrant d'ABHD5 (« alpha/beta-hydrolase domain-containing protein 5 »). La phosphorylation de PLN1 par la protéine kinase A (PKA), stimulée par l'activation des récepteurs b-adrénergique (β-AR) et du récepteur au facteur natriurétique (chez l'homme uniquement, NA-R), libère ABHD5 qui peut interagir avec ATGL (« adipose triglyceride lipase ») et induire la première étape de la lipolyse. GOS2 (« G0/G1 switch gene 2 »), un autre partenaire d'ATGL, participe également à son inhibition. L'interaction de HSL (« hormone sensitive lipase ») et MGL (« monoacylglycérol lipase ») avec la surface de la gouttelette est également inhibée par PLN1 et Fsp27 (« fat specific protein 27 »), la phosphorylation de PLN1 participerait à la levée de cette inhibition. Quand HSL est phosphorylée, elle interagit avec FABP4 (« fatty acid binding protein 4 ») et le complexe transloque à la surface de la gouttelette. FABP4 est impliquée dans le trafic intracellulaire des acides gras (FA) et est nécessaire à la lipolyse.

RI: récepteur de l'insuline; PKB: protéine kinase B; GMPc: GMP cyclique; α-AR: récepteur α adrénergique; A1-R: récepteur A1 de l'adénosine; EP3-R: récepteur 3 de la prostaglandine E; HM74A: récepteur de l'acide nicotinique; PKG: protéine kinase G; DAG: diacylglycérol; TG: triacylglycérol/triglycéride; MAG: monoacylglycérol

2. Fonctions sécrétoires

Outre les acides gras (dont nous discuterons du rôle plus tard dans le chapitre consacré à la lipotoxicité), l'adipocyte est capable de sécréter de nombreuses molécules pouvant avoir un effet autocrine, paracrine et/ou endocrine. Ces molécules jouent un rôle important dans l'homéostasie gluco-lipidique (Blüher, 2014). Le TA a la capacité de sécréter plus de 600 molécules, dont la majorité provient de l'adipocyte (Lehr et al., 2012).

Les plus étudiées sont la leptine et l'adiponectine. La leptine est majoritairement sécrétée par l'adipocyte. Elle est appelée hormone de la satiété car, de manière endocrine, elle agit sur l'hypothalamus pour diminuer la prise alimentaire en fonction du statut énergétique (Friedman and Halaas, 1998; Morton et al., 2006). De manière autocrine et paracrine, elle est capable d'altérer la signalisation de l'insuline dans les adipocytes de souris (Müller et al., 1997; Pérez et al., 2004) et d'induire la lipolyse (Wang et al., 1999; Zeng et al., 2015). La leptine joue également un rôle dans l'immunité adaptative en favorisant la polarisation des lymphocytes T en Th17 (Reis et al., 2015).

L'adiponectine est sécrétée par les adipocytes (Scherer et al., 1995) et améliore les effets de l'insuline (« effet insulino-sensibilisateur ») en se liant aux récepteurs AdipoR1 principalement exprimés par le muscle squelettique et AdipoR2 principalement retrouvés dans le foie (Maeda et al., 2002; Robinson et al., 2011). L'adiponectine a également des effets anti-athérogénique en agissant sur les cellules endothéliales et les macrophages qui jouent un rôle important dans le développement des plaques d'athérome (Guerre-Millo, 2008).

L'adipocyte sécrète aussi de l'adipsine, de l'apeline, de la visfatine, du RBP4 (« retinol binding protein 4 »), de la résistine, des œstrogènes, des facteurs angiogéniques, des prostaglandines, des chimiokines, et des protéines du complément. Tous participent à leur manière à l'homéostasie gluco-lipidique. Plus récemment, le groupe de Barbara Kahn a montré que l'adipocyte produisait une nouvelle classe de lipides, des esters d'acides gras ramifiés d'hydroxy-acides gras (FAHFAs) capables d'augmenter le transport de glucose induit par l'insuline dans les adipocytes et possédant des propriétés antidiabétiques et anti-inflammatoires (Moraes-Vieira et al., 2014, 2016).

ii. Les pré-adipocytes

Les adipocytes sont issus de cellules souches mésenchymateuses (CSM) multipotentes (Rodriguez et al., 2005). Ils existent certainement de nombreux stades intermédiaires entre CSMs et adipocytes qui sont cependant difficiles à caractériser sur le plan expérimental et donc on parle classiquement de deux phases, la phase de détermination et la phase de différenciation terminale (**Figure 5**). La phase de détermination est celle pendant laquelle les CSMs perdent leur caractère de « multipotence » en s'engageant dans le lignage adipocytaire et devenant un pré-adipocyte. Aucune différence morphologique permet de distinguer une CSM d'un pré-adipocyte.

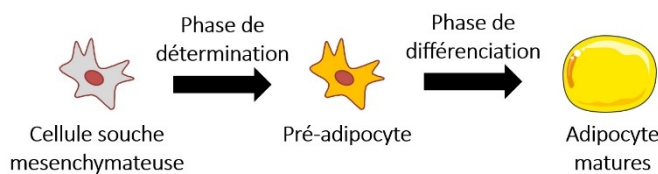


Figure 5 : Représentation schématique de l'adipogenèse.

L'activation de PPAR γ (récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes) et l'inhibition de la voie de signalisation dépendante de la GTPase Rho sont des événements importants pour rentrer dans le lignage adipocytaire au dépendant des lignages osseux et musculaires (Rosen and MacDougald, 2006). Les mécanismes moléculaires impliqués dans la différenciation adipocytaire terminale sont mieux compris et mettent en jeu une cascade de régulation transcriptionnelle complexe aboutissant à l'expression des gènes nécessaires à la fonction des adipocytes matures permettant la synthèse et le transport des lipides, le transport de glucose insulino-dépendant, et la sécrétion des adipokines. Le récepteur PPAR γ 2 joue un rôle central dans la différenciation adipocytaire en induisant à lui seul, lorsqu'il est activé chez un pré-adipocyte, l'ensemble du programme de différenciation en adipocyte mature (Lefterova and Lazar, 2009; Rosen et al., 1999; Tontonoz et al., 1994; Wang et al., 1995) (**Figure 6**). L'expression de PPAR γ 2 et C/EBP α est augmentée par des facteurs pro-adipogéniques dont les principaux sont les protéines de la famille « CCAAT-enhancer-binding proteins » C/EBP α , C/EBP β , C/EBP δ , les protéines KLF5 et KLF15, et SREBP1c. C/EBP α , une fois activée par C/EBP β et C/EBP γ , induit l'expression de PPAR γ 2 qui a son tour augmente l'expression de C/EBP α afin de conserver un haut niveau d'expression de chacun d'eux (Rosen et al., 2002). L'expression de PPAR γ 2 est également

diminuée par des facteurs anti-adipogéniques dont C/EBP γ , CHOP, KLF2, GATA2/3. L'expression de l'ensemble de ces facteurs est sous la dépendance de molécules extracellulaires qui en stimulant leur cascade de signalisation spécifique conduit au contrôle de l'expression de PPAR γ 2 et/ou C/EBP α . Par exemple WINT10b active la voie des β caténines et inhibe l'expression génique de PPAR γ 2 et C/EBP α (Bennett et al., 2002; Longo et al., 2004). L'insuline/IGF1 en activant la voie PI3K/PKB active CREB et inhibe Foxo1 et GATA2/3 induisant ainsi l'expression de PPAR γ et C/EBP α . Les BMP (bone morphogenic protein) participent à la différenciation adipocytaire en favorisant la localisation nucléaire d'un certain nombre de facteurs dont C/EBP α (Rosen and MacDougald, 2006). Le/les ligand(s) endogène(s) de PPAR γ 2 impliqué(s) dans la différenciation adipocytaire ne sont pas définitivement identifiés. La nature des ligands endogènes de PPAR γ est lipidique (PUFA, eicosanoïdes, prostaglandines, endocannabinoïdes, acide nitrolinoléique...). La production de ligands endogènes de PPAR γ pourrait être amplifiée pendant la différenciation terminale (Hallenborg et al., 2016).

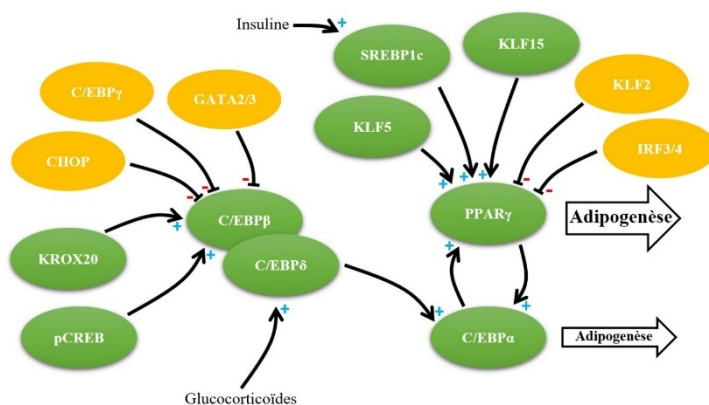


Figure 6 : Résumé de la cascade de signalisation induisant l'adipogenèse lors de la phase de différenciation. En vert, les intermédiaires induisant l'adipogenèse. En orange, les intermédiaires inhibant l'adipogenèse. L'insuline induit l'adipogenèse par l'intermédiaire de SREBP1c. Les glucocorticoïdes induisent l'adipogenèse via C/EBP δ . Adapté de (Ali et al., 2013).

iii. Les cellules du système vasculaire

Le système vasculaire sanguin et lymphatique drainent la plupart des dépôts de tissus adipeux (Bouloumié A, 2013). Le système sanguin du TA est très plastique et le développement du réseau vasculaire est fonction de l'évolution de la masse adipeuse (Miranville et al., 2004). Le système vasculaire sanguin joue un rôle important pour l'oxygénation et l'apport en nutriments aux cellules du TA, et permet une communication inter-organe impliquée dans l'homéostasie gluco-lipidique. Après un repas et chez des sujets sains, le flux sanguin à travers le tissu adipeux est augmenté dû à l'action vasodilatatrice de l'insuline (Bülow et al., 1987) et à une augmentation du volume micro-vasculaire

grâce au recrutement de capillaires (Tobin et al., 2010). Ceci contribue à augmenter la densité de la LPL dans la lumière des capillaires pour accroître l'hydrolyse des TG transportés par les lipoprotéines et augmenter ainsi le flux d'acides gras dans l'adipocyte.

Le système lymphatique drainant les tissus adipeux est moins étudié. Il ne semble pas exister de réseau lymphatique dans le tissu adipeux péri-gonadique. Il pourrait aussi permettre au TA de communiquer avec les ganglions lymphatiques qui constituent les réserves de cellules immunitaires, afin de maintenir l'homéostasie des cellules immunitaires dans le TA. Il a été démontré qu'un réseau lymphatique dysfonctionnel chez la souris induisait une obésité viscérale (Escobedo et al., 2016), suggérant son importance dans l'homéostasie du tissu adipeux.

iv. Les cellules immunitaires

De nombreuses cellules immunitaires du système immunitaire inné et adaptatif sont présentes dans les tissus adipeux. L'ensemble des cellules immunitaires du TA joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie tissulaire. En situation physiologique (sujet mince), les cellules immunitaires sont de nature anti-inflammatoire avec principalement des lymphocytes T Th2 et Treg, des macrophages anti-inflammatoires, des éosinophiles, et des ILC2 (« innate lymphoid cell 2 ») comme décrit dans la **figure 7**. Les ILC2 en produisant de l'IL-5 et de l'IL-13 sont nécessaires à l'homéostasie des éosinophiles et des macrophages anti-inflammatoires du TA (Molofsky et al., 2013). Les éosinophiles, source majeure d'IL-4, et les lymphocytes Th2, en produisant de l'IL-13 surtout et aussi de l'IL-4, participent à la polarisation des macrophages anti-inflammatoires au sein du TA (Kang et al., 2008; Wu et al., 2011). Les macrophages anti-inflammatoires exercent leur rôle de phagocytose pour préserver l'intégrité du TA. Ils sécrètent des cytokines anti-inflammatoires dont la principale est l'IL-10 nécessaire aux Tregs du TA et qui constituent un frein au développement exacerbé d'une réaction inflammatoire (Josefowicz et al., 2012). La production d'IL-33 par le TA, peut-être par les cellules adipeuses beiges, a un rôle primordial pour le développement et le maintien des Tregs et des ILC-2 dans le TA (Molofsky et al., 2013; Vasanthakumar et al., 2015). L'homéostasie de ces cellules immunitaires dans le TA est

importante pour empêcher le développement de l'inflammation dans le tissu adipeux et pour maintenir les fonctions métaboliques et endocrine du TA.

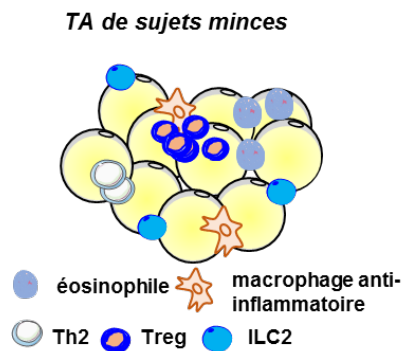


Figure 7. Les populations de cellules immunitaires dans le tissu adipeux de sujets minces. Les cellules immunitaires du tissu adipeux de sujets minces dialoguent pour maintenir un environnement anti-inflammatoire.

b. Le tissu adipeux brun

Le TA brun est abondant chez les mammifères hibernants. Chez l'homme, il est présent chez le nourrisson et devient bien moins développé à l'âge adulte (Chechi et al., 2014). Les adipocytes du TA brun ont une très grande capacité à transporter le glucose et diffèrent des adipocytes blancs sur le plan morphologique (ils contiennent de nombreuses gouttelettes lipidiques) et par leur capacité à contrôler la thermogénèse (Chechi et al., 2014). C'est la protéine mitochondriale UCP-1, spécifiquement exprimée dans ces adipocytes qui lui confère la capacité de découpler la chaîne respiratoire mitochondriale vers la production de chaleur plutôt que d'énergie (ATP). Les adipocytes bruns se différencient à partir d'une CSM pluripotente des somites exprimant les facteurs de transcription PAX7, Homeobox protein engrailed-1, et Myf5. Ces cellules pluripotentes sont communes aux myocytes squelettiques et au derme dorsal, mais ne peuvent pas donner des adipocytes blancs et beiges (Pradhan et al., 2017). Un certain nombre de facteurs favorise le développement du TA brun ainsi que son activité, le plus étudié étant l'exposition au froid qui agit *via* l'induction de la voie noradrénergique du système nerveux sympathique chez le rongeur (Gnad et al., 2014). Chez l'homme, une exposition au froid permet de mettre en évidence une augmentation du transport de glucose par imagerie PET scan (« positron emission tomography ») dans des dépôts de tissus adipeux localisés dans le cou, sur la clavicule et autour de la colonne

vertébrale (**Figure 3**). La capacité thermogénique de ces tissus chez l'homme (ou expression d'UCP1) n'est pas clairement établie.

c. Tissu adipeux beige

Une exposition au froid a aussi un effet sur le TA blanc sous-cutané chez le rongeur. On observe l'apparition d'adipocytes beiges (« entre blanc et brun ») qui peuvent être vus comme des adipocytes aux caractéristiques fonctionnelles et morphologiques similaires aux adipocytes bruns mais qui apparaissent dans le TA blanc sous-cutané, principalement autour des ganglions lymphatiques (Barreau et al., 2016). *Ex vivo* dans des explants de tissus adipeux murins et humains, les adipocytes beiges se développent à partir du réseau de capillaires en réponse à des facteurs pro-angiogéniques (VEGF, FGF-B, EGF). Ils expriment UCP1 et sécrètent PCSK1 (proprotéin-convertase subtilisin/kexin type-1) et son substrat PENK (proenkephalin) ainsi que l'IL-33 (Min et al., 2016). L'IL-33 favorise les adipocytes beiges au sein du TA en augmentant la fraction des ILC2, et par conséquent des éosinophiles et macrophages anti-inflammatoires (Brestoff et al., 2015). L'exposition au froid en activant le tonus sympathique permet d'augmenter l'expression de l'IL-33 et d'augmenter les ILC2 et les éosinophiles dans les tissus adipeux sous-cutanés, mais aussi dans le tissu adipeux brun du rongeur (Ding et al., 2016).

III. ALTERATION DES FONCTIONS DES TISSUS ADIPEUX LORS DE L'OBESITE ET IMPLICATION DANS LE DEVELOPPEMENT DE LA RESISTANCE A L'INSULINE

a. Pathogenèse de la résistance à l'insuline lors de l'obésité

i. Défaut d'expansion des tissus adipeux, lipotoxicité, et résistance à l'insuline

Lors de l'obésité, les tissus adipeux s'adaptent pour tenter de stocker la surcharge calorique sous forme de TG, des lipides non délétères pour l'organisme. On observe une hypertrophie et une hyperplasie des adipocytes qui sera spécifique à chaque individu et également à chaque dépôt de tissu adipeux blanc. Les tissus adipeux sous-cutanés sont plutôt caractérisés par une hypertrophie des adipocytes alors que les tissus adipeux viscéraux ont une hypertrophie et une hyperplasie (recrutement de nouveaux

adipocytes à partir de progéniteurs adipocytaires) des adipocytes. Quand les tissus adipeux blancs atteignent leur capacité maximale d'expansion, les lipides sous forme d'acide gras non estérifiés en excès se retrouvent dans la circulation et vont s'infiltrer et s'accumuler dans des tissus importants pour le contrôle de l'homéostasie gluco-lipidique tels que le foie, le muscle, et le pancréas. Ces lipides et leurs métabolites intracellulaires vont induire des cascades de signalisation conduisant à la résistance à l'insuline et peuvent également provoquer un stress du réticulum perturbant la survie cellulaire, et une inflammation du tissu (Morigny et al., 2016)

Je ne décrirai pas les mécanismes cellulaires sous-jacents à la lipotoxicité qui sont complexes et, en plus, dépendent du type cellulaire considéré.

Chez un sujet obèse, le développement du TA sous-cutané ne semble pas être associé à la résistance à l'insuline alors qu'un excès de TA viscéral est associé au développement des maladies cardio-métaboliques (Porter et al., 2009; Snijder et al., 2005). Tant que les tissus adipeux blancs sont capables de stocker les lipides en excès, les complications métaboliques restent faibles comme chez les obèses morbides (Carnethon et al., 2012; Wildman et al., 2008). Par contre, la localisation anatomique du TA viscéral, drainé par la veine porte, le relie directement au foie qui va percevoir efficacement les signaux envoyés par un TA dysfonctionnel lors de l'obésité (métabolites lipidiques, cytokines inflammatoires, Cf paragraphes suivant) qui perturbent les fonctions du foie, notamment l'adaptation métabolique entre les conditions de jeûne et d'alimentation (Smith and Kahn, 2016).

ii. Inflammation des tissus adipeux et résistance à l'insuline

L'inflammation de bas grade qui se développe au sein des tissus adipeux lors de l'obésité et parfois appelée méta-inflammation, que je vais décrire plus en détail dans les paragraphes suivants, joue un rôle important dans la pathogenèse de la résistance à l'insuline. D'une part, elle peut contribuer à inhiber l'expansion du TA car les cytokines pro-inflammatoires produites inhibent la différenciation adipocytaire (Sullivan et al., 2014; Zoller et al., 2016; Zúñiga et al., 2010). D'autre part, les cytokines pro-inflammatoires en activant leur voie de signalisation spécifique vont perturber la signalisation insulinique dans le foie, le muscle, et les adipocytes eux-mêmes participant ainsi au développement de la résistance à l'insuline. Elles peuvent également affecter des fonctions tissulaires indépendamment de

l'action de l'insuline. Par exemple dans l'adipocyte, les cytokines pro-inflammatoires inhibent l'expression de GLUT4 (Jager et al., 2007) et stimule la lipolyse en inhibant l'expression de la protéine de la gouttelette la périlipine (Rydén et al., 2004). La contribution des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF α dans le développement de la résistance à l'insuline lors de l'obésité est maintenant largement décrite (Ballak et al., 2015; Guilherme et al., 2008).

iii. Perte de fonction des tissus adipeux bruns et beiges et résistance à l'insuline

Lors de l'obésité, une augmentation de l'inflammation et une inhibition de la voie de signalisation de l'insuline a été observée dans le tissu adipeux brun de souris soumises à un régime riche en graisses (Roberts-Toler et al., 2015). Le transport de glucose et l'expression de UCP1 dans les adipocytes bruns est aussi inhibé, suggérant fortement une plus faible activité thermogénique et donc une plus faible dépense énergétique. La destruction du tissu adipeux brun à l'aide de l'expression ciblée de la toxine diphtérique dans l'adipocyte brun démontre l'importance de tissu adipeux brun dans le développement de l'obésité et des pathologies qui en découlent chez le rongeur. D'autres arguments expérimentaux sont en faveur d'un rôle bénéfique du tissu adipeux brun contre le développement de l'obésité et la résistance à l'insuline, comme l'exposition au froid des rongeurs et l'inactivation de UCP1 toujours chez le rongeur (Kusminski et al., 2016; Mattson, 2010; Poekes et al., 2015). Cependant ces approches ne permettent pas de distinguer entre le TA brun et le TA beige, également décrit pour être quantitativement diminué et fonctionnellement inhibé lors de l'obésité (Poekes et al., 2015). De plus, la preuve expérimentale que cibler le tissu adipeux brun chez l'homme pour lutter contre l'obésité et les pathologies cardio-métaboliques n'existe pas encore.

b. Altérations des fonctions des tissus adipeux blancs lors de l'obésité

i. Dans les adipocytes

1. 1. Transport de glucose, lipogenèse, et lipolyse

La stimulation par l'insuline du transport de glucose dans des adipocytes de sujets obèses est fortement diminuée. Cette diminution est due à un défaut de signalisation insulinaire, à l'inhibition d'expression du transporteur de glucose GLUT4, et à des défauts de trafic intracellulaire de GLUT4 (Cormont and

Kaddai, 2013). Le défaut de signalisation insulinique dans les adipocytes apparaît tardivement lors du développement de l'obésité dans des modèles de rongeurs, après la résistance à l'insuline musculaire et hépatique (Kim et al., 2008). Par contre, le transport de glucose par le TA (blanc et brun), mesuré lors d'un clamp euglycémique-hyperinsulinémique chez le rongeur, est fortement diminué dès le premier mois de régime riche en lipides (Turner et al., 2013), suggérant que ce défaut puisse être un événement déclenchant des désordres métaboliques engendrés par l'obésité.

En accord, des études chez la souris montrent que GLUT4 dans l'adipocyte est un acteur clé de l'homéostasie gluco-lipidique. L'inactivation de GLUT4 dans les adipocytes induit une intolérance au glucose et une résistance à l'insuline systémique, hépatique et musculaire (Abel et al., 2001). Cette intolérance au glucose n'est pas due à l'inhibition du transport de glucose par les adipocytes. En effet, la majorité du glucose en situation post-prandiale est utilisée par le muscle. Elle est due à une inhibition de la lipogenèse. La diminution du transport de glucose entraîne une inhibition des facteurs de transcription ChREBP et par conséquent des enzymes de la lipogenèse (Herman et al., 2012). L'absence de GLUT4 dans l'adipocyte perturbe aussi sa fonction endocrine. Les adipocytes n'exprimant pas GLUT4 expriment plus de RBP4 (serum retinol binding protein 4) qui participe au développement de la résistance à l'insuline (Graham et al., 2006; Yang et al., 2005). Les taux de FAHFAs, produits par les adipocytes de façon GLUT4-dépendante sont diminués chez les patients obèses et résistants à l'insuline. Compte tenu de leur rôle bénéfique sur l'homéostasie gluco-lipidique, cette diminution pourrait contribuer aux désordres métaboliques liés à l'obésité (Moraes-Vieira et al., 2016).

L'activité lipolytique des adipocytes est également perturbée lors de l'obésité. L'effet des catécholamines est réduit dans les tissus adipeux sous-cutanés et augmenté dans le tissu adipeux viscéral (Morigny et al., 2016). La lipolyse basale est augmentée chez les sujets obèses. La lipolyse basale est corrélée à la résistance à l'insuline indépendamment de l'IMC. Il est clair que les enzymes de la lipolyse (ATGL, HSL, MGL) jouent un rôle dans l'homéostasie glucidique grâce aux études de souris génétiquement modifiées sur ces enzymes et de mutations chez l'homme (Morigny et al., 2016). Cependant, les mécanismes conduisant à l'augmentation de la lipolyse basale lors de l'obésité ne sont bien connus. Les études portant sur l'expression des enzymes de la lipolyse ne convergent pas vers les

mêmes résultats. Une inhibition de l'expression de la périlipine 1 retrouvée chez des sujets obèses pourrait participer à cette augmentation de lipolyse basale (Wang et al., 2003).

2. Fonction endocrine

En plus des changements d'expression de RBP4 et des FAHFAs dont les changements de sécrétions sont la conséquence des modifications de l'entrée du glucose dans l'adipocyte des sujets obèses, la sécrétion d'autres adipokines, cytokines, et chimiokines par le tissu adipeux est fortement perturbée avec des conséquences importantes sur l'homéostasie gluco-lipidique (**tableau 4**). On gardera en mémoire que les modifications du sécrétome de tissu adipeux lors de l'obésité sont à la fois dues aux adipocytes et aux cellules de la fraction stroma vasculaire, dont les cellules immunitaires.

	Expression chez les mammifères		Conséquences lors de l'obésité :	
	mince	obèse		
Leptine	+	+++	Effet pro inflammatoire (Carbone et al., 2012)	Perturbent l'homéostasie gluco-lipidique en inhibant les voies de réponse à l'insuline (Zhou and Rui, 2013)
Apeline	+	+++	pro-angiogénique ((Bouloumié A, 2013)	
Visfatine	+	+++	Inflammation et augmente la sécrétion d'insuline (Badimon et al., 2015)	
Thrombospondine	+	++	Angiogenèse (Badimon et al., 2015)	
IL-1 β	+	++	Inflammation ; résistance à l'insuline ; athérosclérose (Badimon et al., 2015)	
Résistine	Variable		Inflammation et résistance à l'insuline (Badimon et al., 2015)	
TGF- β	+	++	Fibrose (Badimon et al., 2015)	
TNF- α	+	++	Inflammation, résistance à l'insuline et athérosclérose (Badimon et al., 2015)	
Adiponectine	++++	+	Moins de sensibilité à l'insuline du foie et du muscle (Yamauchi et al., 2003)	
IL-6	-	+++	Inflammation ; résistance à l'insuline, Athérosclérose, (Badimon et al., 2015)	
CCL2			Facteur attractant des macrophages	
RANTES			Facteur attractant des lymphocytes T	

Tableau 4 : Résumé des modifications d'expression des principales adipokines par l'adipocyte lors de l'obésité et leurs fonctions (d'après (Badimon et al., 2015)).

ii. Dans les pré-adipocytes

L'expression d'un marqueur pré-adipocytaire Pref-1 est inhibée dans le TA des souris obèses (Moon et al., 2002; Villena et al., 2008) suggérant une diminution de leur nombre lors de l'obésité. La quantification précise du nombre des pré-adipocytes dans les dépôts adipeux est rendu difficile par l'absence d'un marqueur unique de cette population cellulaire. Cependant, des défauts intrinsèques aux progéniteurs adipocytaires ont été décrits. Les pré-adipocytes de sujets obèses ont une moins grande capacité de différenciation en adipocytes (Isakson et al., 2009). Les CSMs du tissu adipeux de sujets obèses prolifèrent moins, sont moins clonogéniques, et perdent leur multipotence (De Girolamo et al., 2013). Ces défauts pourraient empêcher l'hyperplasie du tissu adipeux lors d'un apport calorique accru conduisant à son développement pathologique avec uniquement des adipocytes hypertrophiques.

iii. Dans le compartiment vasculaire

Lors de l'obésité, la plasticité et la tonicité du réseau vasculaire du TA ne semble plus être aussi efficace. Le flux sanguin ne s'adapte plus en situation post-prandiale chez les sujets obèses et résistants à l'insuline (Ardilouze et al., 2012). Une diminution de la densité des capillaires sanguins dans le TA a également été observée (Pasarica et al., 2009; Ye et al., 2007). De plus, il est possible qu'il puisse y avoir un défaut de transfert de l'insuline depuis les vaisseaux vers l'espace interstitiel du tissu adipeux lors de l'obésité (Sandqvist et al., 2011). Les mécanismes moléculaires ne sont pas connus mais pourraient être reliés, du moins en partie, à l'augmentation d'expression du VEGF-A, le principal facteur angiogénique, dans les tissus adipeux de sujets obèses (Loebig et al., 2010; Silha, Tinahones et al., 2012; Krsek, Sucharda, & Murphy, 2005). Le VEGF-A en sur-stimulant la croissance des cellules endothéliales au sein du TA perturberait leurs fonctions empêchant ainsi la néo-vascularisation (Villaret et al., 2010). Les conséquences du défaut de vascularisation peuvent être multiples : une moins bonne accessibilité des substrats énergétiques depuis la circulation vers l'adipocytes ; le développement de zones hypoxiques qui bien que prouvées chez le rongeur restent débattues chez l'homme obèse (Goossens et al., 2011; Hodson, 2014; Hodson et al., 2013; Kabon et al., 2004; Lawler et al., 2016;

Virtanen et al., 2002) ; une participation à l'établissement de l'inflammation, les cellules endothéliales du sujet obèse exprimant des chimiokines pour des cellules pro-inflammatoires (Villaret et al., 2010).

iv. Dans le compartiment des cellules immunitaires

Lors de l'obésité, les modifications des cellules immunitaires des TA contribuent à l'installation de l'inflammation de bas grade caractéristique des maladies cardio-métaboliques. On observe dans le TA des sujets obèses une diminution des cellules anti-inflammatoires dont les éosinophiles, les Treg, et les macrophages anti-inflammatoires (**Figure 7**) (Feuerer et al., 2009; Huh et al., 2014; Wu et al., 2011). En parallèle, le nombre de cellules immunitaires pro-inflammatoires, du système inné et adaptatif, augmente dans le tissu adipeux de sujets obèses (**Figure 8**) (Bertola et al., 2012; Huh et al., 2014; Magalhaes et al., 2015; O'Sullivan et al., 2016; Wensveen et al., 2015; Zúñiga et al., 2010).

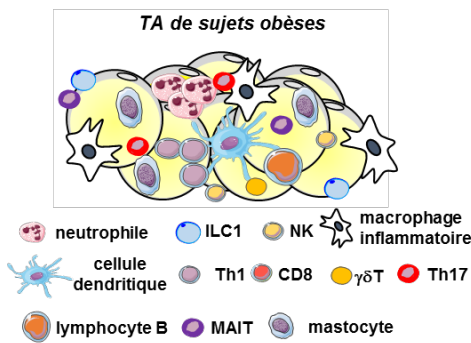


Figure 8. Les populations de cellules immunitaires dans le tissu adipeux de sujets obèses. Les cellules immunitaires du tissu adipeux de sujets obèses sont pro-inflammatoires contribuant à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires participant au développement de l'inflammation de bas grade.

MAIT: mucosal associated invariant T cell
NK: natural killer

Tous les dépôts adipeux ne sont pas touchés de la même manière pour des raisons qui restent encore incomprises. Le TA viscéral est beaucoup plus inflammatoire que les tissus adipeux sous-cutanés (Dam et al., 2016). Cette réaction inflammatoire au sein du TA se développe progressivement lors du développement de l'obésité avec une mise en jeu successive de différentes cellules immunitaires avec dans l'ordre chronologique augmentation des macrophages anti-inflammatoires, des neutrophiles, des lymphocytes B, des changements dans les populations de lymphocytes T, puis polarisation pro-inflammatoire des macrophages. Aucune donnée sur la chronologie relative d'apparition des autres cellules immunitaires n'est disponible. L'ensemble des modifications conduit à la polarisation pro-inflammatoire des macrophages qui est l'événement le plus tardif. De nombreuses études démontrent que la manipulation expérimentale de ces cellules chez la souris, afin de modifier leur nombre ou leurs

fonctions, perturbe l'homéostasie gluco-lipidique. Je ne citerai que les études les plus représentatives pour chaque type cellulaire dans la suite de l'introduction.

1. Les macrophages

Très précocement après l'initiation d'un régime riche en lipides, on observe une augmentation du nombre des macrophages anti-inflammatoires, probablement pour permettre l'expansion du TA (Wernstedt Asterholm et al., 2014). CCL2, une des principales chimiokines des macrophages participe à l'augmentation des macrophages dans le TA lors de l'obésité, grâce à son pouvoir chimio-attractant mais aussi en induisant leur prolifération (Amano et al., 2014). Des souris n'exprimant pas CCL2 ou son récepteur CCR2 accumulent moins de macrophages dans le TA quand on les soumet à un régime riche en lipides et sont protégées du développement de la résistance à l'insuline (De Girolamo et al., 2013; Weisberg et al., 2006). A l'inverse, la surexpression de CCL2 par l'adipocyte suffit à induire le recrutement des macrophages et la résistance à l'insuline (Kamei et al., 2006). D'autres signaux contribuent à l'augmentation du nombre des macrophages dans le tissu adipeux de souris obèses dont la sémaphorine 3E (Shimizu et al., 2013), la nétrine-1 (Ramkhelawon et al., 2014), mais également l'IL-6 par un mécanisme indépendant de son propre récepteur mais dépendant de gp130 (Kraakman et al., 2015; Ley et al., 2013). L'expression de toutes ces molécules est augmentée dans le tissu adipeux lors de l'obésité. L'adipocyte pourrait fortement contribuer à l'augmentation de la plupart d'entre elles mais nous ne savons pas s'il s'agit d'événements précoces lors du développement de l'obésité. Dans mon travail de thèse, je montre que l'augmentation d'expression de CCL2 et de l'IL-6 dans le TA est un événement précoce lors du développement de l'obésité (Vergoni et al., 2016). Plus tardivement dans le développement de l'obésité, on observe une augmentation du nombre de macrophages pro-inflammatoires en parallèle avec la production de cytokines pro-inflammatoires dont le TNF- α et l'IL1- β .

2. Les neutrophiles

On observe une augmentation du nombre des neutrophiles avec un pic très précoce, puis un maintien à un niveau plus élevé que chez les souris minces, mais variable selon les études (Elgazar-Carmon et al., 2008). Les neutrophiles sont connus pour favoriser l'inflammation en permettant le recrutement des

macrophages et en interagissant avec les cellules présentatrices d'antigènes. Les neutrophiles pourraient également avoir des effets délétères sur la sensibilité à l'insuline à cause des enzymes qu'ils sécrètent pour remplir leur fonction comme par exemple l'élastase qui inhibe la signalisation insulinique dans le foie (Talukdar et al., 2012).

3. Les lymphocytes B

Viennent ensuite les lymphocytes B qui semblent précéder la diminution du nombre des Tregs et l'augmentation des lymphocytes T pro-inflammatoires (Th1 et CD8) (Duffaut et al., 2009; Winer et al., 2011). Les lymphocytes B contribuent au développement de la résistance à l'insuline lors de l'obésité (DeFuria et al., 2013; Winer et al., 2011). Winer *et al* ont proposé comme mécanisme l'implication de la production d'IgG par les lymphocytes B. DeFuria *et al* favorisent une activation systémique de l'inflammation car les cellules B des obèses produisent des cytokines pro-inflammatoires et une activation locale de l'inflammation du TA grâce à des mécanismes dépendants de contact cellule-cellule conduisant à la diminution des Treg.

4. Les cellules NK, ILC1 et ILC2, et MAIT

Les cellules NK du tissu adipeux contribuent au développement de la résistance à l'insuline en induisant la polarisation pro-inflammatoire des macrophages (Lee et al., 2016; Wensveen et al., 2015). L'adipocyte de souris obèses exprime à sa surface des ligands capables d'activer les récepteurs NCR1 des cellules NK qui se mettent à proliférer et à produire de l'IFN γ favorisant ainsi la polarisation des macrophages (Wensveen et al., 2015). L'augmentation du nombre des ILC1 contribue au développement des maladies métaboliques. Cette augmentation est due à l'induction d'IL-12 dans le TA des souris obèses qui induit la prolifération des ILC1 résidentes du TA. Les ILC1 produisent de l'INF γ qui favorise l'inflammation. La source cellulaire de l'IL-12 n'est pas connue. La production d'IL-33 par le TA qui est nécessaire aux ILC2 anti-inflammatoires est inhibée dans le tissu adipeux de souris obèses (Ding et al., 2016). Le rôle des MAIT dans le contrôle de l'homéostasie gluco-lipidique n'est pas encore connu. Des études corrélatives suggèrent cependant un fort lien entre les MAIT et la résistance à

l'insuline lors de l'obésité, et plus particulièrement avec l'augmentation de cellules MAIT capables de sécréter de l'IL-17A dans le TA (Carolan et al., 2015; Magalhaes et al., 2015).

5. Les lymphocytes T

La baisse des Treg dans le tissu adipeux constitue un événement important dans le développement de l'inflammation qui conduira aux développements des maladies métaboliques (**Tableau 5**).

CELLULES	Méthode/modèle	EFFETS
CD4 ⁺ ↗	Transfert CD4 ⁺ /Rag1null HFD	↘ poids ↘ Résistance insuline
Th1 ↘	STAT4 KO/WT HFD	= poids ↘ résistance insuline ↘ glucose intolérance ↘ AT inflammation
CD4 ⁺ ↘ CD8 ⁺ ↘	KO TCRβ HFD	↘ résistance insuline ↘ glycémie ↘ AT inflammation
Th1 ↗	Transfert Th1/KO TCRβ HFD	↗ Inflammation ↗ glucose intolérance
CD8 ⁺ ↗	Transfert CD8 ⁺ /Rag1null HFD	Pas de phénotype
CD8 ⁺ ↘	Anticorps neutralisant/WT HFD	= poids ↘ résistance insuline ↘ glucose intolérance ↘ AT inflammation
CD8 ⁺ ↘	Souris CD8a ^{-/-} HFD	Pas de phénotype
CD8 ⁺ ↗	Transfert CD8 ⁺ / Souris CD8a ^{-/-} HFD	↗ résistance insuline ↗ glucose intolérance ↗ AT inflammation
Treg ↗ Th1 ↘	Anticorps anti-CD3 <i>ob/ob</i> et WT HFD	↘ résistance insuline
Treg ↘	Anti-CD25/ <i>db/db</i>	↗ résistance insuline
Treg ↘	Souris Foxp3-DTR+DT/ WT ND	↗ AT inflammation ↗ résistance insuline
Treg ↘	Souris B7 KO (CD80/CD86) ND et HFD	↗ résistance insuline ↗ AT inflammation
Treg ↗	Transfert CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ / <i>db/db</i>	↘ résistance insuline ↘ AT CD8 ⁺
Treg ↗	In situ prolifération (complexe IL2/anti IL2)/ WT HFD	↘ glucose intolérance
Treg ↗ Th1 ↘	Inactivation de STAT3 dans CD4 ⁺	= poids ↘ résistance insuline ↘ glucose intolérance ↘ AT inflammation

Tableau 5. Implication des cellules du système immunitaire adaptatif dans le développement de la résistance à l'insuline. Dans la colonne « cellules » sont mentionnées les conséquences sur le type cellulaire indiqué de la manipulation expérimentale décrite dans la colonne « Méthode/Modèle ».

ND: régime normal ; HFD: régime riche en graisse ; AT: tissu adipeux ; CD4⁺: lymphocyte T CD4⁺; CD8⁺: lymphocyte T CD8⁺; Th1: lymphocyte T CD4⁺ Th1 (pro-inflammatoire); Treg : lymphocyte T régulateur exprimant Foxp3 ; KO: invalidation génique; souris Rag1null : souris sans lymphocytes T et B fonctionnels; *db/db*: souris génétiquement obèses sans récepteur de la leptine fonctionnel; DTR: récepteur de la toxine diphtérique; DT: toxine diphtérique. B7: molécules exprimées par les cellules présentatrices d'antigènes reconnaissant CD28 sur les lymphocytes T et impliquées dans leur stimulation. (Chatzigeorgiou et al., 2014; Dobrian et al., 2013; Eller et al., 2011; Feuerer et al., 2009; Khan et al., 2014a; Nishimura et al., 2009; Priceman et al., 2013; Winer et al., 2009; Zhong et al., 2014).

L'IL-33 étant, comme pour les ILC-2, cruciale pour le maintien des Treg résidents du TA, sa baisse dans le TA lors de l'obésité pourrait contribuer à leur diminution (Ding et al., 2016). La baisse des Tregs entraînent une diminution de l'activité immunosuppressive locale en diminuant les concentrations locales de cytokines anti-inflammatoires IL-10 et IL-5 (Pirola and Ferraz, 2017). Chez les rongeurs, lorsque les Tregs du TA sont supprimés expérimentalement, il a été observé une augmentation de l'inflammation du TA (niveaux élevés de TNF α , IL-6 et RANTES) et une diminution de la sensibilité à l'insuline (Feuerer et al., 2009) ([tableau 5](#)).

L'augmentation de nombreux types cellulaires capables de sécréter de l'IL-17A (Th17, $\gamma\delta$ T, MAIT) pourrait également être un événement important dans le développement de la résistance à l'insuline (Carolan et al., 2015; Fabbrini et al., 2013; Magalhaes et al., 2015; Mehta et al., 2015). La cause de l'augmentation des $\gamma\delta$ T et des MAITs dans le TA des sujets obèses n'est pas connue. Pour les Th17, il a été montré que les cellules dendritiques, dont le nombre est augmenté dans le TA lors de l'obésité (Stefanovic-Racic et al., 2012), et les cellules souches des TA des sujets obèses étaient capable d'induire une polarisation Th17 *ex vivo* (Bertola et al., 2012; Eljaafari et al., 2015). L'augmentation de l'IL-17A pourrait inhiber l'expansion du TA puisque les souris invalidées pour l'IL-17A ont une masse grasse augmentée quel que soit le régime alimentaire. L'absence d'IL-17A pourrait pendant un certain temps améliorer la tolérance au glucose et la résistance à l'insuline. Par contre cet effet protecteur ne se manifeste plus chez des souris âgées ou alimentées avec un régime gras (Zúñiga et al., 2010).

IV. CAUSES DES DYSFONCTIONS ET DE L'INFLAMMATION DES TISSUS ADIPEUX LORS DE L'OBESITE

a. Origine intestinale de l'inflammation des tissus adipeux

L'intestin joue un rôle important dans le développement de l'obésité. 3 à 4×10^{14} bactéries peuvent constituer la flore microbienne (ou le microbiote) intestinale soit approximativement le même nombre de cellule qu'un corps humain (Sender et al., 2016). L'importance du microbiote intestinal et son influence sur l'ensemble du corps a aussi été mis en évidence en transférant du microbiote de souris obèse ou de souris mince vers une souris axénique. Les premières ont pris plus de poids que les secondes sous le même régime (Turnbaugh et al., 2006). Le microbiote a été impliqué dans la régulation de

l'homéostasie énergétique chez l'humain (Khan et al., 2014b; Rosenbaum et al., 2015). Par exemple, il joue un rôle sur la satiété, la dépense d'énergétique, le stockage des graisses et l'extraction des calories de l'alimentation. Lors de l'obésité, la flore intestinale est modifiée et ceci entraîne le développement de la résistance à l'insuline (Caricilli and Saad, 2014; Rescigno, 2014). Ceci pourrait être expliqué par une augmentation de la perméabilité intestinale bien que pour l'instant ce phénomène n'a été prouvé que chez la souris (Genser et al., 2016). Cette augmentation de la perméabilité intestinale serait la conséquence d'une altération de l'immunité innée et adaptative intestinale due aux changements de l'alimentation et du microbiote intestinal (Winer et al., 2017). Cette perméabilité accrue expliquerait l'augmentation de LPS circulant retrouvé chez les patients obèses (Geurts et al., 2014). Or, une injection chronique de LPS chez des souris minces induit l'inflammation du TA, une prise de poids, et la résistance à l'insuline (Caesar et al., 2012; Cani et al., 2007), suggérant un lien de causalité entre perturbation de la fonction de barrière intestinale, l'inflammation du TA, et résistance à l'insuline.

b. Origine centrale de l'inflammation tissu adipeux

Le système nerveux sympathique joue un rôle central dans la régulation du contrôle du métabolisme énergétique. Alors que l'activation sympathique aiguë peut être souhaitable dans certaines circonstances, lors de l'obésité, la stimulation chronique du système nerveux sympathique notamment du système vasculaire musculaire et rénal est susceptible d'augmenter le risque cardiovasculaire (Guarino, Nannipieri, *Front Physiol* 2017). Le tissu adipeux blanc est également innervé par le système sympathique qui stimule directement la lipolyse adipocytaire *via* les récepteurs bêta-adrénérgiques et augmente le nombre d'adipocytes beiges. Cependant, il semblerait que l'innervation sympathique des tissus adipeux soit déficiente lors de l'obésité chez l'homme (Bartness and Song, 2007). Comme le tonus sympathique semble requis pour l'expression de l'IL-33 dans le TA, lui-même nécessaire au maintien des cellules anti-inflammatoires ILC-2 et des Tregs (Ding et al., 2016), la baisse du tonus sympathique pourrait donc contribuer à l'inflammation. Cependant, il vient d'être montré que dans le TA brun la fonction des macrophages résidents conditionne le développement des terminaisons nerveuses des neurones sympathiques (Wolf et al., 2017). Si un tel lien existe également dans

l'innervation sympathique du TA blanc, ce serait plutôt la dysfonction des macrophages qui conduirait aux défauts d'innervation qui amplifieraient ensuite l'inflammation.

c. Origine adipocytaire de l'inflammation des tissus adipeux

Comme nous l'avons déjà vu, les adipocytes lors de l'obésité sécrètent des chimiokines capables d'attirer des macrophages et expriment à leur surface des protéines impliquées dans l'activation des neutrophiles. Quand l'invalidation de ces molécules trouvées augmentées dans l'adipocyte de souris obèses a été réalisée, elle améliore l'état inflammatoire du tissu adipeux et la résistance à l'insuline des animaux. Ils expriment également rapidement après l'initiation d'un régime riche en lipides plus de complexe majeur d'histocompatibilité de classe II à leur surface, événement qui participe au développement de l'inflammation du TA et à la résistance à l'insuline (Deng et al., 2013). Il est donc concevable que l'alimentation riche en lipide altère les adipocytes, modifie leur profil d'expression génique en augmentant l'expression des molécules citées ci-dessus. Dans cette hypothèse, il faut comprendre les mécanismes moléculaires qui vont conduire aux perturbations du programme génique de l'adipocyte lors de l'obésité. Il a été montré qu'un stress oxydatif, un stress du réticulum endoplasmique, et un stress hypoxique se développaient au sein du tissu adipeux lors de l'obésité. Ces stress, comme je vais le décrire dans les paragraphes suivants, peuvent modifier les fonctions adipocytaires et participer à l'inflammation du TA.

i. Stress oxydatif dans le TA, inflammation et résistance à l'insuline

Le stress oxydatif est la résultante d'un déséquilibre dans la balance oxydants/antioxydants en faveur des agents oxydants ROS (« Reactive Oxygen Species ») pouvant entraîner des dommages cellulaires en induisant la peroxydation des lipides, des protéines, et de l'ADN (Atamer et al.). La cellule gère le stress oxydatif en adaptant la synthèse des antioxydants en fonction de leur niveau cellulaire. Le complexe protéique clé de la voie de réponse au stress oxydatif est composé de Nrf2 (nuclear factor (erythroid-derived 2-like 2), un facteur de transcription, et Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein

1) comme censeur des ROS. En présence de ROS, Keap1 se dissociera de Nrf2 le laissant libre d'agir sur ses promoteurs cibles induisant l'expression d'enzymes antioxydantes.

Le stress oxydatif se développe précocement dans les TA lors de l'obésité (Furukawa et al., 2004). Après 8 semaines de régime riche en lipides et sucres, ce stress oxydatif est la conséquence de l'activation de la NADPH oxydase Nox4, qui est activée du fait de la production accrue de NADPH par la voie des pentoses phosphates. Plus tard, la production de ROS par l'adipocyte est due à la sollicitation des mitochondries pour l'oxydation des lipides (Den Hartigh et al., 2017). Un traitement avec un inhibiteur de NADPH oxydase corrige le stress oxydatif dans le TA et améliore l'inflammation du TA et la résistance à l'insuline (Furukawa et al., 2004). Cependant, l'inactivation de Nox4 dans l'adipocyte ne fait que différer le développement de l'inflammation du TA et de la résistance à l'insuline sans affecter le développement de l'obésité (Den Hartigh et al., 2017). L'implication du stress oxydatif dans le développement de la résistance à l'insuline lors de l'obésité apparaît donc plus complexe. De plus, il pourrait être également impliqué dans l'expansion du TA. En effet, l'inactivation de Nrf2 dans les adipocytes entraîne une diminution de l'obésité induite par un régime riche en lipides (Chartoumpakis et al., 2011).

Un stress oxydatif dans l'adipocyte contribue au développement de l'inflammation *in vivo* (Den Hartigh et al., 2017) et *in vitro* en participant à l'activation des facteurs de transcriptions inflammatoires NF κ b et AP1 (Mazière et al., 2009), augmentant la synthèse de chimiokines pro-inflammatoires (Ryu et al., 2013), et inhibant l'expression de l'adiponectine (Kamigaki et al., 2006). L'ajout de peroxyde d'hydrogène sur des adipocytes en culture active les MAPKs ERK 1/2, p38MAPK et JNK et de la kinase inflammatoire IKK β induisant la phosphorylation sur les résidus sérine/thréonine d'IRS-1 et en conséquence une inhibition de la signalisation insulinique. Les ROS perturbent aussi la liaison de C/EBP avec le promoteur de GLUT4, inhibant son expression (Pessler-Cohen et al., 2006). La production de ROS par l'adipocyte peut donc participer à l'inflammation du TA et à perturber ses fonctions métaboliques et endocrines.

ii. Stress du réticulum endoplasmique, dysfonctions et inflammation du TA

La membrane réticulum endoplasmique (RE) est en continuité avec la membrane nucléaire et est le lieu de synthèse des protéines sécrétées et trans-membranaires, des lipides, et participe à l'homéostasie calcique. Toute anomalie dans la synthèse protéique, lipidique, et l'homéostasie calcique sera perçue par les voies de réponses aux stress du réticulum (UPR) afin de corriger les défauts existants en augmentant transcriptionnellement les gènes cibles de l'UPR. Trois voies sont activées de façon coordonnée la voie PERK, IRE-1/XBP1s, et ATF6 (Pagliassotti et al., 2016).

Lors de l'obésité, il a été démontré que l'augmentation du stress du RE dans les tissus cibles de l'insuline -foie et tissu adipeux- est associée à l'augmentation de la résistance à l'insuline (Ozcan et al., 2004) et de l'inflammation (Hotamisligil and Erbay, 2008). A l'inverse, inhiber le stress du RE chez des souris obèses avec le TUDCA entraîne une diminution de l'inflammation du TA (Kawasaki et al., 2012).

Le glucose, les acides gras non estérifiés, et le LPS que l'on retrouve augmentés lors de l'obésité, sont capables d'induire du stress du RE sur des adipocytes en culture (Gregor and Hotamisligil, 2007). Créer expérimentalement un stress du RE dans l'adipocyte a pour conséquence une inhibition de la voie de réponse à l'insuline du fait de l'activation des kinases JNK et IKK β qui phosphorylant IRS-1 sur résidu sérine (Gual et al., 2005; Tanti and Jager, 2009). D'autres conséquences ont été observées comme l'augmentation de la lipolyse (Bogdanovic et al., 2015; Deng et al., 2012), et l'induction de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Hotamisligil and Erbay, 2008; Kawasaki et al., 2012). L'activation de l'inflammation par un stress du RE dans l'adipocyte met en jeu les trois voies de l'UPR qui conduisent à l'activation des kinases IKK β , JNK, des facteurs de transcription inflammatoires NF κ B et AP1, et de l'inflammasome NLRP3 (Gregor and Hotamisligil, 2007; Ng et al., 2014). Un stress du RE dans l'adipocyte peut donc perturber les fonctions métaboliques de l'adipocyte et provoquer l'inflammation. Le stress du RE peut également engendrer un stress oxydant qui peut augmenter la réponse inflammatoire. L'inflammation et le stress oxydant peut aussi induire le stress du RE créant un cercle vicieux aggravant les anomalies métaboliques de l'adipocyte (Gregor and Hotamisligil, 2007).

iii. Hypoxie, dysfonctions et inflammation du TA

L'hypoxie est définie par un manque d'oxygène qu'il soit au niveau cellulaire, tissulaire ou au niveau d'un organisme entier. La protéine clé de la réponse à l'hypoxie est HIF-1 (« Hypoxia inducible Factor ») (Brahimi-Horn and Pouyssegur, 2007). Il s'agit d'un hétérodimère, HIF-1 α et HIF1- β où seul le niveau de HIF-1 α est dépendant de l'état hypoxique, sa dégradation étant inhibée en réponse à un manque d'oxygène (Kaelin and Ratcliffe, 2008; Moroz et al., 2009). Une fois stabilisée, HIF-1 induit la transcription de gènes cibles qui permettent à la cellule de s'adapter à la faible concentration en oxygène pour leur survie.

L'adipocyte pourrait se retrouver en hypoxie du fait de défaut de vascularisation discuté dans le chapitre dédié (III.b.iii). Mais une hypoxie cellulaire a également été montrée à cause d'un problème de respiration mitochondriale dû aux acides gras et conduisant à une surconsommation en oxygène. Ceci entraîne la stabilisation de HIF-1 α dans l'adipocyte (Lee et al., 2014) qui participe au développement de l'obésité et de la résistance à l'insuline lors d'un régime riche en graisses (Jiang et al., 2011).

Mettre des adipocytes en culture en hypoxie inhibent la signalisation de l'insuline et les fonctions métaboliques induites par l'hormone de façon HIF-1-dépendante (Regazzetti et al., 2009) *via* l'inhibition de l'expression de Cavin-1 et Cavin-2 induisant la disparition des cavéoles, nécessaires à la signalisation insulinique (Regazzetti et al., 2015). L'hypoxie entraîne une inhibition de la phosphorylation oxydative induisant la production de lactate (Wood et al., 2011). Elle inhibe la captation des acides gras et stimule la lipolyse (Yin et al., 2009). Elle inhibe la production d'adiponectine (Hosogai et al., 2007) et stimule la production de cytokines pro-inflammatoires en activant le facteur de transcription NF κ B (Stuart Wood et al., 2009; Taylor et al., 2014). L'hypoxie augmente également l'expression de gènes cibles de l'UPR suggérant des interactions entre stress du RE et stress hypoxique. L'hypoxie participe également au développement du stress oxydant (Gregor and Hotamisligil, 2007; Trayhurn, 2013).

Nous venons de voir que les stress qui se développent dans l'adipocyte sont interconnectés et conduisent à la dysfonction des adipocytes sur le plan métabolique et endocrine et activent les voies inflammatoires dans l'adipocyte (Malhotra and Kaufman, 2007; Marseglia et al., 2014). Sans oublier que les autres

cellules du tissu adipeux puissent être soumises aux mêmes stress, l'adipocyte en percevant ces stress (oxydatif, hypoxique, du RE) de façon précoce a le potentiel de déclencher les dysfonctions adipocytaires et l'inflammation du TA. L'ensemble de ces stress sont des stress génotoxiques connus pour activer la voie p53. Le chapitre suivant présentera de façon synthétique les connaissances actuelles sur cette protéine et de façon plus approfondie son implication dans le contrôle du métabolisme cellulaire et dans le développement des maladies métaboliques.

V. P53

a. Fonctions de p53

Le gène TP53 codant pour p53 est connu comme le principal gène suppresseur de tumeur du fait de son activité liée à la protection du génome (Baker et al., 1989). P53 est souvent appelée « gardien du génome » pour ces mêmes raisons. La perte de la fonctionnalité de p53 est très fortement liée à la tumorigenèse (Hollstein et al., 1991). P53 fait partie d'une famille de facteurs de transcription composés de p53, p63 et p73 codés par trois gènes distincts (Fischer et al., 2014). Ils présentent une forte homologie entre eux et sont composés d'un domaine de trans-activation, d'un domaine de liaison à l'ADN et d'un domaine d'oligomérisation qui permet la formation d'un tétramère nécessaire à l'activité de liaison à l'ADN (Kern et al., 1991). Il existe de nombreuses isoformes de p53 dont on ne connaît pas encore les fonctions mais qui pourraient agir comme des dominants négatifs de p53 compte tenu de leur structure (Marcel and Hainaut, 2009). P53 agit principalement en stimulant la transcription de programmes géniques spécifiques qui vont permettre de restaurer l'homéostasie cellulaire compatible avec la survie (**Figure 9**). En cas d'échec, p53 contrôlera l'expression d'autres programmes géniques qui causeront l'apoptose ou la sénescence (**Figure 9**) (Agarwal et al., 1995; Fridman and Lowe, 2003; Speidel, 2015; Vousden and Prives, 2009; Xue et al., 2007). De manière indirecte, p53 peut inhiber l'expression d'un gène en empêchant la liaison d'autres activateurs de transcription sur un promoteur (Ho and Benchimol, 2003). P53 a également un rôle au niveau de la mitochondrie et participe au contrôle qualité de ces organelles (Vaseva and Moll, 2009). Dans la suite, nous parlerons uniquement de la fonction transcriptionnelle de p53.

b. Activation de p53

P53 est activé par des oncogènes et des stress génotoxiques, c'est-à-dire générant des dommages à l'ADN, comme l'hypoxie, le stress oxydatif, et l'inflammation (Vousden and Prives, 2009) (**figure 9**), stress présent dans le TA lors de l'obésité comme décrit dans les paragraphes précédents. Ces stress provoquent chacun une cascade de signalisation spécifique conduisant à la stabilisation de p53 et à l'augmentation de son activité transcriptionnelle.

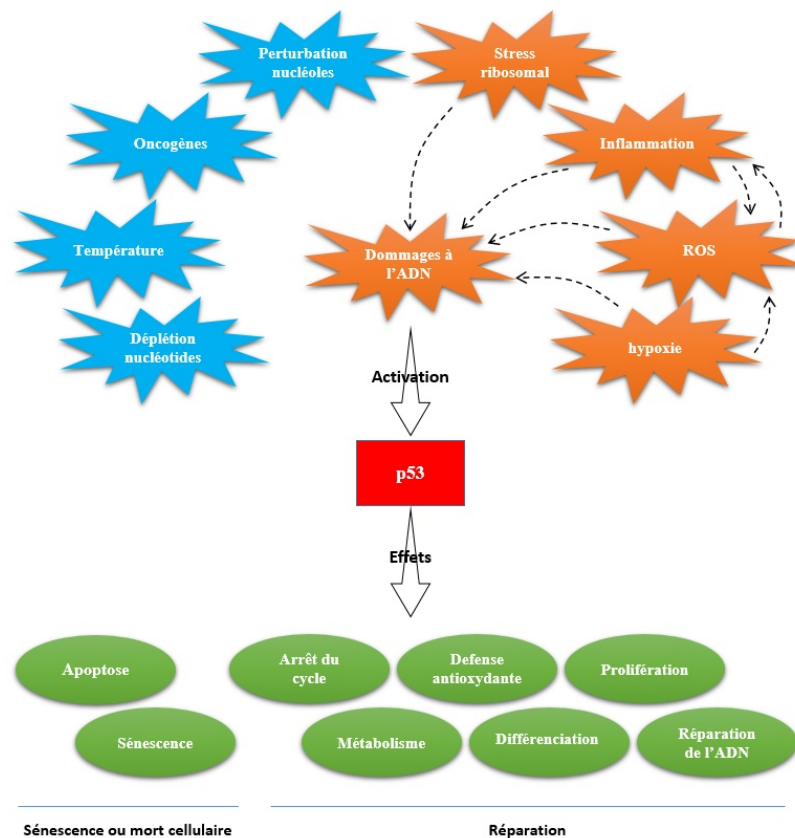


Figure 9. Causes et conséquences de l'activation de p53 dans l'obésité. p53 est activé par de nombreux stress comme les oncogènes, la déplétion en nucléotides, la perturbation des nucléoles, l'augmentation de la température, le stress oxydatif, les dommages à l'ADN (comprenant les cassures simples et doubles brins, le raccourcissement des télomères...), l'hypoxie, le stress ribosomal et l'inflammation. De plus, la plupart des stress sont capables d'engendrer un ou plusieurs des autres. Certains de ces liens sont représentés sur le schéma. En orange sont les stress retrouvés dans l'adipocyte lors de l'obésité. L'activation de p53 peut engendrer de nombreuses conséquences orientant la cellule vers une tentative de réparation des dommages ou à défaut vers la sénescence ou la mort.

La principale régulation de p53 est dû à MDM2 (souris double minute 2 homologue) (Haupt et al., 1997; Momand et al., 1992) avec lequel ils forment un complexe inhibiteur. La dissociation de ce complexe est nécessaire à l'activité de p53 comme décrit dans la **figure 10**. Le niveau d'expression de MDM2 est important car en cas de faible expression, p53 ne sera que mono-ubiquitiné n'induisant qu'une inhibition de son activité transcriptionnelle et non sa dégradation (Li et al., 2003). Ainsi les taux d'expression de p53 et de MDM2 sont fortement liés.

En cas de dommage à l'ADN, une cascade de réponse spécifique se déclenche pour aboutir à la dissociation entre MDM2 et p53. Elle commençant par la phosphorylation de l'histone H₂A_X (en γ H₂A_X) par la kinase ATM et la liaison de γ H₂A_X au niveau des cassures doubles brins de l'ADN. Les kinases ATR et DNA-PK peuvent également remplir cette fonction. La cascade de signalisation induite par ces événements et conduisant à la stabilisation de p53 est représentée dans la **figure 11**. La spécificité de la réponse transcriptionnelle dépendra aussi des différentes modifications post-traductionnelles sur p53 ou MDM2 (Meek, 2015).

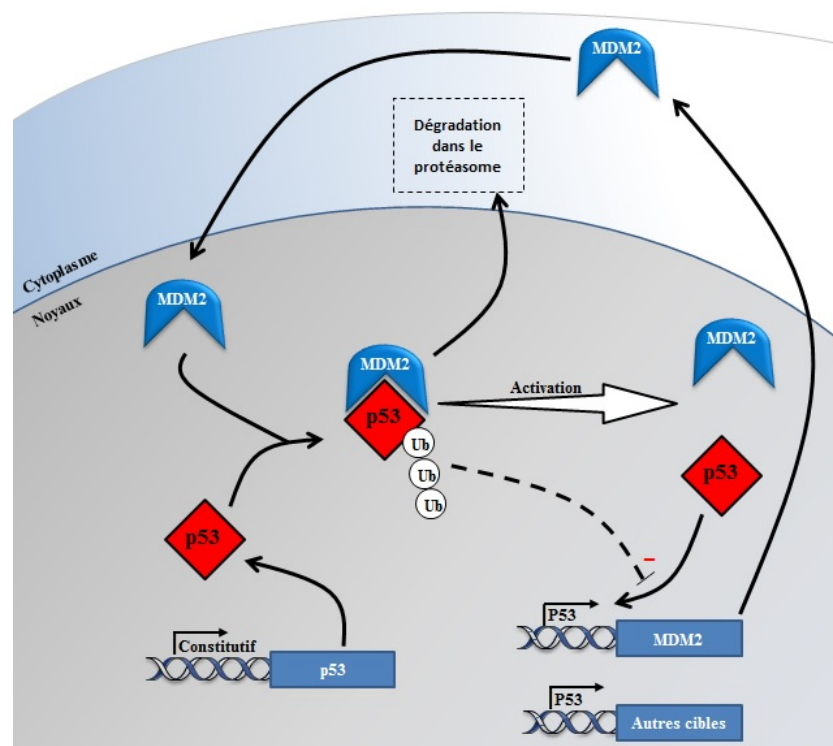


Figure 10. Régulation de p53 par MDM2. P53 et MDM2 sont à la fois effecteur et cible l'un de l'autre. P53 comme facteur de transcription activant l'expression de MDM2 et MDM2 comme E3 ubiquitine ligase

entraînant la dégradation de p53. P53 est exprimé constitutivement et dégradé dans le protéasome tant qu'il forme un complexe avec MDM2. Afin que p53 soit actif, il faut dans un premier temps stabiliser la protéine p53 en dissociant le complexe MDM2-p53.

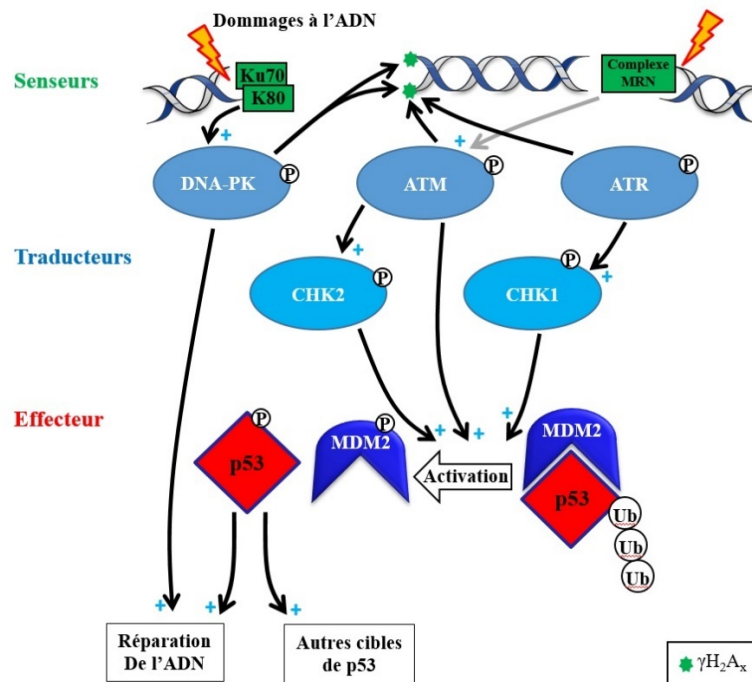


Figure 11. Cascade de réponse aux dommages à l'ADN et activation de p53. Lors de l'apparition de dommage à l'ADN, 3 phases sont induites : les senseurs (comme Ku70 et K80 et le complexe MRN) vont détecter les cassures, induire l'action de traducteurs (comme DNA-PKs, ATM, ATR, CHK1 et 2) qui induisent l'action d'effecteurs (ici p53). Les cassures doubles brins sont reconnues par le complexe protéique Ku70-K80, recrutant et activant par phosphorylation les DNA-PKs qui phosphorylent à leur tour les histones H₂A_x en γH₂A_x. Les DNA-PK activées peuvent aussi induire directement la réparation de l'ADN, indépendamment de γH₂A_x. ATM et ATR s'activent par autophosphorylation en réponse aux dommages à l'ADN et vont aussi phosphoryler H₂A_x en γH₂A_x. Ils induisent ensuite l'activation par phosphorylation de CHK1 et CHK2, qui vont eux-mêmes stabiliser p53 en phosphorylant p53 et MDM2 induisant la séparation du complexe inhibiteur. ATM stabilise et active p53 de 3 manières : en rendant inactif MDM2, en stabilisant p53 et en activant p53. ATM inhibe fortement l'activité de MDM2 par phosphorylation (MDM2 Ser395), l'empêchant d'interagir avec p53. ATM stabilise la protéine p53 en activant l'expression d'USP10 (Ubiquitin Specific Peptidase 10) qui va cliver les ubiquitines sur p53. Et enfin ATM active p53 en le phosphorylant sur Ser15 (Ser18 chez la souris) directement ou *via* CHK2, empêchant aussi son interaction avec MDM2. Les cassures doubles brins sont aussi reconnues par le complexe protéique (MRN) recrutant un homodimère inactif de kinases ATM et entraînant son activation par autophosphorylation. ATM est activé par phosphorylation sur Ser1981 le libérant ainsi de son complexe inhibiteur. Figure adaptée d'après (Bakkenist and Kastan, 2003; Meek, 2009; So et al., 2009).

c. P53 et métabolisme cellulaire

En situation physiologique, p53 contrôle le métabolisme du glucose, des lipides et le métabolisme énergétique de la cellule. P53 joue un rôle sur l'ensemble des étapes de la glycolyse conduisant à son inhibition comme résumé dans la **figure 12**. Par contre, p53 augmente l'efficacité du cycle de Krebs et

donc la phosphorylation oxydative en favorisant la création d'intermédiaire du cycle de Krebs et en induisant la respiration mitochondriale (**figure 13**). P53 semble être à la fois capable d'inhiber (Sahin et al., 2011; Zhang et al., 2014) et de stimuler (Goldstein et al., 2013; Minamino et al., 2009; Wang et al., 2013a) la synthèse de novo de glucose. La **figure 14** illustre par quel mécanisme p53 peut inhiber la néoglucogenèse.

P53 a été démontré comme inhibant la synthèse des lipides via l'inhibition de SREBP1c, connu pour réguler positivement de nombreux gènes clés de la synthèse de lipide. Le facteur de transcription p53 inhibe SREBP1c de manière directe et par l'augmentation d'expression de la Lipine1 (Berkers et al., 2013; Gottlieb and Vousden, 2010). TP53 induit aussi des effets anti-lipogéniques en activant la synthèse d'œstrogène par l'aromatase (Wang et al., 2013b). De plus, p53 inhibe la glycolyse, productrice importante d'Acetyl-CoA, lui-même substrat majeur de la lipogénèse. De même p53 active l'oxydation des acides gras par un mécanisme qui pourraient mettre en jeu la guanidinoacétate méthyltransférase (GAMT) et la créatine lorsqu'un niveau cellulaire bas en énergie est détecté (Maddocks and Vousden, 2011).

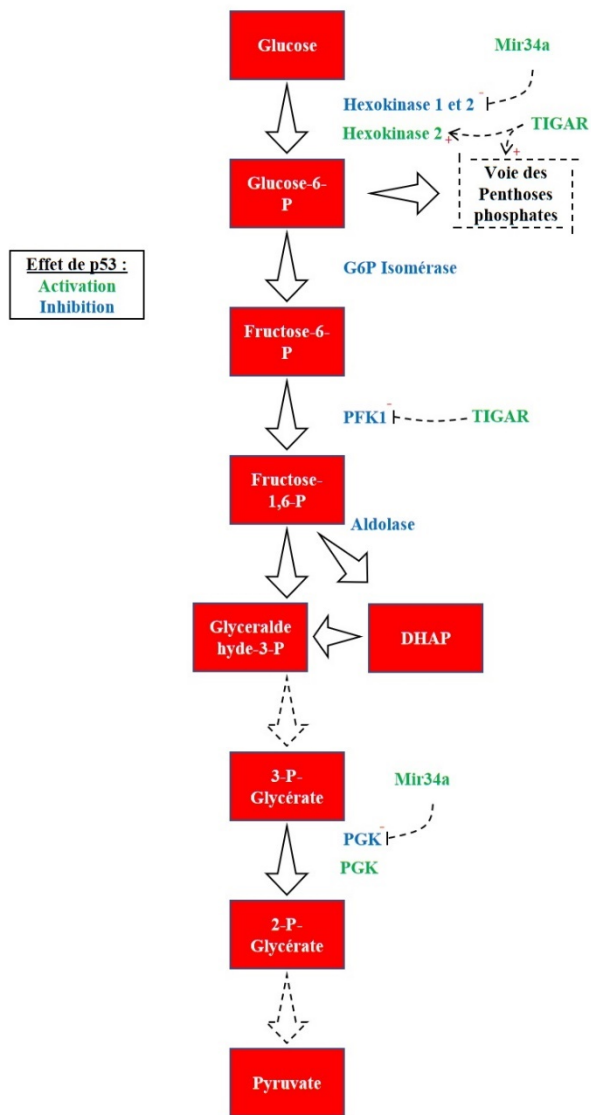


Figure 12. Résumé des actions de p53 sur la glycolyse. De manière générale p53 inhibe la glycolyse. P53 régule négativement l'expression des principales enzymes de la glycolyse directement, pour l'Aldolase, ou via le microARN Mir34a les hexokinases HK1 et HK2, la glucose 6 phosphate isomérase et la PGK (phosphoglycérate kinase) (Kim et al., 2013). Dans le but d'orienter la glycolyse vers la voie des pentoses phosphates, induit l'expression de TIGAR augmentant l'expression de l'hexokinase HK2 et des enzymes principales de la voie des pentoses phosphates (Cheung et al., 2012). TIGAR bloque aussi la glycolyse en aval du carrefour métabolique avec la voie des pentoses phosphates par l'inhibition d'expression de PFK1 (Bensaad et al., 2006).

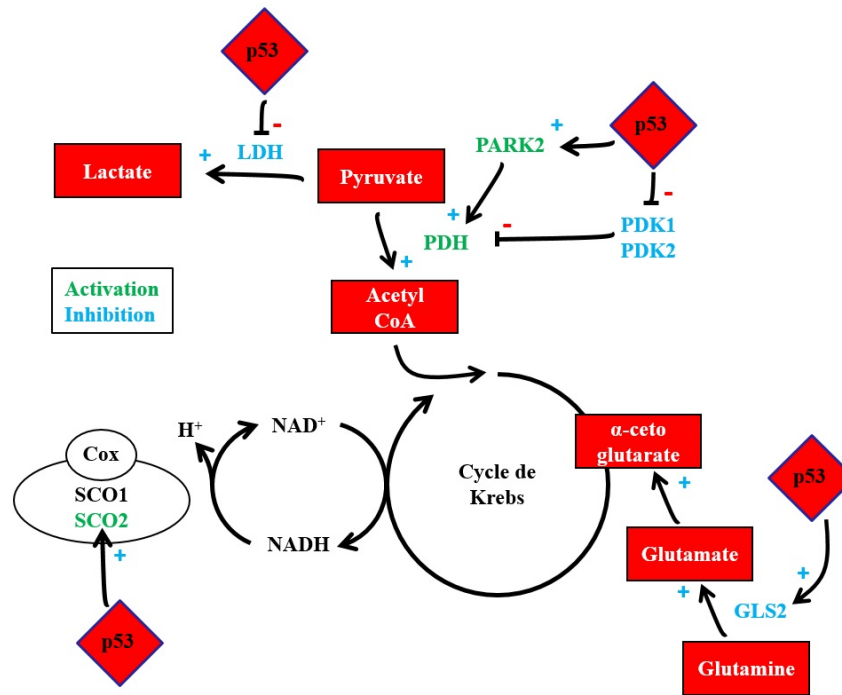


Figure 13. Effet de p53 sur la phosphorylation oxydative. L'entrée principale du cycle de Krebs se fait par l'acétyl-CoA, véritable carrefour métabolique. P53 induit le cycle de Krebs en favorisant d'une part la production d'acétyl-CoA et en inhibant son utilisation vers d'autres voies. Ainsi, p53 active la PDH (pyruvate déshydrogénase) en inhibant l'expression de PDK1 et PDK2 (Pyruvate Déshydrogénase kinase 1 et 2) dont l'activité kinase induit une inhibition de la PDH (Contractor and Harris, 2012; Kim et al., 2013). De même, p53 induit l'expression de PARK2 (parkine), activateur de la PDH (Zhang et al., 2011). Dans le même temps, p53 inhibe la voie de synthèse du lactate à partir de pyruvate en diminuant l'expression de la LDH (lactate déshydrogénase) (Kim et al., 2013). Pour aider au fonctionnement du cycle de Krebs, p53 augmente l'expression de GLS2 (Glutaminase 2) catalysant la réaction de transformation de la glutamine en glutamate, substrat pouvant être transformé en α -cétoglutarate (Hu et al., 2010). Enfin, p53 améliore la respiration mitochondriale en augmentant l'expression de SCO2 (synthesis of cytochrome c oxidase 2) qui avec SCO1 forment le complexe COX (Cytochrome C oxydase) (Matoba et al., 2006). LDH = Lactate Déshydrogénase ; COX = Complexe cytochrome C Oxydase ; SCO1/2 = synthesis of cytochrome c oxidase 1/2 ; GLS2 = Glutaminase 2 ; PARK2 = parkine ; PDK1/2 = Pyruvate Déshydrogénase kinase 1/2

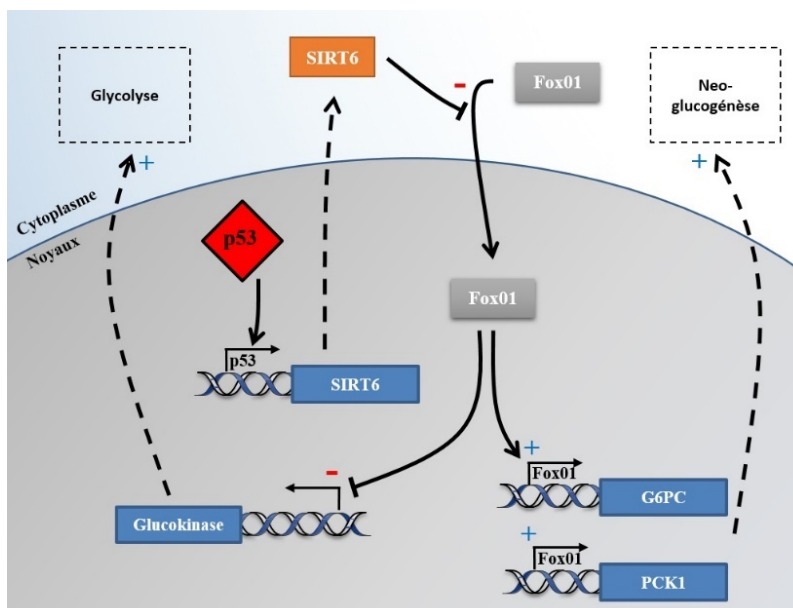


Figure 14. Inhibition de la néoglucogénèse par p53. P53 induit l'expression de SIRT6 (sirtuin 6), qui inhibe la translocation du facteur de transcription FoxO1 vers le noyau. FoxO1 (forkhead box protein O1) ne peut plus activer la néoglucogénèse via l'expression de deux enzymes majeures, PCK1 (phosphoenolpyruvate carboxykinase 1) et G6PC (glucose-6-phosphatase), ni inhiber l'expression de la glucokinase (Zhang et al., 2014).

De manière intéressante p53 a des effets sur le métabolisme cellulaire opposés à ceux de l'insuline (**figure 15**). De plus, P53 et la voie de signalisation à l'insuline sont capables de s'inhiber l'un l'autre comme démontré sur la **figure 16**, suggérant qu'ils jouent l'un pour l'autre un rôle de contrôle négatif en condition physiologique. P53 semble être un bon candidat pour expliquer le développement de la résistance à l'insuline.

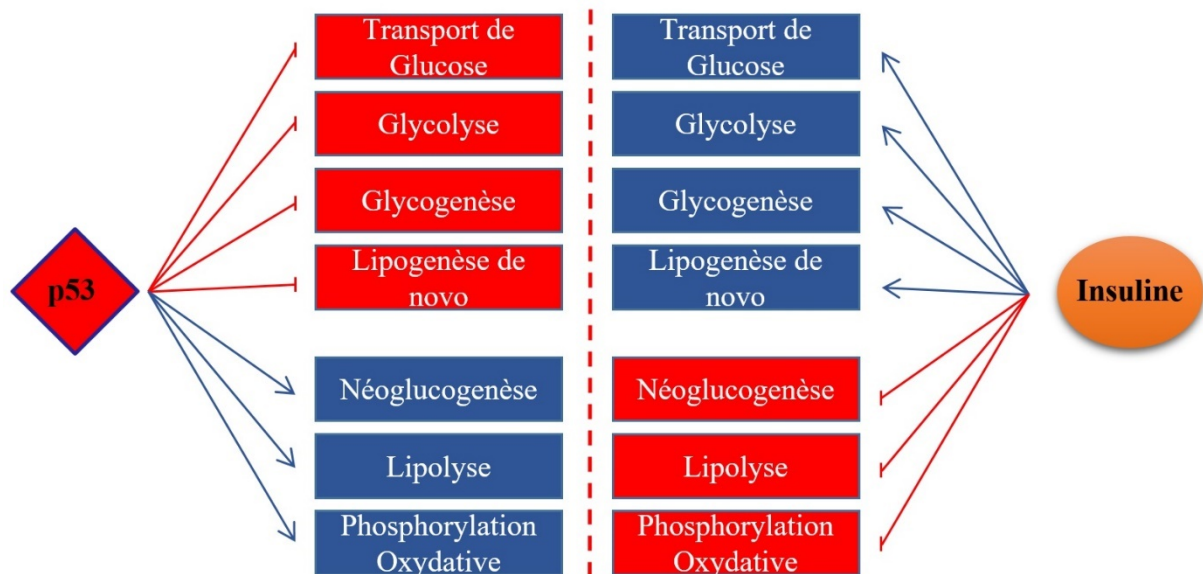


Figure 15 : P53 et l'insuline agissent de manière opposée sur le métabolisme. D'après (Strycharz et al., 2017). Les fonctions métaboliques sont représentées en bleu quand elles sont stimulées et en rouge quand elles sont inhibées.

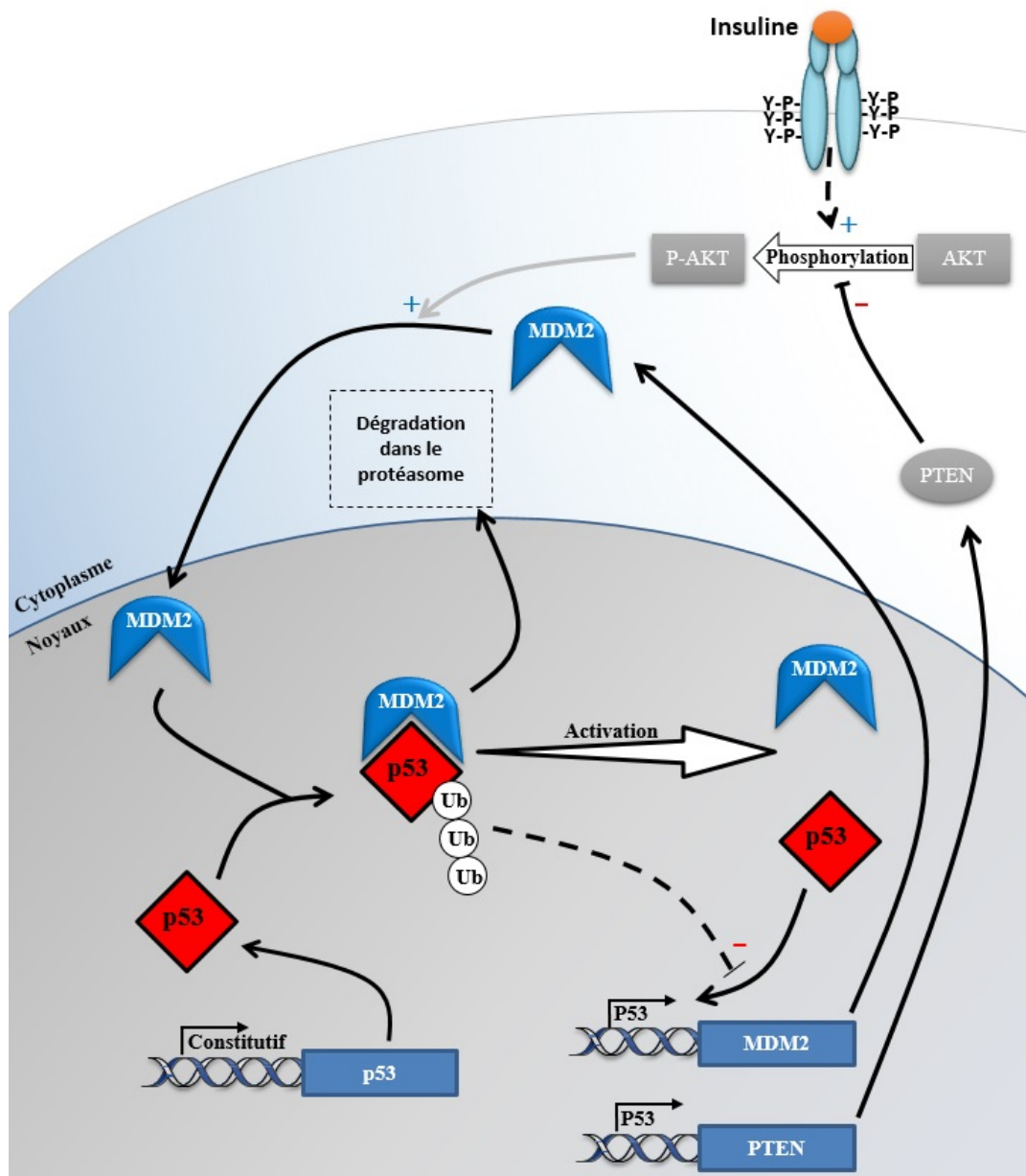


Figure 16. Autorégulation entre p53 et la voie de réponse à l'insuline. L'insuline active la PKB qui phosphoryle MDM2 sur Ser166 et Ser186 (Gottlieb et al., 2002), avec pour conséquence une inhibition de l'auto-ubiquitination de MDM2 (Feng et al., 2004), sa translocation vers le noyau (Mayo and Donner, 2001) et une augmentation de la dégradation de p53. P53 est capable d'inhiber la cascade de réponse à l'insuline en augmentant l'expression de PTEN qui déphosphoryle PIP3 en PIP2.

d. P53 et maladies métaboliques

L'expression de p53 est augmentée lors de l'obésité dans le TA et le foie. Dans les souris génétiquement obèses ob/ob, car déficientes en leptine, la protéine p53 et sa forme active phosphorylée, P-Ser15-p53 sont retrouvées augmentées dans le foie et dans le TA (Minamino et al., 2009; Yahagi et al., 2003, 2004). Chez des souris obèses agouti ou des souris soumises à un régime riche en graisses et en sucres, les mêmes résultats sont retrouvés au sein du TA : p53 est surexprimé, stabilisé et activé dans la fraction

adipocytaire et dans la fraction stroma-vasculaire (Minamino et al., 2009). L'étude de Tchkonina et al. montre que les cellules endothéliales et pré-adipocytaires du TA de rats et de sujets obèses sont plus fréquemment en sénescence (Tchkonina et al., 2010), suggérant une activation accrue de p53 au moins dans ces cellules de la fraction stroma-vasculaire lors de l'obésité. De plus, l'expression de TP53 est également augmentée dans les cellules endothéliales (CD31+/CD45-) isolées à partir de vaisseaux sanguins irrigants le poumon et le muscle squelettique de souris soumises à un régime riche en graisses et sucres (Yokoyama et al., 2014). Chez l'Homme une augmentation d'expression de l'ARNm TP53 et de la protéine p53 a été décrite dans le tissu adipeux omental de sujets obèses (Ortega et al., 2014). De manière intéressante, Homayounfar et al. a mesuré l'expression de p53 dans les tissus périphériques de rats soumis à un régime riche en graisse (Homayounfar et al., 2015) : p53 a été trouvé fortement exprimé à la fois dans les tissus cibles classiques de l'insuline (adipeux, musculaire et hépatique) mais aussi dans d'autres (rein et intestin grêle). Il est donc possible que p53 puisse jouer un rôle encore plus global dans les pathologies liées à l'obésité.

1. P53 : protecteur ou inducteur des maladies métaboliques ?

L'invalidation globale de p53 chez des souris soumises à un régime riche en graisse induit sur le court terme une augmentation importante de leur masse grasse sans prise de poids (Molchadsky et al., 2013) et sur le long terme une prise de poids et une stéatose hépatique (Wang et al., 2013a). L'expression de p53 est donc requise pour limiter la prise de masse grasse et le développement de la stéatose hépatique lors de l'obésité. Cette augmentation de l'adiposité pourrait venir d'une augmentation de l'adipogenèse blanche, normalement inhibée par p53 (Huang et al., 2014; Molchadsky et al., 2013; Okita et al., 2014). Cette hypothèse est appuyée par l'augmentation du niveau d'expression de PPAR γ chez des souris invalidées pour p53 et soumises à un régime riche en graisse (Molchadsky et al., 2013).

L'absence du site de phosphorylation Ser18 sur p53 (modèle de souris KI-TP53 Ser18Ala) qui devrait conduire à un faible niveau d'expression de p53 provoque une intolérance au glucose et la résistance à l'insuline sous régime normal. A l'inverse, les souris « super p53 » qui expriment une copie supplémentaire de p53 ont une meilleure tolérance au glucose et sont plus sensibles à l'insuline (Franck et al., 2012). Par contre, dans un contexte d'obésité, la perte d'une copie de TP53 chez les souris

génétiqnement obèses Agouti améliore leur tolérance au glucose et leur résistance à l'insuline (Minamino et al., 2009), suggérant que p53 peut contribuer lors de l'obésité au développement des complications métaboliques.

Il semblerait donc qu'en situation physiologique p53 soit nécessaire à l'homéostasie métabolique. Par contre lors de l'obésité, il participerait au développement des maladies métaboliques. Les paragraphes suivants décrivent l'implication de l'activation de p53 dans les tissus/organes importants du contrôle du métabolisme pour le développement des pathologies métaboliques.

De façon intéressante, un polymorphisme sur le codon 72 de p53, conduisant au remplacement d'une proline par une arginine prédispose au développement du diabète de type 2. Ce polymorphisme contribue également à l'association entre IMC et diabète de type 2. La modification génétique de ce codon chez la souris (KI P72R) augmente le développement de l'obésité et de la résistance à l'insuline. Donc, une perturbation de fonction de p53, peut chez l'homme contribuer aux développements des maladies métaboliques (Kung et al., 2016).

2. P53 et hépatocytes

La NAFLD (maladie du foie gras non alcoolique) est le terme général définissant des anomalies hépatiques telles que la stéatose hépatique et la stéato-hépatite non alcoolique (NASH), ce qui peut entraîner une fibrose, une cirrhose et un carcinome hépatocellulaire (Patil and Sood, 2017). Dans des souris ob/ob et un modèle de souris génétiquement modifiées développant des NAFLD, p53 est surexprimé dans le foie et est responsable des lésions hépatiques observées. P53 est aussi impliqué dans l'apoptose des hépatocytes dans le NAFLD (Panasiuk et al., 2006). P53 induit aussi une accumulation de ROS dans les cellules du foie aggravant la progression de la stéato-hépatite (Tomita et al., 2012). La pifithrin- α (inhibiteur sélectif de l'activité transcriptionnelle de p53) administrée à des souris développant une NAFLD sous régime riche en graisse active la β -oxydation des acides gras, diminuant le taux d'accumulation de lipide hépatique et donc la stéatose hépatique mais aussi le stress oxydatif et l'apoptose des cellules du foie (Derdak et al., 2013). Ces résultats appuient l'idée que p53 joue un rôle majeur dans le développement des maladies métaboliques dans le foie.

3. P53 et cellule β - pancréatiques

L'hyperglycémie chronique induit du stress oxydatif et du stress du RE dans les cellules β -pancréatiques et l'expression de p53, suggérant fortement un lien entre p53 dans les cellules β du pancréas et la glucotoxicité (Hoshino et al., 2014; Lovis et al., 2008). De plus, l'inhibition de p53 spécifiquement dans ces cellules évite la mort des cellules β soumises à un stress gluco-toxique (Li et al., 2016). Les dommages à l'ADN et l'induction de p53 participeraient à l'apoptose des cellules β dans le diabète de type 2 (Tornovsky-Babeay et al., 2014).

4. P53 et cellules endothéliales

L'étude de Yokoyama et al. a démontré que l'activation de p53 dans les cellules endothéliales lors de l'obésité participe également au développement de la résistance à l'insuline. Un KO spécifique de p53 dans les cellules endothéliales protège les souris du développement de l'obésité et de la résistance à l'insuline normalement observée lors d'un régime riche en graisse et en sucre. L'effet inverse est observé, lorsque p53 est surexprimé dans ces cellules chez des souris soumises cette fois à un régime normal. Ces effets seraient médiés par des défauts des mitochondries et de transport de glucose dans le muscle squelettique. (Yokoyama et al., 2014).

5. P53 et tissu adipeux

L'équipe de Minamino a démontré le rôle majeur de p53 dans le développement de l'insulino résistance. Un KO spécifique de TP3 dans l'adipocyte mature protège de la résistance à l'insuline et de l'intolérance au glucose induites par un régime riche en graisses et sucres. A l'inverse sa surexpression spécifique dans l'adipocyte mature induit une résistance à l'insuline chez des souris sous régime normal sans changement de masse maigre ou grasse. De manière intéressante la modulation d'expression de p53 induit des conséquences sur l'inflammation du TA. En absence de TP53 dans l'adipocyte chez des souris obèses, l'état inflammatoire du TA est diminué alors que sa surexpression chez des souris minces induit un état inflammatoire, mesuré par une augmentation d'expression de TNF α et de CCL2 (Minamino et al., 2009).

Une autre étude menée par ce groupe a suggéré que Sema3E (semaphorine 3E) et son récepteur, plexinD1, pourraient jouer un rôle dans le développement de la résistance à l'insuline en créant une inflammation des tissus adipeux lors de l'activation du p53 dans un modèle d'obésité induite par l'alimentation (Shimizu et al., 2013). L'expression de ces deux protéines, semaphorine 3E/plexine D1, est augmentée dans le tissu adipeux de souris soumises à un régime riche en sucres et en graisses alors qu'elle est diminuée dans les souris ayant un KO spécifique de p53 dans l'adipocyte. Ceci suggérant que l'activation de TP53 induise l'expression de la sémaphorine 3E dans les adipocytes de souris obèses. Cet axe semaphorine 3E/plexine D1 lors de l'obésité favoriserait l'inflammation en recrutant et activant les macrophages dans le tissu adipeux de façon plexin D1 dépendante alors que la perturbation de l'interaction entre ces deux protéines contribue à améliorer les paramètres métaboliques des souris (Shimizu et al., 2013). Il est donc clair que p53 dans l'adipocyte joue un rôle majeur dans le développement de la résistance à l'insuline lors de l'obésité.

P53 semble aussi jouer un rôle sur les cellules stroma-vasculaire du TA. Une étude démontre que l'activité de p53 dans les pré-adipocyte induit leur sénescence en réponse à concentration élevée en acide gras estérifié (Chen et al., 2012). Les pré-adipocytes, lorsqu'ils deviennent sénescents, produisent des cytokines pro-inflammatoires (Tchkonia et al., 2010). L'activation de p53 dans le préadipocyte, en induisant sa sénescence, peut provoquer une inflammation du TA.

Pour résumer, lors de l'obésité l'expression de p53 est augmentée dans les tissus sensibles à l'insuline et peut induire une résistance à l'insuline, voire être responsable de l'hypo-insulinémie observée lors de syndrome métabolique.

e. Rôle de TP63 et TP73 dans le développement des maladies métaboliques.

P63 et p73, les autres membres de la famille de p53, semblent aussi être impliqués dans le contrôle du métabolisme gluco-lipidique mais de manière opposée. Le KO général de p63 dans la souris entraîne une obésité, une insulino résistance liée à l'âge et une intolérance au glucose (Su et al., 2012). Au contraire, les souris p73 KO sont plus tolérantes au glucose et sensibles à l'insuline lors d'un régime riche en graisse, sûrement car elles grossissent moins que les contrôles. Cependant, ces souris vieillissent plus

vite, probablement à cause d'un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire entraînant une accumulation de ROS (Rufini et al., 2012).

Il semble clair que les membres de la famille de p53, et plus particulièrement p53, sont impliqués dans le contrôle du métabolisme gluco-lipidique. Une activation de p53 induite par un stress métabolique chronique (un régime riche en graisses et/ou sucres) dans certains types cellulaires peut participer au développement de la résistance à l'insuline. Peu d'études se sont intéressées aux causes et aux conséquences de l'activation de p53 dans les adipocytes matures. L'objectif de mon travail de thèse présenté dans l'article ci-après a été de déterminer des causes possibles de l'activation de p53 et de m'intéresser aux conséquences de cette activation sur les fonctions adipocytaires et qui pourraient participer au développement de la résistance à l'insuline lors de l'obésité.

ARTICLE :

DNA Damage and the activation of the p53 Pathway Mediate Alterations in Metabolic and Secretory Functions of Adipocytes



Bastien Vergoni,^{1,2} Pierre-Jean Cornejo,^{1,2} Jérôme Gilleron,^{1,2} Mansour Djedaini,^{1,2} Franck Ceppo,^{1,2} Arnaud Jacquet,^{2,3} Gwennaëlle Bouget,^{1,2} Clémence Ginot,^{1,2} Teresa Gonzalez,^{1,2,4} Julie Maillet,^{5,6,7} Véronique Dhennin,^{5,6,7} Marie Verbanck,^{5,6,7} Patrick Auberger,^{2,3} Philippe Froguel,^{5,6,7,8} Jean-François Tanti,^{1,2} and Mireille Cormont^{1,2}

DNA Damage and the Activation of the p53 Pathway Mediate Alterations in Metabolic and Secretory Functions of Adipocytes



Diabetes 2016;65:3062–3074 | DOI: 10.2337/db16-0014

Activation of the p53 pathway in adipose tissue contributes to insulin resistance associated with obesity. However, the mechanisms of p53 activation and the effect on adipocyte functions are still elusive. Here we found a higher level of DNA oxidation and a reduction in telomere length in adipose tissue of mice fed a high-fat diet and an increase in DNA damage and activation of the p53 pathway in adipocytes. Interestingly, hallmarks of chronic DNA damage are visible at the onset of obesity. Furthermore, injection of lean mice with doxorubicin, a DNA damage-inducing drug, increased the expression of chemokines in adipose tissue and promoted its infiltration by proinflammatory macrophages and neutrophils together with adipocyte insulin resistance. In vitro, DNA damage in adipocytes increased the expression of chemokines and triggered the production of chemotactic factors for macrophages and neutrophils. Insulin signaling and effect on glucose uptake and Glut4 translocation were decreased, and lipolysis was increased. These events were prevented by p53 inhibition, whereas its activation by nutin-3 reproduced the DNA damage-induced adverse effects. This study reveals that DNA damage in obese adipocytes could trigger p53-dependent signals involved in alteration of adipocyte metabolism and secretory function leading to adipose tissue inflammation, adipocyte dysfunction, and insulin resistance.

Insulin resistance is associated with obesity and is a major risk factor for type 2 diabetes. Adipose tissue (AT) plays an important role in glucose and lipid homeostasis (1,2), and AT dysfunction associated with obesity has emerged as a critical event for the development of insulin resistance. Low-grade inflammation and oxidative and hypoxic stresses both develop in obese AT and are involved in the alteration of adipocyte functions (3–6). Therefore, activation of stress-signaling pathways in adipocytes is critically involved in AT dysfunction and insulin resistance (7–10).

The tumor suppressor p53 has recently emerged as a novel regulator of metabolic homeostasis and adaptation to nutritional changes in different organs, including AT (11–13). A role for the alterations of p53 activation has thus been proposed in metabolic diseases such as diabetes and obesity. Indeed, activation of p53 was reported in AT of genetically and high-fat/high-sugar obese mice (14,15), and invalidation of p53 in adipocytes was shown to protect obese mice from insulin resistance and reduce AT inflammation (15). Conversely, p53 overexpression in adipocytes triggers insulin resistance and the expression of proinflammatory cytokines in AT (15). Despite the significance of p53 activation in obese AT, its role in the alterations of adipocyte functions and the causes of its activation in obese AT are poorly understood.

¹INSERM, UMR 1065, C3M, Team 7 Molecular and Cellular Physiopathology of Obesity and Diabetes, Nice, France

²Université Côte d'Azur, C3M, Nice, France

³INSERM, UMR 1065, C3M, Team 2 Cell Death, Differentiation and Cancer, Nice, France

⁴INSERM, UMR 1062, Nutrition, Obesity and Risk of Thrombosis, Marseille, France

⁵CNRS, UMR 8199, Lille Pasteur Institute, Lille, France

⁶Lille University, Lille, France

⁷European Genomic Institute for Diabetes, Lille, France

⁸Department of Genomics of Common Disease, School of Public Health, Imperial College London, Hammersmith Hospital, London, U.K.

Corresponding author: Mireille Cormont, cormont@unice.fr.

Received 4 January 2016 and accepted 1 July 2016.

This article contains Supplementary Data online at <http://diabetes.diabetesjournals.org/lookup/suppl/doi:10.2337/db16-0014/-/DC1>.

B.V. and P.-J.C. contributed equally to this study.

J.-F.T. and M.C. are co-senior authors.

© 2016 by the American Diabetes Association. Readers may use this article as long as the work is properly cited, the use is educational and not for profit, and the work is not altered. More information is available at <http://www.diabetesjournals.org/content/license>.

The p53 pathway is a key effector of the DNA damage response (DDR) and is activated by several stressors that induce DNA lesions, the most deleterious one being DNA double-strand breaks (DSBs) (16). The oxidative stress occurring in AT of obese subjects is among the several possible stressors (4,15). We thus hypothesized that nuclear DNA damage in adipocytes triggers the activation of the p53 pathway leading to metabolic and endocrine dysfunctions in adipocytes and to systemic propagation of deleterious signals for insulin sensitivity.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Cell Culture

Human visceral preadipocytes from lean subjects without diabetes (Biopredic, Rennes, France) and 3T3-L1 cells were differentiated into adipocytes as previously described (17,18). Small interfering (si)RNA (Dharmacon) transfection was performed with INTERFERin (Ozyme, St Quentin-en-Yvelines, France) as previously described (19). RAW 264.7 and RAW-Blue (InvivoGen) macrophages were maintained in DMEM-5% heat-inactivated FCS. RAW-Blue expressed secreted embryonic alkaline phosphatase under the control of nuclear factor- κ B (NF- κ B) and activator protein-1. Human mononucleated cells were isolated from blood using Ficoll Hypaque, and monocytes were enriched and differentiated into M0 macrophages, as previously described (20). Volunteers signed an informed consent according to the Declaration of Helsinki and recommendations of an independent scientific review board.

Animal Studies

Male mice were purchased from Charles Rivers Laboratory (St-Aubin-lès-Elbeuf, France). Mice (*ob/ob* and *ob/+*) were used at 14 weeks of age. C57BL6/J mice were used for high-fat diets (HFD) experiments (45 or 60 kcal% fat; ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany) started at 7 weeks of age and continued for 2, 4, or 18 weeks (Supplementary Table 1). At age 15 weeks, C57BL/6J mice were injected for 42 h with doxorubicin (2 mg/kg; Sigma-Aldrich) or 0.9% NaCl for epididymal (epi)AT analysis. An intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) was performed after starvation for 6 h, as previously described (21). The Nice/Sophia-Antipolis University Animal Care Committee approved all studies.

Measurement of Insulin Signaling and Metabolism in Adipocytes

Insulin signaling, 2- 3 H]deoxyglucose uptake, Glut4 translocation, and lipogenesis on isolated adipocytes were determined as previously described (22). Glycerol content in the medium was determined as a readout of adipocyte lipolysis using the GPO-Trinder colorimetric assay (Sigma-Aldrich).

Flow Cytometry Analysis of AT Immune Cells

The stromal vascular fraction (SVF) cells obtained after epiAT treatment with collagenase (21) were incubated 15 min with Fc block, resuspended in dedicated buffer, and stained for 30 min at 4°C with fluorochrome-conjugated specific antibodies or control isotypes to quantify macrophages (F4/80 and CD11c), neutrophils (Lys6G and CD11b), and T (CD3) or

B (B220) lymphocytes. The labeling was analyzed by flow cytometry using a MACSQuant cytometer (Miltenyi) and FlowJo software (TreeStar).

Immune Cells Chemotaxis and Activation Assays

Chemotaxis of RAW 264.7 and human M0 macrophages induced by adipocyte-conditioned media (AdCM) was assessed by Boyden chambers assay (8- μ m pores, BD Bioscience). Cells that were migrated at the filter's lower face were labeled with crystal violet and counted in five randomly selected areas. For macrophage activation, secreted embryonic alkaline phosphatase activity was quantified in the media of RAW-Blue cells. RNAs were prepared for the analysis of polarization marker expression. Human M0 polarization was determined by the quantification of the surface expression of M0, M1, and M2 markers, as previously described (20).

To quantify neutrophil migration against AdCM, 2×10^5 white blood cells were plated in the upper chamber of Boyden chambers (3- μ m pores). Cells in the lower chamber were labeled 2 h later with fluorescein isothiocyanate (FITC)-coupled Lys6G and phycoerythrin-coupled CD11b antibodies before flow cytometry analysis.

Immunofluorescence Studies

Snap-frozen epiAT was embedded in optimal cutting temperature medium, and 15- μ m sections were fixed in 4% paraformaldehyde, incubated in 10 mmol/L glycine, washed, and incubated in PBS, 2% BSA, and 0.1% Tween-20. Adipocytes from epiAT were isolated by collagenase digestion, as previously described (21), and were fixed as above. The AT sections or isolated adipocytes were then incubated with the indicated antibodies and DAPI, washed, and mounted. Images were quantified using motion-tracking software (23).

The three-dimensional imaging of solvent-cleared organs (3DISCO) tissue-clearing method (24) was adapted to AT. EpiAT was fixed in 3% paraformaldehyde and successively washed in PBS containing 0.2% Triton X-100, or 0.2% Triton X-100 and 20% DMSO, or 0.1% Tween-20, 0.1% Triton X-100, 0.1% deoxycholate, 0.1% NP40, and 20% DMSO for 24 h each. EpiAT was then incubated overnight in PBS, 0.2% Triton X-100, 10% DMSO, and 0.3 mol/L glycine and blocked by adding 6% BSA for 2 days. After two washes in PTwH (PBS, 0.2% Tween-20, and 0.001% heparin), samples were incubated 2 days with FITC-labeled anti- γ -H2AX antibody, Alexa Fluor 647 phalloidin, and DAPI in PTwH, 5% DMSO, and 3% BSA, and washed in PTwH for 2 extra days. The clearing was performed by successively using 50%, 75%, and 100% tetrahydrofuran, 3 h each time, and finally, with dibenzyl ether for 2 h before confocal acquisition and image analysis with Fiji software.

Microarray Analysis

RNA was isolated from 3T3-L1 adipocytes using RNeasy Lipid Tissue Kit (Qiagen), quantified by a NanoDrop ND-1000, and the quality verified with an Agilent 2100. Complementary RNA was prepared using TargetAmp Nano-g Biotin-aRNA

labeling for the Illumina System (Epicentre) and hybridized to Illumina Mouse WG-6 v2.0 BeadArrays. Microarray data were normalized and analyzed using the R software limma package (25). We performed a background correction using negative controls on the raw data, applied a quantile normalization using positive controls, followed by a \log_2 transformation, and applied a 1% threshold on the detection P values, which led us to consider 13,314 genes as expressed. We performed ANOVA using the limma “eBayes” procedure. P values were corrected for multiple testing using the Benjamini-Hochberg method to control the false discovery rate with a 5% threshold.

Reactive Oxygen Species, DNA Oxidation, and Telomere Length Determination

Reactive oxygen species (ROS) was quantified in 30- μm epiAT sections using dihydroethidium, as previously described (15), or in isolated adipocytes using the ROS probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCFDA; 10 $\mu\text{mol/L}$). Adipocytes were recovered by centrifugation on dinonyl phthalate and resuspended in H_2O_2 before fluorescence measurement. DNA was prepared from snap-frozen epiAT (DNeasy Blood & Tissue Kit; Qiagen). Amounts of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) were determined using an EIA kit (StressMarq Biosciences Inc.) following the manufacturer's recommendations. Real-time quantitative PCR (qPCR) was used that compares the telomere repeat sequence copy number to a single copy albumin gene.

Western Blotting and Real-Time qPCR

Cells were lysed, and immunoblotting was performed, as previously described (26), using indicated antibodies. RNA preparation and real-time qPCR were performed as previously described (26). Primers were from SABiosciences (Qiagen). The PCR data were analyzed with the comparative cycle threshold ($\Delta\Delta\text{Ct}$) quantitation method.

Statistical Analysis

Data are expressed as the mean \pm SEM. Differences among groups were compared using ANOVA with post hoc analysis for multiple comparisons and the Mann-Whitney test or Student t test when only two groups were compared. Correlation analysis was done by the Spearman test. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5 software. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

RESULTS

The p53 Pathway Is Activated in Adipocytes From Obese Mice

The p21 mRNA level, a p53-target gene, was higher in epiAT and in the adipocyte fraction of the obese *ob/ob* mice and mice fed the HFD compared with their lean counterparts (Fig. 1A and B). The p21 mRNA level in the adipocyte fraction from *ob/ob* and HFD-fed mice was positively correlated to whole-body and fat pad weights and fasting glycemia (Supplementary Table 2). Expression of p53 and p21 proteins was higher in adipocytes from HFD-fed mice compared with their counterparts fed the normal chow diet (NCD) (Fig. 1C). Moreover, the number of adipocytes with a

p21⁺ nucleus was higher in HFD-fed mice than in NCD-fed mice ($61.7\% \pm 5.50\%$ vs. $19.9\% \pm 4.04\%$, respectively; $P < 0.01$) (Fig. 1D). This supports an activation of the p53 pathway in mature obese adipocytes.

An HFD Causes DNA Damage in Adipocytes That Occurs Early Upon Obesity Onset

A main cause for p53 activation is DNA damage, such as telomere shortening and/or DNA DSBs themselves, caused by ROS-induced DNA oxidation. We found a 1.5-fold increase in 8-OHdG, a marker of oxidative DNA damage (27), in the epiAT from mice fed the HFD for 18 weeks (Fig. 1E), which positively correlated with p21 expression (Fig. 1F), suggesting a link between DNA oxidation and p53 activation. We quantified the number of adipocytes with nuclear foci containing phosphorylated histone H2AX (γ -H2AX), which positively correlates with DNA damage. The proportion of adipocytes with no γ -H2AX foci, meaning without DNA damage, was lower in HFD-fed than in NCD-fed mice (6% vs. 12%, respectively) (Fig. 1I, point 0). Furthermore, the proportion of adipocytes with high numbers of γ -H2AX foci per nucleus was increased in adipocytes from HFD-fed mice (representative image in Fig. 1H and quantification of 80–120 adipocytes per group in Fig. 1I). Moreover, we found shortened telomeres in epiAT from HFD-fed mice (Fig. 1G), and telomere length was inversely correlated with p21 expression, whole-body and fat pad weights, and fasting glycemia (Supplementary Table 2).

We next asked whether adipocyte DNA damage was an early event upon the onset of obesity by studying mice after 2 and 4 weeks of HFD feeding, which increased body weight gain, epiAT weight, and adipocyte size (Supplementary Fig. 1F–H). Using the 3DISCO method, we imaged the whole epiAT and characterized cell types with DNA damage using γ -H2AX labeling. The HFD for 2 or 4 weeks increased by two- to threefold, respectively, the number of adipocytes with γ -H2AX⁺ nuclei (cyan color in Fig. 2A and B). ROS amounts were concomitantly increased in epiAT and in adipocytes (Fig. 2C). DNA damage was also detected in nonadipocyte cells (white color in Fig. 2A). The expression of p53 protein and of p21 mRNA was increased, together with the expression of p16^{INK4A} and p19^{ARF} mRNA encoded by the *CDKN2A* locus, which are hallmarks of chronic DNA damage (Fig. 2D) (28). Importantly, after 2 weeks of the HFD, we did not observe features of insulin resistance of adipocytes because insulin-induced lipogenesis in isolated adipocytes (Fig. 2E) and epiAT expression of insulin receptor substrate 1 (IRS1) and adiponectin mRNA was not different compared with NCD-fed mice, whereas the Glut4 mRNA level was increased (Fig. 2F). The leptin mRNA level was increased in agreement with the increase in epiAT weight and adipocyte diameter (Fig. 2F and Supplementary Fig. 1A and B). Glucose homeostasis was not markedly altered after 2 weeks of the HFD because the IPGTT indicated similar glucose tolerance (Fig. 2G), with no difference in insulin secretion during the IPGTT in HFD-fed mice compared

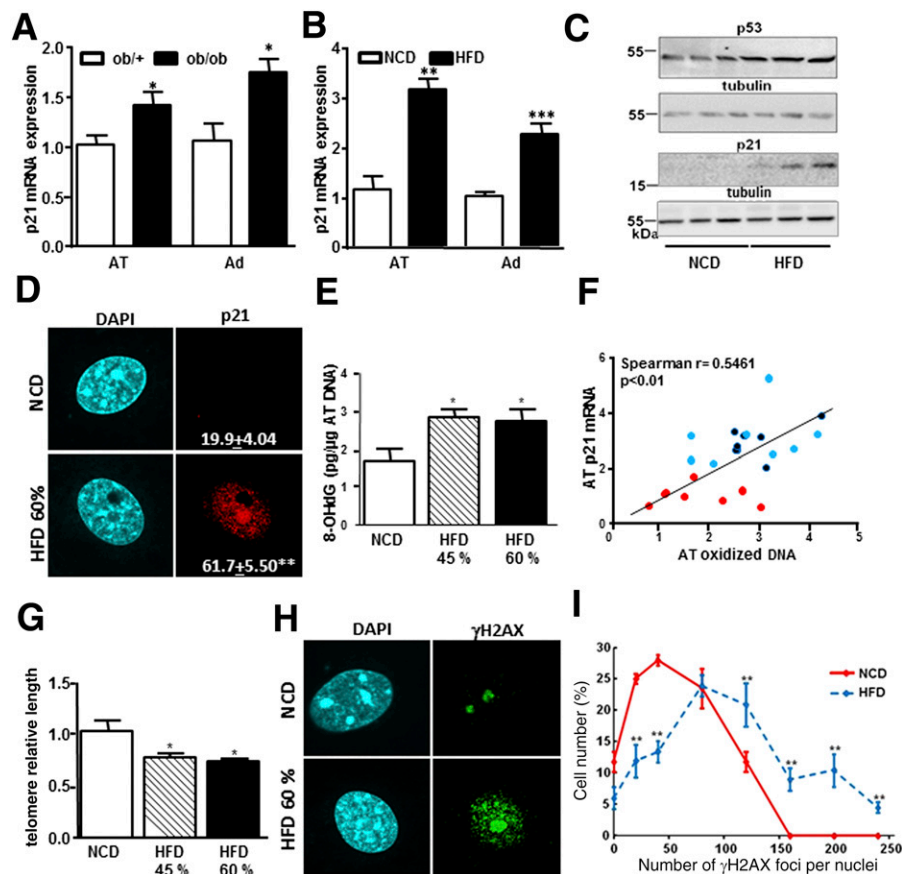


Figure 1—Adipocytes of obese mice exhibit activation of the p53 pathway with an increase in DNA damage and a reduction in telomere length. Level of p21 mRNA in epiAT (AT) and isolated adipocytes (Ad) of *ob/ob* (A) and HFD-fed mice (18 weeks of 60% kcal from fat) and their lean control littermates (NCD-fed) ($n = 8$ per group) (B). p21 mRNA expression was normalized using mouse Rplp0 mRNA level and expressed in arbitrary units with the control value (*ob/+* or NCD-fed mice) taken as 1. C: Western blot analysis of the expression of p53 (anti-p53 #2524, Cell Signaling) and p21 (anti-p21, clone CP74, P1484, Sigma-Aldrich) in isolated adipocytes from HFD- and NCD-fed mice with tubulin (anti-tubulin T6199, Sigma-Aldrich) as the loading control. Each lane corresponds to independent preparations of adipocytes. D: Immunofluorescence analysis of p21 in the nuclei of isolated adipocytes from HFD- and NCD-fed mice. DAPI was used to visualize the nuclei. Representative images and quantification of nuclei with detectable p21 labeling in 15–20 cells per adipocyte preparation ($n = 8$) are shown. E: Amounts of 8-OHdG quantified in total DNA from AT of mice fed the NCD or an HFD (45% or 60% of kcal from fat; $n = 8$ per group). Results are expressed in picograms of oxidized 8-OHdG per microgram of AT DNA. F: Correlation between amounts of AT oxidized DNA and AT p21 mRNA expression (red dots, NCD-fed mice; blue dots, 45% HFD-fed mice; black dots, 60% HFD-fed mice). G: Relative telomere length was estimated from total DNA prepared from AT of NCD- and HFD-fed mice ($n = 8$ per group). Results are expressed in arbitrary units with the NCD-fed mice taken as 1. H and I: Isolated adipocytes from NCD- and HFD-fed mice (60% kcal from fat) were treated for immunofluorescence as in D. Immunodetection was performed with anti- γ -H2AX (Ser139) antibodies (Millipore 05-636), followed by anti-mouse antibodies coupled to Alexa Fluor 488. Nuclei were labeled by DAPI. The quantifications of the foci number were performed on 10–15 cells per preparation of adipocytes ($n = 8$ per group), and the graph represents the number of cells as a function of the foci number. Data are means \pm SEM. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; and *** $P < 0.001$.

with NCD-fed mice (0.89 ± 0.13 ng/mL vs. 0.84 ± 0.15 ng/mL, respectively). Moreover, 2 weeks of the HFD did not modify the HOMA of insulin resistance index (Fig. 2H) or fasting and fed glycemia or insulinemia (Supplementary Fig. 1C and D). By contrast, mice developed glucose intolerance after 4 weeks of HFD feeding, with a further increase in whole-body and epiAT weights and adipocyte size as well as a trend toward a decrease in IRS1 mRNA (Supplementary Fig. 1A, B, and E–I).

After 2 weeks of the HFD, we found in epiAT a lower inducible nitric oxide synthase-to-arginase ratio and an upregulation of the M2 marker CD206 mRNA and the chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2), but we did not

detect any significant differences in the number of F4/80⁺CD11c⁻ macrophages or proinflammatory F4/80⁻CD11c⁺ or F4/80⁺CD11c⁺ cells (Fig. 2I), neutrophils, or T and B lymphocytes (Supplementary Fig. 1K and L). Furthermore, inflammatory gene expression in epiAT and circulating levels of interleukin 6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in HFD-fed mice did not significantly differ compared with NCD-fed mice (Fig. 2J). By contrast, infiltration of neutrophils in epiAT was observed after 4 weeks of the HFD and was detectable until 18 weeks (Supplementary Fig. 1K and L), with a further increase in CCL2 and IL-6 mRNA and a trend toward an increase in CD11c mRNA (Supplementary Fig. 1J).

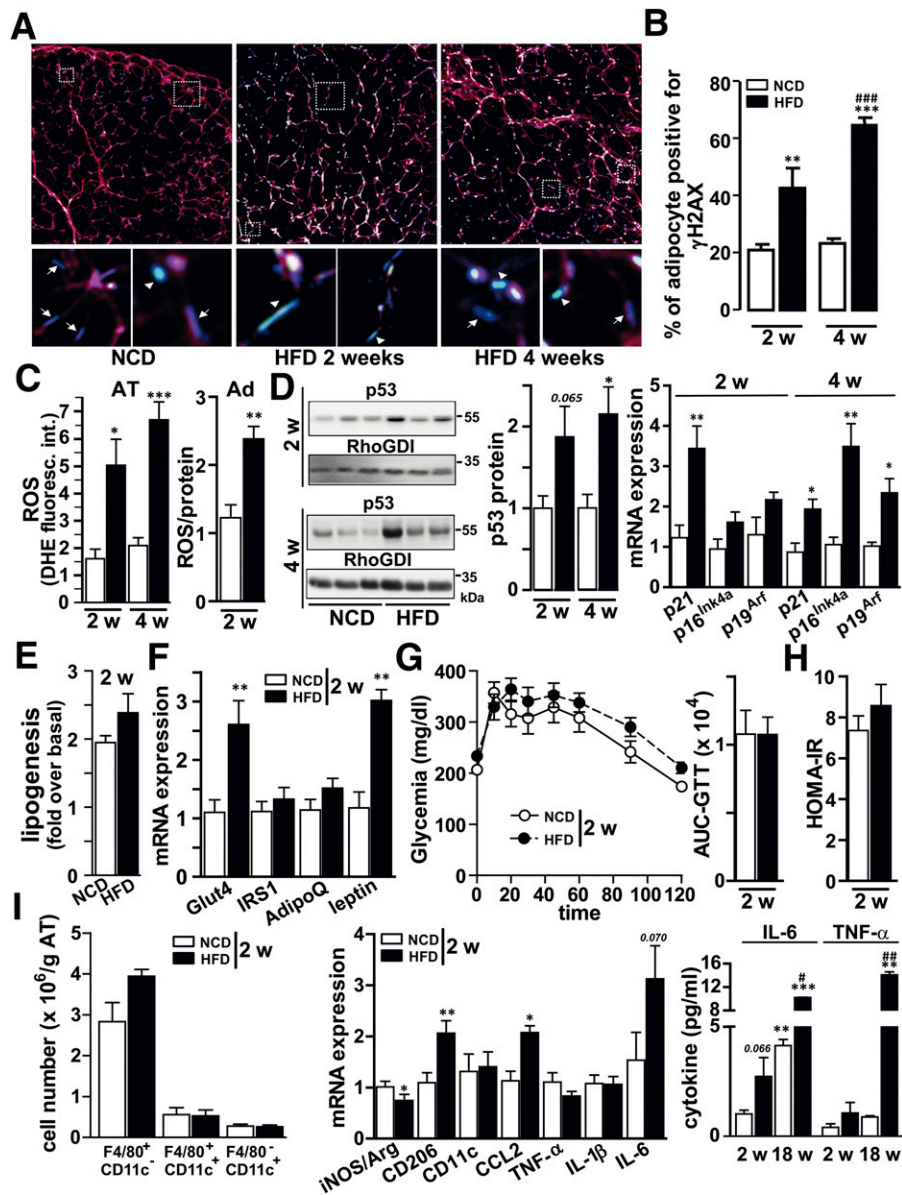


Figure 2—DNA damage in the adipocyte is an early event during obesity development. **A:** Representative images of cleared AT from mice fed the NCD or HFD for 2 or 4 weeks labeled with γ -H2AX antibodies (green), DAPI (blue), and phalloidin (red), together with enlarged views of the delineated regions. Images were acquired with a NikonA1 confocal microscope with a $\times 20$ long-working-distance objective, allowing for acquisitions up to 3 mm into the tissue. A mosaic of nine images over 1 mm was randomly acquired and blindly quantified. Z-projections along the z-axis were generated, and the DAPI (blue) and phalloidin (red) images were merged to discriminate nuclei from small cells that were entirely surrounded by F-actin (purple nuclei) from nuclei of mature adipocytes (Ad) that were not surrounded by F-actin (blue nuclei). Adipocyte nuclei without DNA damage are blue (only DAPI labeling, arrows). They are cyan when DNA damage was present (merge of DAPI [blue] and γ -H2AX [green], arrowheads). Nuclei from other smaller cells without DNA damage are purple (merge of DAPI [blue] and phalloidin [red]) and are white with DNA damage (merge of DAPI [blue], γ -H2AX antibodies [green], and phalloidin [red]). **B:** Quantification of the number of adipocytes presenting DNA damage in their nucleus using the colocalization plug-in of Fiji. Data are expressed as the percentage of cells with DNA damage and are means \pm SEM. $^{**}P < 0.01$ and $^{***}P < 0.001$ HFD vs. NCD-fed mice; $^{###}P < 0.001$ HFD 4 weeks vs. HFD 2 weeks. **C:** Quantification of ROS using dihydroethidium (DHE) labeling on AT sections from mice fed the NCD or HFD for 2 weeks and 4 weeks (left panel), and quantification of ROS production by isolated adipocytes from mice fed the NCD or HFD for 2 weeks using the ROS probe H2DCFDA (right panel). Data are means \pm SEM. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, and $^{***}P < 0.001$ vs. NCD-fed mice. **D:** Western blot analysis of the expression of p53 ($n = 3$ representative mice per group) for 2 weeks ($n = 13$ per group) or 4 weeks ($n = 5$ for NCD and $n = 6$ for HFD) (middle panel), and quantification of the indicated mRNA in AT after NCD or HFD feeding for 2 weeks ($n = 7$ mice per group) (right panel). Results are expressed relative to the NCD-fed mice. Data are means \pm SEM. $^{*}P < 0.05$ and $^{**}P < 0.01$. **E:** Insulin effect on lipogenesis in isolated adipocytes from mice fed the NCD or HFD for 2 weeks ($n = 6$ adipocyte preparations from 6 different mice in each of the groups). Data are expressed as the fold increase over unstimulated cells. **F:** Quantification of the mRNA levels of the indicated genes in AT from mice fed the NCD or HFD for 2 weeks ($n = 7$ mice per group). Data are means \pm SEM. $^{**}P < 0.01$. AdipoQ, adiponectin. **G:** IPGTT in mice fed the NCD or HFD for 2 weeks. Area under the curve (AUC) was calculated from 0 to 120 min. **H:** HOMA of insulin resistance (IR) index (fasting glucose mmol/L \times fasting insulin [μ U/mL]/22.5) of the same mice as in G. **I:** Left panel, quantification by flow cytometry analysis of the numbers of F4/80 $^{+}$ (CD11c $^{+}$ or

These observations support that DNA damage and p53 activation occur very early during obesity development concomitantly to an increase in adipocyte ROS but before the insulin resistance of adipocytes, the inflammation of AT, and the glucose intolerance.

DNA Damage Causes AT Inflammation and Adipocyte Insulin Resistance In Vivo

We next assessed the effect of DNA damage on AT inflammation and adipocyte function by short-term administration of the DNA-damaging drug doxorubicin in lean mice. The weight of epiAT did not differ between control and doxorubicin-administered mice (377.0 ± 31.2 mg vs. 348.3 ± 19.6 mg, respectively), but doxorubicin increased the amount of F4/80⁺CD11c⁻ and F4/80⁺CD11c⁺ macrophages as well as F4/80⁻CD11c⁺ dendritic-like cells in the epiAT (Fig. 3A). Histological examination revealed an infiltration of polynuclear cells in epiAT of doxorubicin-administered mice consisting of 50% of Lys6G⁺ neutrophils without a difference in adipocyte size (Fig. 3B). These changes in immune cells were associated with an increase in inflammatory markers, such as p65-NF- κ B phosphorylation in the SVF (Fig. 3C), TNF- α , IL-1 β , and IL-6 mRNA in epiAT, adipocytes, or SVF (Fig. 3D), and with a decrease in the anti-inflammatory marker CD206 mRNA with a trend toward a decrease of IL-10 mRNA (Fig. 3D). As expected, p53 was activated in the epiAT and adipocytes of mice administered doxorubicin, as indicated by the increase in p21 (Fig. 3E). Doxorubicin decreased Glut4 mRNA and protein, IRS1 and adiponectin mRNA (Fig. 3E and F), and protein kinase B (PKB)/Akt phosphorylation in adipocytes featuring insulin resistance of adipocytes (Fig. 3F). Accordingly, insulin-induced lipogenesis was decreased in isolated adipocytes from the mice injected with doxorubicin and the circulating nonesterified fatty acid level was increased (Fig. 3F and G). These changes in adipocyte functions and AT inflammation did not markedly affect whole-body glucose metabolism because the IPGGT and insulin secretion during this test were unchanged (Fig. 3H and I).

Adipocyte-Mediated Macrophage Chemotaxis Is Increased by Doxorubicin-Induced DNA Damage and p53 Activation

From the above findings, we hypothesized that DNA damage and activation of p53 in adipocytes promote the secretion of chemotactic factors triggering infiltration of immune cells in AT. We thus investigated in vitro the chemotaxis activity of AdCM from adipocytes exposed to doxorubicin to induce DNA damage or to nutlin-3 to activate the p53 pathway. Features of DNA damage, such as an increased number of γ -H2AX foci and of p21 expression, stabilization, and

phosphorylation of p53, were observed in 3T3-L1 adipocytes exposed to doxorubicin (Supplementary Fig. 2A–C). Nutlin-3, an inhibitor of the ubiquitin-ligase mdm2 involved in p53 degradation (29), also induced the stabilization and phosphorylation of p53 and the induction of p21 without inducing DNA damage (Supplementary Fig. 2A–C). AdCM from 3T3-L1 adipocytes exposed to doxorubicin or nutlin-3 did not increase the proinflammatory polarization of mouse RAW macrophages or human monocyte-derived macrophages (Fig. 4A and Supplementary Fig. 3A and B). Importantly, AdCM from adipocytes exposed to doxorubicin or nutlin-3 exhibited a higher chemotactic activity toward mouse macrophages or human monocyte-derived macrophages compared with AdCM from control adipocytes (Fig. 4B and C). Compared with control medium or AdCM from control adipocytes, AdCM from adipocytes exposed to doxorubicin or nutlin-3 also exhibited a higher chemotactic activity toward neutrophils, an effect that is similar or even greater (for doxorubicin exposure) than the neutrophil chemotactic factor *N*-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (Fig. 4D).

Microarray analysis of 3T3-L1 adipocytes exposed to doxorubicin or nutlin-3 revealed that among the expressed chemokines, 11 were deregulated in one or both experimental conditions (Fig. 5A). Analysis by qRT-PCR confirmed that doxorubicin and nutlin-3 increased the mRNA expression of CCL9 (a fibroblast and dendritic cells chemotactic protein), chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL) 1 (a neutrophil chemotactic protein), and CCL2, whereas the expression of CCL7 mRNA, another monocytic chemotactic protein, was increased by nutlin-3 only (Fig. 5B and C). Doxorubicin and nutlin-3 also induced the expression of IL-6. The silencing of p53 blocked the induction by nutlin-3 of all of these mRNAs (Fig. 5B) and partly prevented their upregulation in response to doxorubicin, except for CXCL1 (Fig. 5C). Because p53 silencing only partially reduced p53 expression and activation by doxorubicin (Supplementary Fig. 2C), we treated cells with both p53 siRNA and pifithrin- α , an inhibitor of p53 transcriptional activity. In this condition, CCL2/9, CXCL1, and IL-6 mRNA induction was prevented (Fig. 5C). Importantly, we found that the expression of mRNAs coding for CCL2/7/9 and CXCL1 was increased in epiAT from mice exposed to doxorubicin, both in the adipocyte and SVF fractions for CCL2/7 and only in the adipocyte fraction for CCL9 and CXCL1 (Fig. 5D). We also examined the expression of these chemokines at the onset of obesity when DNA damage was observed in adipocytes. The CCL2 mRNA level was increased after 2 weeks of HFD feeding (Fig. 2I), and a trend toward an increase for CCL9 mRNA was observed (Fig. 5E). The mRNA levels of all of these chemokines were significantly increased after 4 weeks of HFD feeding (Fig. 5F and Supplementary Fig. 1J).

CD11c⁻ and F4/80⁻CD11c⁺ cells in the SVF from mice fed the NCD or HFD for 2 weeks ($n = 6$ mice per group). Values represent the number \pm SEM of each of the cell subtypes per gram of epididymal fat tissues. Fluorescent-coupled anti-F4/80 and CD11c were from eBioscience. Middle panel, quantification of the mRNA expression of markers of inflammation in AT of the same mice. Right panel, concentration of IL-6 and TNF- α in sera of mice fed the NCD or HFD for 2 or 18 weeks (as a positive control). iNOS, inducible nitric oxide synthase. Data are means \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.01$ HFD vs. NCD 2 weeks, and # $P < 0.05$ and ## $P < 0.01$ HFD 18 weeks vs. NCD 18 weeks.

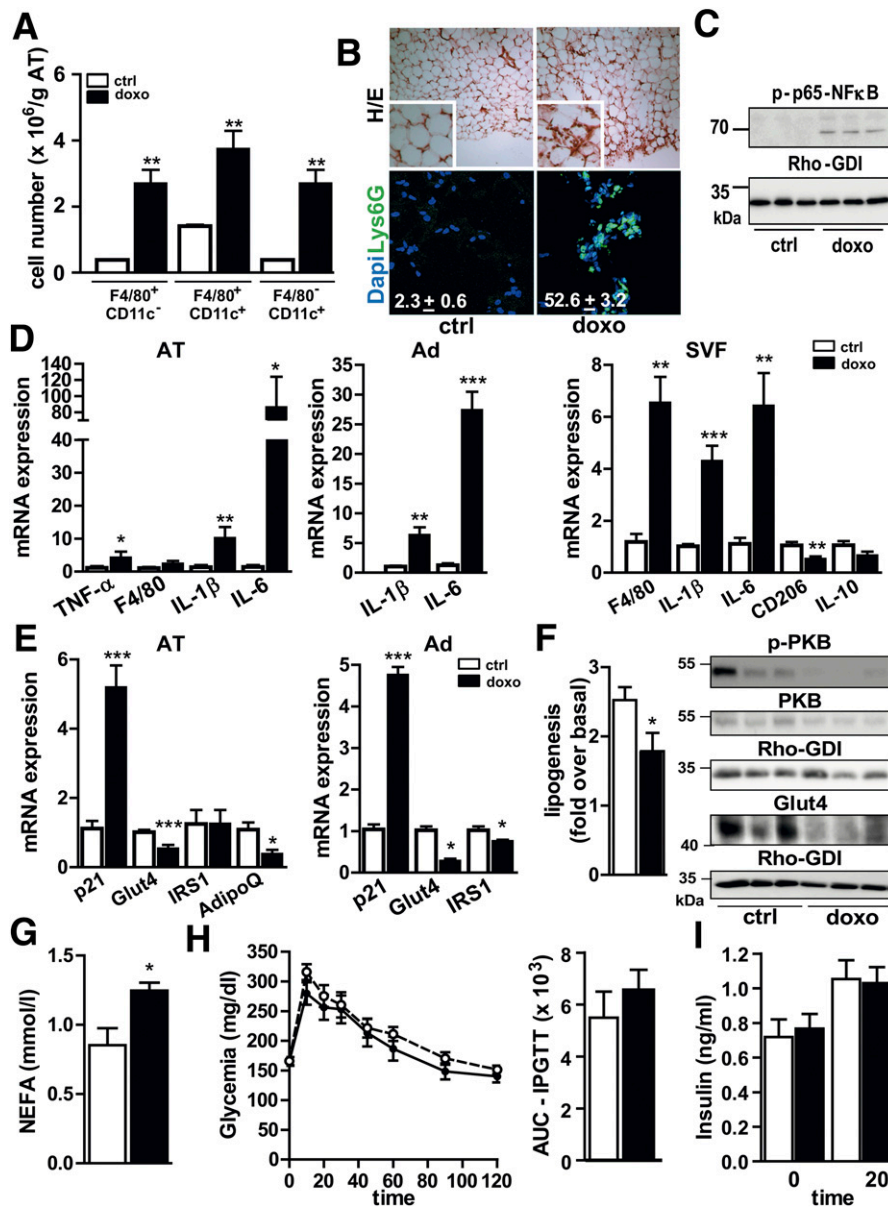


Figure 3—In vivo administration of doxorubicin induces AT inflammation and adipocyte insulin resistance. Mice were injected with doxorubicin (doxo) or vehicle (ctrl; $n = 6$ per group) for 42 h before analysis of the AT, the adipocytes (Ad), and the SVF. **A**: Quantification by flow cytometry analysis of the number of F4/80⁺ (CD11c⁺ or CD11c⁻) and F4/80⁻CD11c⁺ cells in the SVF from control or doxorubicin-injected mice. Values represent the number \pm SEM of each of the cell subtypes per gram of epididymal fat tissues. **B**: Frozen sections of AT were subjected to hematoxylin and eosin (H/E) coloration (top) and to immunodetection (bottom) with an FITC-coupled anti-Lys6G antibody (BioLegend), and nuclei were labeled using DAPI. A representative image from a control and a doxorubicin-injected mouse is shown. For quantification, five images per mouse were automatically captured, and the percentage of cells positive for Lys6G was determined. **C**: Western blot analysis of the level of phosphorylated (p)-p65-NF- κ B (anti-p-p65 NF- κ B #3033, Cell Signaling) in the SVF from control or doxorubicin-injected mice with Rho-GDI as the loading control (anti-Rho-GDI A20 sc-360, Santa Cruz Biotechnology). Each lane corresponds to independent mice. **D** and **E**: Relative expression of the indicated mRNAs in AT, adipocytes, and the SVF from control and doxorubicin-injected mice. The mRNA expression was normalized using mouse Rplp0 mRNA level and expressed in arbitrary units with the control mice taken as 1. AdipoQ, adiponectin. **F**: Left panel, insulin effect on lipogenesis in isolated adipocytes from control or doxorubicin-injected mice ($n = 4$ adipocyte preparations from 4 different mice in each of the groups). Data are expressed as fold over unstimulated cells. Right panel, Western blot analysis of the expression of phosphorylated PKB (anti-p-PKB Ser473 #4058, Cell Signaling), PKB (anti-PKB #9272, Cell Signaling), and Glut4 (anti-Glut4 1F8 sc-53566, Santa Cruz Biotechnology) in isolated adipocytes from control and doxorubicin-injected mice with Rho-GDI as the loading control. **G**: Quantification of free fatty acids (NEFA) in sera from control and doxorubicin-injected mice (NEFA FS kit, DiaSys). **H**: IPGTT in control and doxorubicin-injected mice. The area under the curve (AUC) was calculated from 0 to 120 min. **I**: Quantification of insulinemia in sera of mice before the injection of glucose and 20 min after glucose injection during the IPGTT shown in **H**. Data are means \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ vs. control mice.

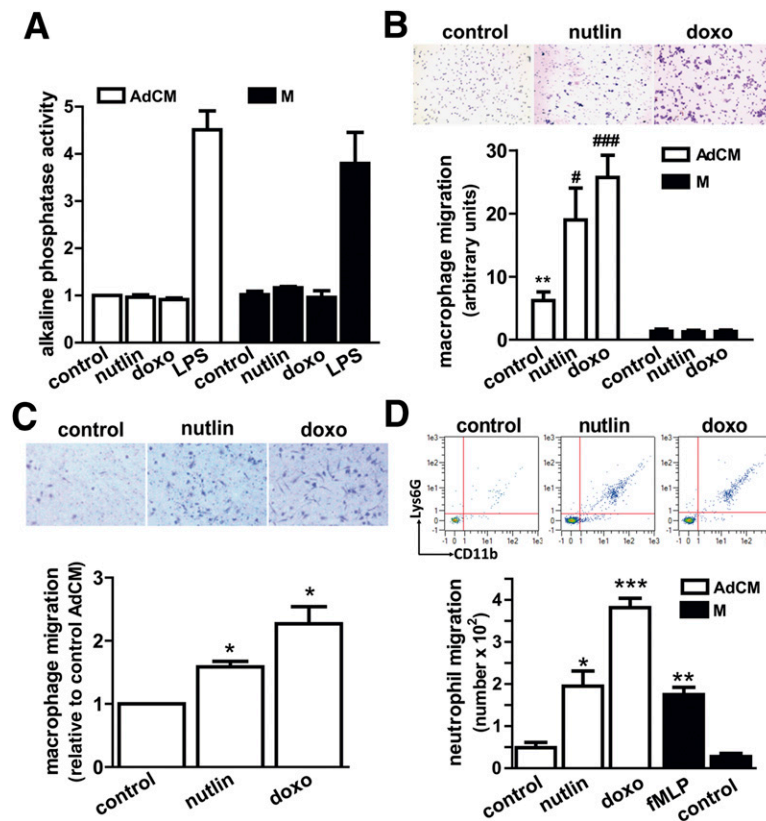


Figure 4—Effect of adipocytes p53 activation on macrophage activation and macrophage and neutrophil migration. *A, B, and D*: 3T3-L1 adipocytes were exposed for 48 h to 10 $\mu\text{mol/L}$ nutlin-3 (nutlin) (Enzo Life Sciences) or for 24 h with 0.5 $\mu\text{g/mL}$ doxorubicin (doxo). Then cells were thoroughly rinsed, fresh medium was added, and the AdCM were collected for the following 24 h. *A*: RAW-Blue macrophages were incubated with AdCM or control culture medium (M) for 24 h, and the activity of the alkaline phosphatase released in the media was quantified as the readout of RAW-Blue activation. Lipopolysaccharide (LPS) (0.5 ng/mL) was added in control medium or AdCM as a positive control for macrophage activation. Quantification of three independent experiments normalized to cells treated with control medium is shown and expressed as means \pm SEM. *B*: Chemotaxis assay was performed with RAW 264.7 macrophages using the indicated AdCM or control M. The number of macrophages stained by crystal violet having performed chemotaxis was counted by analyzing 10 fields for each experimental condition. A typical field corresponding to each of the experimental condition is shown. Results were normalized relative to the number of macrophages attracted by the control M. Data are means \pm SEM of three independent experiments. $**P < 0.01$ control M vs. control AdCM (AdCM from untreated adipocytes). $\#P < 0.05$ and $###P < 0.001$ AdCM from adipocytes exposed to drugs vs. control AdCM. *C*: Human cultured adipocytes were exposed for 48 h to 10 $\mu\text{mol/L}$ nutlin-3 or for 24 h to 0.75 $\mu\text{g/mL}$ doxorubicin. AdCM were collected as described above. Chemotaxis assay was performed with blood monocyte-derived macrophages using the indicated AdCM. Results were normalized relative to the number of macrophages attracted by control AdCM. Data are means \pm SEM of three experiments with three AdCM collected from three independent cultures of human adipocytes with the same human monocyte-derived macrophage preparation. $*P < 0.05$ vs. control AdCM. *D*: The number of neutrophils having performed chemotaxis toward media using *N*-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP; 0.2 $\mu\text{mol/L}$), a chemotactic factor for neutrophils. AdCM of control, nutlin-3-treated, or doxorubicin-treated adipocytes was determined by quantifying the number of CD11b⁺Lys6G⁺ cells in the lower Boyden chamber by flow cytometry analysis. Top, representative flow cytometry plots for CD11b⁺Lys6G⁺ cells that migrated toward AdCM from control, nutlin-3-treated, or doxorubicin-treated cells. Bottom, quantification of the number of migrating neutrophils in chemotaxis assays performed with four independent AdCM and one white blood cell preparation. The experiment was reproduced twice. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, and $***P < 0.001$ vs. control AdCM.

DNA Damage and p53 Activation Inhibit Insulin Signaling and Insulin-Induced Glucose Transport and Increase Lipolysis in Adipocytes

We next assessed whether the insulin resistance of adipocytes from mice injected with doxorubicin (Fig. 3) was only the consequence of AT inflammation or might also be caused by an adipocyte cell-autonomous effect of DNA damage and p53 activation. Treatment of 3T3-L1 adipocytes with doxorubicin or nutlin-3 reduced insulin-induced glucose uptake (Fig. 6*A* and *B*) and Glut4 translocation (Fig.

6*E* and *F*) without changing Glut1 and Glut4 expression (Fig. 6*C* and *D*). Similar results were obtained in human adipocytes (Supplementary Fig. 4*A* and *B*). This effect was associated with a decrease in insulin signaling in 3T3-L1 and human adipocytes (Fig. 7*A* and *B* and Supplementary Fig. 4*C* and *D*). The insulin-induced PKB/Akt phosphorylation in 3T3-L1 adipocytes treated with doxorubicin or nutlin-3 was improved by p53 silencing, which partially reduced p53 expression (Supplementary Fig. 5*A*), or by treatment with pifithrin- α (not shown) and was fully restored

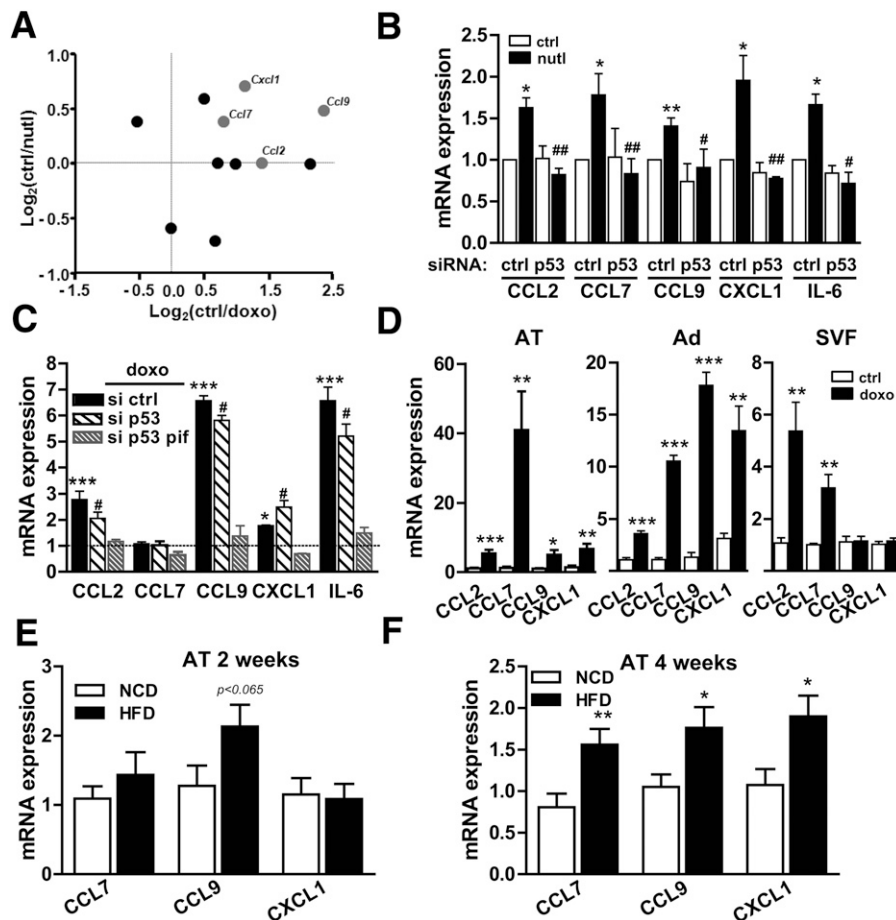


Figure 5—Effect of DNA damage and p53 activation on mRNA expression of cytokines/chemokines and the implication of p53. **A**: 3T3-L1 adipocytes were treated with 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ doxorubicin (doxo) for 24 h or 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ nutlin-3 (nutl) for 48 h. Total RNAs were then prepared and used in gene expression profiling by microarray. The figure represents the changes in the level of expression of cytokines and chemokines between doxorubicin-treated vs. control (ctrl) adipocytes as a function of the changes in the level of expression between nutlin-treated vs. control adipocytes. Changes are expressed in \log_2 . Only the cytokines/chemokines with an expression that changed in one or in the two experimental conditions are shown. Relative mRNA amount of the indicated chemokines/cytokines in 3T3-L1 adipocytes transfected with control siRNA (si ctrl) or p53 siRNA (si p53) and incubated without (ctrl) or with nutlin-3 (**B**) or doxorubicin (**C**). When indicated, adipocytes transfected with p53 siRNA were also treated with pifithrin- α (pif). Data ($n = 3$ –4 independent experiments) were normalized using mouse Rplp0 mRNA level and are expressed as arbitrary units with the value of si ctrl untreated cells taken as 1 (dashed line in **C**). **D**: Relative mRNA expression of the indicated chemokines in AT, adipocyte (Ad), and SVF of control mice or doxorubicin-injected mice. The measurements were performed with the same mRNA samples as those used in Fig. 3D and E. Relative mRNA expression of the indicated chemokines in AT of mice fed the NCD or HFD for 2 weeks (**E**) or 4 weeks (**F**). The measurements were performed with the same mRNA samples as in Fig. 2F–I and Supplementary Fig. 1I–J. Data are means \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ vs. effect in untreated si ctrl cells or in mice injected with vehicle or in NCD-fed mice. # $P < 0.05$ and ## $P < 0.01$ for drug-treated si ctrl cells vs. drug-treated si p53 cells.

when p53 expression and activity was reduced by using both p53 siRNA and pifithrin- α (Fig. 7D and E and Supplementary Fig. 5B). That the deleterious effects of doxorubicin and nutlin-3 involved secretory factors was unlikely because treatment of adipocytes with AdCM from 3T3-L1 adipocytes treated with doxorubicin or nutlin-3 did not alter insulin-induced PKB/Akt phosphorylation (Fig. 7C).

An increase in lipolysis contributes to AT inflammation and to the alteration in insulin sensitivity (30). We found that doxorubicin or nutlin-3 increased lipolysis in 3T3-L1 and human adipocytes, as evidenced by an increase in glycerol release (Fig. 8A and B and Supplementary Fig. 4E and F). The p53 silencing in 3T3-L1 adipocytes decreased by

50% the lipolysis induced by nutlin-3 (Fig. 8A). The lipolytic effect of doxorubicin was modestly but significantly reduced by p53 silencing and markedly inhibited by using both p53 siRNA and pifithrin- α (Fig. 8B). Pifithrin- α alone inhibits by $63.7\% \pm 6.8\%$ and $34.8\% \pm 3.3\%$ nutlin-3- and doxorubicin-induced lipolysis, respectively.

To further explore the mechanisms of the lipolytic effect of DNA damage and p53 activation, we examined the expression of lipolytic enzymes and/or of lipid droplet components. Microarray analysis revealed that the genes involved in the maintenance of lipid droplet integrity and repression of basal lipolysis, such as PLIN1 (coding for perilipin 1) and CIDEC (31,32), were downregulated in

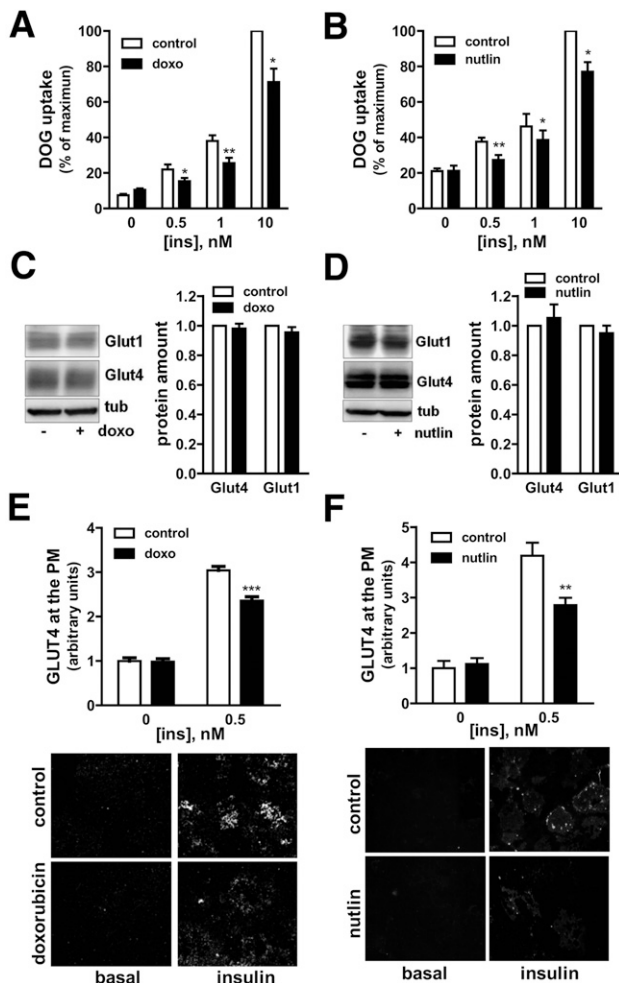


Figure 6—Inhibition of insulin-induced glucose transport and GLUT4 translocation in adipocytes exposed to doxorubicin or nutlin-3. 3T3-L1 adipocytes were treated with 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ doxorubicin (doxo) for 24 h or 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ nutlin-3 (nutlin) for 48 h and stimulated with the indicated concentrations of insulin (ins) for 10 min. *A* and *B*: Measurement of deoxyglucose (DOG) uptake ($n = 3$ independent experiments). *C* and *D*: Representative Western blot analysis and quantification ($n = 4$ independent experiments) of the protein expression of the glucose transporters GLUT4 (anti-GLUT4 1F8, Santa Cruz Biotechnology) and GLUT1 (anti-GLUT1 ab652, Abcam) with tubulin (tub) as the loading control. *E* and *F*: GLUT4 translocation was determined by the quantification of GLUT4 amount in plasma membrane (PM) lawns. Quantification of 26 fields obtained in 2 independent experiments (top panels) and representative fields (bottom panels) are shown. Data are means \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ untreated cells stimulated with insulin vs. drug-treated cells stimulated with insulin.

both doxorubicin- or nutlin-3-treated 3T3-L1 adipocytes (Fig. 8C). The protein level of perilipin 1 was decreased in adipocytes treated with doxorubicin or nutlin-3 (Fig. 8D).

DISCUSSION

Previous studies have reported an upregulation of the p53 pathway in AT of obese rodents and patients (14,15,33), but the causes of p53 activation in obese adipocytes and its consequences on adipocyte metabolism remain ill defined.

Here, we show with several image-based approaches an increase in DNA damage in adipocytes not only when obesity was established but also early after the onset of obesity, before alterations in adipocyte insulin sensitivity and whole-body glucose homeostasis. In addition to adipocytes, DNA damage also occurred in other cell types that remain to be characterized. Some of them aligned in branched actin-rich structures could be endothelial cells in which p53 was activated in obesity (34). Taking into account the high number of γ -H2AX foci per nuclei compared with the telomere number in the adipocytes from mice with installed obesity, it is likely that both DSBs and telomere shortening occurred. DNA damage may thus contribute to the p53 stabilization and p21 upregulation we observed in adipocytes from HFD-fed mice. Of note, those adipocytes were not apoptotic, possibly because the induction of p21 protected them from apoptosis (35).

What could be the cause of adipocyte DNA damage? DNA is sensitive to damage induced by oxidative stress, and we indeed detected an increase in the 8-OHdG level, the most common oxidative DNA lesions (36), in AT from obese mice. These oxidative DNA lesions may contribute to p53 activation in obese adipocytes because we found a positive correlation between 8-OHdG amounts and the expression of the p53-target p21. In installed obesity, adipocytes and proinflammatory macrophages may both contribute to the increase in ROS production (37,38) that could induce DNA damage in adipocytes and other AT cells. However, we also observed DNA damage and ROS in adipocytes at the onset of obesity, before any increase in proinflammatory macrophages or proinflammatory cytokines and before alterations in whole-body glucose homeostasis and adipocyte insulin sensitivity. This increase in ROS may induce DNA damage and, consequently, activation of the DDR known to induce the innate inflammatory response (39) and, thus, could be causal factors in obese AT inflammation and adipocyte dysfunctions.

Such a link between adipocyte DNA damage, AT inflammation, and insulin resistance of adipocytes is supported by the increased amount of proinflammatory immune cells in the AT and the adipocyte insulin resistance of lean mice injected with the DNA damage-inducing drug doxorubicin. Our data argue that these changes in AT immune cells are the consequence of p53-dependent secretion of chemokines induced by DNA damage in the adipocytes. Importantly, the changes in populations of immune cells and in chemokine expression in AT of doxorubicin-injected mice is at least qualitatively consistent with those described in obesity (40,41). Therefore, DNA damage in adipocytes may trigger recruitment of macrophages and neutrophils within AT through the p53-dependent production of several chemokines. Because the secretome from adipocytes exposed in vitro to doxorubicin did not promote macrophage polarization, the increase in proinflammatory macrophages in AT from mice administered doxorubicin would be caused by DNA damage in other cell types or by the vicious cycle that takes place between adipocytes and macrophages leading

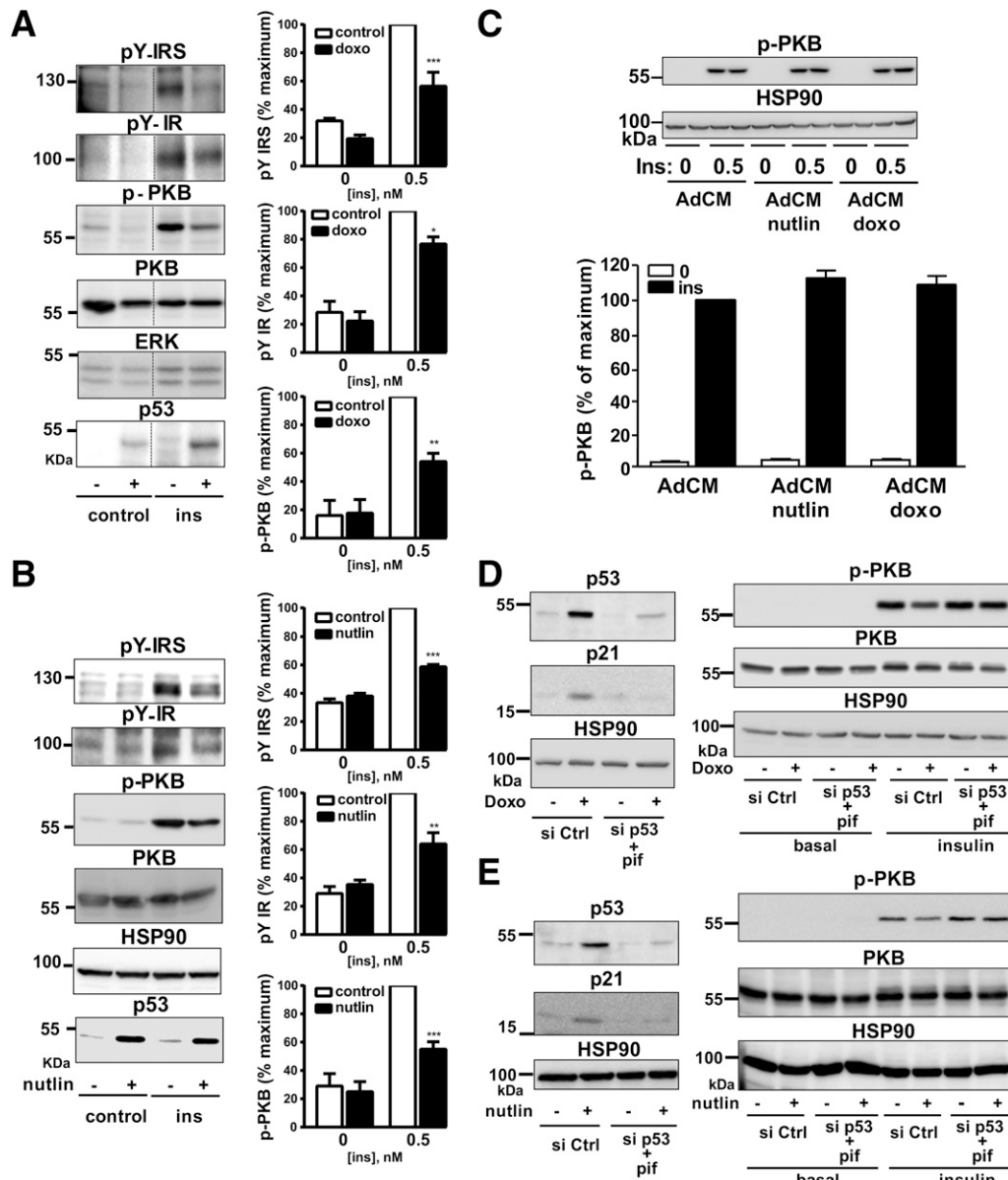


Figure 7—Inhibition of insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes treated with doxorubicin or nutlin-3. 3T3-L1 adipocytes were treated with 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ doxorubicin for 24 h (doxo) or 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ nutlin-3 (nutlin) for 48 h and incubated without or with 0.5 nmol/L insulin (ins) for 10 min. **A** and **B**: Representative Western blot analysis and quantification ($n = 3\text{--}4$ independent experiments) of the expression of the tyrosine phosphorylated (p) (anti-PhosphoTyrosine #9411, Cell Signaling) insulin receptor (pY-IR) and IRS (pY-IRS), the pThr308-PKB (p-PKB) (anti-pThr308-PKB #4056, Cell Signaling), total PKB, and p53. Data are expressed as the percentage of insulin effect in untreated cells stimulated with insulin. Normalization was performed by quantifying extracellular signal-related kinase (ERK) (anti-ERK1/2 #4695, Cell Signaling) or HSP90 (anti-HSP90 sc-13119, Santa Cruz Biotechnology) in each of the experiments. **C**: 3T3-L1 adipocytes were treated for 24 h with 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ doxorubicin or for 48 h with 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ nutlin-3, and the AdCM were collected as described in Fig. 4. 3T3-L1 adipocytes were incubated with AdCM for 24 h, washed, and incubated without or with 0.5 nmol/L insulin for 10 min, before lysis for Western blot analysis of PKB phosphorylation. Representative immunoblots and quantification of three independent experiments are shown. The ratios of pThr308-PKB relative to HSP90 are expressed as the percentage of insulin effect in cells treated with control AdCM. **D** and **E**: 3T3-L1 adipocytes were transfected with control siRNA (si Ctrl) or p53 siRNA (si p53). The cells treated with p53 siRNA were also incubated with 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ pifithrin- α (pif). Cells were incubated with 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ doxorubicin for 24 h (**D**) or with 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ nutlin-3 for 48 h (**E**). Adipocytes were then stimulated with 0.5 nmol/L insulin for 10 min. Western blot analysis of p53 and p21 expression (left panels) and pThr308-PKB and total PKB expression (right panels) with HSP90 as loading control. Representative immunoblots are shown, and quantifications are presented in Supplementary Fig. 5. Data are means \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ untreated cells stimulated with insulin vs. drug-treated cells stimulated with insulin.

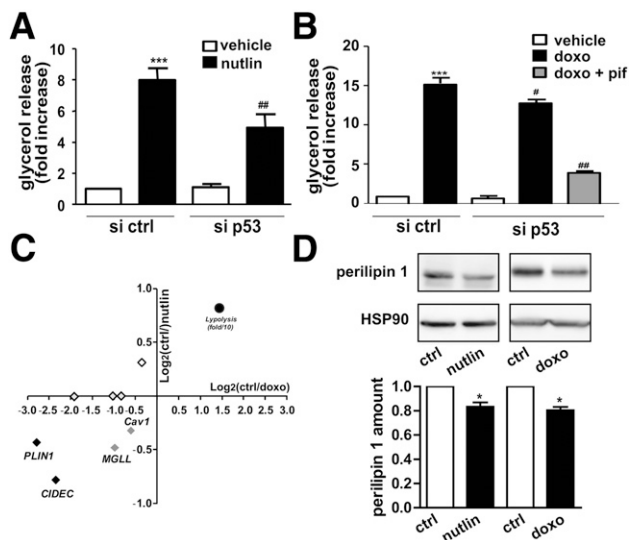


Figure 8—Doxorubicin and nutlin-3 stimulate lipolysis in adipocytes. Glycerol release was measured as an index of lipolysis in the medium of 3T3-L1 adipocytes transfected with control siRNA (si ctrl) or p53 siRNA (si p53) and treated with nutlin-3 (nutlin) (A) or doxorubicin (doxo) with or without pifithrin- α (pif) (B). Data are expressed as the fold increase over control cells (untreated cells transfected with si ctrl) and are presented as means \pm SEM ($n = 3$ –4 independent experiments). *** $P < 0.001$ untreated si ctrl cells vs. drug-treated si ctrl cells. # $P < 0.05$ and ## $P < 0.01$ drug-treated si ctrl cells vs. drug-treated si p53 cells. C: 3T3-L1 adipocytes were treated with 0.5 μ g/mL doxorubicin for 24 h or with 10 μ mol/L nutlin-3 for 48 h. Total RNA were then prepared and used in gene expression profiling. The figure represents the changes in the level of expression of genes involved in lipolysis between doxorubicin-treated vs. control adipocytes as a function of the changes in the level of expression between nutlin-3-treated vs. control adipocytes. Changes are expressed in log₂. The name of genes downregulated in both doxorubicin- and nutlin-3-treated adipocytes are indicated. D: Representative Western blot and quantification ($n = 3$ independent experiments) of the expression of perilipin 1 (*PLN1*) gene using an anti-perilipin 1 antibody (D418, Cell Signaling) with HSP90 as the loading control. Data are means \pm SEM. * $P < 0.05$ nutlin-3- or doxorubicin-treated cells vs. control.

to macrophage activation (42). Also, other adipocyte p53-dependent mechanisms could contribute to AT inflammation during obesity (43).

Hence, DNA damage by increasing AT inflammation may promote adipocyte insulin resistance and dysfunction. However, DNA damage may also trigger adipocyte insulin resistance independently of AT inflammation because inducing DNA damage in cultured adipocytes decreased insulin signaling and uptake of glucose and increased lipolysis. This is not caused by a paracrine action of adipocyte-secreted factors. It is thus plausible that the DDR, mainly through p53 activation, promotes the transcription of proteins downregulating insulin signaling that remains to be identified; however, mitogen-activated protein kinases were not likely involved because they were not activated in our settings (data not shown). From our findings it is tempting to speculate that DNA damage, by altering adipocyte functions, contributes

to systemic insulin resistance. Indeed, by decreasing glucose flux, DNA damage may reduce de novo lipogenesis, and such a decrease is associated with reduced insulin sensitivity (44–46), whereas DNA damage increases lipolysis, which is positively correlated with insulin resistance (30).

In summary, our study shows that DNA damage occurs early in the adipocytes at the onset of obesity and before the development of AT inflammation and adipocyte insulin resistance. DNA damage in adipocytes may be thus causal in the dysfunction and inflammation of AT (Supplementary Fig. 6). Pharmacological or nutritional strategies preventing DNA damage in adipocytes may thus be beneficial for the metabolic complications of obesity.

Acknowledgments. The authors thank the animal facility staff for animal care and breeding, Damien Alcor, head of the Cell Imaging core facility (INSERM UMR 1065, C3M, Nice, France), and also Prof. Marino Zerial and Dr. Yannick Lalaisidizis (Max Planck Institute of Molecular Cell Biology and Genetics, Dresden, Germany) for the free access to the motion-tracking software developed in Prof. Zerial's laboratory.

Funding. This work was supported by INSERM, the Université Côte d'Azur, and by grants from the European Foundation for the Study of Diabetes (EFS-D/Lilly), SFD-Abbott, Aviesan/AstraZeneca (Diabetes and the Vessel Wall Injury Program), and the French National Research Agency (ANR) through "Investments for the Future" Labex SIGNALIFE (grant ANR-11-LABX-0028-01). Light microscopy was performed at the C3M Imaging core facility (part of the Microscopy and Imaging platform Côte d'Azur IBISA). The Nikon A1R-FLIM microscope used for this study was funded thanks to Conseil Général Alpes-Maritimes ("Appel à Projets Santé") and by Région Provence-Alpes-Côte d'Azur (PACA) ("Appel à Projets Plateforme"). The UMR 8199 Genotyping and Expression platform (Lille, France) belongs to the "Federation de Recherche" 3508 funded by Labex EGID (European Genomics Institute for Diabetes, ANR-10-LABX-46) and by the ANR Equipex 2010 session (ANR-10-EQPX-07-01, "LIGAN-PM"). The LIGAN-PM Genomics platform (Lille, France) is also supported by the Fonds Européen de Développement Régional (FEDR) and the Region Nord-Pas-de-Calais-Picardie. B.V. and P.-J.C. were supported by the French Ministry of Education and Research. J.G. was supported by a fellowship (postdoctoral grant) from the "Fondation pour la Recherche Médicale." F.C. was supported by a fellowship from INSERM/Région PACA/FEDER (PhD grant) and by a grant from the Société Francophone du Diabète (SFD/Abbott). G.B. was supported by the Labex SIGNALIFE grant (ANR-11-LABX-0028-01). J.-F.T. is an investigator of the CNRS.

Duality of Interest. No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

Author Contributions. B.V. and P.-J.C. designed and performed most of the experiments, analyzed the data, and reviewed the manuscript. J.G. was involved in the researching of the data, contributed to discussion, and reviewed and edited the manuscript. M.D., C.G., and T.G. performed experiments. F.C. performed RAW-Blue macrophage experiments. A.J. and P.A. were involved in the design and the realization of the experiments with human-derived macrophages. G.B. performed the chemotaxis assay with neutrophils. J.M., V.D., M.V., and P.F. generated and analyzed microarray data. J.-F.T. contributed to data analysis and to the discussion and wrote the manuscript. M.C. designed the study, was involved in data analysis, and wrote the manuscript. M.C. is the guarantor of this work and, as such, had full access to all the data in the study and takes full responsibility for the integrity of the data, the accuracy of the data analysis, and for the decision to submit for publication.

References

1. Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 2000;106:473–481
2. Herman MA, Kahn BB. Glucose transport and sensing in the maintenance of glucose homeostasis and metabolic harmony. *J Clin Invest* 2006;116:1767–1775
3. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006;444:860–867
4. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004;114:1752–1761
5. Houstis N, Rosen ED, Lander ES. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 2006;440:944–948
6. Trayhurn P. Hypoxia and adipocyte physiology: implications for adipose tissue dysfunction in obesity. *Annu Rev Nutr* 2014;34:207–236
7. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol* 2011;29:415–445
8. Bashan N, Kovsan J, Kachko I, Ovadia H, Rudich A. Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species. *Physiol Rev* 2009;89:27–71
9. Tanti JF, Jager J. Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stress-regulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation. *Curr Opin Pharmacol* 2009;9:753–762
10. Regazzetti C, Peraldi P, Grémeaux T, et al. Hypoxia decreases insulin signaling pathways in adipocytes. *Diabetes* 2009;58:95–103
11. Hafsi H, Hainaut P. Redox control and interplay between p53 isoforms: roles in the regulation of basal p53 levels, cell fate, and senescence. *Antioxid Redox Signal* 2011;15:1655–1667
12. Hallenborg P, Feddersen S, Madsen L, Kristiansen K. The tumor suppressors pRB and p53 as regulators of adipocyte differentiation and function. *Expert Opin Ther Targets* 2009;13:235–246
13. Schupp M, Chen F, Briggs ER, et al. Metabolite and transcriptome analysis during fasting suggest a role for the p53-Ddit4 axis in major metabolic tissues. *BMC Genomics* 2013;14:758
14. Yahagi N, Shimano H, Matsuzaka T, et al. p53 Activation in adipocytes of obese mice. *J Biol Chem* 2003;278:25395–25400
15. Minamino T, Orimo M, Shimizu I, et al. A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nat Med* 2009;15:1082–1087
16. Phillips ER, McKinnon PJ. DNA double-strand break repair and development. *Oncogene* 2007;26:7799–7808
17. Kaddai V, Jager J, Gonzalez T, et al. Involvement of TNF- α in abnormal adipocyte and muscle sortilin expression in obese mice and humans. *Diabetologia* 2009;52:932–940
18. Jager J, Grémeaux T, Gonzalez T, et al. Tpl2 kinase is upregulated in adipose tissue in obesity and may mediate interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α effects on extracellular signal-regulated kinase activation and lipolysis. *Diabetes* 2010;59:61–70
19. Kaddai V, Gonzalez T, Keslair F, et al. Rab4b is a small GTPase involved in the control of the glucose transporter GLUT4 localization in adipocyte. *PLoS One* 2009;4:e5257
20. Obba S, Hizir Z, Boyer L, et al. The PRKAA1/AMPK α 1 pathway triggers autophagy during CSF1-induced human monocyte differentiation and is a potential target in CMMML. *Autophagy* 2015;11:1114–1129
21. Jager J, Corcelle V, Grémeaux T, et al. Deficiency in the extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1) protects leptin-deficient mice from insulin resistance without affecting obesity. *Diabetologia* 2011;54:180–189
22. Mari M, Monzo P, Kaddai V, et al. The Rab4 effector Rabip4 plays a role in the endocytotic trafficking of Glut 4 in 3T3-L1 adipocytes. *J Cell Sci* 2006;119:1297–1306
23. Gilleron J, Querbes W, Zeigerer A, et al. Image-based analysis of lipid nanoparticle-mediated siRNA delivery, intracellular trafficking and endosomal escape. *Nat Biotechnol* 2013;31:638–646
24. Renier N, Wu Z, Simon DJ, Yang J, Ariel P, Tessier-Lavigne M. iDISCO: a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. *Cell* 2014;159:896–910
25. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* 2015;43:e47
26. Kaddai V, Gonzalez T, Bolla M, Le Marchand-Brustel Y, Cormont M. The nitric oxide-donating derivative of acetylsalicylic acid, NCX 4016, stimulates glucose transport and glucose transporters translocation in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008;295:E162–E169
27. Dizdaroglu M, Jaruga P. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Res* 2012;46:382–419
28. Muñoz-Espín D, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15:482–496
29. Hock AK, Vousden KH. The role of ubiquitin modification in the regulation of p53. *Biochem Biophys Acta* 2014;1843:137–149
30. Arner P, Langin D. Lipolysis in lipid turnover, cancer cachexia, and obesity-induced insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab* 2014;25:255–262
31. Brasaemle DL. Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J Lipid Res* 2007;48:2547–2559
32. Tanaka N, Takahashi S, Matsubara T, et al. Adipocyte-specific disruption of fat-specific protein 27 causes hepatosteatosis and insulin resistance in high-fat diet-fed mice. *J Biol Chem* 2015;290:3092–3105
33. Ortega FJ, Moreno-Navarrete JM, Mayas D, et al. Inflammation and insulin resistance exert dual effects on adipose tissue tumor protein 53 expression. *Int J Obes* 2014;38:737–745
34. Yokoyama M, Okada S, Nakagomi A, et al. Inhibition of endothelial p53 improves metabolic abnormalities related to dietary obesity. *Cell Rep* 2014;7:1691–1703
35. Inoue N, Yahagi N, Yamamoto T, et al. Cyclin-dependent kinase inhibitor, p21WAF1/CIP1, is involved in adipocyte differentiation and hypertrophy, linking to obesity, and insulin resistance. *J Biol Chem* 2008;283:21220–21229
36. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J* 2003;17:1195–1214
37. Eriksson JW. Metabolic stress in insulin's target cells leads to ROS accumulation - a hypothetical common pathway causing insulin resistance. *FEBS Lett* 2007;581:3734–3742
38. Vieira-Potter VJ. Inflammation and macrophage modulation in adipose tissues. *Cell Microbiol* 2014;16:1484–1492
39. Chatzinikolaou G, Karakasioti I, Garinis GA. DNA damage and innate immunity: links and trade-offs. *Trends Immunol* 2014;35:429–435
40. Surmi BK, Hastly AH. The role of chemokines in recruitment of immune cells to the artery wall and adipose tissue. *Vascul Pharmacol* 2010;52:27–36
41. Huh JY, Park YJ, Ham M, Kim JB. Crosstalk between adipocytes and immune cells in adipose tissue inflammation and metabolic dysregulation in obesity. *Mol Cells* 2014;37:365–371
42. Ceppo F, Berthou F, Jager J, Dumas K, Cormont M, Tanti J-F. Implication of the Tpl2 kinase in inflammatory changes and insulin resistance induced by the interaction between adipocytes and macrophages. *Endocrinology* 2014;155:951–964
43. Shimizu I, Yoshida Y, Moriya J, et al. Semaphorin3E-induced inflammation contributes to insulin resistance in dietary obesity. *Cell Metab* 2013;18:491–504
44. Girousse A, Tavernier G, Valle C, et al. Partial inhibition of adipose tissue lipolysis improves glucose metabolism and insulin sensitivity without alteration of fat mass. *PLoS Biol* 2013;11:e1001485
45. Herman MA, Peroni OD, Villoria J, et al. A novel ChREBP isoform in adipose tissue regulates systemic glucose metabolism. *Nature* 2012;484:333–338
46. Roberts R, Hodson L, Dennis AL, et al. Markers of de novo lipogenesis in adipose tissue: associations with small adipocytes and insulin sensitivity in humans. *Diabetologia* 2009;52:882–890

RESULTATS SUPPLEMENTAIRES :

DNA Damage and the activation of the p53 Pathway Mediate Alterations in Metabolic and Secretory Functions of Adipocytes

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Table 1.

Characteristics of the normal-chow fed mice and the high-fat fed mice.

	Body Weight (g)	Fat pads Weight (mg)	Fasting Glycemia (mg/dl)	IPGTT AUC (arbitrary unit)
Normal chow (n=32)	28.76 ± 0.35	605 ± 83.25	165.3 ± 7.86	7121 ± 1466
high-fat 45 % (n=8)	37.80 ± 0.90 ***	2330 ± 151.1 ***	205.5 ± 11.97*	13734 ± 1527**
high-fat 65 % (n=16)	44.31 ± 1.54 *** ###	2817 ± 180.4 ***	246.0 ± 7.11 *** #	18540 ± 1171 ***

Data are means ± SEM. Comparison between groups was performed with ANOVA and Bonferroni post-hoc test in the case of 18 week-diet. * P< 0.05, ** P< 0.01, *** P< 0.001 standard chow vs high-fat diet; # P<0.05, high-fat diet 65 % vs high-fat diet 45 %.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Table 2.

Correlative analysis between telomere length, p21 mRNA expression, obesity, and glycemia

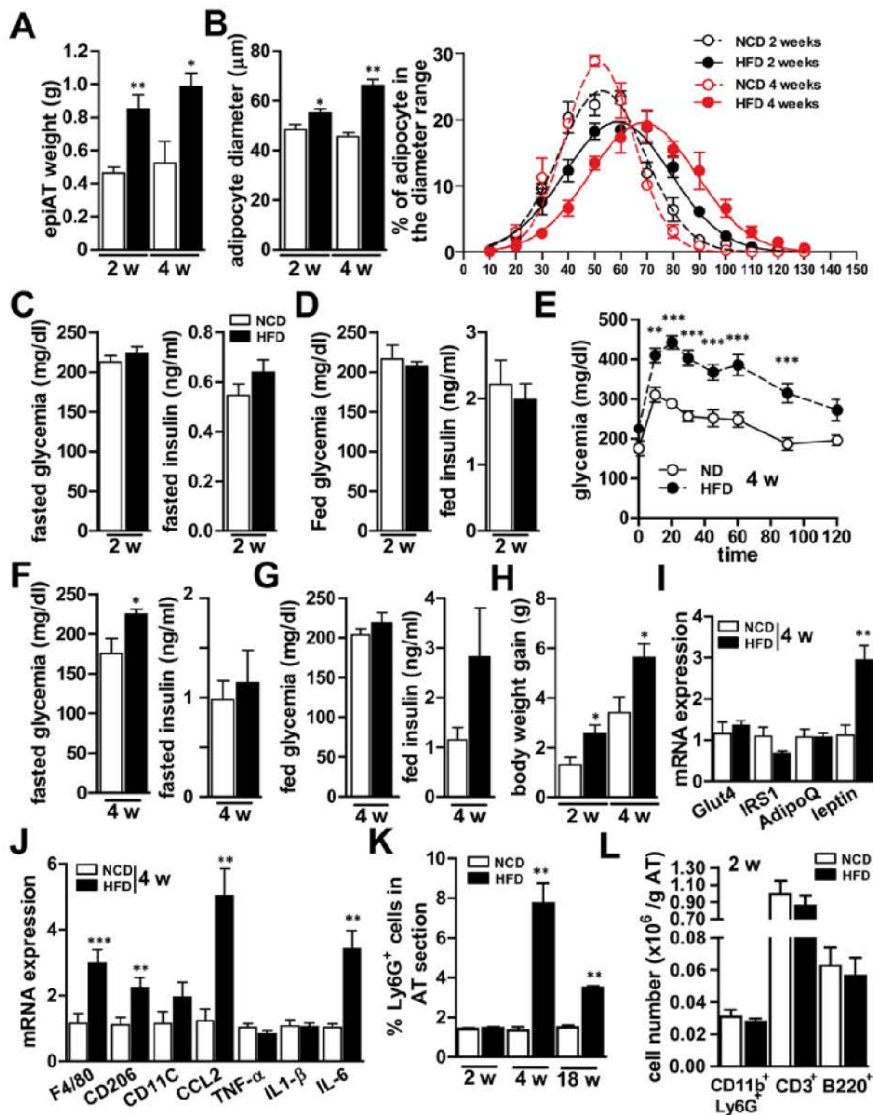
	Body weight	Fat pads weight	Fasting glycemia	p21 mRNA level
Telomere length	-0.549 **	-0.573 **	-0.533**	-0.430*
p21 mRNA level	0.720 ***	0.684 ***	0.494 *	

Telomere length and p21 mRNA level were measured in adipose tissue from mice fed a normal chow-diet (n=8) or a high-fat diet (45 % and 60 % kcal from fat, n=8 for each diet) and correlated to each other and to body weight, fat pads weight and fasting glycemia by Spearman correlation test. Spearman r was indicated in the table. * P< 0.05, ** P< 0.01 and *** P< 0.001.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Figure 1. Characterization of mice fed a high-fat diet for 2 or 4 weeks vs mice fed a normal chow diet.

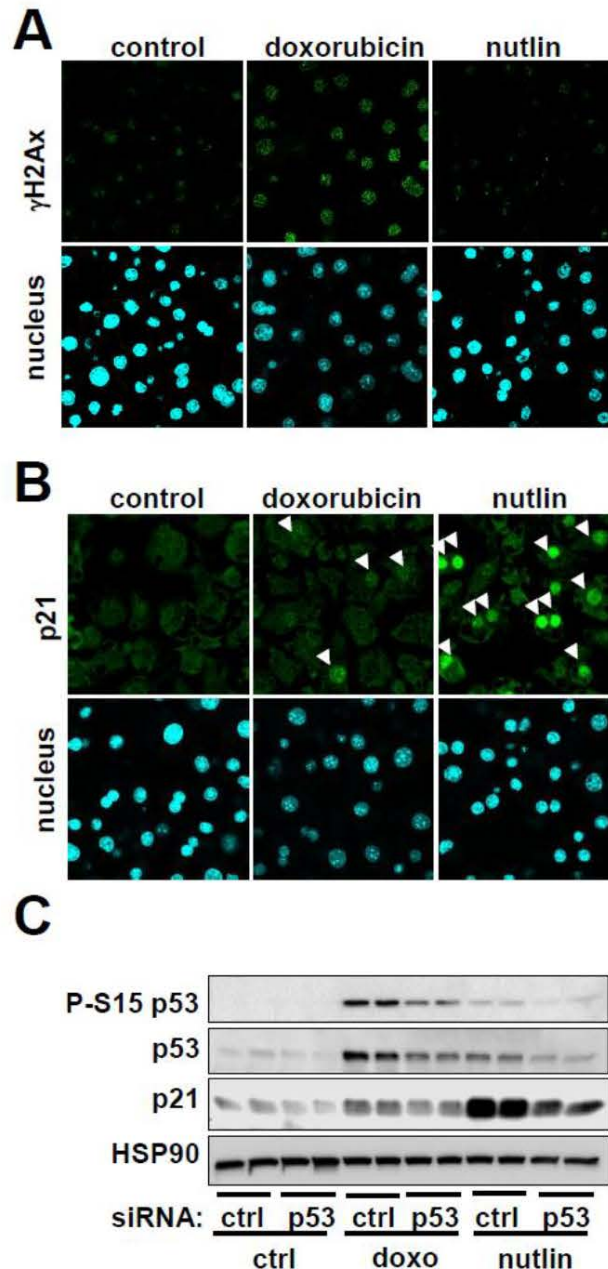
A: Weight of the epididymal adipose tissue (epiAT). *B:* Mean adipocyte diameter (left) and adipocyte number distribution relative to their diameter (right). *C:* Serum glucose and insulin levels in 6 h-fasted mice fed a NCD or a HFD for 2 weeks ($n = 13$ mice per groups analyzed in two independent experiments) *D:* Serum glucose and insulin level in the same mice as in *C* but random fed. *E:* IPGTT in mice fed a NCD ($n=5$) or HFD ($n=6$) for 4 weeks. *F:* Serum glucose and insulin levels in 6 h-fasted mice fed a NCD ($n=5$) or a HFD ($n=6$) for 4 weeks. *G:* Serum glucose and insulin level in the same mice as in *F* but random fed. *H:* Body weight gain of the mice after 2 or 4 weeks of HFD. *I-J:* Expression of the mRNA expression of the indicated genes in AT of mice fed a NCD or HFD for 4 weeks. *K:* Quantification of neutrophil infiltration in AT of mice fed a NCD or HFD for 2, 4, and 18 weeks by immunodetection on AT section with anti-Lys6G antibodies as described in Figure 3. *L:* Quantification of immune cells by flow cytometry in the SVF of AT from mice fed a NCD or HFD for 2 weeks. The CD11b and Lys6G were used to quantify neutrophils, CD3 for T lymphocytes, and B220 for B lymphocytes. Results are expressed as the number of cells per g of epididymal AT. Data are means + SEM with * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ versus NCD-fed mice



SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Figure 2. Induction of DNA damage by doxorubicin and nutlin-3 and effect of p53 siRNA on p53 and p21 expression

3T3-L1 adipocytes cultured on glass coverslips were treated for 24 h with 0.5 $\mu\text{g/ml}$ of doxorubicin or for 48 h with 10 μM nutlin-3. Adipocytes were then treated for immunofluorescence for $\gamma\text{-H2AX}$ labeling (A) or p21 labeling (B) and nucleus detection by using DAPI. The bar corresponds to 10 μm . The arrow heads point to p21-labeled nuclei. C: Western blot analysis of the expression of the indicated protein in 3T3-L1 adipocytes transfected with control siRNA (ctrl) or p53 siRNA and then treated with 10 μM nutlin-3 (nutlin) or with 0.5 μM of doxorubicin. Hsp90 as loading control. A representative experiment was shown.

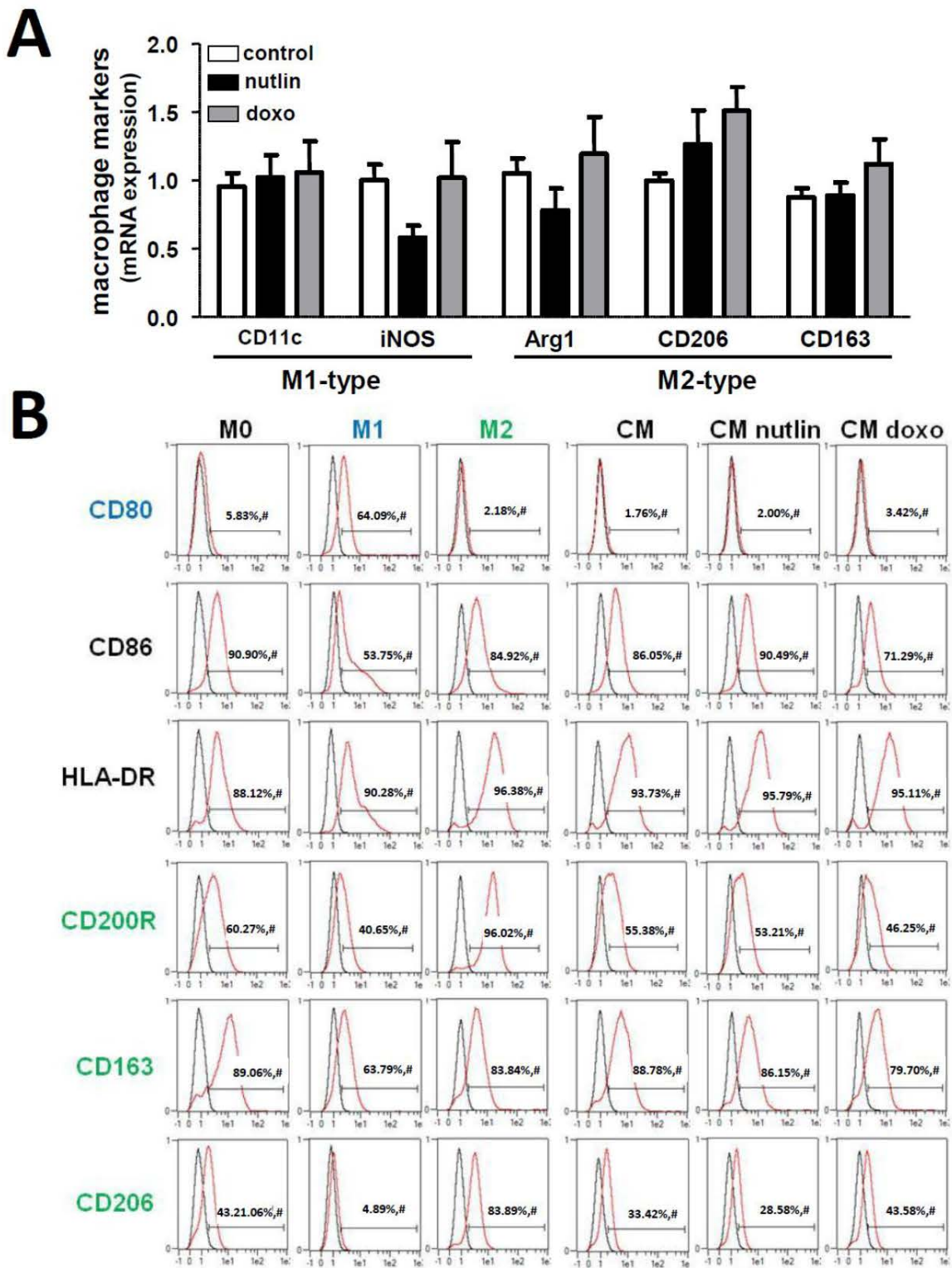


SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Figure 3. Conditioned media from doxorubicin or nutlin-3-treated adipocytes do not modify macrophages polarization

A: 3T3-L1 adipocytes were treated for 48 h with 10 μ M nutlin-3 (nutlin), 24 h with 0.5 μ g/ml doxorubicin (doxo), or vehicle (control). Cells were then thoroughly rinsed and fresh medium was added and the conditioned media was collected for the following 24 h. RAW-blueTM macrophages were incubated with the conditioned media for 24 h and the RNA were extracted in order to quantify the expression of the indicated markers for M1-type and M2-type macrophages. 6-8 independent conditioned media were incubated with macrophages and the results are expressed relative to the mean of the expression of each of the markers in the control condition. No significant differences were observed between the three conditions (ANOVA test). *B:* Blood-derived human monocytes were incubated with 100 ng/ml LPS and 20 ng/ml INF- γ to induce M1 polarization, with 20 ng/ml IL-4 to induce M2 polarization, or with 24 h-conditioned medium (CM) from human adipocytes treated with nutlin (10 μ M/48 h: CM nutlin) or doxorubicin (0.75 μ g/ml for 4 h: CM doxo). The expression of the indicated surface markers for M0 (in black), M1 (blue), and M2 (green) were determined by flow cytometry analysis.

SUPPLEMENTARY DATA

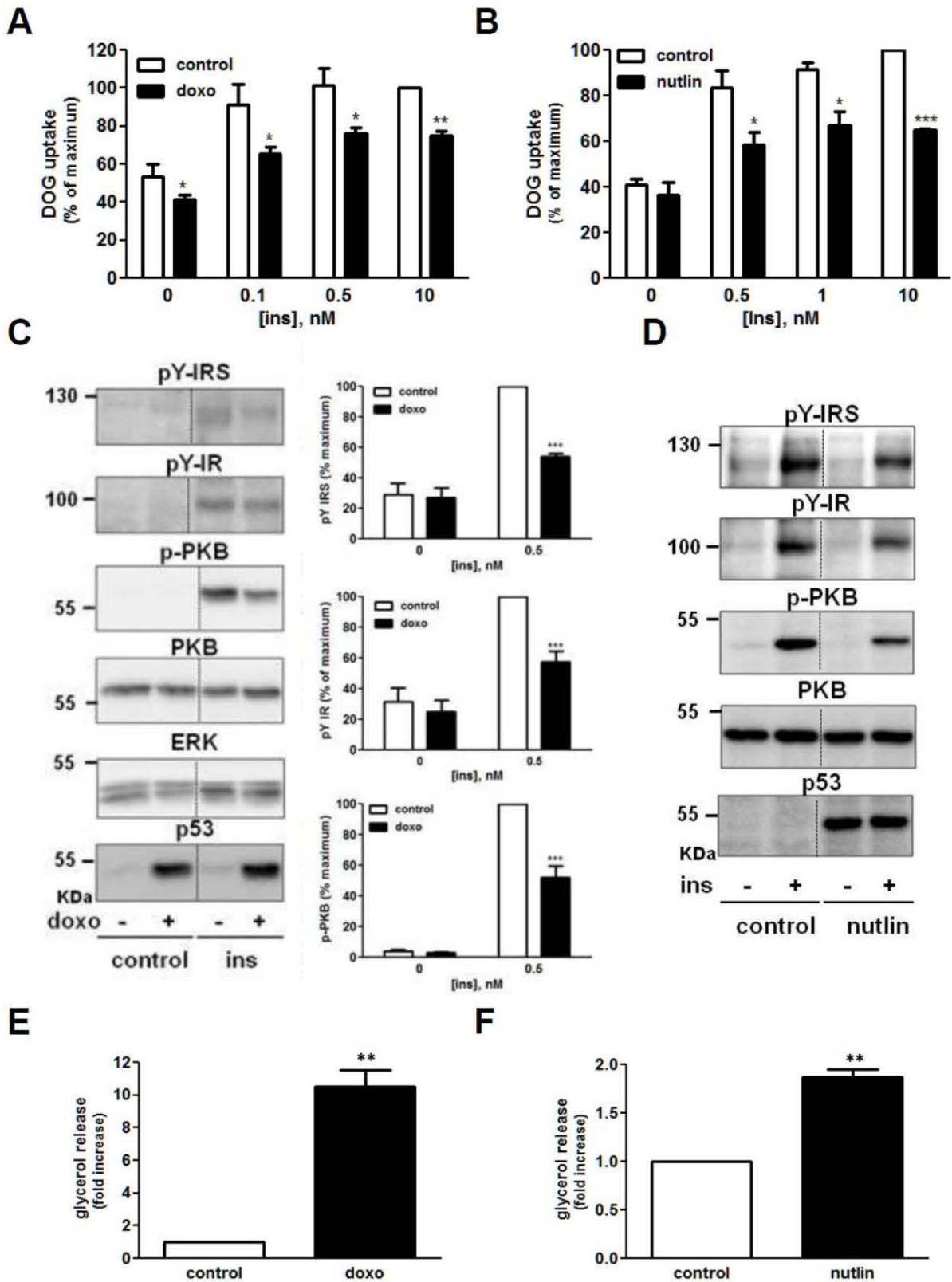


SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Figure 4. Effect of doxorubicin and/or nutlin-3 in human adipocytes on insulin-induced glucose transport, insulin signaling, and lipolysis

A-B: Deoxyglucose (DOG) uptake in human adipocytes treated with 0.75 µg/ml doxorubicin for 24 h (*A*) or 10 µM Nutlin for 48 h (*B*) and stimulated with the indicated concentrations of insulin for 10 min. Data represent means ± SEM of 3 independent experiments with * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ control versus nutlin- or doxorubicin-treated cells. *C*: Human adipocytes were treated with 0.75 µg/ml doxorubicin for 24 h and incubated without or with insulin (ins, 0.5 nM) for 10 min. Western blot analysis of the expression of the indicated protein. Representative immunoblots and means ± SEM of 3 independent experiments are shown. Normalization was performed by quantifying ERK amount in each of the experiments. Data are expressed as percentage of insulin effect in untreated cells stimulated with insulin. *** $p < 0.001$ untreated cells stimulated with insulin vs doxorubicin-treated cells stimulated with insulin. *D*: Human adipocytes were treated with 10 µM nutlin for 48 h and incubated without or with insulin (ins, 0.5 nM) for 10 min before western blot analysis of the indicated proteins. A representative immunoblot is shown and experiment was reproduced once with similar results. *E-F*: Glycerol production by human adipocytes treated with 0.75 µg/ml doxorubicin for 24 h (*C*) or 10 µM nutlin-3 for 48 h (*D*) as an index of lipolysis. Data are means ± SEM of 3 independent experiments with ** $p < 0.01$ control versus nutlin- or doxorubicin-treated cells

SUPPLEMENTARY DATA

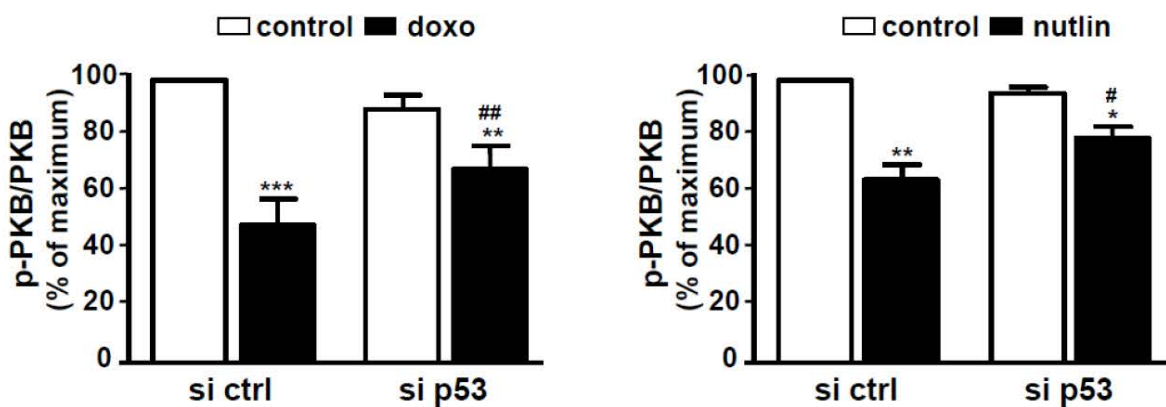


SUPPLEMENTARY DATA

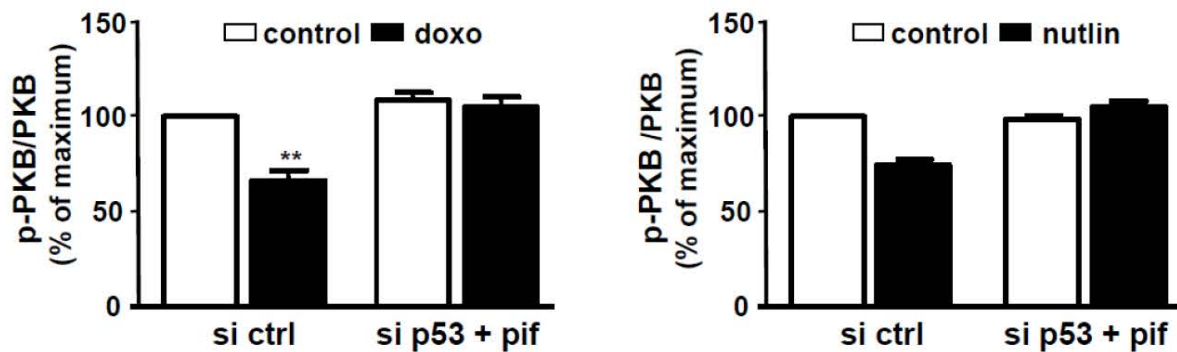
Supplementary Figure 5. p53 silencing partly prevents the inhibitory action of doxorubicin on insulin signaling

A: Western blot analysis of pThr308-PKB and total PKB in 3T3-L1 adipocytes transfected with control siRNA (si Ctrl) or siRNA against p53 (si p53) and incubated without (control) or with doxorubicin (doxo, 0.5 µg/ml) or nutlin-3 (10 µM) for 24 h or 48 h respectively before insulin stimulation (ins, 0.5 nM) for 10 min. Data are means ± SEM of 3 independent experiments and are expressed as % of insulin effect in control cells treated with si Ctrl. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ doxorubicin-treated cells versus control cells; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, si Ctrl doxorubicin-treated cells vs si p53 doxorubicin-treated cells. *B:* Quantification of the ratio of pThr308-PKB/PKB corresponding to the western blots of Figures 7D and E. Graphs represent mean ± SEM of 3 independent experiments for doxorubicin and mean ± SE of 2 independent one for nutlin. ** $p < 0.01$, doxorubicin-treated cells vs control cells.

A



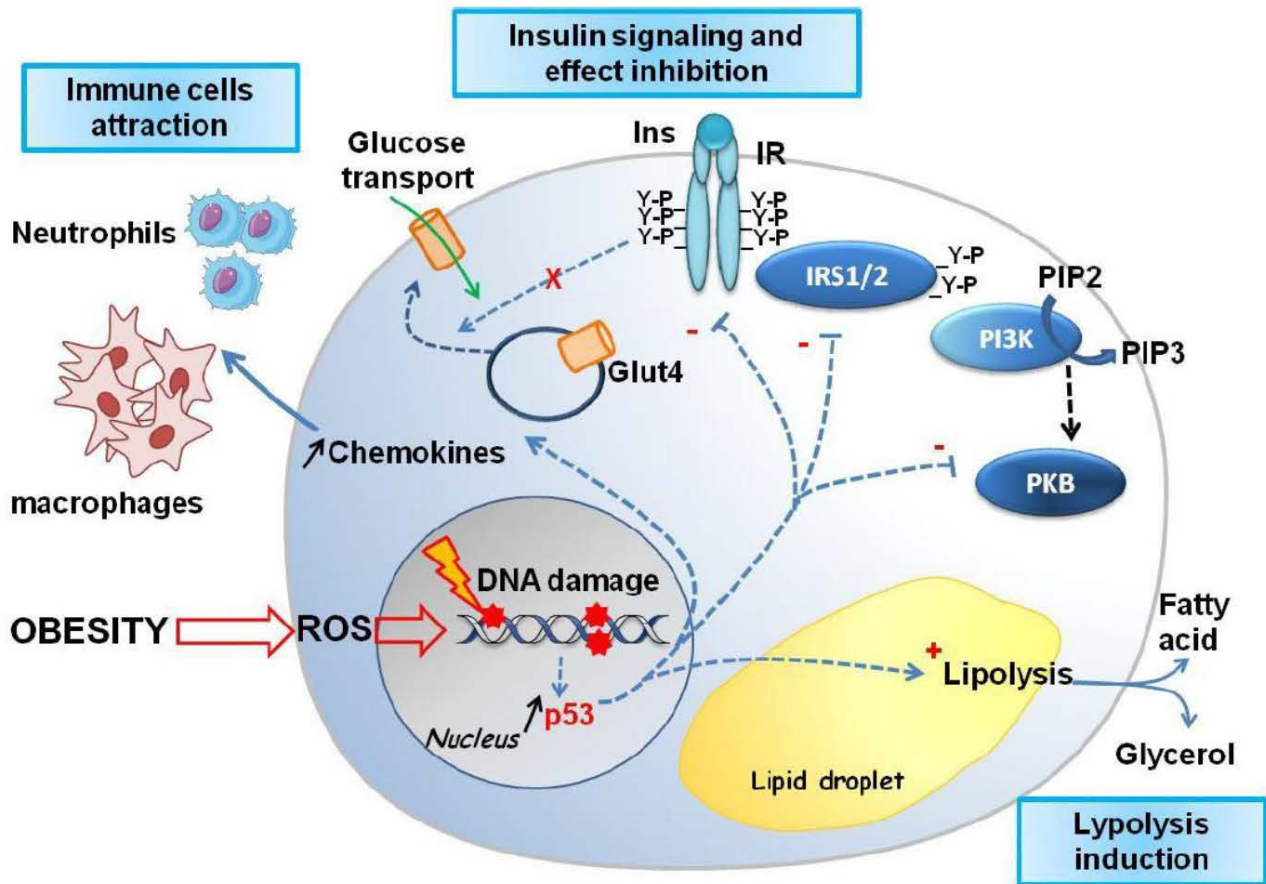
B



SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Figure 6. Schematic representation of the consequences of obesity-induced DNA damage in adipocytes.

ROS production by the AT and adipocytes is increased at the onset of obesity and is accompanied by an increase in DNA damage in adipocytes. The induction of DNA damage in adipocytes induces adipocyte insulin resistance, an increase in its lipolytic activity, and a chemotactic secretome for neutrophil and macrophage. These changes, also observed in obese AT, may trigger a deleterious cross-talk between adipocytes and immune cells leading to AT inflammation and metabolic dysfunctions.



DISCUSSION

Comme décrit dans la partie introduction, des études récentes démontrent l'implication du facteur de transcription p53 dans le développement des maladies métaboliques lors de l'obésité chez le rongeur. Si on se concentre sur le tissu adipeux, plusieurs études ont montré une stabilisation de p53 dans le TA et les adipocytes dans plusieurs modèles d'obésité chez la souris (Minamino et al., 2009; Yahagi et al., 2004), ce que nous confirmons avec des souris soumises à un régime riche en lipide. Notre approche expérimentale utilisant l'imagerie confocale sur des adipocytes isolés permet en plus de dire que la voie p53 est activée dans la majorité des adipocytes lors de l'obésité. En effet, plus de 60 % des adipocytes expriment la cible de p53, p21, lors de l'obésité par rapport à 20 % pour des souris minces. Une augmentation de l'ARNm de p53 et une stabilisation de la protéine ont également été observées dans le tissu adipeux de sujets obèses (Ortega et al., 2014).

Minamino *et al* avait démontré que l'inactivation de p53 dans l'adipocyte protège les souris soumises à un régime riche en lipide et fructose du développement d'une intolérance au glucose et d'une résistance à l'insuline (Minamino et al., 2009). Ces travaux impliquaient donc l'activation de la voie p53 dans l'adipocyte lors de l'obésité dans le développement des désordres métaboliques. Mon travail de thèse a permis **1)** de démontrer que l'activation de la voie p53 dans le TA était un événement précoce lors du développement de l'obésité chez le rongeur; **2)** de proposer un mécanisme responsable de l'activation de p53 dans l'adipocyte; **3)** de proposer des mécanismes reliant activation de la voie p53 et développement de la résistance à l'insuline.

Causes de l'activation de p53 dans les adipocytes lors de l'obésité

Nous montrons que l'activation de la voie p53 (c'est-à-dire la stabilisation de p53 et la transcription d'un gène cible p21) dans le tissu adipeux est détectable dès deux semaines de régime riche en lipide. De façon intéressante, on détecte également dans le TA et les adipocytes dès deux semaines de régime la présence de ROS, comme décrite dans la littérature (voir le sous-chapitre IV.c.i de l'introduction). Ceci précède l'inflammation du tissu adipeux qui n'est donc pas à l'origine de la production de ROS en début de régime. Ceci est donc en accord avec la littérature qui avait montré une augmentation Nox4-

dépendante de la production de ROS par les adipocytes rapidement après le début d'un régime hyperlipidique (Den Hartigh et al., 2017). Les ROS, soit le stress oxydant, sont les inducteurs les plus efficaces de stress génotoxiques conduisant aux dommages à l'ADN, et donc à la stabilisation de p53. Nous avons observé une augmentation du niveau de 8-OHdG dans le TA de souris obèses. Le 8-OHdG correspond à une des forme oxydées de déoxyguanosine par des ROS responsables de cassures double brin de l'ADN (Cooke et al., 2003). De plus, nous avons observé une corrélation positive entre les quantités de 8-OHdG et l'expression p21 dans le tissu adipeux de souris, suggérant que le stress oxydant dans le tissu adipeux est le principal régulateur de l'activité de p53.

Nous montrons que très précocement lors du développement de l'obésité, des dommages à l'ADN s'accumulent dans presque la moitié des adipocytes (**Figure 17**).

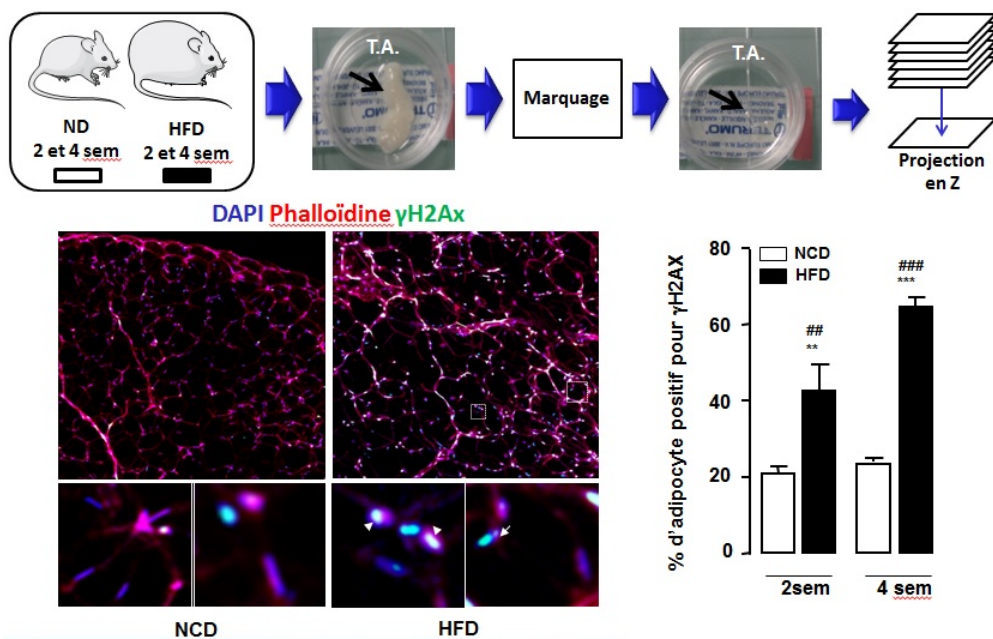


Figure 17. Apparition des dommages à l'ADN aux premiers stades de l'obésité. Des souris ont été nourries avec un régime normal (ND) ou un régime riche en lipide (HFD) pendant 2 ou 4 semaines. Le TA est prélevé, marqué avec les sondes et anticorps adéquates et rendu transparent. Puis des images sont prises au microscope confocal à différents Z. Une projection de toutes les images sur le même plan est opérée. Ces images nous permettent de déterminer si les noyaux (marqués en DAPI) ont ou non des dommages à l'ADN (grâce au marquage γ H2AX). Nous déterminons si un noyau est celui d'un adipocyte ou celui d'une cellule de la fraction stroma vasculaire par co-localisation entre le DAPI et la phalloïdine. En effet, les adipocytes étant de grosses cellules, contrairement aux autres cellules du TA, le noyau ne sera pas entièrement entouré d'actine corticale (marquée par la phalloïdine). Sans dommages à l'ADN, les noyaux des adipocytes seront bleus et en présence de dommages à l'ADN ils seront bleu turquoise. Par contre, les noyaux des petites cellules seront entourés d'actine corticale et après projection sur un même plan ils seront violet en absence de dommages à l'ADN et blanc en présence. Le % d'adipocytes ayant des dommages à l'ADN est ainsi déterminé à 2 et 4 semaines. Adapté de (Vergoni et al., 2016).

Les dommages à l'ADN dus à l'augmentation des ROS pourraient donc être à l'origine de la stabilisation de p53. Il aurait été intéressant de pouvoir étudier la cascade de signalisation entre la relocalisation de γ H2AX et la stabilisation de p53. Malheureusement, les quelques anticorps que nous avons testés, classiquement utilisés dans la littérature pour étudier cette voie, sont vendus comme spécifiques des protéines humaines et n'ont donné aucun signal avec nos échantillons de souris. Les dommages à l'ADN pourraient être amplifiés par une baisse des taux de NAD⁺ car les enzymes permettant la réparation de l'ADN dépendent du NAD⁺ (Tummala et al., 2014). Or, les concentrations tissulaires en NAD⁺ sont diminués lors de l'obésité (Yoshino et al., 2011). L'inhibition de la synthèse de novo de NAD⁺ par l'oncogène URI (unconventional prefoldin RPB5 interactor) induit des dommages à l'ADN dans les hépatocytes (Tummala et al., 2014). URI est surexprimé dans le foie lors de l'obésité. Cette surexpression hépatique de URI, en causant des dommages à l'ADN, a été impliquée dans l'induction d'une réponse inflammatoire Th17. Les auteurs suggèrent que l'IL-17A ainsi produit serait à l'origine de l'infiltration du TA par les neutrophiles, de la lipolyse adipocytaire, de la stéatose hépatique, et de la résistance à l'insuline (Gomes et al., 2016). Des études sont en faveur d'une réponse inflammatoire systémique de type Th17 lors de l'obésité (Endo et al., 2017), avec également plus de Th17 dans le tissu adipeux. L'ensemble des études disponibles ne permet pas de dire si la réponse Th17 systémique précède l'infiltration du TA par les neutrophiles. Par contre, l'apparition des Th17 dans le TA au moins chez la souris est plus tardive que celle des neutrophiles. Les dommages à l'ADN hépatiques pourraient contribuer aux désordres hépatiques sans besoin d'induire une dysfonction du TA. En effet, ces dommages à l'ADN hépatiques pourraient également conduire à l'activation de p53 dans le foie, décrite lors de l'obésité (Méniel et al., 2015), et provoquer les réponses métaboliques décrites dans la partie V.d.2 de l'introduction. Ainsi les dommages à l'ADN dans le foie et dans les adipocytes pourraient contribuer au développement de la résistance à l'insuline lors de l'obésité. Nous sommes en train de déterminer la cinétique d'apparition des dommages à l'ADN dans le foie afin de savoir s'ils apparaissent avant, en même temps ou après ceux retrouvés dans les adipocytes. On peut également se demander si une baisse de NAD⁺ dans les adipocytes, par un mécanisme dépendant ou non de la surexpression de URI, ne pourrait pas contribuer à amplifier les dommages à l'ADN dus au stress oxydatif.

Les dommages à l'ADN sont-ils seuls responsables de la stabilisation de p53 dans les adipocytes lors de l'obésité ? D'autres mécanismes peuvent être proposés à partir de données de la littérature. Une étude récente montre que PTRF, connue également sous le nom de cavin-1 une protéine des cavéoles, est impliquée dans le contrôle de la fonction des ribosomes dans les adipocytes. L'inhibition de PTRF dans les adipocytes conduit à la dysfonction des ribosomes et à l'activation de la voie p53 et cet effet requiert l'intégrité des cavéoles (Liu and Pilch, 2016). De façon intéressante, Regazzetti *et al* ont démontré que l'expression de PTRF était diminuée dans le tissu adipeux viscéral de patients obèses morbides et diabétiques par rapport à des sujets obèses morbides ou minces, suggérant que chez ces patients la baisse de PTRF puisse participer à l'activation de la voie p53. Il serait intéressant de déterminer si les ribosomes sont toujours fonctionnels dans les adipocytes lors de l'obésité et si un défaut existe quand elle se met en place.

Mdm2, l'ubiquitine ligase responsable de l'ubiquitinylation et de la dégradation de p53 est un substrat de la PKB, la kinase impliquée dans les réponses métaboliques de l'insuline. La phosphorylation de Mdm2 par la PKB est activatrice et conduit donc à la déstabilisation de p53 (Gottlieb et al., 2002; Ogawara et al., 2002). Quand l'adipocyte devient résistant à l'insuline lors de l'obésité, p53 pourrait se retrouver stabilisé à cause d'une diminution de sa phosphorylation par la PKB. Aucune étude n'est cependant disponible sur les niveaux d'expression et de phosphorylation de Mdm2 dans les adipocytes lors de l'obésité. Les conséquences d'une inhibition de phosphorylation de Mdm2 pourraient s'étendre aux fonctions de Mdm2 indépendantes de p53 nouvellement décrites, comme son rôle dans le contrôle du métabolisme des acides aminés et de l'homéostasie redox, grâce à ses propriétés de liaison à la chromatine (Riscal et al., 2016).

Ils existent d'autres régulateurs de la fonction/expression de p53 qui pourraient lors de l'obésité participer à sa stabilisation et à son activation. Le microARN miR-34a, transcrit de façon p53-dépendante, est augmenté dans le tissu adipeux et les adipocytes lors de l'obésité (résultats non publiés du laboratoire et (Fu et al., 2014)). Or, miR-34a est connu pour activer p53 dans une boucle de rétrocontrôle positif (Lou et al., 2015), même si cela reste à être démontré dans l'adipocyte.

L'ubiquitine ligase E4F1 induit l'expression d'un programme génique spécifique et dépendant de p53 conduisant à l'inhibition du cycle cellulaire mais pas à l'apoptose (Le Cam et al., 2006). Les niveaux

d'expression de E4F1 serait donc important pour dicter la spécificité de la réponse génique et donc les effets biologiques dépendants de p53. Cependant, cette protéine n'a pas encore été étudiée dans le contexte de l'obésité ni dans l'adipocyte.

Enfin, nous avons montré que le locus *CDKN2A* était induit dans le TA assez rapidement après le début du régime riche en lipide. Nous montrons également sa surexpression dans les adipocytes de souris soumises à un régime riche en lipides pendant 16 semaines ou dans des souris génétiquement obèses *ob/ob* (Figure 18). Le locus *CDKN2A* est également surexprimé dans le tissu adipeux de sujets obèses (communication personnelle du Pr P Arner). Ce locus fait partie du locus *CDKN2A/B* schématisé dans la figure 19. Il code pour les protéines p19^{ARF} (p14^{ARF} chez l'homme) et p16^{INK4A}. Il code également chez l'homme pour un long ARNm non codant ANRIL (Figure 19). P16^{INK4} est un inhibiteur de CDK4/6 (cyclin-dépendent kinase) alors que p19^{ARF} est un inhibiteur de Mdm2.

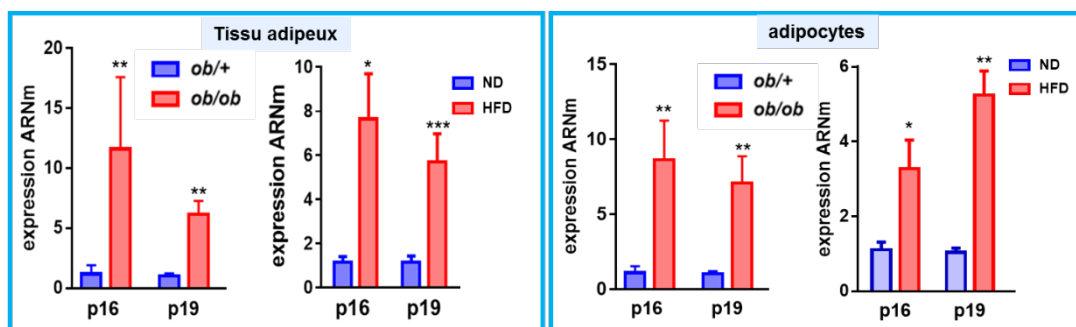


Figure 18. Expression du locus *CDKN2A* dans le tissu adipeux et les adipocytes de souris obèses. Les ARNs ont été extraits à partir de tissu adipeux épididymaire et des adipocytes fraîchement isolés de souris obèses *ob/ob* à l'âge de e12 semaines ou de souris rendues obèses par un régime hyper-lipidique (HFD) de 16 semaines. Les souris minces *ob/+* et les souris alimentées avec un régime normal (ND) sont utilisées en contrôle. Les niveaux d'expression de l'ARNm de p19ARF et de p16INK4A ont été déterminés par RT-qPCR et normalisés par les niveaux de RPLP0. Les résultats sont exprimés par rapport à l'expression dans les souris contrôles minces et correspondent à la moyenne + SEM (n=6-8 par groupes de souris). *,** indiquent que les résultats sont significatifs avec $p < 0.05$ et $p < 0.01$, respectivement.

locus *CDKN2A/B* (Hannou et al., 2015) (**figure 19**). Même si ANRIL n'est pas caractérisé chez la souris, la délétion de la région orthologue porteuse des SNPs chez la souris provoque une inhibition de l'expression du locus *CDKN2A/B* (Visel et al., 2010). Il n'est donc pas exclu que ANRIL soit aussi exprimé chez la souris et qu'un changement de son expression puisse participer à l'induction de p16^{INK4A} et p19^{ARF} dans l'adipocyte lors de l'obésité.

Conséquences de l'activation de la voie p53 dans l'adipocyte

Nous avons donc montré que très tôt après le début d'un régime riche en lipides des dommages à l'ADN étaient détectés et associés à l'activation de la voie p53 dans les adipocytes. L'activation de la voie p53 dans l'adipocyte pouvait donc être proposée comme un événement causal des dysfonctions adipocytaires avec des répercussions possibles sur le tissu adipeux voire l'organisme entier. Nous nous sommes donc demandés qu'elles pouvaient être les conséquences des dommages à l'ADN sur les adipocytes. Les résultats décrits ci-dessous sont résumés dans la **figure 20**.

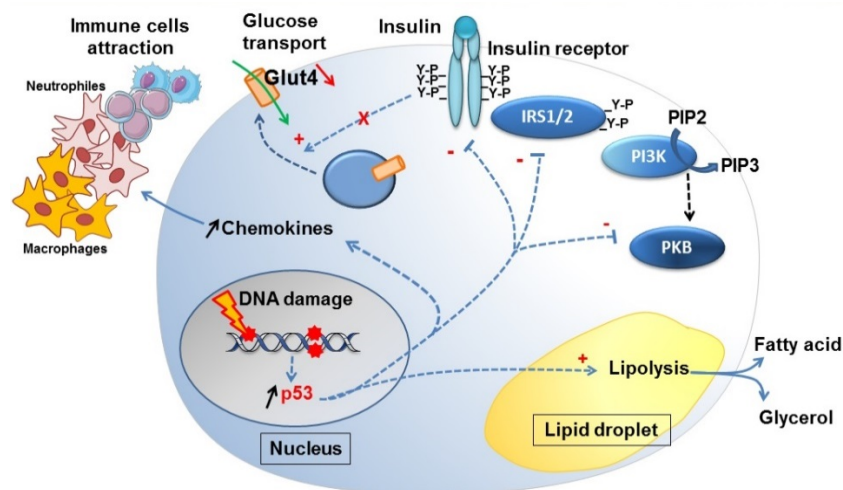


Figure 20. Dommages à l'ADN et activation de p53 dans l'adipocyte lors de l'obésité. Selon (Vergoni et al., 2016).

In vitro, l'induction de dommages à l'ADN à l'aide de la doxorubicine, un agent intercalant également inhibiteur de topoisomérase 2 (Chang et al., 2011) entraîne une inhibition de la signalisation insulinique

avec pour conséquence une inhibition de la stimulation du transport de glucose et de la translocation des transporteurs de glucose Glut4 par l'insuline. Nous ne connaissons pas les mécanismes impliqués. Nous avons cependant exclu la participation de facteurs sécrétés et une augmentation de PTEN (phosphatase and Tensin homolog). PTEN est une phosphatase des PIP3, requis pour l'activation de la PKB, et est une cible caractérisée de p53. Nous n'avons jamais pu mettre en évidence l'induction de PTEN par les dommages à l'ADN ou l'activation pharmacologique de la voie p53 dans les adipocytes, induction de PTEN qui aurait pu conduire à l'inhibition de la PKB. Nous n'avons pas exploré plus en détails les mécanismes possibles en se focalisant plus particulièrement sur les mécanismes connus entraînant l'inhibition de la tyrosine phosphorylation du récepteur de l'insuline (effet sur les cavéoles, expression des inhibiteurs comme SOCS3 et Grb14, expression de tyrosine phosphatases...). Les dommages à l'ADN et l'activation de la voie p53 stimule la lipolyse basale. Nous n'avons observé aucune modification de la lipolyse en réponse à l'isoprotérénol et nous pensons qu'une inhibition d'expression de la périlipine 1 pourrait expliquer cet effet.

Enfin, nous avons montré que les dommages à l'ADN et l'activation de la voie p53 modifiaient les capacités sécrétoires des adipocytes. Les milieux conditionnés d'adipocytes porteurs de dommages à l'ADN attirent plus efficacement les neutrophiles et les macrophages. Les chimiokines impliquées pourraient être CXCL1 pour les neutrophiles et CCL2 et CCL7 pour les macrophages (Ignacio et al., 2016). L'IL-6 également produite dans ces conditions pourrait permettre l'attraction des macrophages (Kraakman et al., 2015; Ley et al., 2013). De façon intéressante et en accord avec notre hypothèse d'un rôle causal des dommages à l'ADN dans les adipocytes dans les désordres métaboliques associés à l'obésité, les événements décrits ci-dessus sont les premiers détectés après le début du régime riche en lipides. Notamment, les milieux conditionnés d'adipocytes porteurs de dommages à l'ADN ne participent pas à l'activation des macrophages *in vitro*, et l'augmentation des macrophages anti-inflammatoires précède celle des macrophages pro-inflammatoires dans le tissu adipeux de souris soumises à un régime riche en lipides. Les modifications des populations de cellules immunitaires, notamment *via* l'augmentation des neutrophiles pourraient engendrer une cascade d'événements conduisant à la polarisation et à l'activation des macrophages au sein du tissu adipeux. L'expérience que nous avons réalisée *in vivo*, consistant à injecter une dose de doxorubicine pour induire de façon aigue

des dommages à l'ADN montrent que cette unique injection suffit à induire l'inflammation dans le tissu adipeux. On ne sait cependant pas si seuls les dommages à l'ADN dans l'adipocyte permettent cette inflammation du fait d'un dialogue modifié entre adipocytes et cellules immunitaires, ou si des dommages à l'ADN hors adipocytes voire même hors du tissu adipeux en sont responsables. Il s'est également avéré que cette inflammation aigue du tissu adipeux n'était pas accompagnée de désordres métaboliques majeurs. Nous avons seulement détecté une augmentation des acides gras circulants probablement le reflet de la lipolyse accrue à cause des dommages à l'ADN dans les adipocytes. On notera cependant, qu'après cette unique injection de doxorubicine et bien que la voie p53 était bien activée dans les adipocytes isolés, nous ne pouvions déjà plus mettre en évidence la présence de dommages à l'ADN au moment du sacrifice (résultats non publiés). Ceci démontre que l'adipocyte a une capacité importante de réparation des dommages à l'ADN et que donc lors de l'obésité le maintien des dommages à l'ADN dans les adipocytes est soit dû à un défaut de réparation soit dû à la présence en continu de stress génotoxique, ou les deux.

En plus des effets publiés décrits ci-dessus, des résultats récents que j'ai pu obtenir montrent que les milieux conditionnés d'adipocytes porteurs de dommages à l'ADN ou avec la voie p53 activée perturbent fortement la différenciation adipocytaire (**Figure 21**) et la croissance/survie des pré-adipocytes (**Figure 22**). Concernant la différenciation adipocytaire, des étapes avant et après l'action de PPAR- γ seraient affectées par les milieux conditionnés puisque l'ajout de rosiglitazone (agoniste pharmacologique de PPAR γ) améliore la différenciation mais sans restaurer un niveau similaire au contrôle (résultats non montrés). La recherche des mécanismes est toujours en cours. Concernant la diminution du nombre de pré-adipocytes par les milieux conditionnés d'adipocytes porteurs de dommages à l'ADN, il semble que ce soit dû au moins en partie à une augmentation de la mort des pré-adipocytes puisque nous observons une augmentation du clivage caspase 3 et de PARP. Nous allons étudier si on observe également une inhibition du cycle cellulaire. En effet, dans une expérience préliminaire, nous avons observé que le milieu conditionné d'adipocytes porteurs de dommages à l'ADN entraînait la stabilisation de p53 dans les pré-adipocytes et provoquait une augmentation de la proportion de pré-adipocytes sénescents (**Figure 23**). Les médiateurs de cette sénescence ne sont pas connus et il nous faudra démontrer si l'activation de p53 fait suite à des dommages à l'ADN et à l'induction du locus

CDKN2A dans les préadipocytes. La mort ou sénescence des pré-adipocytes ainsi que l'inhibition de la différenciation adipocytaire induite à cause des dommages à l'ADN dans les adipocytes pourraient contribuer au défaut d'expansion du tissu adipeux responsable de la lipotoxicité impliquée dans le développement de la résistance à l'insuline.

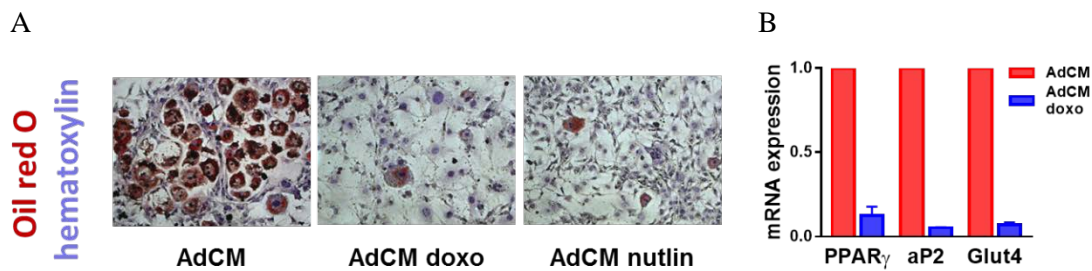


Figure 21. Les milieux conditionnés d'adipocytes porteurs de dommages à l'ADN inhibent la différenciation adipocytaire. Des pré-adipocytes en culture ont été différenciés avec du milieu conditionné par des adipocytes matures. Le milieu est conditionné pendant 2 jours et demi, par des adipocytes matures sans traitement préalable (AdCM) ou avec 24h de traitement à la doxorubicine 0.5 $\mu\text{g/ml}$ pour induire des dommages à l'ADN (AdCM doxo), ou avec 48h de nutline 10 $\mu\text{g/mL}$ pour activer p53 (AdCM nutline). Le cocktail de différenciation ne contient pas de rosiglytazone, agoniste de PPAR γ . A : Les cellules ont été colorées avec de l'oil-red-o. et de l'hématoxyline puis observées par microscopie. B : niveau d'expression des ARNm d'AP2, PPAR γ et GluT4 dans des adipocytes différenciés AdCM et AdCM doxo a été mesuré par RT-qPCR.

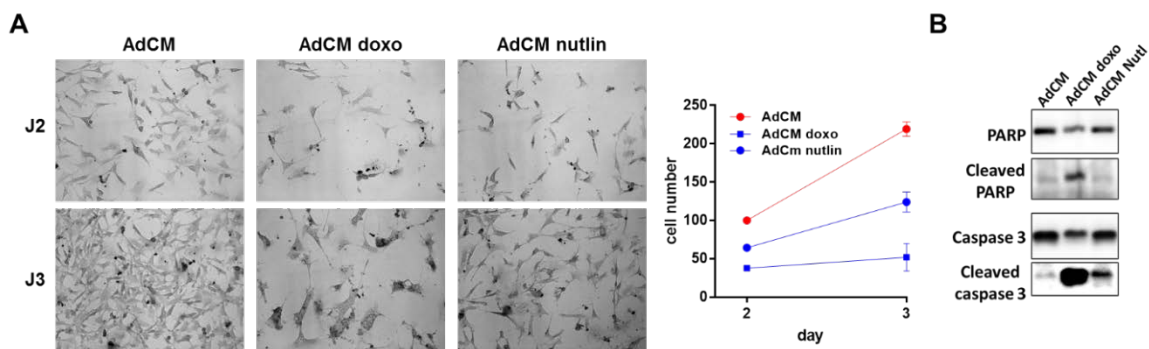


Figure 22. Les milieux conditionnés d'adipocytes porteurs de dommages à l'ADN induisent l'apoptose des préadipocytes. A : Image de culture de pré-adipocyte pendant 2 et 3 jours avec du milieu conditionné d'adipocyte mature sans traitement préalable (AdCM) ou avec 24h de traitement à la doxorubicine 0.5 $\mu\text{g/ml}$ pour induire des dommages à l'ADN (AdCM doxo), ou avec 48h de nutline 10 $\mu\text{g/mL}$ pour activer p53 (AdCM nutline). Leur nombre est ensuite quantifié à 2 et 3 jours. B : À 3 jours de culture, les protéines sont extraites puis analysées par western blot pour observer le clivage de PARP et de la caspase 3.

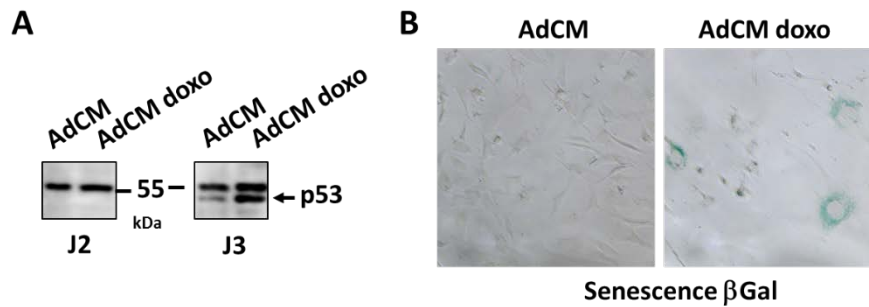


Figure 23. Les milieux conditionnés d'adipocytes porteurs de dommages à l'ADN induisent la sénescence des pré-adipocytes. Culture de pré-adipocyte pendant 2 et 3 jours avec du milieu conditionné d'adipocyte mature sans traitement préalable (AdCM) ou avec 24h de traitement à la doxorubicine 0.5 µg/ml pour induire des dommages à l'ADN (AdCM doxo). A : l'expression de la protéine p53 est mesurée à 2 et 3 jours de culture par Western Blot. B : La sénescence cellulaire des pré-adipocytes à 3 jours de culture avec des milieux conditionnés est mesurée par la détection de la β-galactosidase par un test X-gal.

Comme le nombre de cellules pré-adipocytaires isolées à partir de la fraction stromale du tissu adipeux présentant les caractères de sénescence est augmenté lors de l'obésité (Tchkonia et al., 2010), le sécrétome des adipocytes porteurs de dommages à l'ADN pourrait être un des mécanismes responsables. Nous ne pouvons cependant pas exclure que la sénescence des précurseurs adipocytaires lors de l'obésité puisse être la conséquence de dommages chroniques à l'ADN dans les pré-adipocytes eux-mêmes. Nous avons vu que des dommages à l'ADN sont détectables très tôt après l'initiation d'un régime riche en lipide dans d'autres cellules que les adipocytes (cellules blanches, [figure 17](#)). Ces cellules sont le plus souvent organisées en réseau ressemblant à des vaisseaux sanguins. Or, les progéniteurs adipocytaires blancs et beiges ont cette localisation (Berry et al., 2013; Tang et al., 2008). De plus, il a été montré que lors du vieillissement, les progéniteurs d'adipocytes beiges en devenant sénescents perdaient leur capacité à se différencier avec une répercussion sur l'efficacité à s'adapter au froid (Berry et al., 2017). Un tel mécanisme pourrait également exister lors de l'obésité. Cependant, les cellules du tissu adipeux avec des dommages à l'ADN et localisées en forme de réseau pourraient également être des cellules endothéliales du tissu adipeux. Il a été montré que l'expression de p53 était augmentée dans les cellules endothéliales - de l'aorte, du poumon, et du muscle squelettique- lors de l'obésité. De plus, l'inactivation de p53 dans les cellules endothéliales protège des désordres métaboliques causés par l'obésité (Yokoyama et al., 2014). La contribution d'une éventuelle activation de p53 dans les cellules endothéliales du tissu adipeux n'est cependant pas connue et reste difficile à appréhender expérimentalement. Il est cependant tout à fait plausible que p53 soit également stabilisé dans les cellules

endothéliales du tissu adipeux puisque le groupe du Dr A Bouloumié a montré une augmentation de la proportion de cellules endothéliales sénescents dans le tissu adipeux de sujets obèses (Villaret et al., 2010).

En résumé, l'activation précoce de p53 dans les adipocytes lors de l'obésité pourrait conduire à l'inflammation du tissu adipeux, un défaut d'expansion du tissu adipeux, et à la résistance à l'insuline adipocytaire. Ensemble, ces mécanismes conduiraient à la résistance à l'insuline systémique. En accord, l'inactivation de p53 dans les adipocytes protègent de la résistance à l'insuline chez des souris soumises à un régime riche en lipides et fructose (Minamino et al., 2009). Il faut cependant noter que l'inactivation de p53 dans les adipocytes a été réalisée en utilisant les souris aP2-Cre. Or, il a été décrit que l'utilisation de ces souris pouvait conduire à l'inactivation des gènes floxés dans les macrophages mais aussi dans d'autres cellules (Lee et al., 2013). Minamino *et al* montrent une petite composante myéloïde dans le phénotype observé par des approches de transfert de moelle (Minamino et al., 2009). Il serait tout de même important de reproduire cette étude en utilisant les souris Adiponectine-Cre pour invalider p53 spécifiquement dans les adipocytes.

Rôle de la surexpression de p19^{ARF} dans les adipocytes dans le développement des désordres métaboliques liés à l'obésité

Comme p14^{ARF} contribue à stabiliser p53 (**Figure 24**) dans les adipocytes murins et humains et qu'il est surexprimé dans les adipocytes de souris obèses, nous nous sommes demandés quelles pouvaient être les conséquences de sa surexpression sur les fonctions adipocytaires. Nous montrons que la surexpression de p14^{ARF} entraîne une inhibition de la phosphorylation de la PKB en réponse à l'insuline (**Figure 25**) et l'expression des chimiokines CCL2, CCL9 et CXCL1 (**Figure 26**). La surexpression de p14^{ARF} mime donc les effets de l'inhibiteur pharmacologique de Mdm2, la nutline 3a. La surexpression de p14^{ARF} que nous avons réalisée ne correspond en fait à aucun événement physiopathologique. En effet, p14/p19^{ARF} est exprimé dans les cellules avec un stress génotoxique chronique (dommages à l'ADN chroniques dont les télomères raccourcis). Les conséquences de la surexpression de p14/p19^{ARF}

sur la fonction adipocytaire dans un contexte génotoxique pourraient donc être différentes. C'est en fait ce que suggère une étude récente dans laquelle p19^{ARF} a été surexprimée dans des adipocytes en culture maintenus pendant longtemps en culture (Hasan et al., 2017). Ces « vieux » adipocytes développent un stress oxydatif qui pourrait être à l'origine de dommages à l'ADN et sont caractérisés par une augmentation de l'expression de p19^{ARF} et p16^{INK4A}, Nox4, de CCL2 et d'IL-6 et d'une inhibition de l'expression de PPAR γ , Adiponectine, et Glut4 par rapport à des adipocytes « jeunes ». La surexpression de p19^{ARF} dans les vieux adipocytes inhibe l'expression des ARNm de l'IL-6 et CCL2, l'inverse donc de ce que nous avons observé en surexprimant p14^{ARF} dans des adipocytes « jeunes ». Par contre, dans ces deux conditions l'expression de p19/p14^{ARF}, l'activité de la protéine kinase B est inhibée. Ceci suggère donc que la surexpression de p19^{ARF} puisse affecter de façon différentielle les événements en aval de l'activation de p53 voire également les événements indépendants de p53 quand la cellule se trouve en présence de dommages à l'ADN. Les mécanismes moléculaires responsables de ces effets ne sont pas connus. Cependant il faut noter que dans l'établissement de la sénescence, l'expression de p16^{INK4A} est un médiateur de la sénescence alors que celle de p19^{ARF} est plutôt un frein à la sénescence (Baker et al., 2008).

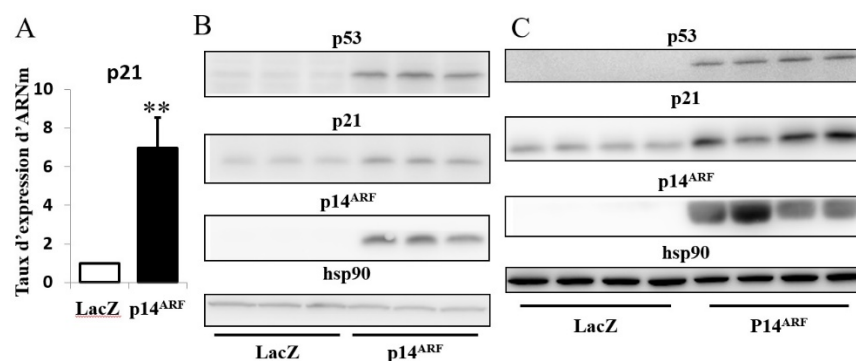


Figure 24. P14^{ARF} stabilise et active p53 dans des adipocytes en culture de souris et des adipocytes primaires humains. Des adipocytes 3T3-L1 exprimant le récepteur CAR (Coxsackie and adenovirus receptor) des adénovirus (A, B) et des adipocytes humains (C) ont été infectés avec un adénovirus codant pour p14^{ARF}. (A) Analyse de l'expression de l'ARNm de p21. (B, C) Analyse de l'expression de p14^{ARF}, p53, p21 et HSP90 en contrôle de charge. ** indique que la différence est significative avec p<0,01.

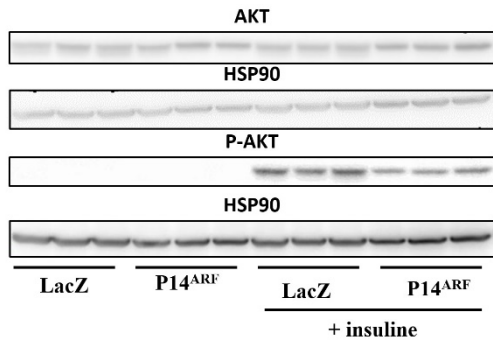


Figure 25. L'expression de P14^{ARF} dans des adipocytes en culture induit une inhibition de la phosphorylation d'AKT en réponse à une stimulation à l'insuline.

Analyse par western blot de l'expression de la protéine AKT et P-AKT. Des adipocytes 3T3-L1 surexprimant le récepteur CAR de l'adénovirus à leurs membranes ont été mis en culture en présence d'adénovirus codant pour LacZ en contrôle ou p14^{ARF}. Les adipocytes sont ensuite stimulés 20 minutes avec 0,5 nM d'insuline.

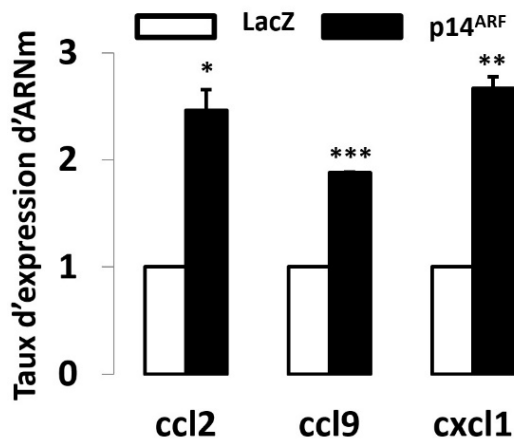


Figure 26. L'expression de P14^{ARF} dans des adipocytes en culture induit l'expression de chemokines pro-inflammatoires.

Analyse par RT-qPCR de l'expression de CCL2, CCL9 et CxCL1. Des adipocytes 3T3-L1 sur-exprimant le récepteur CAR à leurs membranes ont été mis en culture en présence d'adénovirus codant pour LacZ ou de p14^{ARF}. *, ** et *** indiquent que les résultats sont significatifs avec $p < 0.05$, $p < 0.01$ et $p < 0.005$ respectivement.

PERSPECTIVES

Mon travail de thèse permet de proposer que l'activation de p53 dans les adipocytes constitue un événement déclenchant une cascade d'effets (inflammation du tissu adipeux, perturbation des capacités d'expansion du tissu adipeux, résistance à l'insuline adipocytaire) participant aux dysfonctions du tissu adipeux lors de l'obésité et responsables du développement de la résistance à l'insuline.

Dans cette optique, il semble important de déterminer l'ensemble du programme génique codant et non codant contrôlé par p53 en début de régime dans les adipocytes afin de déterminer s'il est possible d'interférer avec ce programme pour empêcher l'installation des défauts. Nous envisageons également de caractériser les facteurs sécrétés responsables des effets notamment sur les pré-adipocytes afin de déterminer s'ils ont une certaine spécificité qui nous permettrait d'envisager de pouvoir les cibler pour restaurer l'expansion du tissu adipeux lors de l'obésité. Les chimiokines qui seraient responsables de l'infiltration du tissu adipeux par les neutrophiles et les macrophages ne sont en effet pas suffisamment spécifiques à l'inflammation du tissu adipeux lors de l'obésité pour pouvoir les cibler.

Il serait également intéressant de mieux comprendre la cascade d'événements qui aboutit à la formation des dommages à l'ADN. L'augmentation du stress oxydatif et plus particulièrement la surexpression de Nox4 dans l'adipocyte observée en début de régime est-elle responsable des dommages à l'ADN et de l'activation de la voie p53 dans les adipocytes ? Y-a-t-il une contribution de la voie p53 mitochondriale dans le développement du stress oxydatif dans l'adipocyte ? Un certain nombre d'études suggère que des antioxydants préviennent des effets délétères de l'obésité (Den Hartigh et al., 2017). Ces antioxydants contrecarrent-ils les dommages à l'ADN et l'activation de la voie p53 dans les adipocytes. Compte tenu du fait que le stress lié à la suralimentation est constant, peut-on envisager d'activer les systèmes de réparation des dommages à l'ADN afin de diminuer ces dommages et réduire l'activation de p53 ? Pour cela, il serait important de caractériser les enzymes impliquées dans la réparation des dommages à l'ADN dans les adipocytes lors de l'obésité et de déterminer si leur activité est affectée par un régime riche en lipide. *In vitro*, la kinase DNA-PK semble jouer un rôle important dans la réparation des dommages à l'ADN des adipocytes (Meulle et al., 2008). Il n'existe cependant pas d'activateur pharmacologique de la DNA-PK. Nous pourrions donc déterminer si son inhibition par des inhibiteurs pharmacologiques spécifiques aggrave les dommages à l'ADN dans les adipocytes lors de l'obésité. Certaines enzymes de réparations de l'ADN étant dépendantes du NAD⁺, on pourrait déterminer les conséquences d'une supplémentation en précurseurs du NAD⁺ tel que l'acide nicotinique (Niacine) présent dans la vitamine B3 sur la quantité de dommages à l'ADN dans les adipocytes de souris soumises à un régime riche en lipides. Est-ce que l'acide nicotinique peut prévenir l'apparition des dommages à l'ADN dans les adipocytes ou d'autres cellules du tissu adipeux et à quelle dose ? L'acide nicotinique est utilisé en clinique pour baisser les taux de cholestérol, diminuer le risque d'infarctus du myocarde chez des sujets avec hypercholestérolémie, et parfois pour traiter l'athérosclérose.

Nous voulons également comprendre le rôle de la surexpression du locus CDKN2A dans l'adipocyte lors de l'obésité. Nous avons commencé par l'étude du rôle de la surexpression de p19^{ARF} dans les adipocytes sur le développement des désordres métaboliques liés à l'obésité. Nous avons obtenu des souris n'exprimant plus p19^{ARF} dans les adipocytes en croisant des souris porteuses de l'allèle floxé de p19^{ARF} avec les souris exprimant la Cre-recombinase sous le contrôle de l'adiponectine. Les souris

viennent d'être mises sous régime riche en lipides. Les premiers résultats seront présentés le jour de la soutenance de la thèse. Nous envisageons ensuite de déterminer le rôle de la surexpression de p16^{INK4A} adipocitaire et de la surexpression du locus CDKN2A dans sa globalité par des approches expérimentales similaires (les souris p16^{INK4A} et CDKN2A floxées sont disponibles).

Il serait également intéressant de déterminer les mécanismes moléculaires responsables de l'augmentation d'expression du locus CDKN2A dans les adipocytes lors de l'obésité. Le lien moléculaire entre dommages à l'ADN chroniques et expression du locus CDKN2A dans l'établissement de la sénescence n'est pas entièrement établi. Il ferait intervenir un changement d'activité du complexe polycombe que nous étudierons dans l'adipocyte lors de l'obésité. Nous essaierons aussi de déterminer si ANRIL est exprimé dans nos modèles murins d'obésité.

En conclusion, l'apparition de dommages à l'ADN dans l'adipocyte est un événement très précoce dans le développement de l'obésité et concomitant à l'apparition d'un stress oxydatif, le principal inducteur des cassures double brin de l'ADN. Ces dommages à l'ADN déclenchent une cascade de signalisation dépendante de p53 qui devrait par analogie à d'autres types cellulaires participer à la restauration de l'homéostasie cellulaire. La diminution de la signalisation insulinique et l'attraction de cellules immunitaires « réparatrices » de tissus endommagés comme les neutrophiles et les macrophages M2 pourraient faire partie de ces mécanismes. Cependant, les effets au sein du tissu adipeux de l'activation de la voie p53 dans l'adipocyte conduisent à des effets délétères dont l'activation des macrophages (Minamino et al., 2009). Les mécanismes ne sont pas connus mais pourraient impliquer la mise en place d'un cercle vicieux entre les adipocytes et les macrophages résidents du TA afin d'installer un état inflammatoire chronique à bas bruit. Il est également possible que les effets observés lors du développement de l'obésité soit la résultante de dommages à l'ADN dans plusieurs types cellulaires du TA. Le rôle de la dérégulation du locus CDKN2A et donc de l'expression de p19^{ARF} et p16^{INK4A}, normalement induit en cas de dommage à l'ADN chronique, dans les mécanismes causant la résistance à l'insuline reste à être élucidé.

BIBLIOGRAPHIE

- Abel, E.D., Peroni, O., Kim, J.K., Kim, Y.B., Boss, O., Hadro, E., Minnemann, T., Shulman, G.I., and Kahn, B.B. (2001). Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature* 409, 729–733.
- Agarwal, M.L., Agarwal, A., Taylor, W.R., and Stark, G.R. (1995). p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 8493–8497.
- Ali, A.T., Hochfeld, W.E., Myburgh, R., and Pepper, M.S. (2013). Adipocyte and adipogenesis. *Eur. J. Cell Biol.* 92, 229–236.
- Amano, S.U., Cohen, J.L., Vangala, P., Tencerova, M., Nicoloso, S.M., Yawe, J.C., Shen, Y., Czech, M.P., and Aouadi, M. (2014). Local proliferation of macrophages contributes to obesity-associated adipose tissue inflammation. *Cell Metab.* 19, 162–171.
- Anhê, F.F., Varin, T. V., Schertzer, J.D., and Marette, A. (2017). The Gut Microbiota as a Mediator of Metabolic Benefits after Bariatric Surgery. *Can. J. Diabetes.*
- Ardilouze, J.-L., Sotorník, R., Dennis, L.A., Fielding, B.A., Frayn, K.N., and Karpe, F. (2012). Failure to increase postprandial blood flow in subcutaneous adipose tissue is associated with tissue resistance to adrenergic stimulation. *Diabetes Metab.* 38, 27–33.
- Atamer, A., Kocyigit, Y., Ecder, S.A., Selek, S., Ilhan, N., Ecder, T., and Atamer, Y. Effect of oxidative stress on antioxidant enzyme activities, homocysteine and lipoproteins in chronic kidney disease. *J. Nephrol.* 21, 924–930.
- Awada, R., Parimisetty, A., and Lefebvre dHellencourt, C. (2013). Influence of Obesity on Neurodegenerative Diseases. In *Neurodegenerative Diseases*, (InTech), p.
- Badimon, L., Oñate, B., and Vilahur, G. (2015). Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells and Their Reparative Potential in Ischemic Heart Disease. *Rev. Esp. Cardiol. (Engl. Ed).* 68, 599–611.
- Baker, D.J., Perez-Terzic, C., Jin, F., Pitel, K.S., Pitel, K., Niederländer, N.J., Jeganathan, K., Yamada, S., Reyes, S., Rowe, L., et al. (2008). Opposing roles for p16Ink4a and p19Arf in senescence and ageing caused by BubR1 insufficiency. *Nat. Cell Biol.* 10, 825–836.
- Baker, S.J., Fearon, E.R., Nigro, J.M., Hamilton, S.R., Preisinger, A.C., Jessup, J.M., vanTuinen, P., Ledbetter, D.H., Barker, D.F., Nakamura, Y., et al. (1989). Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 244, 217–221.
- Bakkenist, C.J., and Kastan, M.B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421, 499–506.
- Ballak, D.B., Stienstra, R., Tack, C.J., Dinarello, C.A., and van Diepen, J.A. (2015). IL-1 family members in the pathogenesis and treatment of metabolic disease: Focus on adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Cytokine* 75, 280–290.
- Barreau, C., Labit, E., Guissard, C., Rouquette, J., Boizeau, M.-L., Gani Koumassi, S., Carrière, A., Jeanson, Y., Berger-Müller, S., Dromard, C., et al. (2016). Regionalization of browning revealed by whole subcutaneous adipose tissue imaging. *Obesity* 24, 1081–1089.
- Bartness, T.J., and Song, C.K. (2007). Thematic review series: adipocyte biology. Sympathetic and sensory innervation of white adipose tissue. *J. Lipid Res.* 48, 1655–1672.
- Bennett, C.N., Ross, S.E., Longo, K.A., Bajnok, L., Hemati, N., Johnson, K.W., Harrison, S.D., and MacDougald, O.A. (2002). Regulation of Wnt signaling during adipogenesis. *J. Biol. Chem.* 277, 30998–31004.
- Bensaad, K., Tsuruta, A., Selak, M.A., Vidal, M.N.C., Nakano, K., Bartrons, R., Gottlieb, E., and Vousden, K.H. (2006). TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell* 126, 107–120.

- Berkers, C., Maddocks, O.K., Cheung, E., Mor, I., and Vousden, K. (2013). Metabolic Regulation by p53 Family Members. *Cell Metab.* *18*, 617–633.
- Berry, D.C., Stenesen, D., Zeve, D., and Graff, J.M. (2013). The developmental origins of adipose tissue. *Development* *140*, 3939–3949.
- Berry, D.C., Jiang, Y., Arpke, R.W., Close, E.L., Uchida, A., Reading, D., Berglund, E.D., Kyba, M., and Graff, J.M. (2017). Cellular Aging Contributes to Failure of Cold-Induced Beige Adipocyte Formation in Old Mice and Humans. *Cell Metab.* *25*, 166–181.
- Bertola, A., Ciucci, T., Rousseau, D., Bourlier, V., Duffaut, C., Bonnafous, S., Blin-Wakkach, C., Anty, R., Iannelli, A., Gugenheim, J., et al. (2012). Identification of adipose tissue dendritic cells correlated with obesity-associated insulin-resistance and inducing Th17 responses in mice and patients. *Diabetes* *61*, 2238–2247.
- Björntorp, P., Gustafson, A., and Persson, B. (1971). Adipose tissue fat cell size and number in relation to metabolism in endogenous hypertriglyceridemia. *Acta Med. Scand.* *190*, 363–367.
- Blüher, M. (2014). Adipokines - removing road blocks to obesity and diabetes therapy. *Mol. Metab.* *3*, 230–240.
- Bogdanovic, E., Kraus, N., Patsouris, D., Diao, L., Wang, V., Abdullahi, A., and Jeschke, M.G. (2015). Endoplasmic reticulum stress in adipose tissue augments lipolysis. *J. Cell. Mol. Med.* *19*, 82–91.
- Bouloumié A, G.J. (2013). Angiogenesis in adipose tissue. In *Physiology and Physiopathology of Adipose Tissue*, p.
- Brahimi-Horn, M.C., and Pouyssegur, J. (2007). Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Lett.* *581*, 3582–3591.
- Brestoff, J.R., Kim, B.S., Saenz, S.A., Stine, R.R., Monticelli, L.A., Sonnenberg, G.F., Thome, J.J., Farber, D.L., Lutfy, K., Seale, P., et al. (2015). Group 2 innate lymphoid cells promote beiging of white adipose tissue and limit obesity. *Nature* *519*, 242–246.
- Bülow, J., Astrup, A., Christensen, N.J., and Kastrup, J. (1987). Blood flow in skin, subcutaneous adipose tissue and skeletal muscle in the forearm of normal man during an oral glucose load. *Acta Physiol. Scand.* *130*, 657–661.
- Caesar, R., Reigstad, C.S., Bäckhed, H.K., Reinhardt, C., Ketonen, M., Lundén, G.Ö., Cani, P.D., and Bäckhed, F. (2012). Gut-derived lipopolysaccharide augments adipose macrophage accumulation but is not essential for impaired glucose or insulin tolerance in mice. *Gut* *61*, 1701–1707.
- Le Cam, L., Linares, L.K., Paul, C., Julien, E., Lacroix, M., Hatchi, E., Triboulet, R., Bossis, G., Shmueli, A., Rodriguez, M.S., et al. (2006). E4F1 Is an Atypical Ubiquitin Ligase that Modulates p53 Effector Functions Independently of Degradation. *Cell* *127*, 775–788.
- Cani, P.D., Amar, J., Iglesias, M.A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A.M., Fava, F., Tuohy, K.M., Chabo, C., et al. (2007). Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes* *56*, 1761–1772.
- Carbone, F., La Rocca, C., and Matarese, G. (2012). Immunological functions of leptin and adiponectin. *Biochimie* *94*, 2082–2088.
- Caricilli, A.M., and Saad, M.J.A. (2014). Gut microbiota composition and its effects on obesity and insulin resistance. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* *17*, 312–318.
- Carnethon, M.R., De Chavez, P.J.D., Biggs, M.L., Lewis, C.E., Pankow, J.S., Bertoni, A.G., Golden, S.H., Liu, K., Mukamal, K.J., Campbell-Jenkins, B., et al. (2012). Association of weight status with mortality in adults with incident diabetes. *JAMA* *308*, 581–590.
- Carolan, E., Tobin, L.M., Mangan, B.A., Corrigan, M., Gaoatswe, G., Byrne, G., Geoghegan, J., Cody, D., O’Connell, J., Winter, D.C., et al. (2015). Altered distribution and increased IL-17 production by mucosal-associated invariant T cells in adult and childhood obesity. *J. Immunol.* *194*, 5775–5780.
- Chang, Y.-L., Lee, H.-J., Liu, S.-T., Lin, Y.-S., Chen, T.-C., Hsieh, T.-Y., Huang, H.-S., and Huang, S.-M.

- (2011). Different roles of p53 in the regulation of DNA damage caused by 1,2-heteroannelated anthraquinones and doxorubicin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *43*, 1720–1728.
- Chartoumpakis, D. V., Ziros, P.G., Psyrogiannis, A.I., Papavassiliou, A.G., Kyriazopoulou, V.E., Sykiotis, G.P., and Habeos, I.G. (2011). Nrf2 Represses FGF21 During Long-Term High-Fat Diet-Induced Obesity in Mice. *Diabetes* *60*, 2465–2473.
- Chatzigeorgiou, A., Chung, K.-J., Garcia-Martin, R., Alexaki, V.-I., Klotzsche-von Ameln, A., Phielers, J., Sprott, D., Kanczkowski, W., Tzanavari, T., Bdeir, M., et al. (2014). Dual role of B7 costimulation in obesity-related nonalcoholic steatohepatitis and metabolic dysregulation. *Hepatology* *60*, 1196–1210.
- Chechi, K., Nedergaard, J., and Richard, D. (2014). Brown adipose tissue as an anti-obesity tissue in humans. *Obes. Rev.* *15*, 92–106.
- Chen, C.-Y., Abell, A.M., Moon, Y.S., and Kim, K.-H. (2012). An advanced glycation end product (AGE)-receptor for AGEs (RAGE) axis restores adipogenic potential of senescent preadipocytes through modulation of p53 protein function. *J. Biol. Chem.* *287*, 44498–44507.
- Cheung, E.C., Ludwig, R.L., and Vousden, K.H. (2012). Mitochondrial localization of TIGAR under hypoxia stimulates HK2 and lowers ROS and cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 20491–20496.
- Colquitt, J.L., Pickett, K., Loveman, E., and Frampton, G.K. (2014). Surgery for weight loss in adults. *Cochrane Database Syst. Rev.* *8*, CD003641.
- Contractor, T., and Harris, C.R. (2012). p53 negatively regulates transcription of the pyruvate dehydrogenase kinase Pdk2. *Cancer Res.* *72*, 560–567.
- Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., and Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* *17*, 1195–1214.
- Cormont, M., and Kaddai, V. (2013). Glucose Transport in White Adipocyte. In *Physiology and Pathophysiology of Adipose Tissue*, (Paris: Springer Paris), pp. 79–99.
- Czech, M.P. (2002). Fat targets for insulin signaling. *Mol. Cell* *9*, 695–696.
- Dam, V., Sikder, T., and Santosa, S. (2016). From neutrophils to macrophages: differences in regional adipose tissue depots. *Obes. Rev.* *17*, 1–17.
- DeFuria, J., Belkina, A.C., Jagannathan-Bogdan, M., Snyder-Cappione, J., Carr, J.D., Nersesova, Y.R., Markham, D., Strissel, K.J., Watkins, A.A., Zhu, M., et al. (2013). B cells promote inflammation in obesity and type 2 diabetes through regulation of T-cell function and an inflammatory cytokine profile. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 5133–5138.
- Deng, J., Liu, S., Zou, L., Xu, C., Geng, B., and Xu, G. (2012). Lipolysis response to endoplasmic reticulum stress in adipose cells. *J. Biol. Chem.* *287*, 6240–6249.
- Deng, T., Lyon, C.J., Minze, L.J., Lin, J., Zou, J., Liu, J.Z., Ren, Y., Yin, Z., Hamilton, D.J., Reardon, P.R., et al. (2013). Class II major histocompatibility complex plays an essential role in obesity-induced adipose inflammation. *Cell Metab.* *17*, 411–422.
- Derdak, Z., Villegas, K.A., Harb, R., Wu, A.M., Sousa, A., and Wands, J.R. (2013). Inhibition of p53 attenuates steatosis and liver injury in a mouse model of non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* *58*, 785–791.
- Ding, X., Luo, Y., Zhang, X., Zheng, H., Yang, X., Yang, X., and Liu, M. (2016). IL-33-driven ILC2/eosinophil axis in fat is induced by sympathetic tone and suppressed by obesity. *J. Endocrinol.* *231*, 35–48.
- Dobrian, A.D., Galkina, E. V, Ma, Q., Hatcher, M., Aye, S.M., Butcher, M.J., Ma, K., Haynes, B.A., Kaplan, M.H., and Nadler, J.L. (2013). STAT4 deficiency reduces obesity-induced insulin resistance and adipose tissue inflammation. *Diabetes* *62*, 4109–4121.
- Duffaut, C., Zakaroff-Girard, A., Bourlier, V., Decaunes, P., Maumus, M., Chiotasso, P., Sengenès, C., Lafontan, M., Galitzky, J., and Bouloumié, A. (2009). Interplay between human adipocytes and T lymphocytes in obesity: CCL20 as an adipochemokine and T lymphocytes as lipogenic modulators. *Arterioscler. Thromb.*

Vasc. Biol. 29, 1608–1614.

Elgazar-Carmon, V., Rudich, A., Hadad, N., and Levy, R. (2008). Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding. *J. Lipid Res.* 49, 1894–1903.

Eljaafari, A., Robert, M., Chehimi, M., Chanon, S., Durand, C., Vial, G., Bendridi, N., Madec, A.-M., Disse, E., Laville, M., et al. (2015). Adipose Tissue-Derived Stem Cells From Obese Subjects Contribute to Inflammation and Reduced Insulin Response in Adipocytes Through Differential Regulation of the Th1/Th17 Balance and Monocyte Activation. *Diabetes* 64, 2477–2488.

Eller, K., Kirsch, A., Wolf, A.M., Sopper, S., Tagwerker, A., Stanzl, U., Wolf, D., Patsch, W., Rosenkranz, A.R., and Eller, P. (2011). Potential role of regulatory T cells in reversing obesity-linked insulin resistance and diabetic nephropathy. *Diabetes* 60, 2954–2962.

Endo, Y., Yokote, K., and Nakayama, T. (2017). The obesity-related pathology and Th17 cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 74, 1231–1245.

Escobedo, N., Proulx, S.T., Karaman, S., Dillard, M.E., Johnson, N., Detmar, M., and Oliver, G. (2016). Restoration of lymphatic function rescues obesity in Prox1-haploinsufficient mice. *JCI Insight* 1.

Fabbrini, E., Cella, M., McCartney, S.A., Fuchs, A., Abumrad, N.A., Pietka, T.A., Chen, Z., Finck, B.N., Han, D.H., Magkos, F., et al. (2013). Association between specific adipose tissue CD4⁺ T-cell populations and insulin resistance in obese individuals. *Gastroenterology* 145, 366-74-3.

Feng, J., Tamaskovic, R., Yang, Z., Brazil, D.P., Merlo, A., Hess, D., and Hemmings, B.A. (2004). Stabilization of Mdm2 via decreased ubiquitination is mediated by protein kinase B/Akt-dependent phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 279, 35510–35517.

Feuerer, M., Herrero, L., Cipolletta, D., Naaz, A., Wong, J., Nayer, A., Lee, J., Goldfine, A.B., Benoist, C., Shoelson, S., et al. (2009). Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat. Med.* 15, 930–939.

Fischer, M., Steiner, L., and Engeland, K. (2014). The transcription factor p53: Not a repressor, solely an activator. *Cell Cycle* 13, 3037–3058.

Franck, D., Tracy, L., Armata, H.L., Delaney, C.L., Jung, D.Y., Ko, H.J., Ong, H., Kim, J.K., Scoble, H., and Sluss, H.K. (2012). Glucose Tolerance in Mice is Linked to the Dose of the p53 Transactivation Domain. *Endocr. Res.* 38, 139–150.

Fridman, J.S., and Lowe, S.W. (2003). Control of apoptosis by p53. *Oncogene* 22, 9030–9040.

Friedman, J.M., and Halaas, J.L. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395, 763–770.

Friedman, J.M., Leibel, R.L., Siegel, D.S., Walsh, J., and Bahary, N. (1991). Molecular mapping of the mouse ob mutation. *Genomics* 11, 1054–1062.

Froguel, P., and Boutin, P. (2001). Genetics of pathways regulating body weight in the development of obesity in humans. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 226, 991–996.

Fu, T., Seok, S., Choi, S., Huang, Z., Suino-Powell, K., Xu, H.E., Kemper, B., and Kemper, J.K. (2014). MicroRNA 34a inhibits beige and brown fat formation in obesity in part by suppressing adipocyte fibroblast growth factor 21 signaling and SIRT1 function. *Mol. Cell. Biol.* 34, 4130–4142.

Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M., and Shimomura, I. (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* 114, 1752–1761.

Genser, L., Poitou, C., Brot-Laroche, É., Rousset, M., Vaillant, J.-C., Clément, K., Thenet, S., and Leturque, A. (2016). [Alteration of intestinal permeability: the missing link between gut microbiota modifications and inflammation in obesity?]. *Med. Sci. (Paris)*. 32, 461–469.

Geurts, L., Neyrinck, A.M., Delzenne, N.M., Knauf, C., and Cani, P.D. (2014). Gut microbiota controls adipose

tissue expansion, gut barrier and glucose metabolism: novel insights into molecular targets and interventions using prebiotics. *Benef. Microbes* 5, 3–17.

Gil, J., and Peters, G. (2006). Regulation of the INK4b/ARF/INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 667–677.

De Girolamo, L., Stanco, D., Salvatori, L., Coroniti, G., Arrigoni, E., Silecchia, G., Russo, M.A., Niada, S., Petrangeli, E., and Brini, A.T. (2013). Stemness and Osteogenic and Adipogenic Potential are Differently Impaired in Subcutaneous and Visceral Adipose Derived Stem Cells (ASCs) Isolated from Obese Donors. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 26, 11–21.

Gnad, T., Scheibler, S., von Kügelgen, I., Scheele, C., Kilić, A., Glöde, A., Hoffmann, L.S., Reverte-Salisa, L., Horn, P., Mutlu, S., et al. (2014). Adenosine activates brown adipose tissue and recruits beige adipocytes via A2A receptors. *Nature* 516, 395–399.

Goldstein, I., Yizhak, K., Madar, S., Goldfinger, N., Ruppin, E., and Rotter, V. (2013). p53 promotes the expression of gluconeogenesis-related genes and enhances hepatic glucose production. *Cancer Metab.* 1, 9.

Gomes, A., Teijeiro, A., Bur'ñ, S., Tummala, K., Yilmaz, M., Waisman, A., Theurillat, J.-P., Perna, C., and Djouder, N. (2016). Metabolic Inflammation-Associated IL-17A Causes Non-alcoholic Steatohepatitis and Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Cell* 30, 161–175.

Goossens, G.H., Bizzarri, A., Venteclef, N., Essers, Y., Cleutjens, J.P., Konings, E., Jocken, J.W.E., Cajlakovic, M., Ribitsch, V., Clement, K., et al. (2011). Increased Adipose Tissue Oxygen Tension in Obese Compared With Lean Men Is Accompanied by Insulin Resistance, Impaired Adipose Tissue Capillarization, and Inflammation. *Circulation* 124, 67–76.

Gottlieb, E., and Vousden, K.H. (2010). p53 regulation of metabolic pathways. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a001040.

Gottlieb, T.M., Leal, J.F.M., Seger, R., Taya, Y., and Oren, M. (2002). Cross-talk between Akt, p53 and Mdm2: possible implications for the regulation of apoptosis. *Oncogene* 21, 1299–1303.

Graham, T.E., Yang, Q., Blüher, M., Hammarstedt, A., Ciaraldi, T.P., Henry, R.R., Wason, C.J., Oberbach, A., Jansson, P.-A., Smith, U., et al. (2006). Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N. Engl. J. Med.* 354, 2552–2563.

Gregor, M.F., and Hotamisligil, G.S. (2007). Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. *J. Lipid Res.* 48, 1905–1914.

Grossman, S.P. (1986). The role of glucose, insulin and glucagon in the regulation of food intake and body weight. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 10, 295–315.

Gual, P., Le Marchand-Brustel, Y., and Tanti, J.-F. (2005). Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie* 87, 99–109.

Guerre-Millo, M. (2008). Adiponectin: An update. *Diabetes Metab.* 34, 12–18.

Guilherme, A., Virbasius, J. V., Puri, V., and Czech, M.P. (2008). Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 367–377.

Hallenborg, P., Petersen, R.K., Kouskoumvekaki, I., Newman, J.W., Madsen, L., and Kristiansen, K. (2016). The elusive endogenous adipogenic PPAR γ agonists: Lining up the suspects. *Prog. Lipid Res.* 61, 149–162.

Hannou, S.A., Wouters, K., Paumelle, R., and Staels, B. (2015). Functional genomics of the CDKN2A/B locus in cardiovascular and metabolic disease: what have we learned from GWASs? *Trends Endocrinol. Metab.* 26, 176–184.

Den Hartigh, L.J., Omer, M., Goodspeed, L., Wang, S., Wietecha, T., O'Brien, K.D., and Han, C.Y. (2017). Adipocyte-Specific Deficiency of NADPH Oxidase 4 Delays the Onset of Insulin Resistance and Attenuates Adipose Tissue Inflammation in Obesity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 37, 466–475.

Hasan, A.U., Ohmori, K., Hashimoto, T., Kamitori, K., Yamaguchi, F., Konishi, K., Noma, T., Igarashi, J.,

- Yamashita, T., Hirano, K., et al. (2017). Increase in tumor suppressor Arf compensates gene dysregulation in in vitro aged adipocytes. *Biogerontology* *18*, 55–68.
- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., and Oren, M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* *387*, 296–299.
- Herman, M.A., Peroni, O.D., Villoria, J., Schön, M.R., Abumrad, N.A., Blüher, M., Klein, S., and Kahn, B.B. (2012). A novel ChREBP isoform in adipose tissue regulates systemic glucose metabolism. *Nature* *484*, 333–338.
- Ho, J., and Benchimol, S. (2003). Transcriptional repression mediated by the p53 tumour suppressor. *Cell Death Differ.* *10*, 404–408.
- Hodson, L. (2014). Adipose tissue oxygenation. *Adipocyte* *3*, 75–80.
- Hodson, L., Humphreys, S.M., Karpe, F., and Frayn, K.N. (2013). Metabolic signatures of human adipose tissue hypoxia in obesity. *Diabetes* *62*, 1417–1425.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., and Harris, C.C. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science* *253*, 49–53.
- Homayounfar, R., Jeddi-Tehrani, M., Cheraghpour, M., Ghorbani, A., and Zand, H. (2015). Relationship of p53 accumulation in peripheral tissues of high-fat diet-induced obese rats with decrease in metabolic and oncogenic signaling of insulin. *Gen. Comp. Endocrinol.* *214*, 134–139.
- Hoshino, A., Ariyoshi, M., Okawa, Y., Kaimoto, S., Uchihashi, M., Fukai, K., Iwai-Kanai, E., Ikeda, K., Ueyama, T., Ogata, T., et al. (2014). Inhibition of p53 preserves Parkin-mediated mitophagy and pancreatic β -cell function in diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 3116–3121.
- Hosogai, N., Fukuhara, A., Oshima, K., Miyata, Y., Tanaka, S., Segawa, K., Furukawa, S., Tochino, Y., Komuro, R., Matsuda, M., et al. (2007). Adipose Tissue Hypoxia in Obesity and Its Impact on Adipocytokine Dysregulation. *Diabetes* *56*, 901–911.
- Hotamisligil, G.S., and Erbay, E. (2008). Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 923–934.
- Hu, W., Zhang, C., Wu, R., Sun, Y., Levine, A., and Feng, Z. (2010). Glutaminase 2, a novel p53 target gene regulating energy metabolism and antioxidant function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 7455–7460.
- Huang, Q., Liu, M., Du, X., Zhang, R., Xue, Y., Zhang, Y., Zhu, W., Li, D., Zhao, A., and Liu, Y. (2014). Role of p53 in preadipocyte differentiation. *Cell Biol. Int.* *38*, 1384–1393.
- Huh, J.Y., Park, Y.J., Ham, M., and Kim, J.B. (2014). Crosstalk between adipocytes and immune cells in adipose tissue inflammation and metabolic dysregulation in obesity. *Mol. Cells* *37*, 365–371.
- Ignacio, R.M.C., Gibbs, C.R., Lee, E.-S., and Son, D.-S. (2016). Differential Chemokine Signature between Human Preadipocytes and Adipocytes. *Immune Netw.* *16*, 189.
- Isakson, P., Hammarstedt, A., Gustafson, B., and Smith, U. (2009). Impaired preadipocyte differentiation in human abdominal obesity: role of Wnt, tumor necrosis factor- α , and inflammation. *Diabetes* *58*, 1550–1557.
- Jager, J., Grémeaux, T., Cormont, M., Le Marchand-Brustel, Y., and Tanti, J.-F. (2007). Interleukin-1 β -induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression. *Endocrinology* *148*, 241–251.
- Jiang, C., Qu, A., Matsubara, T., Chanturiya, T., Jou, W., Gavrilova, O., Shah, Y.M., and Gonzalez, F.J. (2011). Disruption of hypoxia-inducible factor 1 in adipocytes improves insulin sensitivity and decreases adiposity in high-fat diet-fed mice. *Diabetes* *60*, 2484–2495.
- Josefowicz, S.Z., Lu, L.-F., and Rudensky, A.Y. (2012). Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function. *Annu. Rev. Immunol.* *30*, 531–564.
- Kabon, B., Nagele, A., Reddy, D., Eagon, C., Fleshman, J.W., Sessler, D.I., and Kurz, A. (2004). Obesity

decreases perioperative tissue oxygenation. *Anesthesiology* 100, 274–280.

Kaddai, V., Le Marchand-Brustel, Y., and Cormont, M. (2007). Rab proteins in endocytosis and Glut4 trafficking. *Acta Physiol.* 192, 75–88.

Kaelin, W.G., and Ratcliffe, P.J. (2008). Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol. Cell* 30, 393–402.

Kamei, N., Tobe, K., Suzuki, R., Ohsugi, M., Watanabe, T., Kubota, N., Ohtsuka-Kowatari, N., Kumagai, K., Sakamoto, K., Kobayashi, M., et al. (2006). Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J. Biol. Chem.* 281, 26602–26614.

Kamigaki, M., Sakaue, S., Tsujino, I., Ohira, H., Ikeda, D., Itoh, N., Ishimaru, S., Ohtsuka, Y., and Nishimura, M. (2006). Oxidative stress provokes atherogenic changes in adipokine gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 339, 624–632.

Kang, K., Reilly, S.M., Karabacak, V., Gangl, M.R., Fitzgerald, K., Hatano, B., and Lee, C.-H. (2008). Adipocyte-derived Th2 cytokines and myeloid PPARdelta regulate macrophage polarization and insulin sensitivity. *Cell Metab.* 7, 485–495.

Kawasaki, N., Asada, R., Saito, A., Kanemoto, S., and Imaizumi, K. (2012). Obesity-induced endoplasmic reticulum stress causes chronic inflammation in adipose tissue. *Sci. Rep.* 2, 799.

Kern, S.E., Kinzler, K.W., Bruskin, A., Jarosz, D., Friedman, P., Prives, C., and Vogelstein, B. (1991). Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science* 252, 1708–1711.

Khan, I.M., Dai Perrard, X.-Y., Perrard, J.L., Mansoori, A., Smith, C.W., Wu, H., and Ballantyne, C.M. (2014a). Attenuated adipose tissue and skeletal muscle inflammation in obese mice with combined CD4+ and CD8+ T cell deficiency. *Atherosclerosis* 233, 419–428.

Khan, M.T., Nieuwdorp, M., and Bäckhed, F. (2014b). Microbial modulation of insulin sensitivity. *Cell Metab.* 20, 753–760.

Kim, F., Pham, M., Maloney, E., Rizzo, N.O., Morton, G.J., Wisse, B.E., Kirk, E.A., Chait, A., and Schwartz, M.W. (2008). Vascular inflammation, insulin resistance, and reduced nitric oxide production precede the onset of peripheral insulin resistance. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 1982–1988.

Kim, H.-R., Roe, J.-S., Lee, J.-E., Cho, E.-J., and Youn, H.-D. (2013). p53 regulates glucose metabolism by miR-34a. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 437, 225–231.

Kraakman, M., Kammoun, H., Allen, T., Deswaerte, V., Henstridge, D., Estevez, E., Matthews, V., Neill, B., White, D., Murphy, A., et al. (2015). Blocking IL-6 trans-Signaling Prevents High-Fat Diet-Induced Adipose Tissue Macrophage Recruitment but Does Not Improve Insulin Resistance. *Cell Metab.* 21, 403–416.

Kung, C.-P., Leu, J.I.-J., Basu, S., Khaku, S., Anokye-Danso, F., Liu, Q., George, D.L., Ahima, R.S., and Murphy, M.E. (2016). The P72R Polymorphism of p53 Predisposes to Obesity and Metabolic Dysfunction. *Cell Rep.* 14, 2413–2425.

Kusminski, C.M., Bickel, P.E., and Scherer, P.E. (2016). Targeting adipose tissue in the treatment of obesity-associated diabetes. *Nat. Rev. Drug Discov.* 15, 639–660.

Laferrère, B., Heshka, S., Wang, K., Khan, Y., McGinty, J., Teixeira, J., Hart, A.B., and Olivan, B. (2007). Incretin levels and effect are markedly enhanced 1 month after Roux-en-Y gastric bypass surgery in obese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 30, 1709–1716.

Lafontan, M., and Langin, D. (2009). Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog. Lipid Res.* 48, 275–297.

Lawler, H.M., Underkofler, C.M., Kern, P.A., Erickson, C., Bredbeck, B., and Rasouli, N. (2016). Adipose Tissue Hypoxia, Inflammation, and Fibrosis in Obese Insulin-Sensitive and Obese Insulin-Resistant Subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 101, 1422–1428.

Lee, B.-C., Kim, M.-S., Pae, M., Yamamoto, Y., Eberlé, D., Shimada, T., Kamei, N., Park, H.-S., Sasorith, S.,

- Woo, J.R., et al. (2016). Adipose Natural Killer Cells Regulate Adipose Tissue Macrophages to Promote Insulin Resistance in Obesity. *Cell Metab.* *23*, 685–698.
- Lee, K.Y., Russell, S.J., Ussar, S., Boucher, J., Vernochet, C., Mori, M.A., Smyth, G., Rourk, M., Cederquist, C., Rosen, E.D., et al. (2013). Lessons on Conditional Gene Targeting in Mouse Adipose Tissue. *Diabetes* *62*, 864–874.
- Lee, S.H., Lee, S.H., Kim, C.H., Yang, K.S., Lee, E.J., Min, K.H., Hur, G.Y., Lee, S.H., Lee, S.Y., Kim, J.H., et al. (2014). Increased expression of vascular endothelial growth factor and hypoxia inducible factor-1 α in lung tissue of patients with chronic bronchitis. *Clin. Biochem.* *47*, 552–559.
- Lefterova, M.I., and Lazar, M.A. (2009). New developments in adipogenesis. *Trends Endocrinol. Metab.* *20*, 107–114.
- Lehr, S., Hartwig, S., Lamers, D., Famulla, S., Müller, S., Hanisch, F.-G., Cuvelier, C., Ruige, J., Eckardt, K., Ouwens, D.M., et al. (2012). Identification and validation of novel adipokines released from primary human adipocytes. *Mol. Cell. Proteomics* *11*, M111.010504.
- Ley, S., Weigert, A., Hériché, J.-K., Mille-Baker, B., Janssen, R.A.J., and Brüne, B. (2013). RNAi screen in apoptotic cancer cell-stimulated human macrophages reveals co-regulation of IL-6/IL-10 expression. *Immunobiology* *218*, 40–51.
- Li, M., Brooks, C.L., Wu-Baer, F., Chen, D., Baer, R., and Gu, W. (2003). Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science* *302*, 1972–1975.
- Li, Y., Zhang, T., Huang, Q., Sun, Y., Chang, X., Zhang, H., Zhu, Y., and Han, X. (2016). Inhibition of tumor suppressor p53 preserves glycation-serum induced pancreatic beta-cell demise. *Endocrine* *54*, 383–395.
- Liu, L., and Pilch, P.F. (2016). PTRF/Cavin-1 promotes efficient ribosomal RNA transcription in response to metabolic challenges. *Elife* *5*.
- Loebig, M., Klement, J., Schmoller, A., Betz, S., Heuck, N., Schweiger, U., Peters, A., Schultes, B., and Oltmanns, K.M. (2010). Evidence for a relationship between VEGF and BMI independent of insulin sensitivity by glucose clamp procedure in a homogenous group healthy young men. *PLoS One* *5*, e12610.
- Longo, K.A., Wright, W.S., Kang, S., Gerin, I., Chiang, S.-H., Lucas, P.C., Opp, M.R., and MacDougald, O.A. (2004). Wnt10b inhibits development of white and brown adipose tissues. *J. Biol. Chem.* *279*, 35503–35509.
- Lou, G., Liu, Y., Wu, S., Xue, J., Yang, F., Fu, H., Zheng, M., and Chen, Z. (2015). The p53/miR-34a/SIRT1 Positive Feedback Loop in Quercetin-Induced Apoptosis. *Cell. Physiol. Biochem.* *35*, 2192–2202.
- Lovis, P., Roggli, E., Laybutt, D.R., Gattesco, S., Yang, J.-Y., Widmann, C., Abderrahmani, A., and Regazzi, R. (2008). Alterations in microRNA expression contribute to fatty acid-induced pancreatic beta-cell dysfunction. *Diabetes* *57*, 2728–2736.
- Maddocks, O.D.K., and Vousden, K.H. (2011). Metabolic regulation by p53. *J. Mol. Med. (Berl)*. *89*, 237–245.
- Maeda, N., Shimomura, I., Kishida, K., Nishizawa, H., Matsuda, M., Nagaretani, H., Furuyama, N., Kondo, H., Takahashi, M., Arita, Y., et al. (2002). Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat. Med.* *8*, 731–737.
- Magalhaes, I., Pingris, K., Poitou, C., Bessoles, S., Venteclef, N., Kiaf, B., Beaudoin, L., Da Silva, J., Allatif, O., Rossjohn, J., et al. (2015). Mucosal-associated invariant T cell alterations in obese and type 2 diabetic patients. *J. Clin. Invest.* *125*, 1752–1762.
- Malhotra, J.D., and Kaufman, R.J. (2007). Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid. Redox Signal.* *9*, 2277–2293.
- Marcel, V., and Hainaut, P. (2009). p53 isoforms - A conspiracy to kidnap p53 tumor suppressor activity? *Cell. Mol. Life Sci.* *66*, 391–406.
- Marseglia, L., Manti, S., D'Angelo, G., Nicotera, A., Parisi, E., Di Rosa, G., Gitto, E., and Arrigo, T. (2014). Oxidative Stress in Obesity: A Critical Component in Human Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* *16*, 378–400.

- Matoba, S., Kang, J.-G., Patino, W.D., Wragg, A., Boehm, M., Gavrilova, O., Hurley, P.J., Bunz, F., and Hwang, P.M. (2006). p53 Regulates Mitochondrial Respiration. *Science* (80-.). *312*, 1650–1653.
- Mattson, M.P. (2010). Perspective: Does brown fat protect against diseases of aging? *Ageing Res. Rev.* *9*, 69–76.
- Mayo, L.D., and Donner, D.B. (2001). A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 11598–11603.
- Mazière, C., Louvet, L., Gomila, C., Kamel, S., Massy, Z., and Mazière, J.-C. (2009). Oxidized low density lipoprotein decreases Rankl-induced differentiation of osteoclasts by inhibition of Rankl signaling. *J. Cell. Physiol.* *221*, 572–578.
- Meek, D.W. (2009). Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? *Nat. Rev. Cancer* *9*, 714–723.
- Meek, D.W. (2015). Regulation of the p53 response and its relationship to cancer. *Biochem. J.* *469*.
- Mehta, P., Nuotio-Antar, A.M., and Smith, C.W. (2015). $\gamma\delta$ T cells promote inflammation and insulin resistance during high fat diet-induced obesity in mice. *J. Leukoc. Biol.* *97*, 121–134.
- Méniel, V., Megges, M., Young, M.A., Cole, A., Sansom, O.J., and Clarke, A.R. (2015). Apc and p53 interaction in DNA damage and genomic instability in hepatocytes. *Oncogene* *34*, 4118–4129.
- Meulle, A., Salles, B., Daviaud, D., Valet, P., and Muller, C. (2008). Positive regulation of DNA double strand break repair activity during differentiation of long life span cells: the example of adipogenesis. *PLoS One* *3*, e3345.
- Meyre, D., and Froguel, P. (2012). L'obésité dans les gènes ? - Pour la Science.
- Min, S.Y., Kady, J., Nam, M., Rojas-Rodriguez, R., Berkenwald, A., Kim, J.H., Noh, H.-L., Kim, J.K., Cooper, M.P., Fitzgibbons, T., et al. (2016). Human “brite/beige” adipocytes develop from capillary networks, and their implantation improves metabolic homeostasis in mice. *Nat. Med.* *22*, 312–318.
- Minamino, T., Orimo, M., Shimizu, I., Kunieda, T., Yokoyama, M., Ito, T., Nojima, A., Nabetani, A., Oike, Y., Matsubara, H., et al. (2009). A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nat. Med.* *15*, 1082–1087.
- Miranville, A., Heeschen, C., Sengenès, C., Curat, C.A., Busse, R., and Bouloumié, A. (2004). Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation* *110*, 349–355.
- Molchadsky, A., Ezra, O., Amendola, P.G., Krantz, D., Kogan-Sakin, I., Buganim, Y., Rivlin, N., Goldfinger, N., Folgiero, V., Falcioni, R., et al. (2013). p53 is required for brown adipogenic differentiation and has a protective role against diet-induced obesity. *Cell Death Differ.* *20*, 774–783.
- Molofsky, A.B., Nussbaum, J.C., Liang, H.-E., Van Dyken, S.J., Cheng, L.E., Mohapatra, A., Chawla, A., and Locksley, R.M. (2013). Innate lymphoid type 2 cells sustain visceral adipose tissue eosinophils and alternatively activated macrophages. *J. Exp. Med.* *210*, 535–549.
- Momand, J., Zambetti, G.P., Olson, D.C., George, D., and Levine, A.J. (1992). The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* *69*, 1237–1245.
- Moon, Y.S., Smas, C.M., Lee, K., Villena, J.A., Kim, K.-H., Yun, E.J., and Sul, H.S. (2002). Mice lacking paternally expressed Pref-1/Dlk1 display growth retardation and accelerated adiposity. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 5585–5592.
- Moraes-Vieira, P.M., Yore, M.M., Dwyer, P.M., Syed, I., Aryal, P., and Kahn, B.B. (2014). RBP4 activates antigen-presenting cells, leading to adipose tissue inflammation and systemic insulin resistance. *Cell Metab.* *19*, 512–526.
- Moraes-Vieira, P.M., Saghatelian, A., and Kahn, B.B. (2016). GLUT4 Expression in Adipocytes Regulates De Novo Lipogenesis and Levels of a Novel Class of Lipids With Antidiabetic and Anti-inflammatory Effects. *Diabetes* *65*, 1808–1815.

- Morigny, P., Houssier, M., Mouisel, E., and Langin, D. (2016). Adipocyte lipolysis and insulin resistance. *Biochimie* 125, 259–266.
- Moroz, E., Carlin, S., Dyomina, K., Burke, S., Thaler, H.T., Blasberg, R., and Serganova, I. (2009). Real-time imaging of HIF-1 α stabilization and degradation. *PLoS One* 4, e5077.
- Morton, G.J., Cummings, D.E., Baskin, D.G., Barsh, G.S., and Schwartz, M.W. (2006). Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443, 289–295.
- Müller, G., Ertl, J., Gerl, M., and Preibisch, G. (1997). Leptin impairs metabolic actions of insulin in isolated rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* 272, 10585–10593.
- Ng, M., Fleming, T., Robinson, M., Thomson, B., Graetz, N., Margono, C., Mullany, E.C., Biryukov, S., Abbafati, C., Abera, S.F., et al. (2014). Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 384, 766–781.
- Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Eto, K., Yamashita, H., Ohsugi, M., Otsu, M., Hara, K., Ueki, K., Sugiura, S., et al. (2009). CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat. Med.* 15, 914–920.
- O'May, G.A., Reynolds, N., and Macfarlane, G.T. (2005). Effect of pH on an in vitro model of gastric microbiota in enteral nutrition patients. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4777–4783.
- O'Sullivan, T.E., Rapp, M., Fan, X., Weizman, O.-E., Bhardwaj, P., Adams, N.M., Walzer, T., Dannenberg, A.J., and Sun, J.C. (2016). Adipose-Resident Group 1 Innate Lymphoid Cells Promote Obesity-Associated Insulin Resistance. *Immunity* 45, 428–441.
- ObEpi-Roche (2012). ObEpi-Roche 2012 : enquête nationale sur l'obésité et le surpoids.
- Ogawara, Y., Kishishita, S., Obata, T., Isazawa, Y., Suzuki, T., Tanaka, K., Masuyama, N., and Gotoh, Y. (2002). Akt enhances Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *J. Biol. Chem.* 277, 21843–21850.
- Okita, N., Ishikawa, N., Mizunoe, Y., Oku, M., Nagai, W., Suzuki, Y., Matsushima, S., Mikami, K., Okado, H., Sasaki, T., et al. (2014). Inhibitory effect of p53 on mitochondrial content and function during adipogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 446, 91–97.
- Ortega, F.J., Moreno-Navarrete, J.M., Mayas, D., Serino, M., Rodriguez-Hermosa, J.I., Ricart, W., Luche, E., Burcelin, R., Tinahones, F.J., Frühbeck, G., et al. (2014). Inflammation and insulin resistance exert dual effects on adipose tissue tumor protein 53 expression. *Int. J. Obes.* 38, 737–745.
- Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A.-H., Iwakoshi, N.N., Ozdelen, E., Tuncman, G., Görgün, C., Glimcher, L.H., and Hotamisligil, G.S. (2004). Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 306, 457–461.
- Pagliassotti, M.J., Kim, P.Y., Estrada, A.L., Stewart, C.M., and Gentile, C.L. (2016). Endoplasmic reticulum stress in obesity and obesity-related disorders: An expanded view. *Metabolism* 65, 1238–1246.
- Panasiuk, A., Dzieciol, J., Panasiuk, B., and Prokopowicz, D. (2006). Expression of p53, Bax and Bcl-2 proteins in hepatocytes in non-alcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* 12, 6198–6202.
- Pasarica, M., Sereda, O.R., Redman, L.M., Albarado, D.C., Hymel, D.T., Roan, L.E., Rood, J.C., Burk, D.H., and Smith, S.R. (2009). Reduced adipose tissue oxygenation in human obesity: evidence for rarefaction, macrophage chemotaxis, and inflammation without an angiogenic response. *Diabetes* 58, 718–725.
- Patil, R., and Sood, G.K. (2017). Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* 8, 51–58.
- Penney, N.C., Kinross, J., Newton, R.C., and Purkayastha, S. (2015). The role of bile acids in reducing the metabolic complications of obesity after bariatric surgery: a systematic review. *Int. J. Obes. (Lond.)* 39, 1565–1574.
- Pérez, C., Fernández-Galaz, C., Fernández-Agulló, T., Arribas, C., Andrés, A., Ros, M., and Carrascosa, J.M.

- (2004). Leptin impairs insulin signaling in rat adipocytes. *Diabetes* 53, 347–353.
- Pessler-Cohen, D., Pekala, P.H., Kovsan, J., Bloch-Damti, A., Rudich, A., and Bashan, N. (2006). GLUT4 repression in response to oxidative stress is associated with reciprocal alterations in C/EBP alpha and delta isoforms in 3T3-L1 adipocytes. *Arch. Physiol. Biochem.* 112, 3–12.
- Pirola, L., and Ferraz, J.C. (2017). Role of pro- and anti-inflammatory phenomena in the physiopathology of type 2 diabetes and obesity. *World J. Biol. Chem.* 8, 120.
- Poekes, L., Lanthier, N., and Leclercq, I.A. (2015). Brown adipose tissue: a potential target in the fight against obesity and the metabolic syndrome. *Clin. Sci.* 129, 933–949.
- Porter, S.A., Massaro, J.M., Hoffmann, U., Vasan, R.S., O'Donnell, C.J., and Fox, C.S. (2009). Abdominal subcutaneous adipose tissue: a protective fat depot? *Diabetes Care* 32, 1068–1075.
- Pradhan, R.N., Zachara, M., and Deplancke, B. (2017). A systems perspective on brown adipogenesis and metabolic activation. *Obes. Rev.* 18 *Suppl 1*, 65–81.
- Priceman, S.J., Kujawski, M., Shen, S., Cherryholmes, G.A., Lee, H., Zhang, C., Kruper, L., Mortimer, J., Jove, R., Riggs, A.D., et al. (2013). Regulation of adipose tissue T cell subsets by Stat3 is crucial for diet-induced obesity and insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 13079–13084.
- Ramkhalawon, B., Hennessy, E.J., Ménager, M., Ray, T.D., Sheedy, F.J., Hutchison, S., Wanschel, A., Oldebeken, S., Geoffrion, M., Spiro, W., et al. (2014). Netrin-1 promotes adipose tissue macrophage retention and insulin resistance in obesity. *Nat. Med.* 20, 377–384.
- Regazzetti, C., Peraldi, P., Gremeaux, T., Najem-Lendom, R., Ben-Sahra, I., Cormont, M., Bost, F., Le Marchand-Brustel, Y., Tanti, J.-F., and Giorgetti-Peraldi, S. (2009). Hypoxia Decreases Insulin Signaling Pathways in Adipocytes. *Diabetes* 58, 95–103.
- Regazzetti, C., Dumas, K., Lacas-Gervais, S., Pastor, F., Peraldi, P., Bonnafous, S., Dugail, I., Le Lay, S., Valet, P., Le Marchand-Brustel, Y., et al. (2015). Hypoxia inhibits Cavin-1 and Cavin-2 expression and down-regulates caveolae in adipocytes. *Endocrinology* 156, 789–801.
- Reis, B.S., Lee, K., Fanok, M.H., Mascaraque, C., Amoury, M., Cohn, L.B., Rogoz, A., Dallner, O.S., Moraes-Vieira, P.M., Domingos, A.I., et al. (2015). Leptin Receptor Signaling in T Cells Is Required for Th17 Differentiation. *J. Immunol.* 194, 5253–5260.
- Rescigno, M. (2014). Intestinal microbiota and its effects on the immune system. *Cell. Microbiol.* 16, 1004–1013.
- Riscal, R., Schrepfer, E., Arena, G., Cissé, M.Y., Bellvert, F., Heuillet, M., Rambow, F., Bonneil, E., Sabourdy, F., Vincent, C., et al. (2016). Chromatin-Bound MDM2 Regulates Serine Metabolism and Redox Homeostasis Independently of p53. *Mol. Cell* 62, 890–902.
- Roberts-Toler, C., O'Neill, B.T., and Cypess, A.M. (2015). Diet-induced obesity causes insulin resistance in mouse brown adipose tissue. *Obesity* 23, 1765–1770.
- Robinson, K., Prins, J., and Venkatesh, B. (2011). Clinical review: adiponectin biology and its role in inflammation and critical illness. *Crit. Care* 15, 221.
- Rodriguez, A.-M., Elabd, C., Amri, E.-Z., Ailhaud, G., and Dani, C. (2005). The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie* 87, 125–128.
- Rosen, E.D., and MacDougald, O.A. (2006). Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 885–896.
- Rosen, E.D., Sarraf, P., Troy, A.E., Bradwin, G., Moore, K., Milstone, D.S., Spiegelman, B.M., and Mortensen, R.M. (1999). PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol. Cell* 4, 611–617.
- Rosen, E.D., Hsu, C.-H., Wang, X., Sakai, S., Freeman, M.W., Gonzalez, F.J., and Spiegelman, B.M. (2002). C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. *Genes Dev.* 16, 22–26.

- Rosenbaum, M., Knight, R., and Leibel, R.L. (2015). The gut microbiota in human energy homeostasis and obesity. *Trends Endocrinol. Metab.* *26*, 493–501.
- Rubino, F., and Cummings, D.E. (2012). Surgery: The coming of age of metabolic surgery. *Nat. Rev. Endocrinol.* *8*, 702–704.
- Rufini, A., Niklison-Chirou, M.V., Inoue, S., Tomasini, R., Harris, I.S., Marino, A., Federici, M., Dinsdale, D., Knight, R.A., Melino, G., et al. (2012). TAp73 depletion accelerates aging through metabolic dysregulation. *Genes Dev.* *26*, 2009–2014.
- Rydén, M., Arvidsson, E., Blomqvist, L., Perbeck, L., Dicker, A., and Arner, P. (2004). Targets for TNF-alpha-induced lipolysis in human adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *318*, 168–175.
- Ryu, M.J., Kim, S.J., Kim, Y.K., Choi, M.J., Tadi, S., Lee, M.H., Lee, S.E., Chung, H.K., Jung, S.B., Kim, H.-J., et al. (2013). Crif1 Deficiency Reduces Adipose OXPHOS Capacity and Triggers Inflammation and Insulin Resistance in Mice. *PLoS Genet.* *9*, e1003356.
- Sahin, E., Colla, S., Liesa, M., Moslehi, J., Müller, F.L., Guo, M., Cooper, M., Kotton, D., Fabian, A.J., Walkey, C., et al. (2011). Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise. *Nature* *470*, 359–365.
- Sandqvist, M., Strindberg, L., Schmelz, M., Lönnroth, P., and Jansson, P.-A. (2011). Impaired delivery of insulin to adipose tissue and skeletal muscle in obese women with postprandial hyperglycemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *96*, E1320-4.
- Scherer, P.E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G., and Lodish, H.F. (1995). A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J. Biol. Chem.* *270*, 26746–26749.
- Sender, R., Fuchs, S., and Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLOS Biol.* *14*, e1002533.
- Shimizu, I., Yoshida, Y., Moriya, J., Nojima, A., Uemura, A., Kobayashi, Y., and Minamino, T. (2013). Semaphorin3E-induced inflammation contributes to insulin resistance in dietary obesity. *Cell Metab.* *18*, 491–504.
- Silha, J. V., Krsek, M., Sucharda, P., and Murphy, L.J. (2005). Angiogenic factors are elevated in overweight and obese individuals. *Int. J. Obes. (Lond.)* *29*, 1308–1314.
- Smith, U., and Kahn, B.B. (2016). Adipose tissue regulates insulin sensitivity: role of adipogenesis, de novo lipogenesis and novel lipids. *J. Intern. Med.* *280*, 465–475.
- Snijder, M.B., Visser, M., Dekker, J.M., Goodpaster, B.H., Harris, T.B., Kritchevsky, S.B., De Rekeneire, N., Kanaya, A.M., Newman, A.B., Tylavsky, F.A., et al. (2005). Low subcutaneous thigh fat is a risk factor for unfavourable glucose and lipid levels, independently of high abdominal fat. The Health ABC Study. *Diabetologia* *48*, 301–308.
- So, S., Davis, A.J., and Chen, D.J. (2009). Autophosphorylation at serine 1981 stabilizes ATM at DNA damage sites. *J. Cell Biol.* *187*, 977–990.
- Sonksen, P., and Sonksen, J. (2000). Insulin: understanding its action in health and disease. *Br. J. Anaesth.* *85*, 69–79.
- Speidel, D. (2015). The role of DNA damage responses in p53 biology. *Arch. Toxicol.* *89*, 501–517.
- Strycharz, J., Drzewoski, J., Szemraj, J., and Sliwinska, A. (2017). Is p53 Involved in Tissue-Specific Insulin Resistance Formation? *Oxid. Med. Cell. Longev.* *2017*, 9270549.
- Stuart Wood, I., de Heredia, F.P., Wang, B., and Trayhurn, P. (2009). Cellular hypoxia and adipose tissue dysfunction in obesity. *Proc. Nutr. Soc.* *68*, 370.
- Su, X., Gi, Y.J., Chakravarti, D., Chan, I.L., Zhang, A., Xia, X., Tsai, K.Y., and Flores, E.R. (2012). TAp63 is a master transcriptional regulator of lipid and glucose metabolism. *Cell Metab.* *16*, 511–525.
- Sullivan, C.B., Porter, R.M., Evans, C.H., Ritter, T., Shaw, G., Barry, F., and Murphy, J. (2014). TNF α and IL-

1? influence the differentiation and migration of murine MSCs independently of the NF- κ B pathway. *Stem Cell Res. Ther.* 5, 104.

Talukdar, S., Oh, D.Y., Bandyopadhyay, G., Li, D., Xu, J., McNelis, J., Lu, M., Li, P., Yan, Q., Zhu, Y., et al. (2012). Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. *Nat. Med.* 18, 1407–1412.

Tang, W., Zeve, D., Suh, J.M., Bosnakovski, D., Kyba, M., Hammer, R.E., Tallquist, M.D., and Graff, J.M. (2008). White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science* 322, 583–586.

Tanti, J.-F., and Jager, J. (2009). Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stress-regulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation. *Curr. Opin. Pharmacol.* 9, 753–762.

Taylor, C.T., Kent, B.D., Crinion, S.J., McNicholas, W.T., and Ryan, S. (2014). Human adipocytes are highly sensitive to intermittent hypoxia induced NF- κ B activity and subsequent inflammatory gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 447, 660–665.

Tchkonia, T., Morbeck, D.E., Von Zglinicki, T., Van Deursen, J., Lustgarten, J., Scrable, H., Khosla, S., Jensen, M.D., and Kirkland, J.L. (2010). Fat tissue, aging, and cellular senescence. *Aging Cell* 9, 667–684.

Thorp, A.A., and Schlaich, M.P. (2015). Relevance of Sympathetic Nervous System Activation in Obesity and Metabolic Syndrome. *J. Diabetes Res.* 2015, 341583.

Tinahones, F.J., Coín-Aragüez, L., Mayas, M.D., Garcia-Fuentes, E., Hurtado-Del-Pozo, C., Vendrell, J., Cardona, F., Calvo, R.-M., Obregon, M.-J., and El Bekay, R. (2012). Obesity-associated insulin resistance is correlated to adipose tissue vascular endothelial growth factors and metalloproteinase levels. *BMC Physiol.* 12, 4.

Tobin, L., Simonsen, L., and Bülow, J. (2010). Real-time contrast-enhanced ultrasound determination of microvascular blood volume in abdominal subcutaneous adipose tissue in man. Evidence for adipose tissue capillary recruitment. *Clin. Physiol. Funct. Imaging* 30, 447–452.

Tomita, K., Teratani, T., Suzuki, T., Oshikawa, T., Yokoyama, H., Shimamura, K., Nishiyama, K., Mataka, N., Irie, R., Minamino, T., et al. (2012). p53/p66Shc-mediated signaling contributes to the progression of non-alcoholic steatohepatitis in humans and mice. *J. Hepatol.* 57, 837–843.

Tontonoz, P., Hu, E., and Spiegelman, B.M. (1994). Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 79, 1147–1156.

Tornovsky-Babeay, S., Dadon, D., Ziv, O., Tzipilevich, E., Kadosh, T., Schyr-Ben Haroush, R., Hija, A., Stolovich-Rain, M., Furth-Lavi, J., Granot, Z., et al. (2014). Type 2 diabetes and congenital hyperinsulinism cause DNA double-strand breaks and p53 activity in β cells. *Cell Metab.* 19, 109–121.

Trayhurn, P. (2013). Hypoxia and Adipose Tissue Function and Dysfunction in Obesity. *Physiol. Rev.* 93, 1–21.

Tummala, K., Gomes, A., Yilmaz, M., Gra \tilde{a} , O., Bakiri, L., Ruppen, I., Xim \tilde{n} ez-Emb \tilde{n} , P., Sheshappanavar, V., Rodriguez-Justo, M., Pisano, D., et al. (2014). Inhibition of De Novo NAD⁺ Synthesis by Oncogenic URI Causes Liver Tumorigenesis through DNA Damage. *Cancer Cell* 26, 826–839.

Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R., and Gordon, J.I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444, 1027–1031.

Turner, N., Kowalski, G.M., Leslie, S.J., Risis, S., Yang, C., Lee-Young, R.S., Babb, J.R., Meikle, P.J., Lancaster, G.I., Henstridge, D.C., et al. (2013). Distinct patterns of tissue-specific lipid accumulation during the induction of insulin resistance in mice by high-fat feeding. *Diabetologia* 56, 1638–1648.

Vasanthakumar, A., Moro, K., Xin, A., Liao, Y., Gloury, R., Kawamoto, S., Fagarasan, S., Mielke, L.A., Afshar-Sterle, S., Masters, S.L., et al. (2015). The transcriptional regulators IRF4, BATF and IL-33 orchestrate development and maintenance of adipose tissue \tilde{r} esident regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 16, 276–285.

Vaseva, A. V., and Moll, U.M. (2009). The mitochondrial p53 pathway. *Biochim. Biophys. Acta* 1787, 414–420.

Vergoni, B., Cornejo, P.-J., Gilleron, J., Djedaini, M., Ceppo, F., Jacquet, A., Bouget, G., Ginet, C., Gonzalez,

- T., Maillat, J., et al. (2016). DNA Damage and the Activation of the p53 Pathway Mediate Alterations in Metabolic and Secretory Functions of Adipocytes. *Diabetes* 65, 3062–3074.
- Villaret, A., Galitzky, J., Decaunes, P., Esteve, D., Marques, M.-A., Sengenès, C., Chiotasso, P., Tchkonina, T., Lafontan, M., Kirkland, J.L., et al. (2010). Adipose Tissue Endothelial Cells From Obese Human Subjects: Differences Among Depots in Angiogenic, Metabolic, and Inflammatory Gene Expression and Cellular Senescence. *Diabetes* 59, 2755–2763.
- Villena, J.A., Choi, C.S., Wang, Y., Kim, S., Hwang, Y.-J., Kim, Y.-B., Cline, G., Shulman, G.I., and Sul, H.S. (2008). Resistance to high-fat diet-induced obesity but exacerbated insulin resistance in mice overexpressing preadipocyte factor-1 (Pref-1): a new model of partial lipodystrophy. *Diabetes* 57, 3258–3266.
- Virtanen, K.A., Lönnroth, P., Parkkola, R., Peltoniemi, P., Asola, M., Viljanen, T., Tolvanen, T., Knuuti, J., Rönkä, T., Huupponen, R., et al. (2002). Glucose uptake and perfusion in subcutaneous and visceral adipose tissue during insulin stimulation in nonobese and obese humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 3902–3910.
- Visel, A., Zhu, Y., May, D., Afzal, V., Gong, E., Attanasio, C., Blow, M.J., Cohen, J.C., Rubin, E.M., and Pennacchio, L.A. (2010). Targeted deletion of the 9p21 non-coding coronary artery disease risk interval in mice. *Nature* 464, 409–412.
- Vousden, K.H., and Prives, C. (2009). Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* 137, 413–431.
- Wang, M.Y., Lee, Y., and Unger, R.H. (1999). Novel form of lipolysis induced by leptin. *J. Biol. Chem.* 274, 17541–17544.
- Wang, N.D., Finegold, M.J., Bradley, A., Ou, C.N., Abdelsayed, S. V., Wilde, M.D., Taylor, L.R., Wilson, D.R., and Darlington, G.J. (1995). Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. *Science* 269, 1108–1112.
- Wang, S.-J., Yu, G., Jiang, L., Li, T., Lin, Q., Tang, Y., and Gu, W. (2013a). p53-Dependent regulation of metabolic function through transcriptional activation of pantothenate kinase-1 gene. *Cell Cycle* 12, 753–761.
- Wang, X., Zhao, X., Gao, X., Mei, Y., and Wu, M. (2013b). A new role of p53 in regulating lipid metabolism. *J. Mol. Cell Biol.* 5, 147–150.
- Wang, Y., Sullivan, S., Trujillo, M., Lee, M.-J., Schneider, S.H., Brodin, R.E., Kang, Y.H., Werber, Y., Greenberg, A.S., and Fried, S.K. (2003). Perilipin expression in human adipose tissues: effects of severe obesity, gender, and depot. *Obes. Res.* 11, 930–936.
- Weisberg, S.P., Hunter, D., Huber, R., Lemieux, J., Slaymaker, S., Vaddi, K., Charo, I., Leibel, R.L., and Ferrante, A.W. (2006). CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J. Clin. Invest.* 116, 115–124.
- Wensveen, F.M., Jelen, V., Valenti, S., ?estan, M., Wensveen, T.T., Theurich, S., Glasner, A., Mendrila, D., ?timac, D., Wunderlich, F.T., et al. (2015). NK cells link obesity-induced adipose stress to inflammation and insulin resistance. *Nat. Immunol.* 16, 376–385.
- Wernstedt Asterholm, I., Tao, C., Morley, T.S., Wang, Q.A., Delgado-Lopez, F., Wang, Z.V., and Scherer, P.E. (2014). Adipocyte Inflammation Is Essential for Healthy Adipose Tissue Expansion and Remodeling. *Cell Metab.* 20, 103–118.
- Wildman, R.P., Muntner, P., Reynolds, K., McGinn, A.P., Rajpathak, S., Wylie-Rosett, J., and Sowers, M.R. (2008). The Obese Without Cardiometabolic Risk Factor Clustering and the Normal Weight With Cardiometabolic Risk Factor Clustering. *Arch. Intern. Med.* 168, 1617.
- Winer, D.A., Winer, S., Shen, L., Wadia, P.P., Yantha, J., Paltser, G., Tsui, H., Wu, P., Davidson, M.G., Alonso, M.N., et al. (2011). B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies. *Nat. Med.* 17, 610–617.
- Winer, D.A., Winer, S., Dranse, H.J., and Lam, T.K.T. (2017). Immunologic impact of the intestine in metabolic disease. *J. Clin. Invest.* 127, 33–42.

- Winer, S., Chan, Y., Paltser, G., Truong, D., Tsui, H., Bahrami, J., Dorfman, R., Wang, Y., Zielenski, J., Mastrorandi, F., et al. (2009). Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat. Med.* *15*, 921–929.
- Wolf, Y., Boura-Halfon, S., Cortese, N., Haimon, Z., Sar Shalom, H., Kuperman, Y., Kalchenko, V., Brandis, A., David, E., Segal-Hayoun, Y., et al. (2017). Brown-adipose-tissue macrophages control tissue innervation and homeostatic energy expenditure. *Nat. Immunol.* *18*, 665–674.
- Wood, I.S., Stezhka, T., and Trayhurn, P. (2011). Modulation of adipokine production, glucose uptake and lactate release in human adipocytes by small changes in oxygen tension. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* *462*, 469–477.
- World Cancer Research Fund, and American Institute for Cancer Research (2007). Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. AICR, Washington DC.
- World Health Organization (2014). Global status report on noncommunicable diseases.
- Wu, D., Molofsky, A.B., Liang, H.-E., Ricardo-Gonzalez, R.R., Jouihan, H.A., Bando, J.K., Chawla, A., and Locksley, R.M. (2011). Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science* *332*, 243–247.
- Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R.A., Hernando, E., Krizhanovsky, V., Cordon-Cardo, C., and Lowe, S.W. (2007). Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* *445*, 656–660.
- Yahagi, N., Shimano, H., Matsuzaka, T., Najima, Y., Sekiya, M., Nakagawa, Y., Ide, T., Tomita, S., Okazaki, H., Tamura, Y., et al. (2003). p53 Activation in adipocytes of obese mice. *J. Biol. Chem.* *278*, 25395–25400.
- Yahagi, N., Shimano, H., Matsuzaka, T., Sekiya, M., Najima, Y., Okazaki, S., Okazaki, H., Tamura, Y., Iizuka, Y., Inoue, N., et al. (2004). p53 involvement in the pathogenesis of fatty liver disease. *J. Biol. Chem.* *279*, 20571–20575.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Tsuchida, A., Yokomizo, T., Kita, S., Sugiyama, T., Miyagishi, M., Hara, K., Tsunoda, M., et al. (2003). Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* *423*, 762–769.
- Yang, Q., Graham, T.E., Mody, N., Preitner, F., Peroni, O.D., Zabolotny, J.M., Kotani, K., Quadro, L., and Kahn, B.B. (2005). Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* *436*, 356–362.
- Ye, J., Gao, Z., Yin, J., and He, Q. (2007). Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *293*, E1118–28.
- Yin, J., Gao, Z., He, Q., Zhou, D., Guo, Z., and Ye, J. (2009). Role of hypoxia in obesity-induced disorders of glucose and lipid metabolism in adipose tissue. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *296*, E333–42.
- Yokoyama, M., Okada, S., Nakagomi, A., Moriya, J., Shimizu, I., Nojima, A., Yoshida, Y., Ichimiya, H., Kamimura, N., Kobayashi, Y., et al. (2014). Inhibition of endothelial p53 improves metabolic abnormalities related to dietary obesity. *Cell Rep.* *7*, 1691–1703.
- Yoshino, J., Mills, K., Yoon, M., and Imai, S. (2011). Nicotinamide Mononucleotide, a Key NAD⁺ Intermediate, Treats the Pathophysiology of Diet- and Age-Induced Diabetes in Mice. *Cell Metab.* *14*, 528–536.
- Zeng, W., Pirzgalska, R.M., Pereira, M.M.A., Kubasova, N., Barateiro, A., Seixas, E., Lu, Y.-H., Kozlova, A., Voss, H., Martins, G.G., et al. (2015). Sympathetic neuro-adipose connections mediate leptin-driven lipolysis. *Cell* *163*, 84–94.
- Zhang, C., Lin, M., Wu, R., Wang, X., Yang, B., Levine, A.J., Hu, W., and Feng, Z. (2011). Parkin, a p53 target gene, mediates the role of p53 in glucose metabolism and the Warburg effect. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 16259–16264.
- Zhang, P., Tu, B., Wang, H., Cao, Z., Tang, M., Zhang, C., Gu, B., Li, Z., Wang, L., Yang, Y., et al. (2014).

Tumor suppressor p53 cooperates with SIRT6 to regulate gluconeogenesis by promoting FoxO1 nuclear exclusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 10684–10689.

Zhong, J., Rao, X., Braunstein, Z., Taylor, A., Narula, V., Hazey, J., Mikami, D., Needleman, B., Rutsky, J., Sun, Q., et al. (2014). T-cell costimulation protects obesity-induced adipose inflammation and insulin resistance. *Diabetes* *63*, 1289–1302.

Zhou, Y., and Rui, L. (2013). Leptin signaling and leptin resistance. *Front. Med.* *7*, 207–222.

Zoller, V., Funcke, J.-B., Keuper, M., Abd El Hay, M., Debatin, K.-M., Wabitsch, M., and Fischer-Posovszky, P. (2016). TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) inhibits human adipocyte differentiation via caspase-mediated downregulation of adipogenic transcription factors. *Cell Death Dis.* *7*, e2412.

Zúñiga, L.A., Shen, W.-J., Joyce-Shaikh, B., Pyatnova, E.A., Richards, A.G., Thom, C., Andrade, S.M., Cua, D.J., Kraemer, F.B., and Butcher, E.C. (2010). IL-17 regulates adipogenesis, glucose homeostasis, and obesity. *J. Immunol.* *185*, 6947–6959.