



HAL
open science

Rôle des microARNs et de leur machinerie dans le contrôle de l'activité du tissu adipeux brun et la prédisposition au diabète de type 2

Estelle Roger

► To cite this version:

Estelle Roger. Rôle des microARNs et de leur machinerie dans le contrôle de l'activité du tissu adipeux brun et la prédisposition au diabète de type 2. Interactions cellulaires [q-bio.CB]. Université Côte d'Azur, 2018. Français. NNT : 2018AZUR4205 . tel-02086096

HAL Id: tel-02086096

<https://theses.hal.science/tel-02086096>

Submitted on 1 Apr 2019

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.

THÈSE DE DOCTORAT

Rôle des microARNs et de leur machinerie
dans le contrôle de l'activité du tissu
adipeux brun et la prédisposition au diabète
de type 2

Estelle ROGER

IRCAN Inserm U1081 CNRS UMR7284 – C3M Inserm U1065

**Présentée en vue de l'obtention
du grade de docteur en** Sciences de la Vie
et de la Santé spécialité : Interactions
Moléculaires et Cellulaires
d'Université Côte d'Azur
Dirigée par : Pr. Emmanuel Van Obberghen
Co-encadrée par : Dr. Charlotte Hinault
Soutenue le : 7 Décembre 2018

Devant le jury, composé de :
Isabelle Castan-Laurell, PU Inserm,
Université de Toulouse III Paul Sabatier
Charlotte Hinault, MCU-PH Inserm CHU,
Université de Nice Côte d'Azur
Christophe Magnan, PR CNRS,
Université Paris Diderot
Emmanuel Van Obberghen, PU-PH,
Université Nice Côte d'Azur

Rôle des microARNs et de leur machinerie dans le contrôle de l'activité du tissu adipeux brun et la prédisposition au diabète de type 2

Jury:

Président du jury

Christophe Magnan, Professeur des Universités, Université Paris Diderot,
REGLYS CNRS UMR8251

Rapporteurs

Christophe Magnan, Professeur des Universités, Université Paris Diderot,
REGLYS CNRS UMR8251

Isabelle Castan-Laurell, Professeur des Universités, Université de
Toulouse III Paul Sabatier, I2MC Inserm UMR1048

Directeur de thèse

Emmanuel Van Obberghen, Professeur des Universités – Praticien
Hospitalier, Université de Nice Côte d'Azur, LP2M CNRS UMR 7370 –

Co-encadrante de thèse

Charlotte Hinault, Maître de Conférences des Universités – Praticien
Hospitalier, Université de Nice Côte d'Azur, C3M Inserm U1065

Rôle des microARNs et de leur machinerie dans le contrôle de l'activité du tissu adipeux brun et la prédisposition au diabète de type 2

Le tissu adipeux brun (TABr) est devenu ces dix dernières années le centre d'intérêt de nombreux laboratoires en raison de sa capacité à dissiper l'énergie apportée par les substrats sous forme de chaleur. Chez les mammifères, le développement du TABr intervient à la fin de la gestation et devient fonctionnel à la naissance. Sa capacité thermogénique permet aux nouveau-nés de s'adapter face à l'environnement extra-utérin, puis son activité régresse avec l'âge. Ceci suggère que l'environnement intra-utérin joue un rôle important dans la programmation de la physiologie et du métabolisme du TABr. Dans un modèle bien décrit de retard de croissance intra-utérin, qu'est la carence protéique maternelle (CP), la jeune progéniture CP est normoglycémique malgré un défaut de sécrétion de l'insuline mais développe avec l'âge une résistance à l'insuline et une hyperglycémie. Lors de mon arrivée au laboratoire, des résultats suggéraient un rôle du TABr dans les changements dynamiques du profil métabolique de la progéniture CP en fonction de l'âge. En effet, le TABr des rats CP est hyperactif à 3 mois par rapport aux animaux contrôles alors qu'il revient au niveau des contrôles chez la progéniture CP âgée de 18 mois, ce qui corrèle avec l'apparition des troubles métaboliques caractéristiques du diabète de type 2.

Durant ma thèse, mon premier objectif a été de démontrer le rôle causal du TABr dans le maintien de l'homéostasie glucidique chez les jeunes animaux CP. Pour ce faire, nous avons exposé au froid de jeunes rats CP pour solliciter leur TABr et nous avons procédé à l'ablation chirurgicale de ce tissu. Nos résultats montrent que la jeune progéniture CP est mieux protégée que les contrôles à une exposition au froid grâce à l'activité thermogénique accrue de leur TABr. En revanche, l'ablation du TABr induit une hyperglycémie chez les jeunes animaux CP montrant que ce tissu est requis pour maintenir leur normoglycémie. Ces travaux, publiés dans le journal *Diabetes*, suggèrent qu'un environnement intra-utérin défavorable pourrait reprogrammer le métabolisme du TABr.

Le deuxième objectif de ma thèse a été d'identifier les mécanismes moléculaires permettant de maintenir le TABr actif chez la jeune progéniture CP. Nous avons comparé le modèle CP et un autre modèle bien décrit d'activation du TABr par un agoniste des récepteurs β -3 adrénergiques. Dans les deux cas, lorsque le TABr est actif, nous observons une augmentation globale de l'expression des miARNs associée à une augmentation de leur machinerie, et en particulier de la protéine AGO2. De manière intéressante, lorsque le TABr est inactif chez les animaux CP âgés, l'expression des miARNs et celle de la machinerie revient à un niveau contrôle. In vitro, alors que l'activation d'adipocytes bruns matures entraîne une augmentation de la protéine AGO2, sa délétion partielle est suffisante pour diminuer l'activité thermogénique de ces cellules. Ces travaux suggèrent qu'une augmentation de la protéine AGO2 et des miARNs contribue à l'activation du TABr. Le manuscrit correspondant est en révision au journal *Molecular Metabolism*.

Dans la troisième partie de mes recherches, j'ai mis en évidence plusieurs miARNs dont l'expression est diminuée dans le TABr de la jeune progéniture CP. Nous nous sommes focalisés sur let-7c-3p et miR-22-3p les plus fortement diminués. Notre observation clé est que ces deux miARNs agissent de manière synergique pour inhiber l'activité thermogénique des adipocytes bruns matures. Ce travail est en cours de finalisation pour publication.

En conclusion, au cours de de ma thèse, j'ai mis en évidence plusieurs éléments permettant de mieux comprendre la physiologie du TABr et sa dérégulation dans des situations aboutissant à une altération de l'homéostasie glucidique. Bien que des données supplémentaires soient nécessaires, ces contributions renforcent l'idée d'utiliser le TABr comme cible prometteuse pour la prévention et/ou le traitement des perturbations métaboliques associées à l'obésité et au diabète de type 2.

Mots clés : Métabolisme, diabète de type 2, tissu adipeux brun, microARNs, AGO2

Role of microRNAs and of their machinery in the control of brown adipose tissue activity and predisposition to type 2 diabetes

Brown adipose tissue (BAT) has grown over the last ten years into the center of interest for many laboratories due to its capacity to burn energy derived from metabolic substrates into heat. Indeed, in mammals, the development of BAT occurs at the end of gestation to become fully functional at birth. Its thermogenic capacity allows newborns to face extrauterine environment, and thereafter its activity declines with age. This suggests that the intrauterine environment plays an important role in the programming of BAT physiology and metabolism. In a well-known model of intrauterine growth retardation (IUGR), the maternal protein restriction model (called LP for low protein), the young LP progeny is normoglycemic despite an insulin secretion defect but develops insulin resistance and hyperglycemia with age. When I started my thesis work, available results in the laboratory suggested a role of BAT in the dynamic changes of the LP progeny metabolic profile according to the age. Indeed, BAT of young LP rats is hyperactive at 3 months compared to controls while this activity drops back to control levels in old 18-months LP progeny, consistent with the appearance of a type 2 diabetic phenotype.

During my thesis, the first objective was to search for the causal role of BAT in the maintenance of glucose homeostasis in young LP progeny. Using a first strategy, we exposed young LP progeny to a cold challenge to activate their BAT. In a second approach, we performed surgical ablation of their BAT. Our results show that young LP progeny is more protected against a cold challenge than controls, due to the high thermogenic capacity of their BAT. However, BAT ablation induces hyperglycemia in young LP animals showing that this tissue is required to maintain their normoglycemia. This work, published in *Diabetes* in March 2017, suggests that a deleterious fetal environment could reprogram BAT metabolism.

The second objective of my thesis was to identify the molecular mechanisms allowing the maintenance of active BAT in young LP progeny. To do so, we compared two models of BAT activation, ie our LP model and a well-known model of BAT activation with an agonist of β -3 adrenergic receptors. In both cases, when BAT is active, we observed a global increase in microRNA (miRNA) expression associated to augmented miRNA machinery expression, and in particular AGO2 expression. Interestingly, when BAT is inactive in old LP animals, miRNA expression and miRNA machinery expression return to control levels. While activation of mature brown adipocytes in vitro leads to an increase in AGO2 protein expression, partial deletion of this protein is sufficient to decrease the thermogenic activity of these cells. Collectively our data suggest that AGO2 and increased miRNA expression contribute to BAT activation. The manuscript concerning this research is in the review process at *Molecular Metabolism*.

In the third part of my PhD research efforts, I have found that in the BAT of young LP progeny several miRNAs are robustly downregulated. We have focused on let-7cp and miR-22-3p, which have the most severe decrease in expression. Our key finding is that these two miRNAs act synergistically to hinder mature brown adipocyte thermogenic activity. This work is in the process of being finalized for publication.

In conclusion, during my PhD training I have revealed several novel findings, which lead to a better understanding of BAT physiology and its dysregulation in situations eventuating in perturbed glucose homeostasis. While additional efforts are certainly needed, these contributions advance our vision to leverage BAT as a promising target for the prevention and/or treatment of metabolic perturbations associated to obesity and type 2 diabetes.

Keywords: Metabolism, Type 2 Diabetes, brown adipose tissue, microRNAs, AGO2

Remerciements

Tout d'abord, j'aimerais remercier chaleureusement les **Pr. Christophe Magnan** et **Isabelle Castran-Laurell** d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse et de se déplacer respectivement de Paris et Toulouse pour assister à ma soutenance de thèse.

A mon labo...,

Je remercie le **Pr. Emmanuel Van Obberghen** pour m'avoir permis de réaliser ma thèse dans son laboratoire, pour le partage de ses connaissances et son enseignement au cours de ces trois années de doctorat. Je vous remercie de m'avoir fait participer à un des congrès internationaux les plus reconnus dans notre domaine et de m'avoir permis de rencontrer et d'échanger avec les « pontes ».

Je remercie tout particulièrement le **Dr. Charlotte Hinault** pour sa disponibilité, pour sa en fait, la liste serait trop longue et ça serait un peu rébarbatif donc varions les plaisirs ! Charlotte, merci de m'avoir aussi bien cernée avant même que je fasse partie intégrante du labo pour les oraux de la bourse MRT. C'est depuis ce jour là où tu m'as annoncé que je commençais ma thèse en Octobre avec vous et que nos destins étaient liés pour trois ans que nous sommes devenues une équipe soudée (Girl Power !). Un énorme merci pour ton soutien à toute épreuve, merci pour ta positivité qui a souvent contrebalancé mon côté négatif... et dieu sait qu'on en a eu besoin de ton côté positif!!! Merci pour avoir pris soin de moi et de mon projet et ce, en jonglant parfaitement entre tes trois activités professionnelles. Merci également de m'avoir fait confiance et d'avoir cru en moi dans les moments de doutes, nombreux mais qui ont fait que je suis ressortie grandie de cette expérience au niveau professionnel mais aussi au niveau personnel. Merci pour toutes les connaissances que tu m'as transmises, notamment sur le métabolisme et en biochimie qui m'ont énormément servi lors de la rédaction de cette thèse. Durant ces trois ans, j'ai « un peu » pris place aux cotés de Quentin et Clément et je te remercie pour ça...tu as été une merveilleuse rencontre et un soutien infailible même si je me répète ! A présent, il est temps de prendre mon envol mais contrairement à ce que dit le proverbe loin des yeux, près du cœur ! Eh oui la fin de cette thèse ne marque pas la fin de notre histoire qui j'en suis sûre n'est pas terminée

Je tiens également à remercier le **Dr. Olivier Dumortier** ou le « Mozart du Pancréas ». Oli, que de moments passés ensemble ! Merci pour ta bonne humeur, tes anecdotes belges croustillantes ou françaises, les américains du camion de la tour Pasteur (qui ne te font pas grossir d'un poil mais qui ont eu un impact important sur mon tour de hanche XD) sans oublier ta grande qualité scientifique et tes conseils pro mais aussi perso ! Tu as toujours eu « les » remarques intelligentes et pertinentes qui nous ont souvent permis d'avancer d'un point de vue scientifique, je t'en suis très reconnaissante. Merci pour les apéros, le petit verre de rosé aux beaux jours sur la promenade de Saint Laurent, c'était top. Comme je te l'ai déjà dit, tu es une des personnes les plus brillantes que je connaisse, j'espère que l'avenir te réservera pleins de belles choses professionnelles mais aussi personnelles aux côtés de Pascaline, Romain et Cholé (et Nala).

Je remercie le **Dr. Patricia Lebrun** pour son accueil, sa gentillesse, sa pédagogie et sa disponibilité. Merci pour les quelques minutes dans la journée par ci par là qui se transformaient souvent en dizaines de minutes à parler de ton métier de professeur (je me souviens d'anecdotes succulentes

trouvées dans plusieurs copies de tes étudiants... surtout en génétique.. qui nous ont fait beaucoup rire). Je te souhaite une bonne continuation à l'IPMC et plein de bonnes choses avec Franck, Doni et Chiara.

Je remercie **Nadine Gautier** ou « Nadinette » pour sa gentillesse et son accueil à bras ouverts au sein du laboratoire (on ne peut pas dire autrement, tu m'as tout de suite mise à l'aise !!). Merci pour ta bonne humeur, tes petites astuces, pour m'avoir formé à toutes les techniques du laboratoire. Au début de ma thèse, tu étais comme ma « Maman Canard » et je t'ai suivi tous les coins et recoins du labo pour connaître toutes tes petites astuces ! Merci pour toutes ces heures (Dizaines ? Centaines ?) passées à l'animalerie en compagnie de nos petits « ratous » pour les réjouissances comme les OGTT (surtout sur les gros pépères, moi tenant le rat et toi insérant la sonde de gavage... que de souvenirs !), l'ablation du BAT, les taillages de dents ou encore pansages de plaies, CA c'était un beau travail d'équipe ! J'en profite pour faire une petite parenthèse dans ton paragraphe et remercier les rats sans qui ce projet n'aurait pas été possible ! Mais revenons bien vite à toi Nadine ! Merci de m'avoir intégré à la Team Ravitaillement ! J'ai découvert des personnes très très sympas comme Patricia, Serge, ton Didier, Michel et les autres. Tous ces bénévoles (Ironman, Semi-Marathon et Ultra-trail : le meilleur avec les pâtes à la fin) faits à vos côtés dans la bonne humeur m'ont vraiment beaucoup plu. Merci également pour toutes tes anecdotes de voyage (Thaïlande, le mojito à Rome, Venise..). Je te souhaite tout plein de bonheur avec ta petite famille récemment agrandie et j'espère qu'on gardera le contact, qui sait peut-être lors d'une virée shopping à Serravalle ?

Gaïa, merci de ta gentillesse, de ta bonne humeur, de ton attitude plutôt « à la cool » qui m'a souvent permis de relativiser la situation. Grâce à toi, j'ai énormément amélioré mon anglais et au fil du temps tu as réciproquement amélioré ton français, donnant donnant ! Mais bon au combat des langues parlées, je suis loin de te battre...eh oui je ne suis pas quadrilingue de manière courante, mes respects pour ça !! Je te souhaite plein de courage pour la fin et une bonne continuation aux côtés de Tomas, ce n'est pas la période la plus facile mais tu verras dans quelques années, on pourra dire que c'était juste une formalité !

Didier, ou maître Pisani, notre « expert en métabolisme », ou encore les « yeux et les oreilles de la Tour Pasteur ». Didier, merci pour ta disponibilité et ton écoute, même si tu ne faisais pas partie de l'équipe pour moi c'est tout comme. Merci pour les heures passées devant le fameux Seahorse (c'est bon je crois que j'ai eu ma dose !) à déchiffrer les courbes et à établir de nouvelles stratégies expérimentales judicieuses sur les miRs ou sur AGO2. L'avantage c'est qu'on ne perd pas le fil avec toi, les discussions sont toujours recadrées par : « Petite, quelle est ta question ? ». Ton aide à la paillasse, tes connaissances et tes conseils ont apporté une véritable valeur ajoutée à ce projet et je t'en remercie ! Eh oui.. toutes les explications et interprétations sombres la première fois se sont éclaircies peu à peu à mesure que mes connaissances s'étoffaient (en partie grâce à toi). Merci de m'avoir formé à la culture des HMADs également, même si je ne m'en suis finalement pas servi, j'ai découvert un deuxième modèle de culture, différent de la culture primaire. Enfin, Didier, merci pour toutes les fois où le t'ai appelé à la rescousse et où tu as toujours répondu présent (la liste est longue...), tu es été un véritable soutien pendant cette thèse !

Je remercie également le Dr. **Ez Zoubir Amri** pour m'avoir fait connaître son domaine d'étude et son équipe. Merci à **Nathalie**, pour ta gentillesse, ta douceur et ta disponibilité (et aussi merci pour tous les thés offerts lorsque je suis passée au 11^{ème}). Merci aussi à **Jean-Claude**, à **Cécilia**

pour ta gentillesse et ta bonne humeur, je te souhaite plein de courage pour ta dernière année, la rédaction tout ça tout ça.

Je tenais également à remercier la plateforme Animalerie de la Tour Pasteur et notamment **Marielle et Rubi** (notre magnifique chanteur brésilien) pour avoir pris grand soin de nos rats. J'ai l'intime sentiment que tes chansons Rubi ont détendu nos rats dans les moments de stress et de doute ahahaha !! Un merci tout particulier à mes deux professeurs **Nicole Arrighi** et **Cercina Onesto** que j'ai rencontré durant mon cursus à Polytech' et qui m'ont extrêmement soutenu pour ce projet de doctorat, sans vous ce projet n'aurait pas été possible.

De l'autre côté de Nice...

Je tiens à remercier le Dr. Frédéric Bost ; **Fred**, deux ans et demi après notre première rencontre, nous nous sommes finalement retrouvés au sein de ta nouvelle équipe. Toutes mes félicitations pour la réalisation de ce beau projet et merci de m'avoir aussi bien accueillie à mon arrivée et même après pendant les derniers mois de ma thèse. Tu as une équipe formidable !

Je commencerai par remercier les filles, **Aurélie, Lisa** et **Steph**. Merci de m'avoir aussi bien intégré au sein du labo malgré mon arrivée tardive, merci pour votre soutien dans les moments de doute que j'ai partagé avec vous. J'ai appris à vous découvrir et à énormément vous apprécier durant mon séjour à C3M. **Aurélie**, merci pour ta gentillesse, les petits cafés matinaux, les piques niques sur le plaid de Lisa (avec Lisa bien sûr) pendant les chaudes journées d'été. Je te souhaite plein de bonheur avec Paul et une bonne continuation sur Paris (ou ailleurs !). **Lisa**, merci pour toute l'aide que tu m'as apporté, je suis navrée d'avoir été un « boulet » avec mes questions d'ordre administratives ou autres...Merci pour les pauses à discuter shopping ou « Too good too go ». Je te souhaite bonne chance pour la suite mais avant tout place aux pistes de skis, profites !! **Steph**, merci pour ton accueil au sein du groupe, merci pour tes conseils avisés et ta vision des choses. Discuter avec toi m'a appris qu'il ne faut surtout pas se sous-estimer et qu'on peut trouver chaussure à son pied surtout quand on sait qu'on aime la recherche ;).

Les garçons, d'abord jeunes puis moins jeunes... **Youta** et **FR**. Youta merci pour ta bonne humeur, tes blagues des fois nulles, tes fous rires solo (surtout quand tu es saoul et qu'on en vient à parler de citrouille ...) et ton style incontournable de Skateur... Je vais te laisser te moquer une dernière fois de moi : devines où je pars pour les vacances après ma thèse : NYC AHAHAH !! **FR**, le maître du triathlon que j'ai eu l'opportunité de voir à l'œuvre... merci pour ta gentillesse et ton accueil au sein des « beautés du C3M ». Tes petits cris stridents resteront gravés dans ma mémoire. Je te souhaite plein de bonheur à Paris City avec Sandrine et Apolline (et avec les futurs... ?). Je tiens à faire une spéciale dédicace au **Dr. Stéphan Clavel**, merci pour toutes les discussions une fois le bureau déserté par les autres, merci pour tes coups de gueule et ces agacements (il en faut quand même !!), pour tes paris perdus (bon c'est vrai il n'y en a eu qu'un) et pour les contacts pro !! La promesse de t'inviter au resto une fois que je serai une riche banquière d'investissement tient toujours ...

Merci à **Dr. Mazure** ou **Nath** ou encore PDG de TXCELL (wow je suis quand même toujours super impressionnée) et à ses filles : **Lucilla, Monique**, et **Julie** (tout plein de bonheur avec la future naissance de ton petit... Véronique c'est ça ?). Je remercie également le Dr. Tannour-Louet et les différents stagiaires (Ilyes, Jade et Solène) avec qui j'ai passé de super moments.

Enfin, **Cha**, je te souhaite plein de bonnes choses avec ce nouveau projet et j'espère que tu t'épanouiras bien dans cette nouvelle équipe qui est ta nouvelle famille maintenant.

A mes amis (e)s..

Ingrid et Ophélie, ça commence à faire un bail, et décidément les filles, on a le chic pour s'embarquer dans les mêmes galères euhhh projets restons polies ! Mais c'est grâce à ces « projets » qu'on arrive aussi à s'accorder des pauses détente Thalazur (piscines chauffées, jacuzzi, massage... c'était le pied..). Les filles, merci pour votre écoute et votre soutien dans les moments difficiles, vous avez été de véritables piliers pour moi !

Ingrid, merci de t'être livrée à moi..., merci pour tous ces samedis après-midi à faire les magasins (à essayer des fringues qu'on ne va finalement pas acheterahaha !!) ou des randos (enfin avant que la rédaction ne débute ...), merci de m'avoir accompagnée au Jet Ski à Théoule, je ne sais pas si on pourrait qualifier ça de meilleure expérience de notre vie tellement on a eu froidahaha !! En revanche cette petite virée à Milan entre filles était très sympa dommage qu'on n'ait pas pu rester plus longtemps ! Merci aussi de m'avoir fait découvrir ta famille, ton papa et ta maman, Quentin, Sako et Annick tous très sympas ! Tu sais que malgré les aléas de la vie, je serai toujours là pour toi et tu peux entièrement compter sur moi !

Ophélie, ma petite 2mer (référence au cours de Baldovini de Polytech...rien que d'y penser j'en ai des sueurs), on se serre les coudes depuis le début de la rédaction et bien avant encore depuis les cours de chimie organique de GB3 (Beurk !)... Merci pour ta bonne humeur à toute épreuve, tu es la personne la plus positive que je connaisse, je suis ravie d'avoir fait la connaissance du Marseillais Mathieu qui s'entend très bien avec l'Antibois Julien ! Merci pour ces randos de l'extrême à la Clue de la Cerise mais surtout à **l'inoubliable Pont des Tuves**, on quand même bien galéré mais qu'est-ce qu'on a rigolé avec la Team Balise (enfin surtout toi et moi car Julien et Matt riaient plutôt jaune XD). Je t'envoie tout mon soutien et mon courage pour la fin de la thèse et bientôt on pourra à nouveau « sonner le clairon » de 7 Wonders et enfin gagner à Andor (même si décidément on n'a pas l'air très doués ...).

Alex, ma petite MOS (mon oie sauvage pour ceux qui lisent et qui ne comprennent pas), tu as pris ton envol pour la capitale depuis la fin de nos années Polytech, mais pour autant c'est avec toi que j'ai vécu une des plus belles aventures de ma vie jusqu'à présent, et je pense que tu vois à quoi je fais référence (si tu ne trouves pas, ça commence par un B ;))). Ça a été une expérience inoubliable et c'est vraiment là-bas qu'on a appris à se connaître, à s'apprécier, à avoir des fous rires la nuit en rentrant tard à cause de l'étrange Aaron qui cuisinait de l'ail et du gingembre ou à cause de « Cenépil » mouhahaha et enfin à s'aimer si tu le permets... (en tout bien tout honneur). Merci pour nos conversations téléphoniques de deux heures minimum à chaque fois pour faire le point sur nos vies... Tu as également été un pilier pour moi, tu es une véritable force de la nature doublée d'un amour et c'est cela que j'admire chez toi. Je suis ravie de connaître Xav' et je vous souhaite tout plein de bonheur dans votre vie future. Bien sûr je n'oublie pas tous les gens géniaux que j'ai rencontré grâce à toi, en particulier Clémence.

Emilie et Ben, que de projets Polytech réalisés ensemble !! Emilie, je me souviens de ton hésitation à la fin de nos études entre le doctorat et les brevets... et bien malgré cette dure année de labeur au CIEPI que tu as réussi avec brio, je peux te dire que tu ne t'es pas trompée !! Merci pour tes blagues, souvent assez nulles MAIS comme je les aime, qui ne font rire que nous... merci

pour nous avoir fait découvrir toute ta famille qui ne fait que s'agrandir avec l'arrivée de tes neveux trop mimis. Avec tous les mariages que vous avez enchainés avec Ben cette année, ça va bien finir par être le vôtre un jour XD ? Ben, merci pour ta bonne humeur et les descentes des pistes au ski, même si ça commence à faire longtemps... j'espère qu'on aura l'occaz d'en refaire quelques-unes dans les années à venir à Tignes ou Val Thorens ?!

Morgan, cowboy, ton départ dans le grand Nord entouré de vaches n'enlèvent rien à nos années de rigolade, j'ai toujours apprécié en toi ce grain de folie qui fait que tu es une personne unique que j'adore ! **Marie** et **Val**, toutes mes félicitations pour votre achat, c'est la vie des grandes personnes maintenant, vous êtes les premiers à vous lancer et je vous souhaite pleins de bonnes choses pour la suite. Une petite dédicace à Marie, dans le temps où elle était encore parisienne, et qu'elle m'attendait avec des bonnes boissons fraîches à la maison lors de notre stage GB3.

Perrine, ma petite Pepette !! On s'est également suivies dans la galère de la thèse et je pense que de nous deux tu as tiré le gros lot (le meilleur chef XD), ma pauvre !! En souvenir, nos soirées au Mano entourées parfois d'Anthony et/ou de Pierre. Perrine, que la force soit avec toi pour la fin, tu as un très beau parcours et j'espère que ta nouvelle vie à Montpellier ou en Suisse (je te la conseille vivement) te plaira !

Enfin, **Jenny**, ma plus vieille amie si je puis dire puisqu'on se connaît depuis le collège, j'évite de parler du nombre d'années car on va commencer à se faire peur.... Merci pour ces virées bars ou restos parfois plus ou moins espacées qui nous ont permis de garder le contact au fil des années. Je te souhaite pleins de bonnes choses pour ton avenir juridique et personnel également.

A ma famille...,

Je tiens à remercier mes parents les plus proches, **Papa, Maman, Isabelle, LE Jo, Elodie** et ma **Clara** adorée. En premier lieu merci de m'avoir permis de faire ce que j'aime et de poursuivre de loooooongues études, promis maintenant les choses sérieuses commencent ! Merci de m'avoir soutenue malgré nos mondes professionnels très différents et merci infiniment de m'avoir supportée dans les moments difficiles et de m'avoir rassurée et fait relativiser quant à la situation... **Maman**, merci de m'avoir fait profiter de ton expérience (cf. les longues discussions qu'on a pu avoir quant à la gestion du stress ou des conflits), merci pour tous ces contacts qui me seront très utiles par la suite, j'en suis sûre !! **Papa**, merci d'avoir volé à mon secours à chaque fois que j'étais en galère et en panique (notamment pour des raisons mécaniques) et merci d'avoir été présent en toute circonstance ; merci pour ces virées à Toudon avec notre compagnon préféré Louky. **Le Jo**, merci pour ta protection et ta franchise, même si nous n'avons pas été d'accord sur tous les sujets, et bien tu restes un modèle pour moi depuis que je suis petite. **Isa**, merci pour ta bonne humeur et tes conseils, merci d'être là au quotidien pour Papa. Je suis fière de dire que tu le rends heureux et ça depuis plus de dix ans maintenant. Je vous souhaite de belles dizaines d'années à venir ! **Elodie**, plus petite en âge mais déjà tellement mature ! Au cours des dernières années, on a traversé à peu près les mêmes épreuves au même moment et on s'est bien serrées les coudes... je te souhaite de réussir dans ta carrière et de pouvoir t'envoler (pas trop loin quand même) là où tu le souhaiteras pour construire ta vie. Promis un jour, je t'emmènerai aux Studios Harry Potter, j'y mets un point d'honneur !! **Clara**, je suis tellement fière de toi, chaque jour je te vois grandir, t'épanouir dans ta nouvelle formation et prendre de l'assurance ! Je suis persuadée que tu feras une chargée de communication hors norme. Un énorme merci pour t'être occupée de moi (surtout à faire des tresses à l'envers) et toutes nos soirées Netflix du Jeudi soir !

Je tiens à remercier tout particulièrement mes grands-parents, **Mamy, Pitou** (qui sait tout) et **Jeanine**. Mamy, merci pour ces innombrables mercredis à t'occuper de moi quand je n'avais pas école (avec les tartines de Nesquik), c'est un des souvenirs les plus heureux de mon enfance. Mon Pitou et ma Jeanine, merci pour cet accueil chaleureux à chaque visite à Cimiez, merci pour la Bollène, dans la maison de Mamoune puis celle de Jeanine et Pitou, surtout merci de m'avoir transmis le gène (via Maman) de la Marmotte, je pense qu'on s'accorde tous les trois pour dire que l'entrée dans le lit est le meilleur moment de la journée !

A **Céline, Enzo** et **Asao** ! Céline, ma sœur de cœur, bien que les dernières années n'aient pas été faciles pour toi, tu t'es battue et tu t'es relevé à merveille autant sur le plan professionnel que personnel, je suis également extrêmement fière de toi ! Tu as élevé deux magnifiques fils qui font la fierté de tous, et surtout la tienne, bravo pour ce bel accomplissement ! Pour l'avenir, je te souhaite beaucoup de bonheur en famille et un épanouissement professionnel, tu le mérites tellement !

Renan, merci d'avoir été mon super grand cousin à qui je peux tout dire et merci pour cette semaine à dévaler les pistes à Val Thorens, ça faisait longtemps que je n'avais pas été la dernière que l'on attend (comme dans le temps avec Tonton et Aelick). Merci **Marraine** et **Tonton** pour votre accueil trop au top à Saint Just mais aussi à Paris !

N'oublions pas une grosse partie de la famille, la **RUSSO family** ! Merci à toutes les cousines grandes et petites, quoi qu'elles ne soient plus aussi petites maintenant et aussi à Matthias (le seul mec !). Merci tatie Doumé pour ton grain de folie et ta bonne humeur communicative, merci Tatie Gény pour ta gentillesse et ta douceur et Tonton Vincent pour tes whiskys bien corsés ou les bloody mary, promis un jour je viendrai passer quelques jours à Cittanova !

A ma famille, **Julien**, quatre ans déjà que nos chemins se sont croisés, j'ai l'impression que c'était hier ! Merci de m'avoir fait découvrir ton univers sportif, tes parents (et grands-parents) adorables et attentionnés, tes amis du hand (spéciale dédicace aux Marseillais et à Pipo qui régale) et tes amis de l'école que je connaissais déjà de vu mais que j'ai appris à découvrir et à grandement apprécier. Je dois aussi te décerner une médaille pour avoir supporté mon humeur et avoir été présent (surtout pendant la rédaction...) ! Merci d'avoir compris à quel point ce projet était important pour moi (pas facile quand on vient de deux mondes pro différents) et de m'avoir soutenue ! J'ai parfois envié ton côté insouciant qui équilibrait à merveille mon côté anxieux... Merci d'avoir agrandi cette famille avec Olive, Judy, La Coö... et un énorme merci pour avoir contrebalancé ma poisse des transports (surtout EasyJet...) lorsqu'on voyageait ensemble !! Merci pour tous ces voyages faits ensembles (Londres, Barcelone, la côte Atlantique, les Cinq Terres, Edinbourg et j'en passe. A présent, de nouveaux voyages et projets nous attendent, et ça commence bientôt avec le départ pour la Big Apple pendant les fêtes (j'en ai toujours rêvé...) !

Liste des abréviations

AB : Acides Biliaires	DGCR8 : DiGeorge syndrome critical region 8
AC : Adénylate Cyclase	DIO2 : Deionidase 2
ACC : Acétyl-CoA Carboxylase	DIT : Diet Induced Thermogenesis
ADA : American Diabetes Association	EASD : European Association for the Study of Diabetes
ADN : Acide DésoxyriboNucléique	Ebf2 : Early b cell factor 2
ADP : Adenosine DiPhosphate	EHMT1 : Euchromatin Histone-lysine N-Methyltransferase 1
AG : Acides Gras	ELOVL : ELongation Of Very Long chain fatty acids
AGO : Argonaute	EWAS : Epigenome-Wide Association Study
AMPc : Adénosine Monophosphate cyclique	EXP5 : Exportine 5
APJ : Apelin Receptor	FABP : Fatty Acid Biding Protein
ARN : Acide RiboNucléique	FATP : Fatty Acid Transport Protein
ARNm : Acide RiboNucléique messenger	DNMT : DNA methyltransferases
AFT : Activating Transcription Factor	DT1 : Diabète de Type 1
ATGL : Adipocyte TriGlyceride Lipase	DT2 : Diabète de Type 2
ATP : Adénosine Tri Posphate	DPP4 : Dipeptyl PePtidase-4
BMP : Bone Morphogenic Protein	FABP4 : Fatty Acid Binding Protein 4
BMPR : Bone Morphogenic Protein Receptor	FADH2 : Flavin Adenine Dinucleotide H2
CIDEA : Cell death inducing DFFA like effector a	FAS : Fatty Acid Synthase
CP : Carence Protéique	FGF : Fibroblast Growth Factor
CPT : Carnitine PalmitoylTransférase	G3P : Glycérol-3-Phosphate
C/EBP : CAAT/ enhancer binding protein	G-6-P : Glucose-6-Phosphate
COX : Cytochrome C Oxidase	GABA : Gamma-AminoButyric Acid
CREB : C-AMP Response Element	GCK : Glucokinase
CS : Citrate Synthase	GDF-3 : Growth Differentiation Factor-3
CSM : Cellules Souches Mésoenchymateuses	GH : Growth Hormone
Dex : Dexaméthasone	GIP : Gastric Inhibitory Polypeptide
DG : DiGlycérade	

GIPR: Gastric Inhibitory Polypeptide Receptor
GLP-1: Glucagon-Like Peptide-1
GLP-1R: Glucagon-Like Peptide-1 Receptor
GLUT: GLUcose Transporter
GPR120: G-Protein Coupled Receptor 120
GR: Glucocorticoid Receptor
GWAS: Genome-Wide Association Study
H3K9: Histone 3 Lysine 9
HDAC: Histone déacétylase
HK2: Hexokinase 2
hMADS: human Multipotent Adipose Derived Stem cells
HSL: Hormone Sensitive Lipase
IBMX: IsoButylMethylXantine
IGF: Insulin-Like Growth Factor
IL-6: Interleukine-6
IMC: Indice de Masse Corporelle
IRF4: Interferon Regulatory Factor 4
IRS: Insulin Receptor Substrate
LADA: Latent Autoimmune Diabetes of Adulthood
LDH: Lactate Déshydrogénase
LPL: Lipoprotéine Lipase
MBzP: monobenzyl-phtalate
MEHP: Mono-(2-éthylhexyl)-Phtalate
METRL: Meteorin-Like protein
miARN ou miR : microARN
MG: Monoglycéride
MGL: MonoacylGlycérol Lipase

MODY: Maturity Onset Diabetes of the Young
NADH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide H
NP: Natriuretic Peptide
NRF: Nuclear Respiratory Factor
NRG4: Neuregulin 4
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PABPC : Polyadenylated-binding protein
PACT : Protein Kinase R-activation Protein
PDH : Pyruvate DésHydrogénase
PDK1: Phospho-inositide Dependant Kinase-1
PDK4 : Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4
PEE : Perturbateur Endocrinien Environnemental
PEP: PhosphoEnolPyruvate
PEPCK: PhosphoEnolPyruvate CarboxyKinase
PET-CT: Positron-Emission Tomography – Computed Tomography
PGC1: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1
Pi : Phosphate inorganique
PI3K : Phosphoinositide 3-Kinase
PKA : Protéine Kinase A
PLIN : Périlipines
PMF : Proton Motive Force
POP : Polluant Organique Persistant
PP : Polypeptide Pancréatique
PPAR : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
PRDM16 : PRD1-BF-1-RIZ1 Homologous-Domain Member 16

RE : Reticulum Endoplasmique

RCIU : Retard de Croissance Intra-Utérin

RISC: RNA-induced silencing complex

ROS: Reactive Oxygen Species

SCD: Stéaroyl-CoA Desaturase

SGLT: Sodium-Glucose Linked Transporter

SHOX2: Short Sature Homebox Protein 2

SIRT1: Sirtuine 1

SNP: Single Nucleotide Polymorphims

SNS: Système Nerveux Sympathique

SVF : Stroma-Vascular Fraction

T3 : Triiodothyronine

T4 : Thyroxine

TA: Tissu Adipeux

TAB: Tissu Adipeux Blanc

TABr : Tissu Adipeux Brun

TABsc : Tissu Adipeux Blanc sous-cutané

TFAM: Mitochondrial Transcription Factor A

TGA: Transcriptional Gene Activation

TGS: Transcriptional Gene Silencing

TMTD: Target RNA-directed miRNA degradation

TNF- α : Tumor necrosis factor alpha

TRBP: TAR-RNA Biding Protein

TRPV1: Transient Receptor Potential Vanilloide 1

TG: Triglycérides

TZD: Thiazolidinedione

UCP1: Uncoupling Protein 1

UTR: UnTranslated Region

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VLDL: Very Low Density Lipoprotein

Table des illustrations

1. Physiopathologie du diabète de type 2

Figure 1 : L'axe cerveau-intestin dans la détection, l'absorption et la métabolisation du glucose	p.22
Figure 2 : L'action de l'insuline sur ses tissus cibles en période postprandiale	p.25
Figure 3 : L'action des hormones contre-régulatrices sur le maintien de la glycémie à distance des repas	p.28
Figure 4 : Estimation du nombre de personnes touchées par le diabète à travers le monde	p.31
Figure 5 : Les différents stades du développement du diabète type 2	p.35
Figure 6 : Les mécanismes épigénétiques susceptibles de moduler l'expression de gènes	p.45
Figure 7 : Les mécanismes impliqués dans le développement du diabète de type 2	p.47

2. Origine développementale du diabète de type 2

Figure 8 : Les différents modèles d'environnement maternel délétère	p.53
Figure 9 : Présentation du modèle de carence protéique maternelle durant la gestation et la lactation	p.56

3. Tissu adipeux brun et adaptation du métabolisme énergétique

Figure 10 : Distribution anatomique des différents dépôts de TA	p.68
Figure 11 : Programme de différenciation adipocytaire	p.70
Figure 12 : Principaux acteurs de la lipogenèse	p.75
Figure 13 : Libération des Acides Gras par la lipolyse	p.76
Figure 14 : Devenir mitochondrial des Acides Gras pour produire de l'énergie	p.77
Figure 15 : Cascade transcriptionnelle de la différenciation adipocytaire brune	p.80
Figure 16 : Morphologie des adipocytes bruns	p.81
Figure 17 : La phosphorylation oxydative mitochondriale et découplage par la protéine spécifique des adipocytes bruns, UCP1	p.83
Figure 18 : Activation de l'adipocyte brun via le système nerveux sympathique	p.88
Figure 19 : Le métabolisme du glucose dans les adipocytes bruns	p.92
Figure 20 : Induction de l'activité du TABr par différents acteurs endogènes/exogènes	p.95
Figure 21 : Sécrétion de Batokines et effets autocrines/paracrines	p.97
Figure 22 : Facteurs influençant la différenciation brune	p.100
Figure 23 : TABr interscapulaire chez le rat et protocole de préparation de la fraction stroma-vasculaire	p.105
Figure 24 : Différenciation d'adipocytes bruns matures dérivés de la fraction stroma vasculaire de TABr de rat	p.106

4. Les microARNs

Figure 25 : Nomenclatures des miARNs	p.109
Figure 26 : Biogenèse canonique des miARNs	p.112
Figure 27 : Mécanisme d'action des miARNs	p.114
Figure 28 : Les miARNs forment des réseaux complexes d'interaction	p.115
Figure 29 : L'implication des miARNs dans le métabolisme	p.117
Figure 30 : Les miARNs dans la différenciation adipocytaire brune	p.121

Conclusion générale

Figure 31 : Schéma conclusif des résultats obtenus au cours du doctorat	p.152
--	-------

Table des matières

Résumé

Abstract

Liste des abréviations

Table des Illustrations

I. Introduction

1. Physiopathologie du diabète de type 2	21
1.1 Régulation de la glycémie au cours du temps	21
1.1.1 L'homéostasie glucidique : une question de survie	21
1.1.2 La gestion de la glycémie après un bol alimentaire.....	22
❖ L'axe intestin-cerveau : manger, détecter, informer.....	22
❖ La sécrétion et l'action de l'insuline après un bol alimentaire.....	23
❖ Le maintien de l'homéostasie glucidique à distance des repas : rôle des hormones contre régulatrices	27
1.1.3 La communication inter-organe liée au métabolisme glucidique	29
1.2 La pandémie diabétique et l'établissement du diabète de type 2.....	31
1.2.1 Données épidémiologiques	31
1.2.2 Le diabète de type 2 versus les autres types de diabète.....	32
1.2.3 De l'insulino-résistance au diabète de type 2.....	34
1.3 Etiologie multifactorielle du diabète de type 2	36
1.3.1 La génétique.....	36
1.3.2 L'étroite relation avec l'obésité.....	37
❖ Les chiffres.....	37
❖ La prédisposition génétique à l'obésité	38
❖ La physiopathologie de l'obésité	38
▪ Le cerveau : maillon central de la régulation de l'homéostasie énergétique.....	38
▪ La dérégulation de la balance énergétique : central versus périphérie.....	39
1.3.3 Les autres facteurs environnementaux	41
❖ Le vieillissement et la sédentarité	41
❖ Le microbiote	42
❖ Les perturbateurs endocriniens	43
❖ L'environnement intra-utérin	44
1.3.4 L'épigénétique	44

2.	Origine développementale du diabète de type 2.....	48
2.1	Concept de conditionnement précoce du développement des maladies métaboliques à l'âge adulte	48
2.1.1	Etudes épidémiologiques originelles.....	48
2.1.2	Naissance de l'hypothèse du « phénotype d'épargne » de l'étiologie du diabète de type 2	51
2.1.3	De « l'origine fœtale des maladies métaboliques » au concept « d'origine développementale survenue à l'âge adulte ».....	51
2.2	Différents modèles animaux d'environnement intra-utérin délétère : le modèle de carence protéique maternelle.....	53
2.2.1	Les modèles animaux de RCIU	54
2.2.2	Le modèle de restriction protéique maternelle et ses conséquences à court et long terme sur la progéniture	55
2.2.3	Les mécanismes cellulaires du conditionnement intra-utérin	58
2.3	Quid de l'environnement paternel ?.....	60
2.4	La transmission transgénérationnelle.....	61
2.4.1	Etudes épidémiologiques humaines en faveur du concept de transmission transgénérationnelle.....	62
2.4.2	Transmission transgénérationnelle des maladies métaboliques dans des modèles animaux	62
2.4.3	Les mécanismes de la transmission transgénérationnelle et les limites.....	64
3.	Tissu adipeux brun et adaptation du métabolisme énergétique	66
3.1	Le tissu adipeux : un organe plastique	66
3.1.1	L'ontogénie du tissu adipeux	66
3.1.2	La distribution anatomique des tissus adipeux.....	67
3.1.3	L'adipogenèse	69
	❖ Cellules Souches Mésoenchymateuses.....	69
	❖ Programme de différenciation adipocytaire	70
3.1.4	La diversité au sein de l'organe adipeux.....	72
	❖ Cellules de l'immunité	72
	❖ Vascularisation.....	73
	❖ Innervation	73
3.1.5	Le métabolisme énergétique de l'adipocyte	73
	❖ Stockage des Acides Gras	74
	❖ Acides gras : une source d'énergie.....	75
	❖ Oxydation des Acides Gras.....	77
3.1.6	Le tissu adipeux comme organe endocrine.....	78

3.2 Quelles spécificités pour le Tissu Adipeux Brun ?	79
3.2.1 Les facteurs de la différenciation adipocytaire brune	79
3.2.2 Les particularités de l'adipocyte brun.....	81
❖ Les marqueurs de l'adipocyte brun.....	81
❖ La mitochondrie.....	82
❖ La protéine thermogénique par excellence : UCP1.....	84
▪ Découverte et rôle d'UCP1.....	84
▪ Activation d'UCP1.....	85
❖ La biogenèse mitochondriale.....	86
3.2.3 La thermogénèse adaptative non-frissonnante	87
❖ L'organisme face au froid et la voie β -adrénergique.....	87
❖ L'importance du métabolisme lipidique	89
▪ Absorption et stockage	89
▪ Dégradation des triglycérides intracellulaires.....	90
▪ Oxydation des Acides Gras.....	91
❖ Le métabolisme du glucose	91
❖ La thermogénèse induite par l'excès de substrats	93
3.2.4 Activation du BAT par d'autres voies (endogènes et exogènes)	94
3.2.5 La sécrétion de « Batokines ».....	96
3.2.6 Le browning.....	98
3.3 Redécouverte chez l'homme et cible thérapeutique émergente	101
3.3.1 L'intérêt thérapeutique du tissu adipeux brun	102
3.3.2 La controverse du tissu adipeux brun	103
3.3.3 Les essais cliniques en cours	104
3.4 Différents modèles cellulaires	104
3.4.1 La culture primaire : adipocytes bruns dérivés de la fraction stroma vasculaire ..	105
3.4.2 Les autres modèles cellulaires d'adipocytes bruns	107
4. Les microARNs	108
4.1 Historique.....	108
4.2 Nomenclature	109
4.3 Machinerie et action des miARNs.....	110
4.3.1 La biogenèse et maturation des miARNs.....	110
❖ La voie canonique (Figure 26).....	111
❖ L'importance de la machinerie des miARNs et sa régulation	113
❖ La voie non canonique.....	113
4.3.2 Les mécanismes d'actions.....	114

4.3.3 La dégradation des microARNs	115
4.4 miARNs et métabolisme	116
4.4.1 La régulation du métabolisme énergétique par les miARNs.....	116
4.4.2 Les miRNAs impliqués dans la différenciation adipocytaire brune	118
❖ La machinerie des miARNs.....	118
❖ Les miARNs.....	119
4.4.3 Les miARNs dans le diabète et la prédisposition au diabète.....	121
4.4.4 Les miARNs : Outils thérapeutiques et Biomarqueurs ?	123
II. Résultats	
1. Présentation du travail- Contexte scientifique.....	125
Article I (Diabetes, Mars 2017)	128
Article II (Revue à Molecular Metabolism, 2018).....	128
Article III (à finaliser pour publication).....	128
III. Discussion	
1. Adaptation métabolique suite a une carence protéique maternelle : rôle du tissu adipeux brun.....	134
1.1 Carence protéique maternelle et adaptation des tissus périphériques dans la progéniture	134
1.2 L'adaptation du tissu adipeux brun : programmation intrinsèque ou conséquence d'une altération métabolique ?	137
1.3 Quid du rôle du système nerveux central dans l'activation du tissu adipeux brun ?...	139
1.4 Objectif : Réussir à maintenir le TABr actif	141
2. Les miARNs comme outil thérapeutique pour activer le tissu adipeux brun.....	143
2.1 La machinerie des miARNs : acteurs clés dans le contrôle de la différenciation et de la fonction du TABr	143
2.2 Les miARNs : autres acteurs clés pour le tissu adipeux brun.....	146
2.3 Les miARNs et leur machinerie : cible thérapeutique?.....	148
IV. Conclusion générale	152
V. Références	154

I. Introduction bibliographique

1. Physiopathologie du diabète de type 2

Le diabète de type 2 (DT2) est une maladie multifactorielle caractérisée par une altération du métabolisme glucidique et lipidique due à une réduction de l'action périphérique de l'insuline et de sa sécrétion par le pancréas. Elle est définie comme étant une hyperglycémie chronique et est diagnostiquée quand la glycémie basale dépasse 1,26 g/L ou 6,9 mmol/l.

1.1 Régulation de la glycémie au cours du temps

1.1.1 L'homéostasie glucidique : une question de survie

L'organisme est un système physiologique intégré régi par de multiples interactions entre les organes pour maintenir une homéostasie énergétique. Il s'agit d'un équilibre dynamique entre les dépenses et les apports d'énergie, permettant le maintien de la stabilité du milieu interne de l'organisme face à des modifications du milieu extérieur (Campbell, 1995). Les dépenses résultent principalement de l'activité physique, du métabolisme basal mais aussi de la thermogenèse, tandis que les apports énergétiques proviennent majoritairement de l'alimentation. Indispensable au bon fonctionnement de l'organisme, le glucose est considéré à la fois comme une source énergétique pour les cellules et comme une entité élémentaire à la base de la plupart des réactions biochimiques de l'organisme. Dans la circulation sanguine, le glucose est en mouvement entre ses sites de production et d'absorption et ceux de son métabolisme à visée énergétique. Il est par conséquent nécessaire de maintenir un équilibre entre les apports et les dépenses glucidiques. Cette homéostasie glucidique est finement régulée par le système nerveux central et par le système hormonal pour maintenir une concentration de glucose dans le sang (glycémie) autour de 1g/L (5,56 mmol/L). Les tissus périphériques vont s'adapter pour maintenir cette glycémie constante dans l'organisme en équilibrant les réserves et les dépenses. En revanche, le cerveau qui est incapable de faire des réserves énergétiques voit son fonctionnement presque exclusivement dépendant de l'utilisation du glucose en consommant 70 % de l'apport et de la production journalière (environ 120 grammes). En situation de déprivation énergétique lors du jeûne, le cerveau pourra utiliser les corps cétoniques, mais un défaut d'approvisionnement prolongé du cerveau en glucose aboutit à des séquelles cérébrales irréversibles. A l'inverse, une hyperglycémie chronique pourra conduire à l'apparition du diabète. Par conséquent, il est important de comprendre comment l'homéostasie est maintenue et régulée au cours du temps pour assurer le bon fonctionnement des différents organes.

1.1.2 La gestion de la glycémie après un bol alimentaire

❖ L'axe intestin-cerveau : manger, détecter, informer

La détection des nutriments par l'intestin joue un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie glucidique (Holst et al., 2016). En effet, suite à un bol alimentaire principalement composé de glucides complexes, les nutriments sont digérés par un ensemble d'enzymes contenues dans la salive, les sucs pancréatiques (**Figure 1**). Une fois sous forme de monomère, le glucose va être absorbé très efficacement par les entérocytes de la partie haute de l'intestin grêle grâce aux transporteurs SGLT (Sodium-Glucose Linked Transporter). L'augmentation de la concentration intracellulaire en glucose va permettre son relargage dans la circulation sanguine par les protéines transmembranaires glycolysées appelés GLUT (GLUcose Transporter). Au-delà de leur rôle dans l'absorption du glucose, les entérocytes informent également le reste de l'organisme de l'arrivée du glucose. En réponse à l'entrée du glucose dans le cytoplasme, les cellules entéroendocrines sécrètent des hormones gastro-intestinales. Ces hormones, dont les principales sont le GLP-1 (Glucagon-Like Peptide-1), le GIP (Gastric Inhibitory Polypeptide), la ghréline ou encore la cholécystokinine, sont détectées par les neurones entériques (Thorens and Larsen, 2004). Ces derniers signalent au système nerveux central et informent l'hypothalamus de l'arrivée du glucose dans le tube digestif (Clemmensen et al., 2017). En réponse à ce message nerveux afférent, le cerveau va à son tour envoyer des signaux de satiété inhibant la production de glucose endogène et stimulant la dépense énergétique (**Figure 1**).

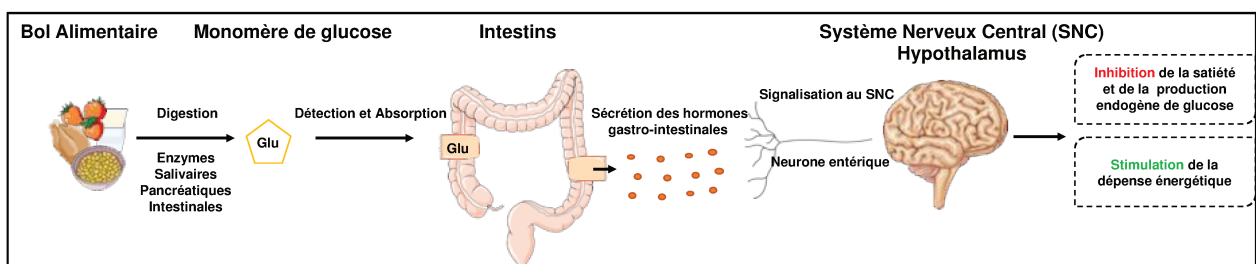


Figure 1 : L'axe cerveau-intestin dans la détection, l'absorption et la métabolisation du glucose (Adapté de Migrenne et al., 2006)

La sécrétion des hormones gastro-intestinales induit aussi une diminution de la vidange gastrique permettant l'arrivée progressive des nutriments dans l'intestin et empêchant l'absorption trop rapide du glucose pour une meilleure gestion de la glycémie. L'importance de la communication nerveuse entre l'intestin et le cerveau a été mise en évidence chez des patients ayant subi une vagotomie et soumis à un test de tolérance au glucose (Humphrey et al., 1975). Lors de ce test, un bolus de glucose est administré oralement aux patients de telle sorte à induire une forte hyperglycémie. Chez les patients

ayant subi une vagotomie, il est constaté une baisse d'efficacité dans la gestion de l'hyperglycémie induite lors de ce test (Humphrey et al., 1975). Plus récemment, des études ont montré qu'inversement, en situation d'hypoglycémie, l'intestin participe à la production endogène de glucose et que cette production participe au maintien de l'homéostasie glucidique (De Vadder et al., 2016; Soty et al., 2017). Les mécanismes de communication entre l'intestin et le cerveau et leurs rôles dans l'homéostasie glucidique et le métabolisme énergétique font aujourd'hui l'objet de recherches intensives (Clemmensen et al., 2017; De Vadder et al., 2016).

❖ ***La sécrétion et l'action de l'insuline après un bol alimentaire***

Outre l'absorption des glucides alimentaires par le tractus intestinal, les principaux acteurs de la régulation de la glycémie sont le pancréas, le foie, le muscle et les tissus adipeux. Ceux-ci sont caractérisés par leur capacité de sécrétion d'hormones hypo ou hyperglycémiantes pour le pancréas, ou de stockage, relargage et production de substrats énergétiques aboutissant à l'équilibre glycémique pour le foie, le muscle et le tissu adipeux.

L'augmentation de la glycémie suite à un repas est directement perçue par le pancréas. Cet organe à la fois endocrine et exocrine est constitué pour sa partie endocrine de petits groupes de cellules nommés « îlots de Langerhans » distribués à travers l'organe (2% de la masse pancréatique) (Conwell et al., 2014). Ceux-ci sont entourés de cellules acineuses (98 % de la masse pancréatique) pour la partie exocrine chargées de la sécrétion d'enzymes digestives (trypsine, chymotrypsine, amylase) (Conwell et al., 2014). Les îlots de Langerhans ont un rôle clé dans la régulation endocrine de la glycémie avec notamment la production et la sécrétion par les cellules α et β des deux hormones protagonistes, respectivement, le glucagon et l'insuline. En plus de ces cellules α et β majoritaires au sein des îlots de Langerhans pancréatiques, il existe deux autres types cellulaires : les cellules δ sécrétant de la somatostatine et les cellules dites « PP-cells » sécrétant le Polypeptide Pancréatique (PP). Alors que la somatostatine se lie à son récepteur spécifique pour induire l'inhibition de la sécrétion de l'insuline, du glucagon, de l'hormone de croissance ou encore de l'hormone thyroïdienne, le PP joue un rôle dans le mécanisme d'inhibition de la sécrétion pancréatique de la somatostatine (Kim et al., 2014b).

L'insuline, considérée à ce jour comme la seule hormone hypoglycémiante de l'organisme, est un polypeptidique de 5.7 kDa composée de deux chaînes A et B, respectivement de 21 et 30 acides aminés, reliés par deux ponts disulfures. L'insuline est sécrétée par les

cellules β des îlots de Langerhans lors d'une augmentation de la concentration plasmatique de glucose (mais aussi des acides aminés et des acides gras libres) (Fu et al., 2013). En effet, ce dernier va pénétrer dans les cellules β pancréatiques au moyen des transporteurs de glucose GLUT et plus particulièrement de l'isoforme GLUT-2 chez les murins et GLUT-1 chez l'homme (De Vos et al., 1995; McCulloch et al., 2011), difficilement saturable ce qui lui permet de transporter le glucose proportionnellement à sa concentration extracellulaire. GLUT-2/1 sont couplés à la glucokinase qui phosphoryle le glucose intracellulaire pour donner du Glucose-6-Phosphate (G-6-P), permettant la séquestration du glucose dans le cytoplasme des cellules.

Le glucose est alors métabolisé et l'augmentation du ratio ATP/ADP provoque la dépolarisation de la membrane plasmique puis l'exocytose des vésicules contenant l'insuline. Le processus de sécrétion est biphasique, avec une première sécrétion rapide où l'insuline stockée dans les granules de sécrétion proche de la membrane est relarguée dans les minutes qui suivent l'absorption intestinale du glucose, et une seconde phase de sécrétion impliquant des grains sécrétoires plus éloignés de la membrane et de l'insuline nouvellement synthétisée. Cette hormone est synthétisée sous forme d'un précurseur appelée pré-proinsuline qui sera clivée lors de différentes étapes de maturation pour aboutir à la forme mature du peptide.

L'action pléiotropique de l'insuline est médiée par son récepteur hétérotétramérique, une glycoprotéine de surface composée de deux sous-unités α portant le site de liaison pour l'hormone et deux sous-unités β ayant une activité tyrosine kinase. Les différentes sous-unités sont reliées par des ponts disulfures. Le récepteur de l'insuline est ubiquiste mais plus fortement exprimé dans les tissus dits insulino-sensibles que sont le foie, le muscle et le tissu adipeux. La liaison de l'insuline sur son récepteur induit une stimulation de son activité tyrosine kinase intrinsèque avec autophosphorylation (résidus Tyr114, Tyr1150, Tyr1151) et phosphorylation d'autres protéines dites substrats requises pour la médiation de la signalisation insulinique (ex : les IRS pour Insulin Receptor Substrate). Consécutivement, plusieurs autres protéines intra-cellulaires incluant des kinases (Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK)), des phosphatases et des facteurs de transcription sont activées permettant la régulation des effets métaboliques et mitogéniques de l'insuline sur ses tissus cibles (Taniguchi et al., 2006; Van Obberghen et al., 2001).

Le foie est un organe central par sa localisation et son rôle crucial dans la régulation de la glycémie. C'est l'organe capable à la fois de produire et de stocker le glucose selon l'état nutritionnel de l'organisme (Nordlie et al., 1999). Le foie est irrigué par la veine porte

qui amène un sang riche en nutriments notamment suite à un repas. Lorsque la glycémie augmente, les transporteurs GLUT-2 permettent de faire rentrer le glucose rapidement dans les hépatocytes même pour de fortes concentrations; il sera immédiatement phosphorylé par la glucokinase, comme dans les cellules β . Ensuite les hépatocytes, sous le contrôle de l'insuline, vont réapprovisionner leur stock de glucose sous forme de glycogène, polymère formé d'un grand nombre de molécules de glucose, via la glycogénogenèse. Parallèlement, l'insuline va empêcher la production de glucose hépatique en inhibant la glycogénolyse à partir du glycogène et la synthèse de novo de glucose à partir d'acide pyruvique, c'est à dire la néoglucogenèse (**Figure 2**).

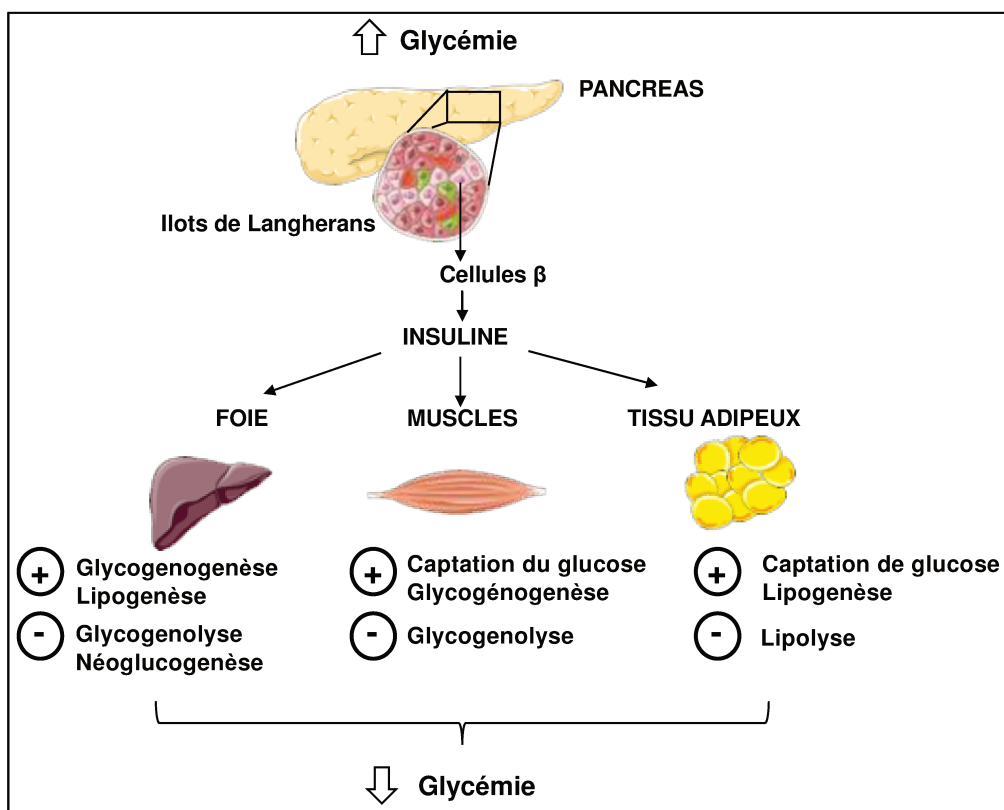


Figure 2 : L'action de l'insuline sur ses tissus cibles en période postprandiale

En situation de jeûne, la production de glucose hépatique permet l'approvisionnement en glucose pour tout le reste de l'organisme, d'où l'importance de l'insuline dans l'inhibition de celle-ci après un repas pour le maintien de l'homéostasie glucidique. Une fois les stocks de glycogène réapprovisionnés, l'insuline stimule la conversion du glucose en acides gras par le processus de la lipogenèse de novo. Les Acides Gras (AG) néo-formés sont acheminés vers le muscle pour sa propre consommation et vers le tissu adipeux où ils seront stockés sous forme de Triglycérides (TG). Par ailleurs, lorsque la cellule a besoin d'énergie, le glucose est hydrolysé pour produire de l'ATP qui constitue la

principale source d'énergie chimique intracellulaire grâce à la glycolyse cytoplasmique couplée au cycle de Krebs et à la phosphorylation oxydative mitochondriale.

Ainsi après un repas, l'insuline favorise le stockage de glucose sous forme de macromolécules dans le muscle et le foie principalement sous forme de glycogène et dans le tissu adipeux sous forme de TG (**Figure 2**). L'insuline va tout d'abord permettre l'entrée du glucose dans les cellules musculaires et du tissu adipeux en stimulant la translocation à la membrane plasmique de son transporteur GLUT-4, augmentant son incorporation d'un facteur 15 à 20 (Brewer et al., 2014). Dans le muscle, les réserves énergétiques serviront pour la production d'ATP nécessaire à la contraction musculaire. En effet, le muscle ne possède pas la glucose-6-phosphatase nécessaire à la transformation du G-6-P en glucose. Dans le tissu adipeux qui constitue la plus grande réserve énergétique chez l'homme, l'insuline est à l'origine de deux actions concomitantes : elle favorise la lipogenèse, synthèse d'AG et de TG à partir de glucose, et inhibe leur oxydation lors de la lipolyse pour éviter qu'ils soient aussitôt relargués et permettre de réduire leur concentration plasmatique (**Figure 2**).

Outre les actions principales de l'insuline sur les tissus métaboliques cibles cités ci-dessus, l'hormone hypoglycémiante joue aussi un rôle dans la régulation de plusieurs autres fonctions physiologiques notamment au niveau du cerveau, longtemps considéré comme « insensible » à l'insuline. En effet, contrairement aux muscles ou au tissu adipeux, l'hormone n'est pas nécessaire pour le transport de glucose dans les cellules du cerveau qui utilise les isoformes GLUT-1 et GLUT-3. Néanmoins, une étude pionnière sur les primates ont montré que l'injection intra-cérébroventriculaire d'insuline diminuait la prise alimentaire et la prise de poids (Woods et al., 1979). Un nombre croissant d'études sur les rongeurs et les humains a depuis identifié l'insuline en tant que peptide neurorégulateur important dans le cerveau, où l'hormone coordonne divers aspects de l'équilibre énergétique et de l'homéostasie du glucose périphérique (Tups et al., 2017). Des souris invalidées pour le récepteur de l'insuline dans les neurones développent une insulino-résistance associée à une exacerbation de l'obésité induite par l'alimentation (Gray et al., 2014). D'autre part, l'insuline a également un rôle fonctionnel dans les cellules α et β du pancréas où la signalisation joue un rôle essentiel pour le maintien de la sécrétion d'insuline appropriée ainsi que pour la sécrétion du glucagon (Bunner et al., 2014; Kulkarni et al., 1999).

❖ **Le maintien de l'homéostasie glucidique à distance des repas : rôle des hormones contre régulatrices**

L'apport alimentaire et la production endogène de glucose ne sont pas constants et l'organisme va devoir maintenir sa glycémie lors des périodes de jeûne, d'exercice physique ou de stress, au cours desquelles l'absorption intestinale de glucose est nulle. Le maintien constant de la glycémie implique donc un équilibre subtil entre l'entrée et la sortie de glucose du sang. Le système nerveux sympathique couplé aux signaux hormonaux et aux signaux métaboliques comme la diminution de la concentration plasmatique du glucose est capable d'induire la sécrétion de glucagon, peptide composé de 29 acides aminés, synthétisé sous forme de préproglucagon par les cellules α des îlots de Langerhans juxtaposées aux cellules β . Les actions du glucagon sont globalement à l'opposé de celles induites par l'insuline agissant de manière réciproque soulignant l'importance de leur complémentarité (Jones et al., 2012). En effet, le glucagon est une hormone hyperglycémiant qui va stimuler la production endogène de glucose. En se fixant à son récepteur à sept domaines transmembranaires couplé à une protéine Gs, le glucagon active l'Adénylate Cyclase (AC) qui aboutit à l'augmentation de la production d'AMPc (Adénosine Monophosphate cyclique) et à l'activation de la protéine kinase A (PKA). Celle-ci induit des effets rapides par l'activation et l'inhibition d'enzymes métaboliques. Cependant l'action du glucagon est majoritairement localisée au niveau du foie, où les stocks de glycogène hépatique peuvent être mobilisés grâce à la glycogénolyse pour libérer du glucose dans le sang (**Figure 3**). Le foie exprime notamment la Glucose-6-Phosphatase, indispensable pour retirer le groupement phosphate et libérer le glucose à partir de G-6-P. La mobilisation des stocks de glycogène participe donc activement à la régulation de l'homéostasie glucidique et permet la libération de glucose qui peut alors être utilisé par les organes qui en ont besoin. Parallèlement, lorsque ces stocks commencent à diminuer, le foie et le rein vont pouvoir convertir des composés non glucidiques en glucose via la néoglucogenèse, dont les principaux substrats sont le lactate, le pyruvate, le glycérol ainsi que les acides aminés glucoformateurs (Cano, 2002; L.R., 2015). L'intestin pourra également participer en l'absence d'une production hépatique de glucose (Mutel et al., 2011; Penhoat et al., 2014). Le glucagon viendra par ailleurs stimuler la lipolyse au niveau du tissu adipeux.

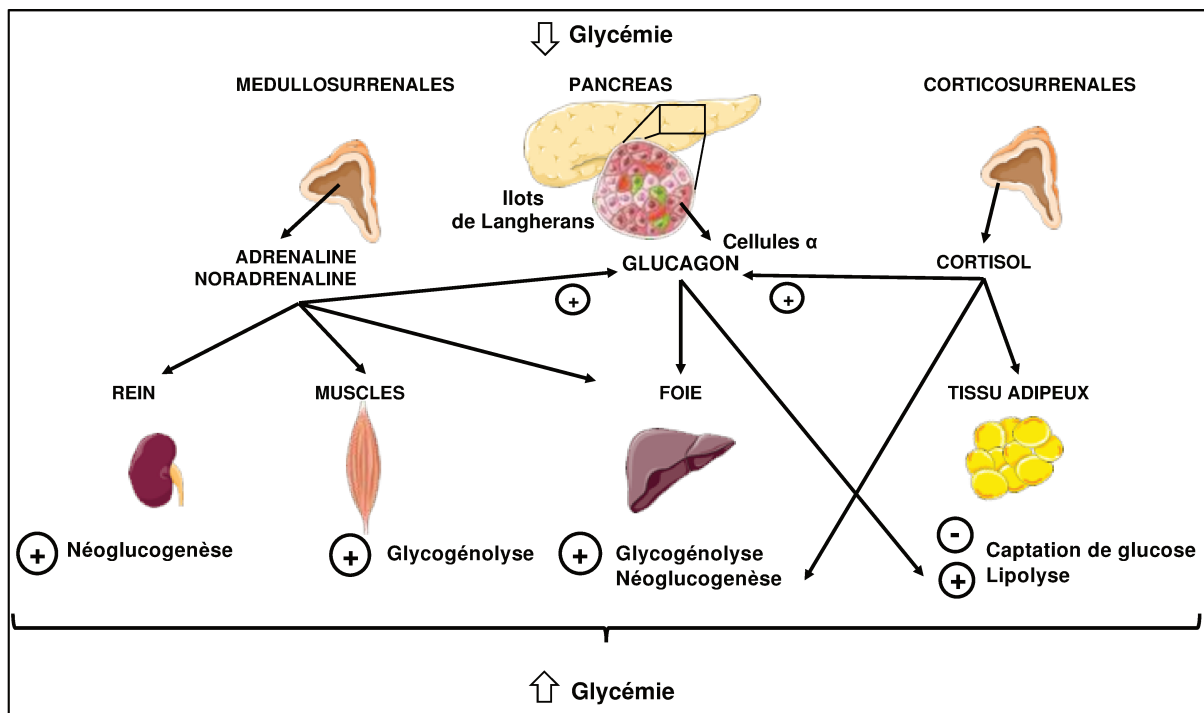


Figure 3 : L'action des hormones contre-régulatrices sur le maintien de la glycémie à distance des repas

Le glucagon mais aussi les catécholamines (adrénaline et noradrénaline) ainsi que les glucocorticoïdes agissent dans le but d'augmenter la concentration plasmatique de glucose. Le rôle de ces hormones contre-régulatrices de l'insuline est d'autant plus important compte-tenu des séquelles cérébrales dommageables encourues en cas d'hypoglycémie prolongée. En ce qui concerne les catécholamines, l'adrénaline est sécrétée par les cellules médullosurrénales notamment en réponse à l'hypoglycémie, reconnue comme un stimulus de stress (Tank and Lee Wong, 2015). La noradrénaline quant à elle est principalement libérée au niveau du tronc cérébral et par les fibres nerveuses du système nerveux sympathique ainsi que par les médullosurrénales. Ces deux catécholamines ont un rôle significatif dans le maintien de la glycémie durant l'exercice et dans des situations de stress (Rizza et al., 1979; Sprague and Arbelaez, 2011). Elles stimulent la sécrétion de glucagon et inhibent celle de l'insuline, causant une diminution du ratio insuline/glucagon induisant ainsi la néoglucogenèse dans le foie, la glycolyse musculaire et la clairance de glycogène dans ces deux derniers tissus (**Figure 3**). Au sein du tissu adipeux brun, la noradrénaline peut se fixer sur son récepteur β adrénergique et mobiliser les réserves de TG contenus dans les gouttelettes lipidiques via l'induction de la lipolyse. Le métabolisme du tissu adipeux brun sera détaillé plus particulièrement dans la troisième partie de ce manuscrit. Les glucocorticoïdes, et plus particulièrement le cortisol chez l'homme, sont libérés à partir du cortex surrénalien en réponse au stress que représente l'hypoglycémie (Sprague and Arbelaez, 2011). Les

glucocorticoïdes augmentent la production hépatique de glucose, notamment en augmentant la disponibilité des précurseurs de la néoglucogenèse et en stimulant la sécrétion de glucagon (**Figure 3**). Ils sont aussi à l'origine d'une insulino-résistance musculaire en diminuant l'utilisation périphérique du glucose et son oxydation. Enfin, ils diminuent la sécrétion de l'insuline.

1.1.3 La communication inter-organe liée au métabolisme glucidique

Pour maintenir l'homéostasie glucidique, la communication entre les organes est primordiale. En effet, comme décrit ci-dessus, le pancréas va sécréter deux hormones clés qui vont agir sur leurs principaux tissus cibles (foie, muscle et tissu adipeux) pour stocker les excédents après un bol alimentaire ou produire du glucose en situation éloigné des repas à partir de précurseurs provenant de ces mêmes tissus. Tout ceci pour améliorer l'absorption du glucose, réduire l'hyperglycémie, et apporter au cerveau le glucose nécessaire à son bon fonctionnement. L'intestin qui informe l'organisme de l'arrivée de glucose après un repas viendra à l'inverse soutenir le foie en situation de jeûne prolongé tout comme les reins pour produire du glucose de novo. L'ensemble de cette communication classique inter-organe constitue le métabolisme intégré relativement bien documenté (Bergman, 2007; Kowalski and Bruce, 2014; Tups et al., 2017). A présent, la communauté scientifique s'interroge sur l'habileté des organes à interagir au moyen de nouveaux signaux métaboliques notamment endocriniens et sur la sécrétion d'insuline pour offrir des opportunités thérapeutiques pour les patients atteints d'une dérégulation du métabolisme glucidique (Shirakawa et al., 2017).

Dans ce contexte, des études randomisées ont mis en évidence que la chirurgie bariatrique initialement destinée à réduire le poids des patients obèses peut être effectuée pour traiter le diabète et ses complications métaboliques, le terme de « chirurgie métabolique » est alors apparu (Kamvissi-Lorenz et al., 2017). Ces études ont montré que le contournement du duodénum et de parties du jéjunum exerce un effet important sur la sensibilité à l'insuline et sa sécrétion, renforçant ainsi le rôle de l'intestin dans l'homéostasie glucidique. Les hypothèses concernant le mécanisme d'action de la chirurgie métabolique pour la rémission du diabète vont des théories axées sur la détection jéjunale des nutriments à l'action des incrétines (GLP-1 et GIP), en passant par la sécrétion émoussée d'hormones de résistance à l'insuline aux modifications du microbiote (Kamvissi-Lorenz et al., 2017).

Le foie qui est un organe clé dans la régulation de l'homéostasie glucidique a récemment été décrit comme organe source de facteurs circulants qui peuvent directement signaler

aux îlots et contribuer au métabolisme organisationnel. En effet, El Ouaamari et al. ont mis en évidence que la protéase SerpinB1 (inhibiteur d'élastase) sécrétée par les hépatocytes augmente la prolifération et la fonction des cellules β pancréatiques (El Ouaamari et al., 2016). Cette communication entre le foie et le pancréas n'est pas étonnante étant donné que ces deux organes auraient des origines embryonnaires communes (Pandol, 2010). De la même manière, Song et al. ont mis en évidence le rôle de la Kisspeptine (ou KISS-1 metastasis suppressors gene) dans la régulation de l'homéostasie glucidique. La Kisspeptine est produite au niveau du foie suite à l'activation de la voie de signalisation PKA-CREB par le glucagon entraînant un défaut de sécrétion d'insuline (Song et al., 2014).

Le tissu adipeux, organe majeur pour le stockage lipidique, est aussi décrit comme un organe endocrine capable d'intégrer de multiples signaux systémiques et de sécréter plusieurs hormones appelées adipokines (Luo and Liu, 2016). En effet, la découverte de la leptine, hormone synthétisée et sécrétée par les adipocytes et dont l'action au niveau du système nerveux central sur la régulation de la prise alimentaire et de la dépense énergétique a été clairement démontrée, a donné au tissu adipeux une dimension de tissu endocrine qu'il n'avait pas auparavant. Cette hormone a été décrite pour inhiber la sécrétion d'insuline via les canaux ioniques potassium dépendant de l'ATP (Kulkarni et al., 1997);(Chen et al., 2013a). Il a depuis été démontré que de nombreuses autres adipokines influent sur la fonction des cellules β en améliorant (adiponectine, FABP4, nesfatine) ou en inhibant (résistine, apeline) la libération d'insuline, ou en influençant la survie des cellules β (FGF 21) (Cantley, 2014).

D'autre part, il est bien connu que le cerveau régule l'homéostasie énergétique en exerçant un contrôle continu et coordonné sur la plupart des organes métaboliques. La cellule β pancréatique est une des cibles principales des neurones. En effet, ces cellules sont très innervées par le système nerveux sympathique et parasympathique qui exprime de multiples neurotransmetteurs. L'acétylcholine est un neurotransmetteur majeur de l'action parasympathique et régule la sécrétion d'insuline via l'activation de ses récepteurs muscariniques spécifiques situés à la surface des cellules β . Dans les îlots humains, contrairement à la situation observée chez la souris, l'innervation cholinergique est rare. L'apport cholinergique provient de la sécrétion de l'acétylcholine par les cellules α environnantes qui libèrent le neurotransmetteur suite à une diminution de la concentration plasmatique de glucose. Cette étude prouve l'importance des signaux paracrines provenant des îlots contribuant à la régulation neuroendocrine des cellules β pancréatiques (Rodriguez-Diaz et al., 2011).

Une dernière preuve de la communication inter-organe réside dans le fait que des hormones telles que la leptine, l'insuline, le GLP-1 qui sont sécrétées dans différents tissus de l'organisme, agissent au niveau central sur l'hypothalamus et d'autres aires cérébrales et influent sur la régulation de l'homéostasie métabolique. De plus, ces hormones sont aussi capables d'agir sur des neurones dopaminergiques pour influencer la composante hédonique de la prise alimentaire (Clemmensen et al., 2017).

Compte tenu du rôle signifiant de la communication inter-organe dans la régulation de l'homéostasie métabolique, ces données doivent être prises en compte dans la compréhension de systèmes complexes de dérégulation que sont l'obésité ou le diabète et nécessitent des investigations plus profondes.

1.2 La pandémie diabétique et l'établissement du diabète de type 2

1.2.1 Données épidémiologiques

Le diabète est une maladie chronique évolutive considéré comme un problème majeur de santé publique. En effet, le diabète est l'une des quatre maladies non transmissibles prioritaires ciblée par les dirigeants mondiaux selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). A l'échelle mondiale, le diabète concerne 425 millions de personnes en 2017 (**Figure 4**), contre 108 millions en 1980 et touchera plus de 629 millions de personnes en 2045 selon les données publiées par la Fédération Internationale du Diabète (IDF, 2017).

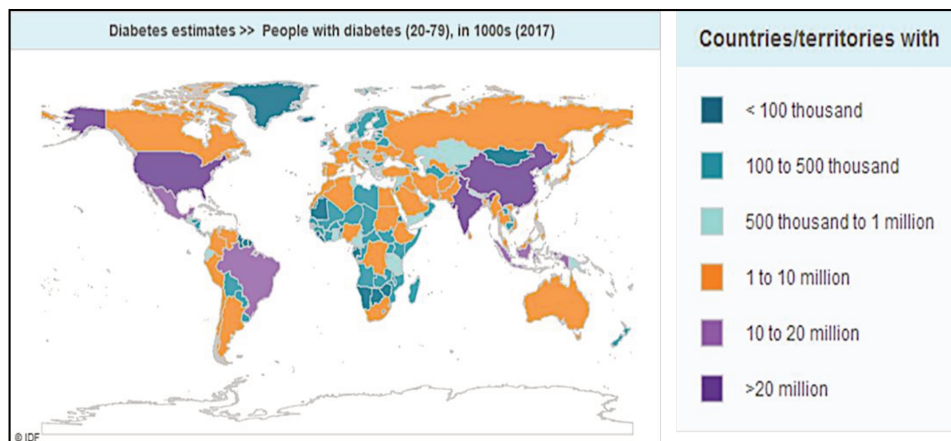


Figure 4 : Estimation du nombre de personnes touchés par le diabète à travers le monde (IDF, 2017)

A ce titre, il est important de mentionner que le diabète fait peser un lourd fardeau sur les systèmes de soin de santé et sur l'économie mondiale. Aux dépenses médicales directes comprenant la prévention, le traitement du diabète et de ses complications (soins ambulatoires et d'urgence), s'ajoutent les dépenses indirectes comme par exemple la perte de revenu familial associée aux incapacités et aux décès prématurés. En 2017, le

montant total des dépenses mondiales de santé liées au diabète s'élevait à 727 milliards de dollars et devrait augmenter de 7 % pour atteindre 776 milliards de dollars en 2045.

A long terme, si le diabète n'est pas diagnostiqué dans les stades précoces de son développement, il peut entraîner des complications touchant de nombreuses parties de l'organisme qui constituent une importante cause de mortalité. Ainsi, parmi les complications possibles figurent l'infarctus du myocarde, l'insuffisance rénale, l'amputation des membres inférieurs ou encore la cécité. De plus, le diabète a récemment été associé à des taux accrus de certains cancers et une progression des taux d'incapacité physique et cognitives (WHO, 2016; Wong et al., 2013). Compte tenu de la recrudescence des complications recensées et de l'augmentation de l'espérance de vie des patients diabétiques, il est important de surveiller la qualité de vie des de ceux-ci.

Notons qu'il existe des moyens de prévenir le diabète comme une activité physique régulière, une alimentation saine, et un contrôle régulier tensionnel et lipidique. Dans le but d'améliorer la qualité de vie des personnes vivant avec le diabète, le diagnostic précoce est primordial. Par la suite, lorsque la pathologie a été diagnostiquée, des interventions efficaces au regard de leur coût sont mises en place telles que le contrôle glycémique régulier assorti de la prescription de médicaments ou des examens destinés au dépistage des lésions oculaires et rénales (WHO, 2016).

1.2.2 Le diabète de type 2 versus les autres types de diabète

Il existe plusieurs types de diabète mais le DT2 ou non insulino-dépendant est prédominant en termes de prévalence avec plus de 90 % des cas représentés dans la plupart des populations. Le DT2, associé à l'insulino-résistance, est aussi appelé "diabète de la maturité" ou "diabète gras" car il se développe plus souvent avec l'âge et dans un contexte d'obésité. Les origines de cette pathologie seront développées dans la section suivante.

Par ailleurs, il existe d'autres types de diabète dont la prévalence est moindre notamment le diabète de type 1 (DT1), diabète juvénile ou insulino-dépendant qui se caractérise par une production d'insuline insuffisante dans l'organisme dû à une destruction auto-immune des cellules β pancréatiques. Ainsi le diabète de type 1 est diagnostiqué en présence d'anticorps dirigés contre les îlots pancréatiques. Il est généralement convenu que le DT1 résulte d'une interaction complexe entre des facteurs génétiques, environnementaux, et immunologiques. Au niveau mondial, le DT1 représente environ 8 % des cas recensés de

diabète (IDF, 2017). La pathologie est plus souvent diagnostiquée chez les enfants et les jeunes adolescents dont les symptômes les plus fréquents sont une polyurie, une polydipsie associée à une fatigue importante et des troubles de la vision dans certains cas. Le traitement du DT1 est l'insuline, qui n'est plus du tout sécrétée par les cellules β pancréatiques préalablement détruites (Katsarou et al., 2017). Différents schémas thérapeutiques existent basés sur l'utilisation d'insuline ayant des modes d'action immédiates, lentes ou très lentes, et impliquant en général plusieurs injections par jour.

Les autres types de diabète concernent les 2 % restants et représentent des formes rares du diabète. C'est le cas du diabète MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young) qui est défini sur des critères essentiellement cliniques : jeunes patients de moins de 40 ans, initialement non insulino-dépendants et de transmission autosomique dominante (Fajans et al., 2001). Un autre diabète qui se développe généralement à un âge adulte avancé mais qui s'apparente à un DT1 est le diabète LADA (Latent Autoimmune Diabetes of Adulthood). Il se définit comme un diabète non-insulinodépendant diagnostiqué chez les patients entre 30 et 50 ans qui présentent des anticorps contre la glutamate décarboxylase, enzyme qui réalise la conversion du L-Glutamate en γ -aminobutyrate (GABA) exprimée dans le cerveau et le pancréas. A l'image du DT1, le diabète LADA est une maladie auto-immune mais se développe plutôt chez les adultes à l'instar du DT2.

Un diabète peut également survenir lors d'une grossesse, il s'agit du diabète gestationnel. Il se définit comme tout état d'hyperglycémie apparu au cours de la grossesse chez une femme sans diabète connu antérieurement (Kharroubi and Darwish, 2015). Selon les études épidémiologiques réalisées en 2015, la prévalence du diabète gestationnel concerne environ 5 % des grossesses (Kampmann et al., 2015). Il se développe généralement au cours du second ou du troisième trimestre de la grossesse, entre la 24^{ème} et la 28^{ème} semaine. C'est à cette période que le diagnostic s'effectue, au moyen d'un test oral de tolérance au glucose recommandé par l'OMS, l'ADA (American Diabetes Association) et l'EASD (European Association for the Study of Diabetes). Si 2 h après l'ingestion d'un bolus de glucose de 75g, la glycémie est supérieure à 11.1 mmol/L, l'état de diabète gestationnel est déclaré. Au cours de la grossesse normale, il existe une insulino-résistance physiologique, progressive et réversible associée à un hyperinsulinisme réactionnel (Vambergue et al., 2002). Le diabète gestationnel se développe alors lorsque la mère n'est plus capable de produire suffisamment d'insuline nécessaire au fonctionnement de son organisme et au développement du fœtus, conduisant à une hyperglycémie. L'hyperglycémie maternelle stimule alors le pancréas endocrine du fœtus et induit une hyperactivité des cellules β conduisant à une

hyperinsulinémie. Les forts taux d'insuline fœtale stimulent le stockage de l'énergie sous forme de graisses, et une macrosomie fœtale est souvent observée à la naissance (nourrissons de plus de 4 kg à la naissance). Il existe plusieurs facteurs de risque parmi lesquels un indice de masse corporel > 30 ou une certaine prédisposition ethnique (amérindienne, asiatique) qui augmentent la probabilité de développer un diabète gestationnel. De plus, les enfants nés de mères ayant subi un diabète gestationnel pendant la grossesse sont plus susceptibles de développer à leur tour un diabète de type 2 ou une obésité à l'âge adulte. Par ailleurs, le diabète gestationnel augmente le risque de développer un diabète de type 2 par la suite pour les mères (Kampmann et al., 2015). En somme le risque augmente à chaque grossesse.

1.2.3 De l'insulino-résistance au diabète de type 2

Depuis plus de cinq décennies, l'insulino-résistance est associée au DT2. L'insulino-résistance est non seulement le facteur de prédiction le plus significatif dans le développement de la pathologie du DT2, mais aussi une cible thérapeutique lorsque la maladie est installée. Cliniquement, le terme « insulino-résistance » signifie qu'une concentration d'insuline supérieure à la quantité normale est requise pour maintenir une normoglycémie. A l'échelle cellulaire, cela se caractérise par une baisse progressive de la sensibilité des cellules cibles à l'insuline entraînant des phénomènes de compensations métaboliques.

Plus précisément, la résistance à l'insuline se caractérise par une diminution de la sensibilité de l'hormone dans ses tissus cibles (foie, muscle squelettique et tissu adipeux) et par conséquent une capacité moindre de ceux-ci à fournir une réponse appropriée à une concentration d'hormone donnée (Gutierrez-Rodelo et al., 2017). La résistance à l'insuline peut être compensée dans un premier temps par une augmentation de la sécrétion de l'hormone. Les cellules β pancréatiques vont donc devoir fournir des doses plus importantes d'insuline pour obtenir les mêmes effets au niveau des tissus insulino-sensibles. Ceci entraîne une « hyper-insulinémie », considérée comme un marqueur classique de la résistance à l'insuline (Jones et al., 1997). Cette phase précoce de la pathologie est généralement asymptomatique puisque la sécrétion de l'hormone est suffisante pour compenser la résistance des tissus et maintenir une normoglycémie avec uniquement des hyperglycémies transitoires. Cependant, dans certains cas, la sensibilité à l'insuline va encore se détériorer et l'hypersécrétion d'insuline ne pourra plus compenser cette insulino-résistance. Ceci a deux conséquences majeures : un défaut de captation

du glucose par le muscle et le tissu adipeux et une augmentation de la néoglucogenèse hépatique (Clore et al., 2000; Magnusson et al., 1992). En effet, l'excès d'insuline dans la circulation sanguine contribue au développement de la résistance à l'insuline par un rétrocontrôle négatif en induisant l'internalisation du récepteur à l'hormone, par une altération des taux de transcription notamment pour GLUT-4, sa dégradation et l'inhibition de son activité (Huang et al., 2001). Ces deux conséquences majeures vont conduire à une hyperglycémie chronique chez le patient, qui sera alors hyperglycémique et hyperinsulinémique. L'augmentation de la glycémie observée après un repas sera plus élevée et le temps nécessaire pour revenir à l'état basal plus long chez un individu résistant à l'insuline par rapport à un individu normal. Il s'agit du prédiabète. Ensuite le pancréas s'épuise et le diabète s'installe avec ces deux défauts : une résistance à l'insuline et une sécrétion d'insuline insuffisante. **(Figure 5)** (Kahn, 1998; Phillips et al., 2014)). Il est à noter que des évidences existent pour imaginer le schéma inverse selon lequel l'hyperinsulinémie causerait la résistance à l'insuline (Czech, 2017).

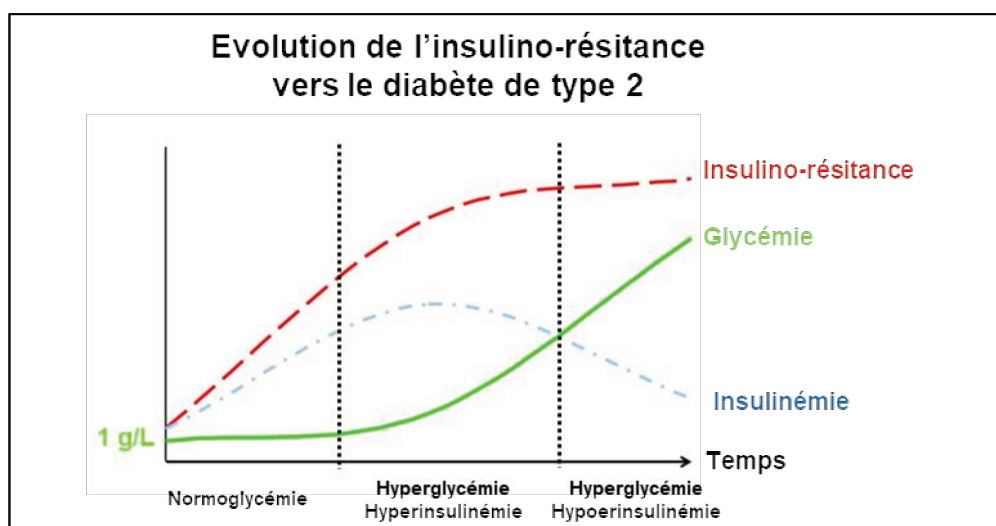


Figure 5 : Les différents stades du développement du diabète de type 2 (Adapté de Ramlo-Halsted and Edelman, 1999)

D'autre part des débats subsistent quant à la chronologie des tissus affectés par la résistance à l'insuline (Czech, 2017; Samuel and Shulman, 2012). Au niveau périphérique, la chute de sécrétion de l'insuline par le pancréas provoque une diminution majeure de la captation musculaire de glucose induite par l'insuline et l'insulino-résistance musculaire joue un rôle majeur dans l'hyperglycémie postprandiale (Ryder et al., 2001). Au niveau du foie, une activation du facteur de transcription Foxo1 augmente l'expression d'enzymes clés de la néoglucogenèse. Il est aussi bien établi que l'accumulation des lipides dans les tissus ectopiques tels que le muscle ou le foie contribuent au développement des phases précoces de l'insulino-résistance. Des stratégies visant à

réduire le contenu lipidique de ces organes présentent donc un grand intérêt thérapeutique pour le traitement de l'insulino-résistance (Alejandro et al., 2015; Czech, 2017; Samuel and Shulman, 2012).

1.3 Etiologie multifactorielle du diabète de type 2

1.3.1 La génétique

Bien qu'il existe une prédisposition, la base génétique du DT2 est complexe et l'hétérogénéité phénotypique de cette pathologie rend difficile les études génétiques. Cependant, au début des années 2000, l'analyse de vastes cohortes de patients à l'aide de GWAS (Genome-Wide Association Study) et de méta-analyses ont permis d'identifier plus de 47 loci et de 150 SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) associés à un risque accru de développer la maladie (Bonfond and Froguel, 2015 ; Prasad and Groop, 2015). Pour la plupart d'entre elles, ces variations géniques sont associées à des voies de signalisation impliquées dans le fonctionnement des cellules β -pancréatiques. Parmi les SNPs découverts grâce à ces analyses méta génomiques, il existe entre autres des mutations dans le gène de la glucokinase (GCK) qui permet de produire le glucose – 6-phosphate pour la synthèse de glycogène dans le foie. Ceci a permis l'identification de l'étiologie génétique de certaines formes monogéniques de diabète incluant les MODY-2 et MODY-5 (Marz et al., 2004).

Par ailleurs, un des plus importants locus de susceptibilité est situé sur le facteur de transcription TCF7L2, impliqué dans la voie de signalisation Wnt et dans les mécanismes incluant la sécrétion et la maturation de l'insuline. A ce jour, le SNP identifié sur ce facteur de transcription grâce aux GWAS est le plus connu et a été confirmé dans une cohorte de patients diabétiques de type 2 et non-obèses (Sladek et al., 2007). Malgré le succès des GWAS, il existe un décalage entre la découverte de plusieurs SNPs associés au développement du DT2 et la compréhension de comment ces SNPs impactent physiologiquement la pathologie du DT2. De plus, les GWAS sont efficaces pour identifier de nouveaux gènes associés au risque de développer la pathologie, mais leur valeur prédictive pour la future occurrence du DT2 est très limitée comparé aux facteurs de risques classiques comme l'obésité (développé plus loin dans le manuscrit). En effet, l'association ne signifie pas la causalité, et l'identification de SNPs dans ou près des gènes associés au risque de développer le DT2 ne signifie pas que ces variants sont la cause directe des effets observés sur le DT2. Les premières études épidémiologiques réalisées chez des jumeaux ont montré que l'héritabilité du DT2 pouvait varier de 30 à 70

% selon l'âge auquel apparaît la maladie, avec un plus grand rôle de la composante génétique dans les premières phases de développement de la maladie (Bonfond and Froguel, 2015). Cependant, il n'existe pas un seul gène associé au DT2 mais plusieurs, ce pourquoi la pathologie est qualifiée de polygénique. En revanche, l'ensemble des variants ou modifications génétiques associées au DT2 ne peuvent expliquer à ce jour que 10-15% des cas recensés. Plus récemment, le rôle de l'épigénome dans le DT2 est étudié par plusieurs équipes de recherche.

1.3.2 L'étroite relation avec l'obésité

Associé aux facteurs génétiques, les facteurs environnementaux prennent une part de plus en plus importante dans le développement du DT2, compte tenu du changement des habitudes de vie et de l'impact de l'industrialisation dans nos sociétés. Ils contribuent notamment au déséquilibre alimentaire à l'origine de l'augmentation croissante de l'obésité. En effet, la suralimentation est un des déterminants fondamentaux de l'obésité entraînant un déséquilibre de la balance énergétique caractérisé par un excès des apports alimentaires par rapport aux dépenses énergétiques. Cet excès est alors stocké sous forme de graisse majoritairement dans les adipocytes aboutissant à une accumulation de la masse adipeuse puis potentiellement dans les autres tissus (foie, muscles, pancréas). L'expansion des dépôts adipeux résultent d'une augmentation du nombre d'adipocytes (hyperplasie) associé à une augmentation de leur taille (hypertrophie). Le tissu adipeux sera détaillé dans la partie III de ce manuscrit, mais il faut noter ici que l'accumulation de la masse grasse plus particulièrement dans le tissu adipeux viscéral a des répercussions néfastes dans la régulation du métabolisme général contribuant à l'insulino-résistance (Kahn and Flier, 2000). En effet, la résistance à l'insuline est associée à l'obésité dans 80% des cas (ref). Un moyen simple d'estimer le surpoids ou l'obésité est la mesure de l'indice de masse corporelle (IMC). Celui-ci se calcule en divisant le poids corporel par la taille au carré et est exprimé en kg/m^2 . Un individu est considéré en surpoids si son IMC dépasse la valeur de 25 et obèse lorsque cette même valeur excède 30.

❖ Les chiffres

Aujourd'hui, 1,9 milliards d'adultes sont en surpoids dans le monde et parmi eux, 650 millions sont obèses soit 10% de la population totale (WHO, 2017). Ce chiffre a été augmenté par l'essor des pays en voie de développement, à forte démographie, auparavant non touchés par les problèmes de suralimentation comme de nombreux états

d'Amérique du Sud, la Chine, certains pays d'Afrique et du Moyen Orient. Parmi les pays occidentaux, les Etats-Unis abritent le nombre le plus important d'obèses à l'âge adulte mais aussi chez les enfants (OECD 2017) ; surtout dans la population économiquement faible.

❖ **La prédisposition génétique à l'obésité**

Comme c'est le cas pour le diabète de type 2, il existe également une prédisposition génétique à l'obésité. Bien que les estimations varient d'une étude à une autre (jumeaux ou familles), il semblerait que l'héritabilité de l'obésité s'étende de 40 à 70 % (Bray et al., 2016). Il existe des formes monogéniques d'obésité, situations rares où le seul gène en cause a une influence majeure. Les individus atteints des formes les plus connues d'obésité monogéniques possèdent une déficience au niveau des récepteurs à la leptine, hormone de satiété, ou de la mélanocortine-4 exprimés principalement au niveau de l'hypothalamus et impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique au niveau central (Heymsfield and Wadden, 2017).

Parallèlement, certaines formes d'obésité commune résultent de l'interaction de nombreux variants dans différents gènes influencés par des facteurs environnementaux et sont dites polygéniques. La détermination de variants polygéniques implique l'étude du génome à grande échelle avec des GWAS sur des populations d'obèses apparentées ou non. Pour exemple, les patients possédant plusieurs copies du gène FTO (Fat mass and obesity-associated protein) voient leur poids augmenté de 1 à 3 kg, par rapport aux personnes qui n'en possèdent aucune (Heymsfield and Wadden, 2017). De plus, la mutation de ce gène chez les individus ne possédant qu'une copie augmenterait le risque de développer l'obésité de 30 %, et ce risque serait accru jusqu'à 70% chez les personnes possédant deux copies (Frayling et al., 2007). Il est à noter que les variants génétiques et gènes mutés considérés comme étant impliqués dans la physiopathologie de l'obésité sont pour l'essentiel des gènes du système nerveux central.

❖ **La physiopathologie de l'obésité**

▪ **Le cerveau : maillon central de la régulation de l'homéostasie énergétique**

L'hypothalamus est considéré comme une structure du système nerveux central clé dans la régulation de la prise alimentaire. Les noyaux arqués constituent une zone hypothalamique qui perçoit les signaux métaboliques provenant de la périphérie via la circulation systémique (Roh et al., 2016). De manière générale, deux jeux de neurones situés dans les noyaux arqués sont inhibés ou excités par différentes hormones neuroendocriniennes et maintiennent la balance énergétique. Ces neurones régulent la

prise alimentaire et la dépense énergétique, et constituent la première cible des hormones métaboliques provenant de la périphérie telles que la leptine, l'insuline, la ghréline, le GLP-1 (dont les récepteurs sont présents dans différentes régions de l'hypothalamus) ou encore les nutriments (Heymsfield and Wadden, 2017; Schwartz et al., 2000).

Un groupe de neurones produit des neuropeptides orexigéniques (stimulant la prise alimentaire), le neuropeptide Y (NPY) et le peptide « agouti-related » (AgRP) alors que l'autre groupe de neurones produit des neuropeptides anorexigéniques (inhibant la prise alimentaire) comme la proopiomelanocortine (POMC). L' α -MSH (Melanocyte-Stimulating-Hormone) produite à partir du POMC agit sur les récepteurs à la mélanocortine de type 3 et 4 (MCR3 et 4) au niveau des neurones de second ordre situés dans les noyaux paraventriculaire (PVN), l'hypothalamus ventromédial (HVM) et latéral (HL) et engendre une réduction de la prise alimentaire et une augmentation de la dépense énergétique (Roh et al., 2016). Au niveau des MCR 3 et 4, l'AgRP entre en compétition avec l' α -MSH pour antagoniser ses effets. Les neurones situés dans les noyaux PVN secrètent des neuropeptides ayant une action catabolique (CRH, TRH, Somatostatine, Vasopressine, Oxytocine) et contrôlent l'influx sympathique vers les organes métaboliques périphériques pour augmenter l'oxydation des AGs et la lipolyse (Foster et al., 2010). De même, les neurones de l'HL produisent des neuropeptides orexigéniques, comme la melanin-concentrating hormone (MCH) ou l'orexine, encore appelée hypocrétine (Roh et al., 2016). Il existe par ailleurs d'autres régions du cerveau impliquées dans la régulation de la prise alimentaire faisant l'objet d'intenses recherches (Roh et al., 2016).

▪ La dérégulation de la balance énergétique : central versus périphérie

Afin de maintenir un équilibre énergétique stable, il est nécessaire que l'énergie absorbée égale la dépense énergétique. Cependant, une altération de certains noyaux présents dans le cerveau et plus particulièrement dans l'hypothalamus engendre une augmentation de l'absorption d'énergie conduisant à une obésité, sujet sur lequel beaucoup d'études se sont penchées (Roh et al., 2016). En effet, l'ablation spécifique des neurones NPY/AgRP dans l'hypothalamus aboutit à une diminution de la prise alimentaire et de la prise de poids, suggérant que ces neurones sont essentiels dans la régulation de la prise alimentaire (Bewick et al., 2005). De même, la destruction des noyaux PVN chez le rat cause une hyperphagie et une obésité consécutive, mettant en lumière le rôle inhibiteur de ces noyaux dans la prise alimentaire et la prise de poids (Leibowitz et al., 1981). Une autre étude démontre l'importance de la régulation centrale du métabolisme énergétique en administrant de la leptine au niveau intra-cérébro-ventriculaire. Les auteurs observent

une atténuation de l'obésité chez des souris invalidées pour le gène de la leptine (*ob/ob*) (Coppari et al., 2005).

Etant donné le rôle de l'insuline au niveau central, il n'est pas étonnant que l'altération de la signalisation insulinaire IRS-PI3K dans les neurones hypothalamiques engendre une obésité (Kubota et al., 2004). Dans le cas d'une obésité induite par un régime riche en graisses, des études démontrent une diminution du nombre de neurones activés par la leptine et la résistine dans différentes régions hypothalamiques impliquées dans le contrôle du métabolisme (Alsuhaymi et al., 2017). Toutes ces études démontrent l'importance de la régulation centrale de l'homéostasie énergétique.

La dérégulation de la balance énergétique implique des mécanismes centraux relayés par des hormones neuroendocriniennes sécrétées par les tissus périphériques. De plus, certains mécanismes périphériques favorisent l'insulino-résistance associée à l'obésité.

En effet, lors d'une obésité, une accumulation d'AGs libres dans les tissus périphériques est observée. L'accumulation excessive de lipides dans les adipocytes, et l'accumulation de lipides ectopiques dans le foie et le muscle peuvent conduire à une résistance à l'insuline par la formation de produits métaboliquement toxiques. Par exemple, il a été démontré que les acides gras saturés augmentent la production de céramides, qui engendre une lipotoxicité et des dysfonctions cellulaires, et qui semble contribuer à la résistance à l'insuline (Kahn and Flier, 2000; Tchkonja et al., 2013)). L'augmentation de la masse adipeuse entraîne une dérégulation de la sécrétion des adipokines qui va participer à l'établissement de la résistance à l'insuline dans les tissus périphériques (Kwon and Pessin, 2013). En effet, certaines adipokines favorisent un état inflammatoire du tissu adipeux contribuant à l'insulino-résistance comme par exemple la leptine, qui induit une réponse inflammatoire via les voies de signalisation JAK2 et STAT3 (Kwon and Pessin, 2013). L'adiponectine est une adipokine anti-inflammatoire qui favorise la différenciation des macrophages de type M2 anti-inflammatoire et qui inhibe la sécrétion d'interféron- γ par les cellules NK sans affecter leur capacité cytotoxique (Wilk et al., 2013).

Les adipocytes viscéraux sécrètent également des cytokines inflammatoires comme le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α) et l'interleukine IL-6. Ainsi, il a été suggéré que le TNF- α diminue l'expression de gènes requis pour l'action de l'insuline et augmente le taux d'acides gras libres en stimulant la lipolyse (Peraldi and Spiegelman, 1998). D'autre part, une accumulation de cellules immunitaires dans le tissu adipeux ainsi que dans les autres tissus métaboliques est associée à l'obésité créant un état chronique inflammatoire de bas grade. En effet, l'augmentation notamment des macrophages qui sécrètent des cytokines

pro-inflammatoires altère la sensibilité à l'insuline (Heymsfield and Wadden, 2017). Les travaux pour élucider les mécanismes qui lient obésité et résistance à l'insuline supportent le concept que l'obésité « viscérale » et « non sous-cutanée » contribue au développement de l'insulino-résistance et au risque de développer un DT2. Par ailleurs, aujourd'hui l'immunométabolisme est devenue un grand champ d'investigations dans le contexte de l'obésité (Lee et al., 2018; Ray et al., 2016).

L'ensemble de ces études montre qu'une altération de la capacité du système nerveux central à réguler l'homéostasie énergétique et/ou une dérégulation du métabolisme au niveau des tissus périphériques contribuent fortement au développement d'une obésité souvent doublée d'une insulino-résistance.

1.3.3 Les autres facteurs environnementaux

Au-delà de l'obésité associée de façon étroite au DT2, certains autres facteurs environnementaux favorisent l'apparition de cette pathologie métabolique.

❖ Le vieillissement et la sédentarité

Le DT2 est une pathologie qui se développe avec l'âge et qui se caractérise par une installation lente et progressive comme vu précédemment, débutant par une phase d'insulino-résistance et aboutissant sur la phase d'hyperglycémie chronique dans 10 à 20 % des cas. C'est pourquoi la prévalence du DT2 est plus importante chez les personnes âgées. Cette augmentation est liée au vieillissement de la population, à l'augmentation de l'espérance de vie des diabétiques ou encore à une hygiène de vie plus délétère. Il est bien connu que le vieillissement est un facteur de risque dans l'altération du métabolisme glucidique et le développement du DT2. En effet, celui-ci affecte non seulement la masse des cellules β pancréatiques mais aussi la sécrétion d'insuline et la sensibilité des tissus cibles à l'hormone (De Tata, 2014). De plus, au cours des dernières années, il y a eu une recrudescence d'études indiquant que le risque de développer des maladies métaboliques et en particulier le DT2 était aussi associé à la sédentarité (Hamilton et al., 2014). La sédentarité s'évalue comme le temps total quotidien ou hebdomadaire passé dans une position assise. En effet, une méta-analyse prenant en compte 10 études réalisées chez l'homme (dont 6 prospectives) a identifié une association entre le risque élevé de développement du DT2 et le temps passé à regarder la télévision (Wilmot et al., 2012). Evidemment, le temps passé à regarder la télévision n'est qu'un des nombreux facteurs qui explique la sédentarité où les patients sont assis pendant de longues périodes de temps avec des muscles inactifs. Par ailleurs, la sédentarité a aussi été associée à la sensibilité à l'insuline dans une étude comprenant 801 participants en bonne santé. Dans cette

étude, les auteurs ont démontré que la sédentarité était inversement corrélée à l'insulino-sensibilité (Balkau et al., 2008). Dans cette optique, les pouvoirs publics s'engagent à développer de nouvelles stratégies de santé publique visant à la prévention du DT2 chez les patients réfractaires aux recommandations physiques.

❖ **Le microbiote**

Une des nouvelles causes environnementales récemment mise en exergue est l'impact de la flore bactérienne sur la modulation de l'équilibre glucidique. La flore bactérienne intestinale ou « microbiote intestinal » s'acquiert dès les premiers mois et jusqu'aux deux premières années qui suivent la naissance et est principalement composé de bactéries anaérobies (Schmidt et al., 2018). A l'âge adulte la diversité du microbiote intestinal (plus d'un millier de bactéries ont été identifiées) est stable et unique pour chaque individu. Le changement dans la composition du microbiote intestinal est influencé par différents facteurs notamment l'alimentation.

Des études épidémiologiques ont mis en évidence une corrélation inverse entre l'ingestion de fibres alimentaires et l'occurrence du DT2 (Kovatcheva-Datchary et al., 2015). Lors de ces études, l'ingestion d'un régime riche en fibres alimentaires est associée à des concentrations bactériennes élevées du genre *Prevotella* au niveau intestinal qui permet l'amélioration de la glycémie postprandiale. Étonnamment, un lien entre des thérapies antidiabétiques et la modulation du microbiote chez les humains a été mis en évidence (Kovatcheva-Datchary et al., 2015). En effet, il a récemment été montré que la metformine aurait un impact sur la composition du microbiote (Pollak, 2017) avec un enrichissement des souches *Lactobacilles* et *Escherichia*, bactéries produisant du butyrate et du propionate enrichies chez les patients sains. Les patients traités à la metformine qui présentent une amélioration du métabolisme glucidique sont donc reconnaissables grâce à ce critère. D'autre part, les patients atteints du DT2 présentent un enrichissement des gènes microbiens impliqués dans la dégradation de la lysine, acide aminé associé à l'amélioration de la sensibilité à l'insuline (Brunkwall and Orho-Melander, 2017).

La prévalence du DT2 au niveau mondial connaît une recrudescence spectaculaire ces dernières années et parmi les stratégies innovantes pour le traitement du diabète de type 2, la modulation du microbiote s'impose comme un candidat favorable. Historiquement, les expériences qui ont permis de mettre en évidence le rôle du microbiote dans le contrôle de l'homéostasie glucidique ont été faites par le groupe américain de Jeffrey I Gordon et ont montré que des souris axéniques (dépourvues de microbiote intestinal) possédaient une meilleure tolérance au glucose. De même, des souris axéniques recolonisées avec une flore provenant de souris nourries avec un régime standard

présentent une augmentation de 60% de leur masse adipeuse (Backhed et al., 2004). La transplantation du microbiote fécale est souvent utilisée sur des modèles animaux mais la transposition de cette technique chez l'homme pose à l'heure actuelle de grands débats. Une première étude réalisée en 2016 chez 18 individus humains a mis en place la transplantation de microbiote à partir de sujets sains dont l'IMC est < à 25 vers des sujets atteints du syndrome métabolique. A la suite de cette transplantation, les sujets ont présenté une amélioration de la sensibilité à l'insuline au niveau périphérique et une augmentation de la quantité de bactéries produisant du butyrate chez les receveurs (Vrieze et al., 2012). Cependant, il est à noter que cette étude de petite envergure ne présentait pas de données concernant les taux de glucose sanguins des patients et n'a pas encore été reproduite. Une autre stratégie innovante est le développement d'un microbiote génétiquement modifié. Récemment, la souche *Lactococcus lactis* a été génétiquement modifiée pour produire du GLP-1 impliqué dans la stimulation de la sécrétion d'insuline (Arora and Backhed, 2016). Enfin, une dernière stratégie consiste à utiliser des probiotiques tout en maintenant un régime riche en fibres. Comparé aux probiotiques, l'utilisation de souches bactériennes génétiquement modifiée possède certains avantages, car il permet la colonisation d'un seul germe efficace pour produire le composé thérapeutique désiré (Brunkwall and Orho-Melander, 2017). En conclusion, malgré une série d'études très intéressantes, la causalité du microbiote ainsi que son utilité thérapeutique dans le domaine du diabète et de l'obésité restent à être démontrées de façon claire.

❖ Les perturbateurs endocriniens

Les perturbateurs endocriniens environnementaux (PEE) sont des molécules naturelles ou chimiques ubiquistes dans notre environnement quotidien et capables d'interférer avec le système endocrinien, mais également de perturber les voies de signalisation du métabolisme glucidique et lipidique. Chez l'homme, les accidents d'exposition ont montré un lien direct entre exposition à certains polluants organiques persistants (POPs) et survenue d'un syndrome métabolique ou d'un diabète de type 2 dans les années qui ont suivi des expositions aiguës (Chevalier and Fenichel, 2015). Ces données ont été confirmées à plus grande échelle, dans des études épidémiologiques longitudinales, qui ont mis en évidence des concentrations plus élevées de PEE chez les patients obèses et/ou diabétiques de type 2, notamment de POPs, qui doivent donc être considérés comme des facteurs de risque à part entière d'insulino-résistance. Il a ainsi été estimé qu'une exposition chronique à certains composés chimiques était responsable d'une augmentation d'incidence de l'obésité et du diabète (Legler et al., 2015), avec une alerte notamment sur le rôle d'une exposition au BPA (Bisphénol A). Dans des modèles de lignées cellulaires, l'exposition d'adipocytes murins à des mélanges de

polluants organiques (dont des pesticides organochlorés) est capable d'induire une insulino-résistance et une diminution d'expression de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique (Ruzzin et al., 2010). Autre exemple, l'exposition in vitro aux phtalates, notamment au mono-(2-éthylhexyl) -phtalate (MEHP) et au monobenzyl-phtalate (MBzP), conduit quant à elle à l'activation des récepteurs PPAR (Peroxisome proliferator-activated receptor) et ainsi à une différenciation adipocytaire marquée (Hurst and Waxman, 2003). La participation de l'exposition aux PEE dans l'épidémie d'obésité et de diabète de type 2 ne semble plus faire de doute. De ce fait, de nombreuses investigations sont en cours aujourd'hui et les instances européennes et internationales effectuent un suivi soutenu de ces molécules.

❖ *L'environnement intra-utérin*

Au-delà des facteurs postnataux qui contribuent à l'apparition du DT2 à l'âge adulte mais qui ne sont pas suffisants pour expliquer la prévalence du DT2, l'environnement intra-utérin est un facteur supplémentaire déterminant pour le développement pandémique du DT2. Dans un premier temps, des études épidémiologiques réalisées sur des femmes enceintes au préalable diabétiques ont suggéré que les fœtus soumis à un environnement délétère durant la gestation et la petite enfance auraient un risque accru de développer des maladies métaboliques à l'âge adulte telles que le diabète ou l'obésité (Dabelea, 2007). Les enfants nés de mères diabétiques présentent à l'adolescence une obésité associée à une détérioration du métabolisme glucidique (Silverman et al., 1998). Par ailleurs, d'autres études épidémiologiques ont montré que les fœtus subissant un faible apport énergétique durant la gestation sont challengés lorsqu'ils sont confrontés à une augmentation modeste de l'apport en nutriments et ont un risque accru de développer un diabète à l'âge adulte (Hales et al., 1991). Cette notion sera détaillée dans la partie suivante du manuscrit.

1.3.4 L'épigénétique

Étymologiquement, épigénétique signifie « à côté » de la génétique et se réfère à tous les processus moléculaires qui influencent l'expression des gènes sans changer le code génétique. Les modifications épigénétiques sont stables, héritables et sont extrêmement importantes car elles pourraient expliquer l'interaction complexe qu'il existe entre la composante génétique et environnementale du DT2. En général, elles se décomposent en trois types de régulation (**Figure 6**) : une activation ou inhibition de la transcription à travers l'acétylation ou la méthylation des histones respectivement, une inhibition transcriptionnelle par hyperméthylation des îlots CpG au niveau des promoteurs des

gènes, et enfin une inhibition post-transcriptionnelle via des ARNs non codants. Parmi les ARNs non-codants, les plus étudiés sont les microARNs (miARNs), petits ARNs de 20 à 22 nucléotides qui interagissent avec le 3' UTR de l'ARN messager d'un gène pour induire l'inhibition de sa traduction et/ou la dégradation de son ARN messager cible (Guo et al., 2010). La partie consacrée à l'implication des miARNs dans la régulation du métabolisme glucidique sera détaillée dans la dernière partie du manuscrit.

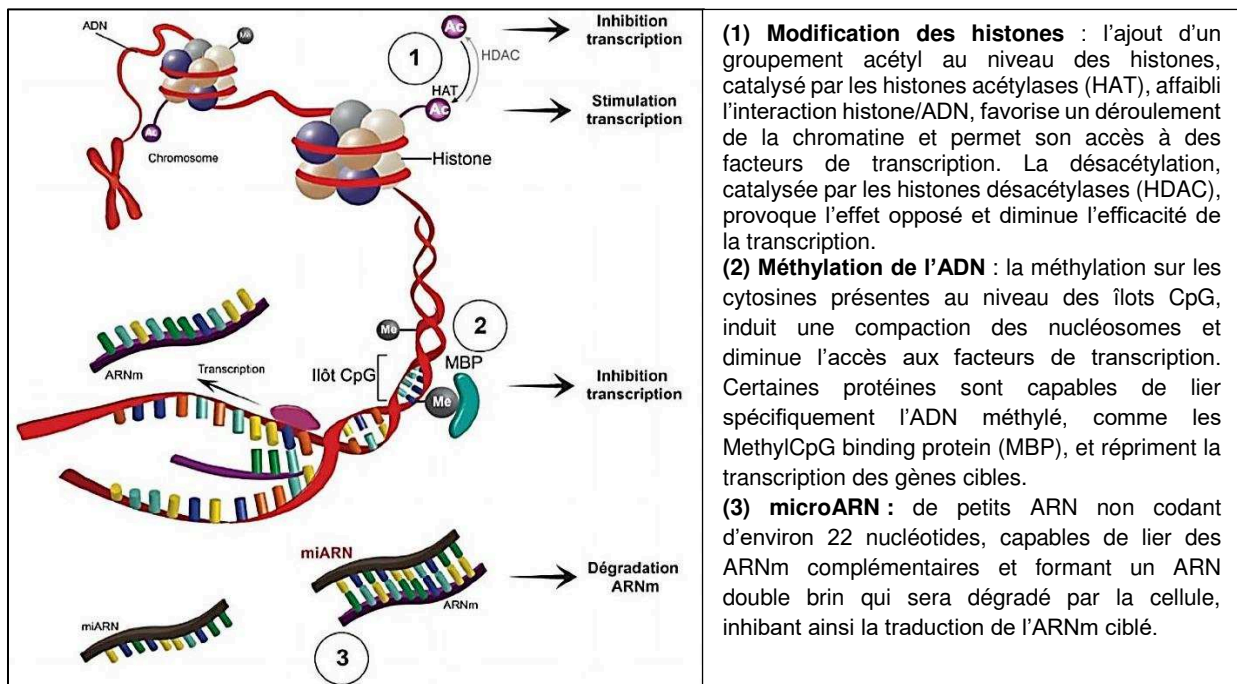


Figure 6 : Les mécanismes épigénétiques susceptibles de moduler l'expression de gènes (Source : Melchior and Poisbeau, 2015).

Ces dernières années, de nombreuses découvertes concernant la méthylation de l'ADN associées à des variations de l'homéostasie glucidique ont été mises à jour et concernent les principaux tissus impliqués dans la régulation du métabolisme du glucose parmi lesquels le pancréas et le tissu adipeux. Au niveau des îlots pancréatiques, des études chez l'homme ont permis l'identification de l'hyperméthylation de promoteurs de gènes importants pour le développement et la fonction pancréatique tels que INS, PDX1, PPARGC1A, GLP1R chez des sujets diabétiques (Davegardh et al., 2018). Par ailleurs, des taux élevés de glucose sanguin ont été directement associés à une augmentation de la méthylation des gènes INS et PDX1 dans la cellule β -pancréatique. A l'image des techniques développées en génétiques, les GWAS, une méthode d'analyse de méthylation de l'ADN a été mise en place. Cette technique connue sous le nom de EWAS (epigenome-wide association study) a permis l'identification de gènes hypo ou hyperméthylés chez les patients diabétiques de type 2. Un des gènes dont l'expression est altérée est HDAC7 chez ces patients et code pour une enzyme dé-acétylant les

histones. HDAC7 est hypométhylé et donc surexprimé dans les îlots de patients souffrant de DT2. De plus, une autre étude a montré que l'augmentation de l'expression de HDAC7 dans les îlots de rats et dans les cellules β -pancréatiques altère la fonction mitochondriale et la sécrétion d'insuline, suggérant que l'état de méthylation du gène HDAC7 pourrait contribuer à la dégradation de la fonction des cellules β -pancréatiques chez les patients diabétiques (Davegardh et al., 2018).

D'autre part, les études de méthylation de l'ADN réalisées sur le tissu adipeux de patient souffrant de DT2 ont mis en évidence plus de 7000 gènes différentiellement méthylés, dont PPAR γ , IRS1 ou encore TCF7L2, gènes candidats pour le développement du DT2 au préalable identifiés par les GWAS. De plus, les enzymes de méthylation de l'ADN appelées les « DNA methyltransferases », dont la DNMT3A, contribuent à l'insulino-résistance *in vitro* dans des adipocytes humains et murins (Davegardh et al., 2018). Une des cibles de la DNMT3A dans l'adipocyte est le gène du Fibroblast Growth Factor 21 (FGF 21), facteur de croissance dont les propriétés insulino-sensibilisatrices autocrines et paracrines sont connues (Davegardh et al., 2018). Une augmentation de la méthylation de ce dernier gène associée à une diminution de l'expression de la protéine a été observée dans le tissu adipeux des patients diabétiques de type 2, suggérant ainsi que des taux élevés du FGF 21 pourraient améliorer l'insulino-résistance induite par DNMT3A.

Cependant, il est difficile de tirer des conclusions sur la causalité des locus différentiellement méthylés dans le développement du DT2 et de déterminer si ces modifications épigénétiques sont une cause ou une conséquence de la pathologie. C'est pourquoi l'établissement d'études longitudinales permettra d'étudier le lien de cause à effet qu'il existe entre méthylation de l'ADN et DT2.

Le DT2 a de toute évidence une origine multifactorielle (**Figure 7**). Alors que les gènes prédisposent une personne pour le développement de cette pathologie, les facteurs environnementaux postnataux tels que l'obésité et prénataux ne peuvent être exclus. Ainsi, l'émergence du diabète chez un individu résulte de l'interaction complexe entre les gènes et l'environnement. De plus en plus d'études indiquent que les modifications épigénétiques pourraient servir d'intermédiaire à cette interaction.

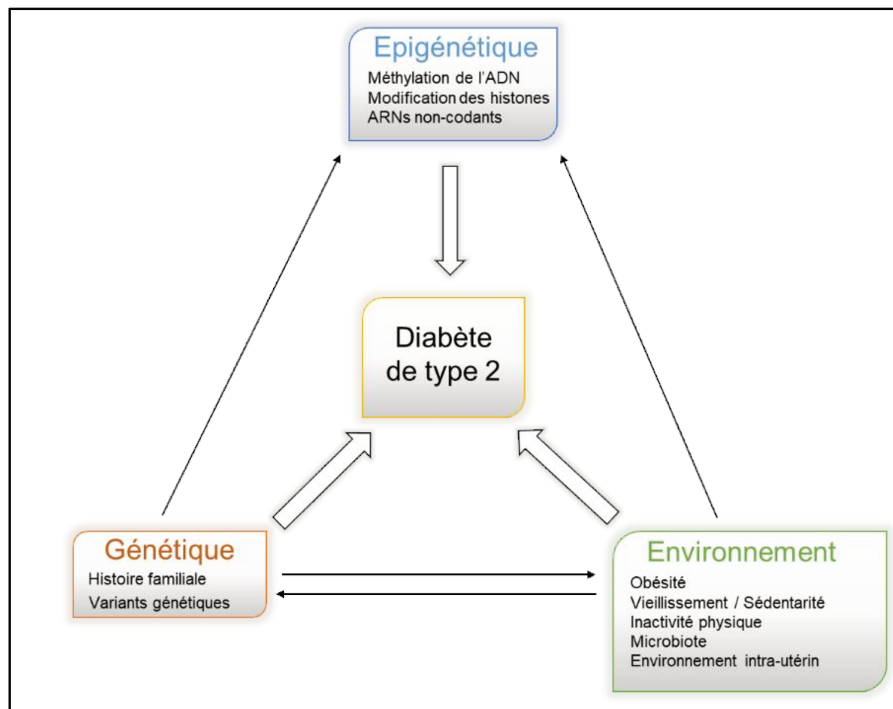


Figure 7 : Les mécanismes impliqués dans le développement du diabète de type 2 (Adapté de Ling and Groop, 2009)

2. Origine développementale du diabète de type 2

2.1 Concept de conditionnement précoce du développement des maladies métaboliques à l'âge adulte

L'environnement post-natal propre à chaque individu peut influencer son métabolisme comme vu précédemment, mais dans certains cas, l'environnement auquel les géniteurs ont été exposés (prénatal) peut aussi contribuer au risque de développer des maladies métaboliques à l'âge adulte pour la progéniture. En effet, la plasticité des organismes durant les phases précoces de développement permet la mise en place de différents phénotypes à partir d'un même génotype sous l'influence de différents stimuli environnementaux (Bateson et al., 2004; Bateson et al., 2014).

2.1.1 Etudes épidémiologiques originelles

Les premiers travaux épidémiologiques suggérant une origine développementale des maladies métaboliques ont été menés par David Barker à la fin des années 1980 et montrent un lien entre petit poids de naissance et augmentation du risque cardiométabolique à l'âge adulte (Barker et al., 1989). En effet, les données relevées sur plus de 5600 sujets masculins ont montré que les hommes nés avec un faible poids de naissance présentaient un taux plus élevé de mortalité associé à une cardiopathie ischémique. Des études ultérieures ont montré qu'un petit poids de naissance était également associé à une augmentation de la pression sanguine à l'âge adulte et à des concentrations plasmatiques élevées de fibrinogène (Hanson and Gluckman, 2014a). Ceci suggère une altération des vaisseaux sanguins qui pourrait contribuer au développement de troubles vasculaires à l'âge adulte.

De ces études pionnières découle la notion de retard de croissance intra-utérin (RCIU) qui se caractérise comme une anomalie dynamique de la croissance du fœtus et qui se traduit par une taille insuffisante pour l'âge gestationnel c'est-à-dire qu'à la naissance, le fœtus aura un poids insuffisant selon les courbes de référence. Le RCIU résulte d'un environnement intra-utérin délétère dont les causes multiples comprennent entre autres les pathologies chroniques (néphropathie, cardiopathie, anémie), le tabagisme ou encore la carence alimentaire sévère de la mère gestante. En effet, en 1990, la malnutrition maternelle durant la gestation a été reconnue par la communauté scientifique comme un important facteur environnemental favorisant le RCIU et aboutissant au développement des maladies cardiométaboliques de la progéniture à l'âge adulte (Hanson and Gluckman, 2014a). Le RCIU suggère également la notion d'effet parental, processus par lequel les attributions phénotypiques de la mère (et du père) influencent le développement de la progéniture.

Parmi les acteurs impliqués dans le métabolisme énergétique, le pancréas est un organe central. Par ailleurs, il est bien connu que la croissance des cellules β pancréatiques s'accélère durant la vie fœtale (Hellerstrom and Swenne, 1991) et suggère qu'un RCIU pourrait influencer de manière négative le métabolisme glucidique de la progéniture à l'âge adulte (Hanson and Gluckman, 2014b). Dans le but de déterminer si une réduction de la croissance fœtale a un impact sur l'altération du métabolisme glucidique et la survenue du diabète à l'âge adulte, en 1991, Nicholas Hales et David Barker ont mené une étude épidémiologique pionnière sur 370 sujets masculins anglais âgés de 59 à 70 ans dont le poids de naissance était connu (Hôpital de Hertfordshire) et ont mesuré la glycémie, la concentration en insuline et en pro-insuline à jeun ainsi que les mêmes paramètres après l'ingestion d'un bolus de glucose de 75 g (30 min et 120 min) (Hales et al., 1991). Dans cette étude, l'augmentation des concentrations de glucose plasmatique à jeun est corrélée à une diminution du poids de naissance et des concentrations de pro-insuline, associé à une dysfonction de la cellule β pancréatique. Inversement, les concentrations de glucose plasmatiques 30 et 120 min après l'ingestion du bolus de glucose diminuent lorsque les poids de naissance augmentent (Hales et al., 1991). Pour résumer, les auteurs démontrent que le RCIU conduisant à un petit poids de naissance est fortement associé à une altération du métabolisme glucidique et à la survenue d'un diabète à l'âge adulte. Ces sujets présentant un RCIU ont également une pression artérielle élevée, ce qui pourrait expliquer l'association entre l'hypertension artérielle et la tolérance au glucose (Hales et al., 1991).

Grâce à toutes les associations observées lors des études épidémiologiques, David Barker a formulé l'hypothèse de l'origine fœtale des maladies métaboliques, aussi connue sous le nom d'hypothèse de Barker (Barker, 1995). Il postule que la sous-nutrition pendant la gestation entraîne un faible poids de naissance et reprogramme la relation entre glucose et insuline, aboutissant à la modification permanente du métabolisme glucidique (Barker, 1997). Cette reprogrammation augmente le risque de développer des désordres métaboliques à l'âge adulte (hypertension, ischémies cardiaques et DT2).

De plus, d'autres épisodes historiques marquants tels que la seconde guerre mondiale ont permis de renforcer l'hypothèse de Barker. Durant cette guerre, une période de famine est survenue dans l'est des Pays-bas à l'hiver 1944-1945 (Dutch Hunger Winter). Des registres répertoriant les rations alimentaires officielles (entre 400 et 800 calories journalières) durant la période exacte de famine ainsi que les soins de santé prodigués et les poids de naissance des nouveau-nés sont encore disponibles pour cette population (Lumey et al., 2007). Les nouveau-nés présentant un faible poids de naissance ont été suivis au cours du temps pour l'étude des maladies métaboliques et constituent une cohorte qui a fait l'objet de nombreuses études. Ces

dernières ont notamment montré que l'exposition prénatale à la famine et donc l'évolution du fœtus dans un environnement intra-utérin délétère était associée à un petit poids de naissance et au développement de maladies métaboliques à l'âge adulte chez la progéniture (Hanson and Gluckman, 2014b). Plus particulièrement, si la famine est survenue lors des phases tardives de la gestation, le poids de la progéniture à la naissance a été profondément impacté. De plus, la progéniture ayant expérimenté la famine in utero était hyper glycémique et présentait une altération de la tolérance au glucose avec l'âge (Ravelli et al., 1998). Par ailleurs, les conséquences métaboliques peuvent être différentes selon les fenêtres de temps puisque les fœtus exposés pendant le premier trimestre de la grossesse ont plus facilement développé une obésité à l'âge adulte (Lumey et al., 2007).

D'autres preuves de l'association entre la restriction alimentaire durant la gestation et le développement de troubles métaboliques à l'âge adulte tels que l'hypertension ont été mises en évidence dans une cohorte chinoise exposée à une famine in utero dans les années 1960 (Hanson and Gluckman, 2014b). De même, l'étude de différentes cohortes durant les famines ukrainiennes (1932-1933) ou autrichiennes sur plusieurs périodes (1918-1919, 1938 et 1946-1947) suggèrent que la restriction alimentaire durant les phases critiques du développement joue un rôle primordial sur la physiologie des organes et tissus clés de l'organisme (Hanson and Gluckman, 2014b). Malgré les preuves apportées par ces études, cette hypothèse repose sur le fait que l'induction des troubles métaboliques observés à l'âge adulte est l'unique résultat de la malnutrition pendant la gestation et/ou la lactation. Cependant, soulignons le fait que les différentes populations étudiées lors des études épidémiologiques étaient aussi soumises à un stress considérable. Pour exemple, durant la Dutch Hunger Winter, les régimes alimentaires contenaient des bulbes de tulipes qui auraient pu contenir des toxines et affecter le développement fœtal (Hanson and Gluckman, 2014b). Par ailleurs, la distinction entre la première étude citée et les suivantes est le changement radical de régime dans la population hollandaise durant la seconde guerre mondiale, alors que ce n'est pas le cas pour les autres populations où la famine a émergé graduellement au cours du temps (Hanson and Gluckman, 2014b). Malgré ces différences, le point commun entre toutes ces études est l'observation d'un RCIU et d'un petit poids de naissance dû à une malnutrition maternelle, provoquant l'apparition de troubles métaboliques à l'âge adulte chez la progéniture.

A la fin des années 2000, 8 % des grossesses européennes étaient concernées par le RCIU (Lee et al., 2013a; Romo et al., 2009) et cette prévalence ne fait qu'augmenter en particulier dans les pays sous-développés ou en voie de développement (Sharma et al., 2016), ce qui accroît la population à risque pour le développement des maladies métaboliques comme le DT2, comme énoncé par l'hypothèse de Barker. De manière

intéressante, cette hypothèse combine plusieurs idées clés : premièrement, les effets induits au niveau physiologique sur les différents tissus et organes sont persistants, et deuxièmement, ces effets peuvent rester latents pendant plusieurs années.

2.1.2 Naissance de l'hypothèse du « phénotype d'épargne » de l'étiologie du diabète de type 2

Pour expliquer les données épidémiologiques, les professeurs Hales et Barker ont formulé l'hypothèse du phénotype d'épargne ou « Thrifty Phenotype Hypothesis » (Hales and Barker, 2001, 2013). Celle-ci postule qu'en cas de malnutrition maternelle ou d'un autre stress intra-utérin, les organes de l'embryon vont subir une adaptation suite à la restriction in utero. En effet, la croissance de certains organes clés comme le cerveau est optimisée au détriment d'autres comme notamment le foie, les muscles ou le pancréas. Néanmoins, les changements permanents induits par une mauvaise nutrition à l'âge fœtal, sont préjudiciables pour le développement et la fonction des cellules β pancréatiques des îlots de Langerhans (Hales and Barker, 2013). Ces changements comprennent une capacité réduite de sécrétion d'insuline et une résistance à l'insuline qui, combinée aux effets de l'obésité, du vieillissement et de l'inactivité physique, sont les facteurs les plus importants dans la détermination du diabète de type 2 (Sharma et al., 2016). Depuis que l'hypothèse a été proposée, de nombreuses études dans le monde ont confirmé les preuves épidémiologiques initiales. Bien que la force de la relation ait varié d'une étude à l'autre, la relation avec la résistance à l'insuline est claire à tous les âges étudiés (Hales and Barker, 2001 ; 2013). Pour comprendre l'importance de l'hypothèse du phénotype d'épargne pour la prévention primaire du diabète de type 2, il est urgent de déterminer dans quelle mesure la « programmation in utero » influence le développement du diabète de type 2 dans différentes populations et de comprendre les effets à court et long terme de l'exposition pendant la grossesse ainsi que les mécanismes moléculaires distincts impliqués.

2.1.3 De « l'origine fœtale des maladies métaboliques » au concept « d'origine développementale survenue à l'âge adulte »

Le concept de l'origine développementale des maladies métaboliques s'est développé à partir d'études épidémiologiques sur la mortalité infantile et adulte. Comme cité précédemment, le trio d'articles scientifiques pionniers publiés dans *The Lancet* (Barker and Osmond, 1986; Barker et al., 1989; Ravelli et al., 1998) par l'équipe de Barker ont sans doute influencé l'opinion dans le domaine de la plasticité développementale et ont permis la formulation de l'hypothèse de l'origine fœtale des maladies métaboliques

développées à l'âge adulte, appelée hypothèse de Barker. Cependant, le manque de mécanismes biologiques expliquant cette hypothèse et la latence entre la vie prénatale et la survenue de la maladie à l'âge adulte a limité l'acceptation de l'idée par la communauté scientifique (Hanson and Gluckman, 2014b). De plus, cette hypothèse repose sur la corrélation entre petit poids de naissance et le risque de développer la pathologie à l'âge adulte et non la causalité directe (Hanson and Gluckman, 2014b).

C'est pourquoi, au début des années 2000, ce concept a évolué pour aboutir à la notion d'origine développementale des maladies métaboliques survenues à l'âge adulte. La notion d'origine fœtale des maladies métaboliques développées à l'âge adulte a été étendue pour reconnaître la portée plus large de l'impact de l'environnement sur les phases de développement précoce, allant de l'ovocyte à la petite enfance, sur la santé à long terme et implique la notion de plasticité développementale, qui met l'accent sur le processus résultant de l'interaction génotype-environnement (Hanson and Gluckman, 2014b). En effet, l'embryon est particulièrement sensible à l'environnement. La notion de « programmation in utero », rappelle le programme génétique du développement et est définie comme un mécanisme mis en place lors des phases précoces de développement qui aura une empreinte inévitable sur la survenue de la pathologie car une fois le processus initié son résultat est prédéterminé (Hanson and Gluckman, 2014b). A présent, la notion plus nuancée de conditionnement est préférée par la communauté scientifique, bien que peu employée. Ce concept postule que l'environnement durant les phases précoces de développement conditionne seulement un individu à adapter sa réponse physiologique en réponse aux challenges environnementaux ultérieurs. Plus particulièrement, l'adaptation des organes du fœtus soumis à un environnement hostile in utero, par exemple la restriction nutritive, peut rester sans effet délétère particulier sur le long terme si la carence est maintenue après la naissance. Néanmoins, si le nouveau-né passe d'une situation de carence nutritive maternelle in utero à un apport alimentaire adéquat, voire de suralimentation, il n'est alors plus adapté (également appelé « mismatch ») (Sharma et al., 2016). Ce phénomène joue un rôle fondamental sur le conditionnement du développement des maladies métaboliques à l'âge adulte. Dans le cadre du métabolisme, il a cependant été suggéré l'existence d'une adaptation métabolique des tissus périphériques pour palier au défaut de l'homéostasie glucidique survenue à l'âge adulte chez une progéniture ayant subi un RCIU.

Cette adaptation métabolique peut parfois résulter d'un remodelage du paysage épigénétique de chaque individu (Block and El-Osta, 2017; Vickers, 2014). Cette partie sera plus approfondie dans la suite de ce chapitre. Par ailleurs, d'autres mécanismes

peuvent également intervenir pour moduler la réponse adaptative aux stimuli environnementaux (Hanson and Gluckman, 2014b).

2.2 Différents modèles animaux d'environnement intra-utérin délétère : le modèle de carence protéique maternelle

Afin de déterminer les mécanismes moléculaires découlant des observations épidémiologiques, un certain nombre de modèles animaux ont été mis en place pour évaluer l'importance des stimuli environnementaux lors des phases précoces de développement et tenter de mieux comprendre comment la nutrition maternelle influe sur le bon développement du fœtus et l'apparition de troubles métaboliques à l'âge adulte chez la progéniture. Dans de tels modèles, les femelles gestantes sont soumises à une variété de challenges environnementaux pendant différentes fenêtres de temps du début de la gestation à la fin de la lactation. Ceux-ci incluent l'induction d'une insuffisance utéroplacentaire via la ligature des artères utérines, la carence maternelle nutritive, calorique ou protéique, mais également la surnutrition maternelle durant la gestation (Devaskar and Chu, 2016; Swanson and David, 2015; Warner and Ozanne, 2010) (**Figure 8**).

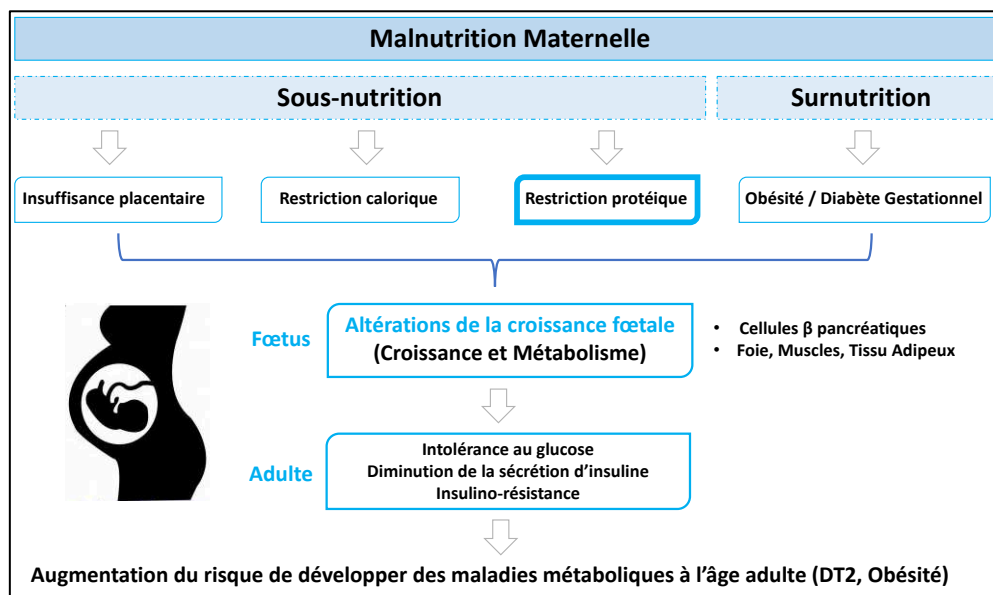


Figure 8 : Les différents modèles d'environnement maternel délétère (Adapté de Warner and Ozanne, 2010)

Dans la suite de ce chapitre, je me focaliserai sur la carence maternelle nutritive entraînant un RCIU. L'ensemble des études établies sur les modèles animaux mis en place pour étudier le RCIU s'accordent pour démontrer qu'une malnutrition sévère de la mère et par conséquent du fœtus peut avoir un impact sur le métabolisme glucidique de la progéniture à l'âge adulte (Devaskar and Chu, 2016; Warner and Ozanne, 2010).

2.2.1 Les modèles animaux de RCIU

Un des modèles de RCIU, décrit pour la première fois en 1964 chez la rate, est l'induction chirurgicale d'une hypoperfusion utéro-placentaire via la ligature des artères utérines (Wigglesworth, 1964). Celui-ci aboutit à une réduction du flux sanguin et donc à une diminution de l'apport fœtal en nutriments et en oxygène (Lafeber et al., 1984; Wigglesworth, 1974) et s'accompagne d'effets métaboliques drastiques sur la progéniture. C'est en effet le modèle pour lequel les troubles métaboliques apparaissent le plus tôt au cours de la vie adulte. La ligature peut être établie unilatéralement, permettant l'inclusion d'animaux contrôles au sein d'un même environnement maternel, ou bilatéralement (Janot et al., 2014; Lueder and Ogata, 1990). A la naissance, les individus présentent un retard de croissance ainsi que plusieurs défauts pancréatiques notamment une diminution de la prolifération des cellules β pancréatiques associés à une hypo-insulinémie (Simmons et al., 2001). Dès 7 semaines, une insulino-résistance s'installe chez ces individus suivie d'une hyperinsulinémie provoquant le développement progressif d'une hyperglycémie (Simmons et al., 2001).

Moins drastique que le premier modèle présenté, la carence calorique maternelle induit également une situation d'insuffisance utéroplacentaire menant au développement de désordres métaboliques à l'âge adulte chez la progéniture (Duque-Guimaraes and Ozanne, 2013). En ce qui concerne ce modèle, il existe plusieurs fenêtres d'étude concernant la gestation couplée ou non à la lactation et différentes sévérités de carence (Warner and Ozanne, 2010). Pour exemple, une réduction de 50 % des apports journaliers durant la dernière semaine de gestation induit chez le fœtus un retard de croissance associé à une diminution du poids du pancréas et du contenu insulinique (Garofano et al., 1998). A un an, ces animaux sont hyperglycémiques, intolérants au glucose et insulino-péniques (Garofano et al., 1999). Cette insulino-pénie est également associée à une augmentation du taux d'apoptose des cellules β pancréatiques. Par ailleurs, si une carence plus sévère est appliquée pendant la totalité de la gestation, comme par exemple, une diminution de 70% des apports caloriques (Mayeur et al., 2013), les auteurs observent une diminution du poids du placenta associé à une altération de la fonction mitochondriale de ce tissu qui peut avoir des conséquences préjudiciables sur le développement de la progéniture, compte tenu de l'importance du placenta dans la croissance fœtale (Duque-Guimaraes and Ozanne, 2013). Enfin, l'adoption d'une restriction calorique plus modeste durant la première moitié de la gestation (20%), a pour effet le développement d'une insulino-résistance et d'une hyperleptinémie chez la progéniture à l'âge adulte.

Dans le domaine de la carence nutritive, le modèle de RCIU le plus étudié, et celui utilisé par mon équipe de recherche, est la carence protéique (CP) maternelle (Snoeck et al., 1990). En effet, plusieurs études ont montré le rôle central des acides aminés dans la croissance fœtale (Brown et al., 2011; Vaughan et al., 2017). De plus, la carence protéique subie par la mère gestante provoque l'apparition de troubles métaboliques chez la progéniture avec une hyperglycémie à partir de 15 mois (Cette partie sera plus détaillée dans la section suivante).

La chirurgie, la carence énergétique ou protéique sont des modèles animaux de RCIU majeurs dans l'étude du conditionnement nutritionnel de l'insulino-résistance, mais notons qu'il existe bien d'autres facteurs favorisant le développement de l'insulino-résistance à l'âge adulte : l'apport alimentaire inadéquat en micronutriments durant la gestation et la vie postnatale précoce (Duque-Guimaraes and Ozanne, 2013), l'administration des agents pharmacologiques tels que les glucocorticoïdes (dexaméthasone) (Warner and Ozanne, 2010). Tous ces modèles de RCIU s'accompagnent de troubles métaboliques apparaissant à différentes fenêtres de temps au cours de la vie adulte de la progéniture, et aboutiront au développement d'une insulino-résistance et d'un DT2 plus ou moins rapidement (Palou et al., 2012).

2.2.2 Le modèle de restriction protéique maternelle et ses conséquences à court et long terme sur la progéniture

Dans le domaine du conditionnement nutritionnel de la résistance à l'insuline, le modèle de CP maternelle est le plus étudié car la progéniture issue de mères gestantes carencées en protéines présente les ressemblances phénotypiques les plus étroites avec les situations observées chez l'homme lors des études épidémiologiques (Duque-Guimaraes and Ozanne, 2013; Ozanne and Hales, 1999). En effet, ce régime reflète la faible teneur en protéines ingérée par les futures mères notamment dans les pays en voie de développement, où le statut socioéconomique défavorable limite la quantité de protéines consommée pendant la grossesse et l'allaitement (Symonds et al., 2009).

Le modèle CP maternel est basé sur l'ingestion d'un régime carencé en protéines, à savoir 8% comparé à un régime contrôle qui en contient 20%, durant la gestation et la lactation suivi d'un sevrage à partir duquel les rats sont nourris avec un régime contrôle (Duque-Guimaraes and Ozanne, 2013) (**Figure 9**).

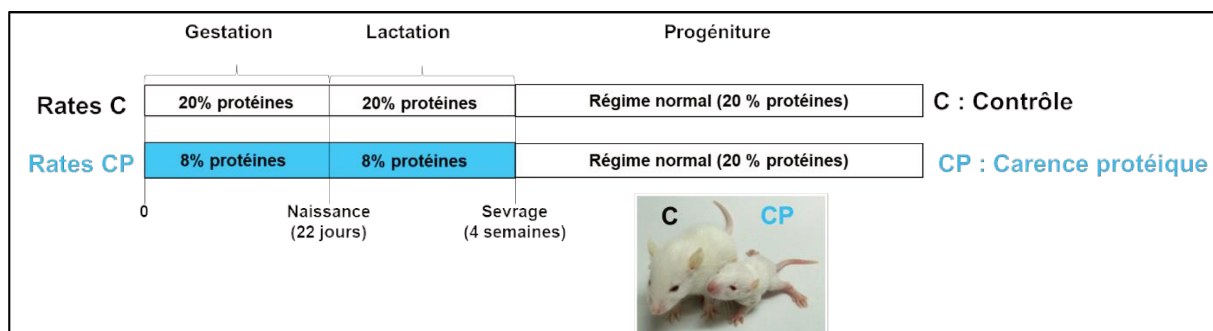


Figure 9 : Présentation du modèle de carence protéique maternelle durant la gestation et la lactation (Adapté de Dumortier et al., 2017)

Cette teneur de 8 % en protéines correspond au % de protéines le plus faible sans effet délétère sur la mère, sur le nombre de ratons par portées ou sur le poids du placenta (Snoeck et al., 1990). Bien que la teneur en protéines de ce régime soit réduite, les taux de carbohydrates sont à leur tour élevés de manière à maintenir le régime isocalorique (Duque-Guimaraes and Ozanne, 2013). Le délai d'apparition des troubles métaboliques associés au retard de croissance dépendra du sexe, mais dans les deux cas les animaux développeront une altération de l'homéostasie glucidique avec l'âge (Fernandez-Twinn et al., 2005; Petry et al., 2001).

A la naissance, les animaux dont les mères ont été carencées en protéines, présentent un retard de croissance caractérisé par une diminution du poids et de la taille, respectivement de 20 et 10%. Selon l'hypothèse du Thirty Phenotype, le développement du cerveau est privilégié face à celui des autres organes. A la naissance, la masse des cellules β pancréatique est déjà fortement diminuée (Boujendar et al., 2002; Snoeck et al., 1990). Plus tard au sevrage, le pancréas présente une diminution significative de son poids associée à une diminution de 50 % de la masse des cellules β pancréatiques et de la prolifération de ces mêmes cellules faisant suite à un allongement du cycle cellulaire (Dahri et al., 1991; Dumortier et al., 2007; Remacle et al., 2007; Snoeck et al., 1990). Tous ces défauts conduisent à la formation d'îlots de petite taille. De plus, la diminution de l'expression du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et de son récepteur est associée à une diminution de la vascularisation (densité numérique et volumique) au sein des îlots (Snoeck et al., 1990).

A 3 mois, les animaux présentent une glycémie normale malgré une diminution de la sécrétion d'insuline comparé aux animaux contrôles (Dahri et al., 1991; Dumortier et al., 2007; Petrik et al., 1999; Snoeck et al., 1990). Différentes études ont corrélé ce paradoxe apparent dans la jeune progéniture CP à un processus adaptatif dans les tissus périphériques, entraînant une sensibilité accrue à l'insuline avec une expression accrue

des récepteurs de l'insuline dans le tissu adipeux blanc, les muscles et le foie (Ozanne et al., 1996a; Ozanne et al., 1996b; Shepherd et al., 1997). Ces mécanismes pourraient contribuer à l'amélioration de la tolérance au glucose et au maintien de la normoglycémie chez ces jeunes rats. Malheureusement, l'adaptation métabolique des tissus, quelle qu'elle soit, se détériore avec l'âge (15-18 mois) et ces animaux présentent une insulino-résistance et une hyperglycémie, caractéristiques du DT2 chez l'homme (Petry et al., 2001).

Afin de restaurer une nutrition adéquate pour palier au retard de croissance développé suite à une carence protéique maternelle, la teneur en protéines peut être restaurée dans le régime des femelles durant la lactation. L'administration du régime carencé en protéines aux mères seulement pendant la gestation n'affecte pas de façon permanente le poids de la progéniture (Dahri et al., 1991). Par ailleurs, la microvascularisation des îlots de Langerhans est restaurée, mais ceci ne reverse pas nécessairement les effets métaboliques indésirables provoqués par la carence protéique durant la gestation (Bennis-Taleb et al., 1999). Il est important de noter que la structure et la fonction du pancréas endocrine ne sont pas entièrement restaurées puisque les jeunes rats possèdent une réduction du contenu insulinique (Dahri et al., 1991). Ce défaut est accompagné d'une altération de la fonction mitochondriale des îlots pancréatiques avec une augmentation de la production des espèces réactives de l'oxygène (Theys et al., 2009).

A l'inverse, l'exposition post-natale à un challenge nutritionnel supérieur à celui connu pendant la gestation induit une croissance post-natale accélérée. Ce phénomène est appelé « catch up growth » et est également associé à une augmentation de l'adiposité et au risque de développer une obésité ultérieure (Bieswal et al., 2006; Bol et al., 2009; Coupe et al., 2012). En effet, une étude de « catch up growth » chez le rat a mis en évidence le développement d'une insulino-résistance dans le tissu adipeux avec une hypertrophie des adipocytes à 3 mois associée à une diminution des taux protéiques d'IRS-1, de la PI3K et de la protéine kinase B (AKT2) (Berends et al., 2013). De même chez l'homme, une croissance post-natale accélérée est associée à un risque accru de développer une obésité à l'âge adulte (Druet et al., 2012). Ces études sont en faveur de l'idée que l'insulino-résistance au niveau de l'adipocyte pourrait être une des premières défaillances métaboliques qui favorise le développement du DT2 à l'âge adulte après une forte accélération de la croissance postnatale. Cependant, au-delà de la résistance à l'insuline au niveau périphérique à l'échelle de l'adipocyte, il existe également une résistance à l'hormone au niveau central. En effet, l'expression de protéines importantes

de la voie de signalisation insulinique comme la PI3K (sous-unité p110 β) est diminuée dans les noyaux arqués de l'hypothalamus dans un modèle murin de « catch up growth », suggérant que ces défauts pourraient contribuer à la résistance des effets de l'insuline au niveau central (Berends et al., 2018).

Comme nous l'avons vu, les effets induits par un retard de croissance peuvent avoir différentes origines selon la fenêtre de temps durant laquelle la carence protéique est appliquée, mais aboutissent de façon comparable au développement de troubles métaboliques à l'âge adulte plus ou moins réversibles (Martin-Gronert and Ozanne, 2007, 2012). Cependant, il reste à déterminer dans quelles mesures ces potentiels troubles métaboliques peuvent être retardés ou évités grâce à un régime post-natal adéquat. Le développement du modèle animal CP ainsi que les résultats observés sont en adéquation avec les concepts qui découlent des études épidémiologiques humaines, montrant que le métabolisme des principaux organes impliqués dans la régulation de l'homéostasie glucidique peut être conditionné par la sous-nutrition maternelle.

2.2.3 Les mécanismes cellulaires du conditionnement intra-utérin

Lorsque l'origine développementale des maladies métaboliques est considérée, la question centrale qui en découle est : comment un stimulus transitoire, dans notre cas un challenge nutritionnel, survenu à l'âge fœtal et/ou durant la vie postnatale précoce peut donner lieu à des conséquences phénotypiques à plus long terme et quels sont les mécanismes responsables des modifications observées ? Plusieurs facteurs ont été impliqués dans le conditionnement développemental des maladies métaboliques, comme par exemple l'axe GH (Growth Hormone) /IGF (insulin-like growth factor) (Vaiserman, 2018), l'altération de la fonction mitochondriale ou encore les glucocorticoïdes (Vo and Hardy, 2012). Dans ce chapitre, je me focaliserai sur la régulation de l'expression des gènes via les modifications épigénétiques, à ce jour considérée comme un des mécanismes importants dans la détermination des phénotypes conditionnés par un environnement intra-utérin délétère.

Comme nous avons pu le voir précédemment, il existe différentes cibles pour ces modifications épigénétiques dont les plus connus, dans le domaine de la programmation nutritionnelle, sont les facteurs de transcription. La première étude pionnière liant épigénétique et RCIU a été publiée par Park et al. en 2008. Cette étude implique le facteur de transcription PDX1, qui joue un rôle critique dans le développement précoce du pancréas endocrine et exocrine et dans la différenciation tardive et la fonction de la cellule

β pancréatique. Les auteurs ont montré que les niveaux d'ARNm du gène PDX1 étaient diminués de plus de 50 % chez les fœtus dont la mère a subi une ligature des artères utérines (Park et al., 2008; Rando and Simmons, 2015). En effet, ceci est dû à la répression épigénétique du facteur de transcription correspondant qui s'effectue en deux étapes : premièrement, une dé-acétylation des histones par le complexe mSin3A suivie par une méthylation de ces dernières permise grâce au recrutement de l'enzyme DNMT3A (Park et al., 2008). Plus récemment, il a été montré que les traitements hormonaux empêchant la dé-acétylation des histones de PDX1 permettent de prévenir le développement du diabète chez des rats qui présentent un retard de croissance (Pinney et al., 2011). Par ailleurs, dans des îlots humains de patients atteints de DT2, l'expression de PDX1 est aussi fortement diminuée et associée à une augmentation de la méthylation des enhanceurs du gène (Yang et al., 2012).

Dans le modèle de carence protéique maternelle, une étude a montré une diminution de la méthylation du facteur de transcription PPAR α , impliqué dans le métabolisme lipidique aboutissant à une augmentation de l'expression du gène (Slater-Jefferies et al., 2011). L'augmentation de l'expression de PPAR α dans le tissu cardiaque provoque une augmentation de la métabolisation des acides gras par la β -oxydation et a déjà été impliqué dans la pathogenèse de la cardiomyopathie diabétique (Slater-Jefferies et al., 2011). Dans les îlots de rats issus de mères carencées en protéines, il y a une augmentation de la méthylation du facteur de transcription Hnf4 α (Hepatocyte Nuclear Factor 4 α), conduisant à une réduction significative de son expression (Rando and Simmons, 2015; Sandovici et al., 2011). Ce facteur est très important puisque qu'il est requis pour la différenciation des cellules β pancréatiques et le bon fonctionnement de l'homéostasie glucidique.

Associés aux modifications épigénétiques, il existe également des preuves de l'implication des miARNs dans la mémoire cellulaire et le développement d'une réponse métabolique adaptative avec l'âge chez des animaux présentant un RCIU en particulier suite à une carence maternelle nutritive. (Cet aspect sera abordé dans la partie dédiée aux microARNs).

Un nombre important de modifications épigénétiques, notamment les microARNs, impactent des loci clés impliqués dans le métabolisme énergétique. L'exposition à un environnement intra-utérin délétère permet aux cellules d'acquérir une « mémoire » via les modifications épigénétiques, transmises de manière stable au cours des divisions cellulaires, qui conditionnent le développement des maladies métaboliques à l'âge adulte.

2.3 Quid de l'environnement paternel ?

Alors que l'impact de l'environnement maternel sur le développement de la progéniture est très largement étudié, la contribution de l'environnement paternel sur les phénotypes développés par la progéniture est beaucoup plus obscure. Dans ce domaine, beaucoup d'études se sont concentrées sur des paramètres de fertilité comme le nombre et la motilité des spermatozoïdes, mais peu ont étudié le lien qui existe entre la nutrition paternelle et le développement de phénotypes spécifiques chez la progéniture. Ce domaine d'étude est d'autant plus important que l'indice de masse corporelle du père semble être un bien meilleur facteur indicatif des caractéristiques métaboliques de la progéniture que celui de la mère (Figuroa-Colon et al., 2000). Pour mieux comprendre les mécanismes impliqués, un nombre grandissant de modèles animaux ont mis en évidence les effets d'un régime paternel pauvre (restriction calorique ou protéique) ou riche (forte teneur en graisses) en nutriments sur le métabolisme de la progéniture (Rando and Simmons, 2015). Tout comme pour les modèles maternels, le temps d'exposition au régime et la fenêtre d'étude varie considérablement : certaines appliquent les différents régimes à partir du sevrage jusqu'à la maturité sexuelle alors que d'autres considèrent la sous-nutrition in utero, faisant des sujets d'études, la génération n°2 à partir d'un environnement intra-utérin maternel délétère (Cette dernière partie sera développée dans le paragraphe suivant intitulé la transmission transgénérationnelle). Dans les études de transmission paternelle des maladies métaboliques, les paramètres les plus fréquemment étudiés concernent l'homéostasie glucidique (glycémie à jeun, insulinémie...), mais aussi les paramètres liés au cholestérol et au métabolisme lipidique (Rando and Simmons, 2015). La consommation paternelle d'un régime carencé en protéines (9% comparé à 18% en condition contrôle) durant 7 semaines avant l'accouplement est associée à une détérioration de la tolérance au glucose chez la progéniture mâle et femelle. De plus, les mâles issus d'un régime paternel carencé en protéines présentent une adiposité significativement élevée, une diminution du poids du cœur rapporté à la masse corporelle et des taux élevés de cytokines pro-inflammatoires : TNF- α (Watkins and Sinclair, 2014). Enfin, l'ingestion de ce régime pauvre en protéines est aussi associée à une augmentation de la pression systolique sanguine. Cette étude révèle l'impact du régime paternel sur les effets métaboliques et cardiovasculaires de la progéniture. Cependant les mécanismes moléculaires restent à déterminer à l'heure actuelle. Une autre étude, réalisée chez des souris mâles âgés de 3 mois carencés en protéines du sevrage à la maturité sexuelle, a montré une diminution des taux hépatiques de cholestérol et de ses esters associés chez la progéniture (Carone et al., 2010).

A l'inverse, les mâles maintenus sous régime riche en graisses avant l'accouplement provoquent une altération de la tolérance au glucose et une morphologie pancréatique anormale chez la progéniture (Rando and Simmons, 2015). De plus, il a été montré que l'obésité paternelle marque de façon particulière l'épigénome des spermatozoïdes, augmentant le risque d'obésité chez la progéniture (de Castro Barbosa et al., 2016; Donkin et al., 2016)

Dans la même optique, des études réalisées chez les rongeurs ont montré que l'épigénome du sperme paternel serait à l'origine de l'altération de la méthylation de l'ADN chez la progéniture, et plus particulièrement certains gènes importants pour le fonctionnement de la cellule β pancréatique (Barres and Zierath, 2016; Donkin and Barres, 2018). Par ailleurs, la progéniture issue de pères carencés en protéines présente un profil de méthylation différent au niveau de « l'enhancer » du facteur de transcription PPAR α , précédemment cité.

Il faut noter que les études présentées dans ce chapitre nécessitent une reproductibilité dans des cohortes additionnelles de rongeurs pour s'assurer de la généralisation de ces découvertes.

2.4 La transmission transgénérationnelle

Comme précédemment mentionné lors de la présentation du DT2, la prévalence de cette pathologie a augmenté de manière drastique à travers le monde. Bien que très controversée pour l'instant avec peu d'études robustes à l'appui, la transmission transgénérationnelle pourrait être un facteur supplémentaire contribuant au risque de développer le DT2 à l'âge adulte. Le terme de transmission transgénérationnelle est employé lorsque les phénotypes sont transmis jusqu'à la génération F2 pour la lignée paternelle et F3 pour la lignée maternelle, la F0 étant la mère gestante subissant un challenge et la F1 le fœtus issu de l'environnement intra-utérin délétère (Stegemann and Buchner, 2015). A l'opposé, le terme intergénérationnel est employé pour des générations ayant un lien de parenté direct (Stegemann and Buchner, 2015). Une multitude de paramètres initiaux peuvent induire un héritage transgénérationnel, notamment l'environnement social ou la nutrition (Sales et al., 2017) et un phénotype peut être transmis de différentes façons d'une génération à une autre, en particulier via l'héritage socio-culturel, le microbiote ou encore la lignée germinale (Heard and Martienssen, 2014; Stegemann and Buchner, 2015). Dans ce chapitre, nous nous focaliserons sur la transmission transgénérationnelle via la lignée germinale maternelle et/ou paternelle, comprenant une multitude de modifications épigénétiques (Sales et al., 2017). Comme vu précédemment, l'état

nutritif influe sur les modifications épigénétiques, ayant alors un rôle de senseurs métaboliques qui traduisent le challenge nutritionnel par une altération de l'expression génique.

2.4.1 Etudes épidémiologiques humaines en faveur du concept de transmission transgénérationnelle

Chez l'homme, il est difficile d'étudier la transmission transgénérationnelle des maladies métaboliques, notamment à cause du nombre restreint de descendants par génération et des fenêtres de temps espacées entre chaque génération. Cependant, il est possible de contourner cet obstacle expérimental en se replongeant dans l'histoire moderne grâce à la cohorte de la paroisse d'Overkalix dans le nord de la Suède (Barres and Zierath, 2016; Rando and Simmons, 2015). Dans cette étude, l'apport alimentaire de la F0 durant la période pré-pubère a été associé au risque de développer des maladies cardiovasculaires et un DT2 à l'âge adulte chez la génération F2. En effet, si le mâle de la F0 est exposé à une nutrition excessive durant cette période, les descendants mâles de la F2 présentent un risque accru de développer le diabète à l'âge adulte. De manière surprenante, les effets observés sont spécifiques au sexe puisque l'environnement nutritionnel masculin a un effet sur la santé du descendant F2 mâle et inversement pour la gène féminine, lorsque la F0 femelle est exposée à une famine durant cette même période pré-pubère, sa descendante à la génération F2 a un risque accru de développer le diabète avec l'âge (Barres and Zierath, 2016; Rando and Simmons, 2015). Enfin, le fait que la restriction nutritive durant la période pré-pubère des grands-parents ait un effet sur la condition métabolique de leurs petits-enfants, deux générations après la fin du challenge, est en faveur de l'idée que les stimuli environnementaux affectent l'épigénome au cours du développement (Barres and Zierath, 2016).

2.4.2 Transmission transgénérationnelle des maladies métaboliques dans des modèles animaux

Un des premiers modèles étudiés pour mettre en lumière la transmission non-Mendélienne des caractères est la souche murine Agouti Jaune ou A^{vy} pour « Agouti Viable Yellow Mouse Strain » et concerne le gène Agouti, chargé de déterminer la couleur du pelage d'un mammifère. L'expression ectopique de ce dernier gène est associée à un phénotype obèse chez la souris. Dans ce modèle, il existe une mutation du gène qui provient de l'insertion d'une particule IAP (Intracisternal A Particule) en amont de la séquence codante du gène Agouti. Le statut de méthylation de cette particule influence la transcription du gène Agouti et détermine la couleur du pelage de ces souris et par conséquent l'obésité associée (Stegemann and Buchner, 2015) (Patti, 2013 ; Vaiserman, 2018). Ce statut est transmis via la lignée germinale

femelle aux futures générations (Patti, 2013; Stegemann and Buchner, 2015; Vaiserman, 2018). En effet, si ce locus est déméthylé, il y aura expression du gène *Agouti* et apparition du phénotype obèse. Cependant, le traitement des souris femelles A^{vy} mutées avec des composés modifiant le statut de méthylation de la particule IAP, notamment un régime supplémenté en groupement méthyles (acide folique, vitamine B12) induit une hyperméthylation du locus IAP et une diminution de la transcription de ce gène. Ce régime est également capable de prévenir la transmission de l'obésité à travers les générations, démontrant ainsi que la nutrition peut influencer les modifications épigénétiques du locus au sein des cellules germinales (Patti, 2013; Stegemann and Buchner, 2015; Vaiserman, 2018).

Des altérations du métabolisme glucidique peuvent aussi être transmises aux générations suivantes via la lignée germinale à la fois paternelle et maternelle. En effet, un régime riche en graisses a une influence transgénérationnelle sur la sensibilité à l'insuline des futures progénitures. Des études ont révélé que l'exposition maternelle ou paternelle à un régime riche en graisses aboutit à une résistance à l'insuline et semble affecter profondément la fonction des cellules β pancréatiques chez les générations suivantes (Dunn and Bale, 2011; Patti, 2013).

En ce qui concerne notre modèle d'étude, un régime carencé en protéines maintenu durant la lactation altère l'homéostasie glucidique non seulement chez la progéniture F1, mais cet effet, bien que plus nuancé, persiste jusqu'à la génération F3 (Stegemann and Buchner, 2015). L'altération de l'homéostasie glucidique est reflétée par une diminution des concentrations plasmatiques d'insuline, associée à une diminution de la masse pancréatique et du volume insulaire, les effets observés sur la morphologie pancréatique commencent à décroître chez la génération F3 (Stegemann and Buchner, 2015). De plus, le régime carencé en protéine administré à des femelles gestantes F0 aurait des effets sur le potentiel de reproduction des descendantes femelles de la génération F2. En effet, des études réalisées chez le rat ont montré que lorsque la femelle gestante F0 reçoit un régime carencé en protéines durant la gestation et la lactation, les femelles descendantes F2 présentent une diminution de la réserve ovarienne associée à une accumulation excessive de ROS (Reactive Oxygen Species), une instabilité du nombre de copie de l'ADN mitochondrial et une diminution de la taille des télomères dans les cellules ovariennes, indiquant un vieillissement prématuré du tractus reproductif (Aiken et al., 2015; Barres and Zierath, 2016).

Pour résumer, ces résultats apportent la preuve que le régime parental peut affecter la santé de la progéniture à travers les générations et soutiennent le concept d'un conditionnement transgénérationnel environnemental influençant l'expression des gènes dans les descendants.

2.4.3 Les mécanismes de la transmission transgénérationnelle et les limites

Les modifications épigénétiques au niveau du sperme ou de l'ovocyte sont considérées comme mécanismes centraux impliqués dans la transmission transgénérationnelle. Il est maintenant bien connu que l'exposition à des environnements délétères peut influencer sur le statut épigénétique des gamètes mâles et femelles, aboutissant à des changements phénotypiques chez la progéniture qui se développe à partir de ces gamètes (Patti, 2013).

Contrairement aux études sur les maladies héréditaires conventionnelles, les études sur l'hérédité transgénérationnelle ont jusqu'à présent été largement observationnelles, fournissant peu de liens de causalité entre variants épigénomiques et effets phénotypiques. Il y a de nombreuses raisons à cela, y compris les limites expérimentales liées à la mesure quantitative de l'épigénome (Stegemann and Buchner, 2015). De plus, la communauté scientifique ignore encore si l'héritage transgénérationnel est généralement causé par un seul ou un petit nombre de changements de l'épigénome ou si elle est plus souvent due à des changements globaux. Par ailleurs, dans la plupart des études l'analyse de l'épigénome a été limitée aux mesures de la méthylation de l'ADN dû à la facilité technique de mesure quantitative de ce paramètre. Ceci présente donc probablement une image très limitée des mécanismes épigénétiques potentiels sous-jacents à l'hérédité transgénérationnelle des maladies métaboliques et suggère une question : quelle est la part des autres mécanismes épigénétiques dans la transmission transgénérationnelle des maladies métaboliques ? De manière intéressante, il a été montré que la micro-injection de fragments d'ARN de région codantes ou d'ARN non-codant tels que des miRNAs dans des œufs de souris fertilisés peut entraîner un défaut épigénétique, une paramutation, dont la transmission héréditaire efficace est corrélée à la présence de l'ARN injecté dans le noyau spermatique (Rassoulzadegan et al., 2006; Wagner et al., 2008). Ces paramutations affectent les phénotypes adultes chez plusieurs générations successives de souris. Ces résultats mettent donc en évidence la diversité des effets épigénétiques induits par l'ARN pouvant expliquer les transmissions non-Mendéliennes de différentes pathologies dont les maladies métaboliques.

L'idée de l'héritage transgénérationnel des maladies métaboliques reste très controversée à l'heure actuelle car ces concepts sont basés presque exclusivement sur des modèles animaux et apporte une autre question quant aux mécanismes de la transmission transgénérationnelle : à savoir sur combien de générations est véritablement transmis le risque de développer une maladie métabolique à l'âge adulte ? En effet, certaines études transgénérationnelles démontrent des effets jusqu'à la F3 sans que la génération F2 soit affectée ou dans une moindre mesure (Stegemann and Buchner, 2015), mettant en doute la légitimité de la dilution des effets observés au cours des générations (Huypens et al., 2016).

Dans cette partie, nous avons vu comment l'environnement maternel, et dans une moindre mesure l'environnement paternel (peu étudié à l'heure actuelle), peut influencer le métabolisme de la progéniture induisant des désordres à l'âge adulte. Une compensation métabolique peut se mettre en place pour permettre à la progéniture, ayant subi des carences à l'âge fœtal durant les stades précoces de développement, de s'adapter aux challenges énergétiques durant sa vie adulte. Néanmoins, ces compensations ou adaptations métaboliques s'amointrissent ou s'avèrent insuffisantes avec l'âge.

3. Tissu adipeux brun et adaptation du métabolisme énergétique

3.1 Le tissu adipeux : un organe plastique

Le tissu adipeux (TA) est considéré comme le réservoir énergétique de l'organisme. Il stocke l'énergie sous forme de TG dans des conditions d'excès de substrats et parvient à mobiliser cette énergie sous forme d'acides gras libres qui seront par la suite catabolisés en période interprandiale. L'accumulation des acides gras et de leurs produits métaboliques peut être toxique pour la cellule (lipotoxicité). C'est pourquoi il existe des mécanismes finement régulés pour permettre un équilibre entre stockage et clairance des TG (Unger, 2002). Le TA est également reconnu comme un organe « endocrinien » qui synthétise et sécrète des adipokines, pouvant agir au niveau local ou systémique et influencer les autres organes. La capacité du tissu adipeux à répondre aux variations de l'offre et de la demande d'énergie est elle-même contrôlée par le système endocrine qui intègre les besoins métaboliques. Les travaux réalisés dans des modèles animaux et cellulaires ont permis de mettre en évidence la plasticité de l'organe adipeux et ce dernier a été historiquement classifié en deux catégories : le tissu adipeux blanc (TAB) et le tissu adipeux brun (TABr) auquel nous allons plus particulièrement nous intéresser. Ces deux tissus présentent des caractéristiques et des localisations anatomiques distinctes (Cinti, 2005).

3.1.1 L'ontogénie du tissu adipeux

Le développement du TA est un processus initié durant la vie fœtale, qui continue tout au long de la vie néanmoins, le TAB humain va subir des modulations physiologiques de son développement au cours de la vie (augmentation/diminution), alors que le TABr va régresser avec l'âge (Gesta et al., 2007; Lee et al., 2014). Dans un premier temps, le TA apparaît sous la forme d'un tissu conjonctif lâche contenant une matrice extracellulaire et de rares cellules, principalement mésenchymateuses. Ces territoires cellulaires fournissent un cadre pour le recrutement de progéniteurs adipocytaires et l'initiation de la différenciation cellulaire appelée adipogenèse. Puis au cours du développement, les cellules mésenchymateuses s'agrègent pour former des lobules mésenchymateux avec une structure réticulaire (Wassermann, 2011). La vascularisation et la prolifération des cellules mésenchymateuses initialement présentes sont considérées comme les deux événements majeurs de cette première phase de développement du TA. La prolifération est observée essentiellement dans les cellules progénitrices peu différenciées qui se différencient ensuite en adipocytes en accumulant des microgouttelettes lipidiques et formant des lobules graisseux primitifs (Lee et al., 2014; Poulos et al., 2010). Dans un deuxième temps, le TA primitif évolue pour former les lobules graisseux définitifs entourés

de tissu conjonctif. Après la naissance, les principaux processus qui permettront la plasticité du TA sont l'augmentation du nombre de cellules via la différenciation terminale de cellules progénitrices (hyperplasie) et l'élargissement des adipocytes (hypertrophie) (Greenwood and Hirsch, 1974). Tout développement anormal du TA pourra conduire à une obésité lors d'une augmentation excessive ou une lipodystrophie lors d'une perte accrue.

Les premières études histogénétiques ont attribué l'origine du TA au mésoderme (Lee et al., 2014; Poissonnet et al., 1984). Cependant, le fait que différents dépôts de TA apparaissent au cours du développement avec des caractéristiques moléculaires distinctes a suggéré qu'il existe une hétérogénéité parmi ces différents dépôts. Par exemple, le TA situé au niveau du cou et de la tête est généré à partir du neuroectoderme, plutôt qu'à partir du mésoderme, celui retrouvé au niveau des os et des muscles du crâne est quant à lui formé à partir de la crête neurale, suggérant ainsi une origine commune des lignées mésenchymateuses au sein d'une localisation anatomique donnée (Billon et al., 2007). D'autre part, des études réalisées à partir de cellules progénitrices provenant des dépôts adipeux interscapulaires ont montré que ces cellules, qui expriment le Facteur Myogénique 5 (Myf5) et le facteur de transcription Pax7, sont capables de se différencier *in vitro* en adipocytes bruns plutôt que blancs, mais également en myocytes, suggérant ainsi que les adipocytes blancs et bruns ne proviennent pas des mêmes lignées cellulaires (Billon et al., 2007). Ainsi, l'étude de l'ontogénie montre que différents types cellulaires peuvent aboutir à la formation d'adipocytes matures en fonction de la localisation anatomique ou des conditions physiologiques.

Chez les rongeurs, le TAB se développe principalement après la naissance alors que chez l'homme, le TAB apparaît lors du deuxième trimestre de la grossesse. En ce qui concerne le TABr, il se développe à la fin de la gestation chez l'homme et chez le rongeur. Il est complètement fonctionnel à la naissance où il joue un rôle essentiel pour assurer l'adaptation face à l'environnement extra-utérin (Frontini and Cinti, 2010; Nedergaard et al., 2007).

3.1.2 La distribution anatomique des tissus adipeux

Le TA est considéré comme un des plus gros organes du corps humain puisque même chez une personne maigre il peut atteindre 15 à 25% de son poids total, et cette proportion peut s'élever jusqu'à 50% dans les cas d'obésité morbide (Tran and Kahn, 2010). Par ailleurs, l'organe adipeux est complexe et il est plus correct de parler des TAs qui agissent

« en collaboration » au sein d'un véritable organe, et qui régulent ensemble de nombreux paramètres métaboliques comme notamment la prise de nourriture, l'immunité, l'angiogenèse ou encore l'ostéogenèse (Choe et al., 2016). Comme mentionné précédemment, il existe deux types de TA prédominants : le TAB impliqué principalement dans le stockage des graisses et le TABr requis pour la dépense énergétique via la thermogenèse.

Le TAB est principalement retrouvé au niveau sous-cutané et au niveau intra-abdominal (plus communément appelé TA viscéral). La délimitation géographique entre ces deux tissus se situe le long de la surface ventrale du rein et de la surface dorsale des intestins. Le TAB viscéral comprend quatre sous-catégories chez l'homme : le TAB omental, mésentérique, périrénal et rétropéritonéal (**Figure 10**). L'augmentation de la masse de TAB viscéral (apparenté à une obésité) est associée au risque de développer des troubles métaboliques tels que l'insulino-résistance, le DT2, l'hypertension, l'athérosclérose ainsi que la stéatose hépatique (Baik et al., 2000; Wang et al., 2005). En revanche, l'ablation du TAB viscéral provoque une augmentation de la sensibilité à l'insuline périphérique et une diminution de la glycémie associée (Barzilai et al., 1999; Thorne et al., 2002). Chez les rongeurs, un autre type de TAB viscéral se distingue également, le TAB périgonadal ou épидидymal. Le TA sous-cutané quant à lui est localisé au niveau glutéo-fémoral et plus généralement dans les parties basses du corps chez l'homme (Choe et al., 2016). Ce tissu est plutôt considéré comme un tissu insulino-sensible ayant des effets métaboliques opposés à celui du tissu viscéral.

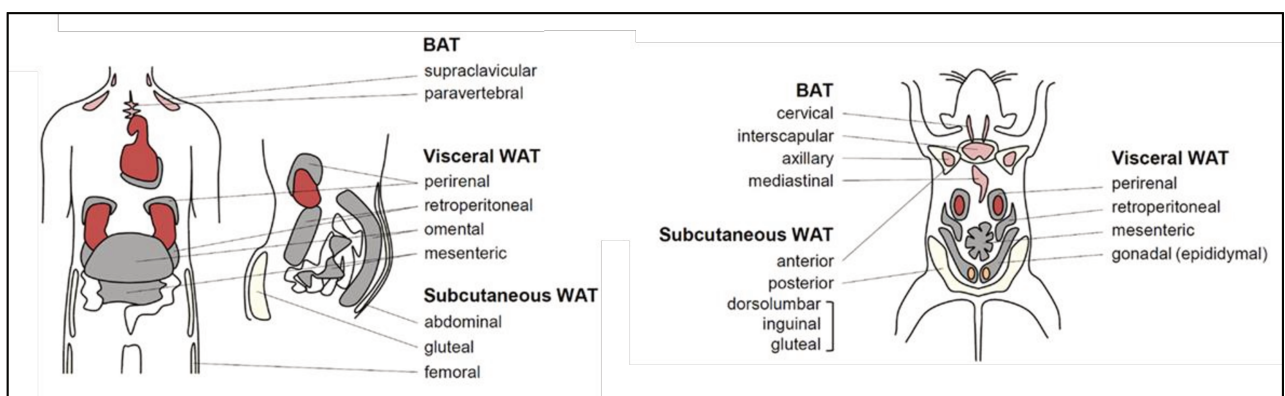


Figure 10 : Distribution anatomique des différents dépôts de TA (Adapté de Choe et al., 2016)

Concernant le TABr, il a longtemps été considéré comme étant présent et fonctionnel uniquement chez les nouveau-nés humains, et par conséquent négligé par les scientifiques. Cependant, il y a maintenant 10 ans, la technique d'imagerie par émission de positrons associée à de la tomographie ou PET-CT Scan (Positron-Emission

Tomography and Computed Tomography) a permis de mettre en évidence que du TABr était présent au niveau des régions supra-claviculaires et para-vertébrales à l'âge adulte chez l'homme (Choe et al., 2016) (**Figure 10**). Plus récemment, quatre autres dépôts de TABr ont été mis en évidence au niveau des régions cervicales, axillaires et abdominales chez l'homme (Leitner et al., 2017). Tous ces dépôts sont également retrouvés chez le rongeur où le TAB est surtout présent au niveau inter scapulaire sous la forme de deux lobes très vascularisés et innervés (Choe et al., 2016).

3.1.3 L'adipogenèse

La masse du TA peut s'accroître tout au long de la vie adulte par hypertrophie et hyperplasie. Cependant il est bien connu que les adipocytes matures ne sont pas des cellules prolifératives et ne peuvent donc pas subir de mitoses. Selon Spalding et al., seulement 10 % des cellules adipocytaires sont renouvelées chaque année (Spalding et al., 2008). Pour permettre une expansion de la masse du TA, il existe des cellules souches immatures également appelées cellules progénitrices adipocytaires prêtes à être mobilisées en cas de besoin métaboliques, capables de proliférer et de se différencier en adipocyte, confirmant ainsi la plasticité du TA.

❖ Cellules Souches Mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont des cellules progénitrices multipotentes qui se trouvent dans le TA post-natal et qui peuvent se différencier en plusieurs types cellulaires notamment les cellules adipocytaires mais aussi des cellules osseuses ou musculaires en fonction de leurs localisations anatomiques et des stimuli. Différentes études ont permis d'identifier des marqueurs de surface cellulaires spécifiques des progéniteurs adipocytaires comme CD24+/PDGFR α /Sca 1+/CD34+ (Lee et al., 2014). En effet, bien que relativement rare au sein de la fraction stromale, les cellules CD24+ ont la capacité de pouvoir reformer un organe adipeux fonctionnel à partir d'un nombre limité de cellules. Pour exemple, la transplantation de cellules CD24+ dans les dépôts adipeux de souris lipodystrophiques, aboutit à la formation d'un organe adipeux présentant une morphologie adipocytaire normale et une fonctionnalité non altérée (Rodeheffer et al., 2008). Ces études suggèrent que les cellules CD24+ sont des cellules souches progénitrices adipocytaires. Comme mentionné précédemment, il existe différentes sortes de CSM pouvant aboutir à la formation d'adipocytes blancs ou bruns. Par ailleurs, Lee et al., ont mis en évidence dans le TAB, la présence de CSM capables de se différencier en adipocytes blancs mais aussi en adipocytes bruns (dits beiges ou

brite ou brown-like), en fonction du signal d'induction (Lee et al., 2012). Les CSM qui donneront naissance à des adipocytes brite/beige ont une morphologie unique et sont plus généralement retrouvées dans la région périvasculaire. Ces cellules sont distinctes des progéniteurs adipocytaires classiques et présentent une signature de marqueur de surface cellulaire unique : CD 34+/Sca 1+/PDGFR α +/Pax7-/Myf5-. Le développement et la fonctionnalité des adipocytes brite/beige sera détaillé plus loin dans le manuscrit. Les CSM propres à chaque dépôt adipeux sont donc capables d'entrer dans le programme de différenciation adipocytaire (ou adipogénèse).

❖ Programme de différenciation adipocytaire

Au cours de la différenciation adipocytaire, les CSM vont subir différentes transformations pour acquérir le phénotype d'adipocytes matures avec trois étapes principales : prolifération, expansion clonale et différenciation. Ces différentes étapes sont contrôlées par l'expression chronologique de différents marqueurs précoces et tardifs. L'expression de ces marqueurs est régie par une cascade transcriptionnelle qui a fait l'objet d'intenses investigations particulièrement dans la lignée fibroblastique des 3T3-L1 (Rosen and MacDougald, 2006; Tontonoz and Spiegelman, 2008).

Parmi les partenaires requis, PPAR γ , qui est un membre de la superfamille des récepteurs nucléaires hormonaux et un facteur de transcription central dans le processus d'adipogénèse (Park et al., 2015) (**Figure 11**).

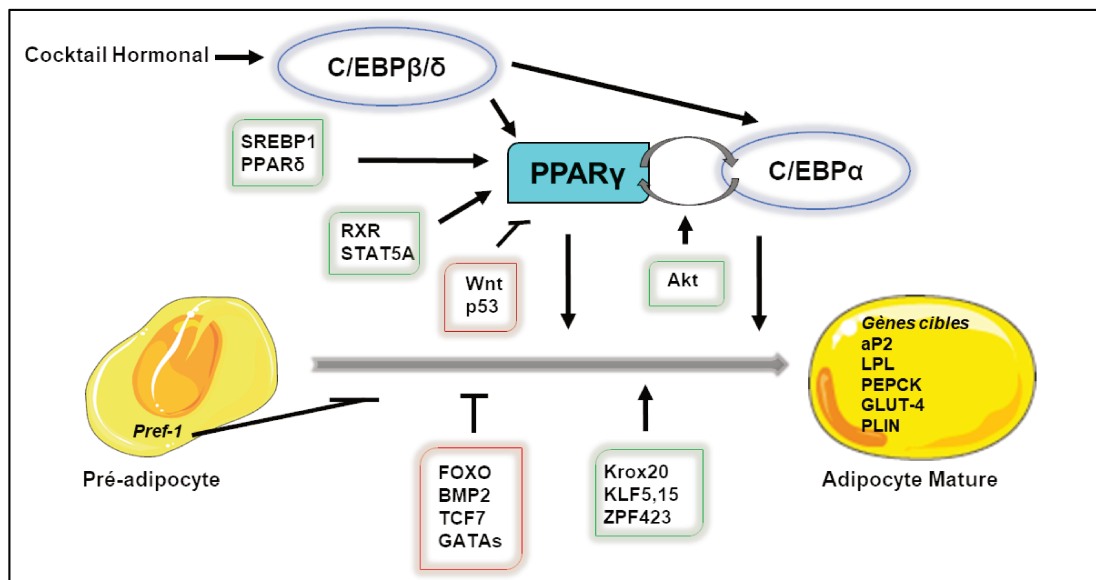


Figure 11 : Programme de différenciation adipocytaire (Adapté de Tontonoz and Spiegelman, 2008; Lefterova and Mitchell, 2009; Park et al., 2015)

Ce processus implique également des membres de la famille des C/EBP (CAAT/ enhancer binding protein). Sur la base des observations faites in vitro, un modèle de différenciation adipocytaire a été développé (Rosen and MacDougald, 2006). Il postule que les traitements hormonaux induisent l'engagement des pré-adipocytes dans le processus de différenciation et provoquent l'expression des facteurs de transcription C/EBP β et δ (Park et al., 2015; Tontonoz and Spiegelman, 2008). Par la suite, C/EBP β et δ forment un hétérodimère et se lient à leur tour sur le promoteur du gène PPAR γ , qui dès son activation induit la transcription d'une quantité de gènes cibles impliqués dans les processus de lipogenèse et de stockage des graisses. Grâce à ce stimulus, l'expression de C/EBP α est induite et cette protéine agit sur le promoteur de PPAR γ , créant ainsi une boucle d'autorégulation positive. In vitro, au fur et à mesure de la différenciation une diminution de l'expression de CEBP β/δ est observée en faveur d'une augmentation de PPAR γ et CEBP α . Il est important de noter que PPAR γ reste le facteur de transcription central nécessaire à l'adipogenèse. En effet, dans des pré-adipocytes où PPAR γ a été invalidé, la protéine C/EBP α est incapable de promouvoir seule l'adipogenèse (Rosen et al., 2002; Tontonoz and Spiegelman, 2008). Cependant, C/EBP α participe au programme de différenciation complet puisque les cellules invalidées pour cette dernière présentent une diminution de la sensibilité à l'insuline (Park et al., 2015; Tontonoz and Spiegelman, 2008; Wu et al., 1999b). La plupart des gènes caractéristiques des adipocytes matures impliqués dans la lipogenèse et la sensibilité à l'insuline (aP2, PEPCK, LPL, adiponectin, GLUT-4) contiennent des domaines de liaisons pour PPAR γ .

D'autres facteurs sont impliqués dans l'activation des protéines de la famille des PPARs comme la protéine retinoid X receptor (RXR) et le transducteur de signal et activateur de transcription 5 A (STAT5A). La protéine kinase B (Akt) potentialise l'activation réciproque de CEBP α sur PPAR γ . De plus, les protéines de la famille des Krüppel Like Factor KLF5 et KLF15 induisent entre-autre l'expression de PPAR γ . Enfin, l'activation du Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c (ADD1/SERBP-1c) et de PPAR δ régulent positivement et de façon précoce l'expression de PPAR γ , facteur de transcription clé de la différenciation adipocytaire. Enfin, les facteurs Krox20, et ZFP423 (Zinc Finger Protein) sont connus pour promouvoir l'adipogenèse (Lowe et al., 2011; Lynes and Tseng, 2015; Tontonoz and Spiegelman, 2008). Au contraire plusieurs autres voies de signalisation ont été montrées pour compromettre l'adipogenèse notamment la voie Wnt et p53 qui inhibent le facteur de transcription PPAR γ (Tontonoz and Spiegelman, 2008). Des facteurs de la famille des BMP (Bone Morphogenic Protein) comme BMP2, la voie des β -caténines, par l'induction du facteur de transcription TCF7 ou encore les protéines forkhead (FOXO) empêchent l'engagement dans la différenciation (Lowe et al., 2011). Le marqueur

spécifique des pré-adipocytes Pref-1 joue lui aussi un rôle anti-adipogénique et sera diminué au cours de la différenciation.

En résumé, la différenciation adipocytaire se caractérise par l'acquisition du phénotype lipidique accompagné de l'expression de nombreuses protéines métaboliques, grâce à l'action coordonnée de nombreux facteurs de transcriptions et de voie de signalisation. Au cours des 30 dernières années, l'utilisation de modèles cellulaires et animaux a permis de découvrir et de mieux comprendre tous ces acteurs pro-adipogéniques et anti-adipogéniques qui sont finement régulés.

3.4.1 La diversité au sein de l'organe adipeux

Le TA est un mélange cellulaire dynamique, outre des adipocytes matures (sièges de l'activité métabolique), des préadipocytes (cellules fibroblastiques déjà déterminées en adipocytes) et des CSM, d'autres cellules sont présentes comme des cellules sanguines, des cellules de l'immunité et des cellules endothéliales toutes présentes dans la fraction stroma-vasculaire (SVF) (Lee et al., 2014). En effet, le TA est vascularisé et innervé même si le TABr est considéré comme étant plus innervé et vascularisé que le TAB.

❖ Cellules de l'immunité

Ces cellules immunitaires présentes dans le TA comprennent les macrophages, les cellules T effectrices et mémoire, les cellules régulatrices FoxP3 + T productrices d'IL-10, les cellules NK et les granulocytes. Certaines études suggèrent que ces éléments pourraient jouer un rôle dans le recrutement des progéniteurs et la fonction adipocytaire (Guzik et al., 2017). Les cellules immunitaires infiltrantes produisent non seulement des cytokines, mais aussi des métalloprotéinases, des espèces oxygénées réactives et des chimiokines qui participent au remodelage tissulaire, à la signalisation cellulaire et à la régulation de l'immunité. Cependant, l'infiltration massive des cellules immunitaires va générer un état inflammatoire observée notamment dans les troubles métaboliques tels que l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète.

Les macrophages résidents dans le TA ont la particularité d'être classées en deux sous-populations en fonction de leur phénotype : les macrophages M1 pro-inflammatoires et les macrophages M2 anti-inflammatoires notamment impliqués dans la réparation tissulaire (Galvan-Pena and O'Neill, 2014). Certaines études ont montré que les macrophages peuvent affecter le développement du TA ainsi que ses fonctions endocrine et métabolique. En effet, les macrophages sont une source majeure de facteurs angiogéniques impliqués dans l'expansion du TA (Lee et al., 2014). Une déplétion des macrophages dans le TA altère l'adipogenèse (Han et al., 2011). Inversement,

l'accumulation des macrophages de type M1 favorise l'état d'insulino-résistance suggérant le rôle prépondérant de ces cellules immunitaires dans l'homéostasie glucidique (Lumeng et al., 2007).

❖ **Vascularisation**

De nombreux indices suggèrent que l'angiogenèse et l'adipogenèse sont deux processus étroitement liés durant le développement et la phase d'expansion post-natale du TA. Pour exemple, une étude a montré qu'un milieu conditionné provenant de la culture de cellules endothéliales favorisait la prolifération des pré-adipocytes, bien que les mécanismes et voies de signalisation impliquées soient encore très peu étudiés (Hutley et al., 2001). Pourtant, dans le domaine de la thérapie contre l'obésité, des agents pharmacologiques inhibant l'angiogenèse ont montré des résultats encourageants, à savoir une réduction de la masse grasse dans des modèles d'obésité murins (Brakenhielm et al., 2004). Un mécanisme qui pourrait expliquer cette réduction est la diminution de la vascularisation des dépôts adipeux et donc une induction de l'apoptose au niveau de ces dépôts (Sun et al., 2012).

❖ **Innervation**

Le système nerveux sympathique joue également un rôle au sein du TA notamment dans la mobilisation des acides gras et du flux sanguin. En effet, une sympathectomie chimique ou une dénervation chirurgicale du TAB augmente la prolifération et la différenciation des progéniteurs adipocytaires blancs (Foster and Bartness, 2006; Lee et al., 2014). De plus, l'activation du récepteur adrénérgique $\alpha 2$ in vitro induit la prolifération de pré-adipocyte (Bouloumie et al., 1994). L'innervation est également très importante au niveau des dépôts de TABr étant à l'origine de l'activation de certaines voies métaboliques. Cette partie sera détaillée dans la suite du chapitre consacré au TABr.

Ainsi, tous les composants du TA jouent un rôle dans le maintien de l'homéostasie, dans l'activation de certaines voies de signalisation ou encore dans la contribution à des situations pathologiques comme l'insulino-résistance.

3.1.5 Le métabolisme énergétique de l'adipocyte

En tant qu'organe spécialisé dans le stockage des graisses, le TA, en particulier le TAB, est caractérisée par une balance dynamique entre stockage et clairance des AGs. En effet, comme vu précédemment, la prise de nourriture stimule la voie lipogénique et le stockage des TGs par l'intermédiaire de l'insuline alors que le jeûne induit la voie

lipolytique et favorise la libération des AGs du TA à partir des TGs, notamment via l'action du glucagon et des catécholamines. Le TABr, quant à lui, est plutôt spécialisé dans la clairance et la production de chaleur à partir de substrats énergétiques dont les caractéristiques seront détaillées dans la partie II de ce chapitre.

❖ **Stockage des Acides Gras**

La lipogenèse, qui a lieu majoritairement dans le foie et le TA, est le processus métabolique de synthèse d'AG de novo à partir de glucose et englobe de manière plus générale la biosynthèse des TGs (Bodis and Roden, 2018; Luo and Liu, 2016). Au niveau du TA, la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques après un bol alimentaire induit la captation du glucose par les adipocytes via les transporteurs GLUT-4. Le glucose est alors métabolisé en pyruvate via la glycolyse cytoplasmique, celui-ci va à la mitochondriale pour entrer dans le cycle de Krebs jusqu'à la formation de citrate qui retourne dans le cytoplasme pour donner de l'acétyl-CoA. La synthèse d'AG débute et se décompose en quatre étapes (**Figure 12**) (Bodis and Roden, 2018; Calderon-Dominguez et al., 2016). Tout d'abord, l'acétyl-CoA est carboxylé en malonyl-CoA, grâce à l'enzyme acétyl-CoA carboxylase (ACC) (Berg, 2012; Bianchi et al., 1990). Puis, l'acides gras synthase (ou Fatty Acid Synthase (FAS)), enzyme cytosolique multifonctionnelle, permet la formation de palmitate, un AG saturé composé de 16 carbones. Le palmitate (ou acide palmitique) est l'acide gras le plus long produit par l'enzyme FAS. A partir de ce dernier, des acides gras plus longs pourront être produits par des enzymes pour la plupart localisées dans le réticulum endoplasmique (RE), les ELOVLS (ELongation Of Very Long chain fatty acids) qui forment une famille de 7 protéines chez les humains (Calderon-Dominguez et al., 2016; Kihara, 2012). La dernière étape de la synthèse des AGs est la désaturation de ces derniers par des enzymes appelées désaturases, comme la stéaroyl-coA desaturase (SCD), dont le rôle est d'introduire des liaisons doubles à des positions spécifiques de la chaîne de l'AG. Une fois que les AGs ont été synthétisés, ils peuvent être estérifiés pour être stockés sous forme de TGs dans un organelle appelé gouttelette lipidique composé d'un noyau lipidique neutre, recouvert par une monocouche de phospholipides (Calderon-Dominguez et al., 2016). Les gouttelettes lipidiques permettent de prévenir la lipotoxicité cellulaire et de fournir les substrats pour la β -oxydation mitochondriale. Durant le processus d'estérification des AGs, les diacylglycérol acyltransférases (DGAT1/2) catalysent l'étape finale de la voie de synthèse des TGs à partir d'AGs activés, les Acyl-CoA et de Glycérol-3-Phosphate (G3P) (Calderon-Dominguez et al., 2016). A ce jour, il existe trois moyens d'obtenir du G3P : la glycolyse, la néoglucogenèse ou la glycéronéogenèse via la phosphorylation du glycérol. Dans le cas de la glycéronéogenèse, le G3P est formé à partir de PhosphoEnolPyruvate (PEP)

issu de l'oxaloacétate, grâce à l'isoforme cytosolique de la phosphoénolpyruvate carboxykinase ou PEPCK.

Les AGs peuvent également provenir de la circulation sanguine. En effet, la lipoprotéine lipase (LPL) située au niveau des cellules endothéliales hydrolysent les TGs présents dans le sang et contenus dans les lipoprotéines (chylomicrons et VLDL) (Kersten, 2014). Ainsi les AG libérés pénètrent dans l'adipocyte où ils sont réestérifiés pour être stockés (**Figure 12**). Comme cité précédemment, l'insuline favorise l'entrée du glucose dans la cellule, mais induit également la synthèse de la LPL et l'induction de la translocation des protéines de transports des AGs (Van Obberghen et al., 1979). En effet, les AGs passent au travers de la membrane cellulaire des vaisseaux sanguins puis de l'adipocyte sous le contrôle de transporteurs membranaires comme CD36 ou d'autres protéines de la famille des transporteurs d'AGs (FATP) et sont pris en charge par les protéines de transports des AGs (Fatty Acid Binding Protein 4, FABP4 ou adipocyte protein 2, ap2).

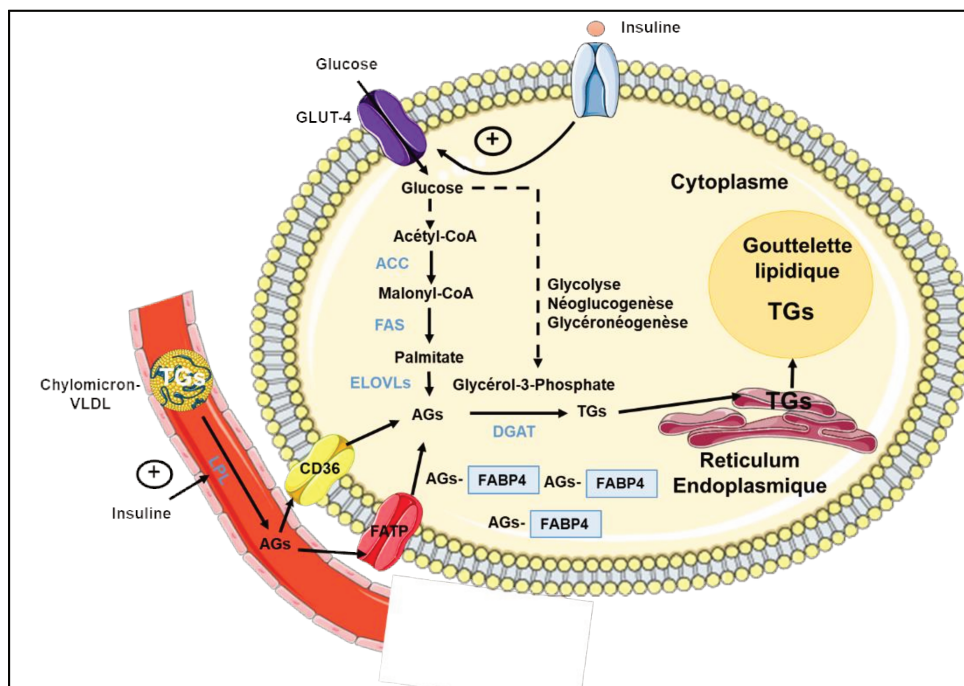


Figure 12 : Principaux acteurs de la lipogenèse (Adapté de Calderon-Dominguez et al., 2017)

❖ Acides gras : une source d'énergie

Opposée à la lipogenèse, la lipolyse est le processus catabolique qui intervient dans la dégradation des TGs stockés dans les adipocytes et la libération des AGs et du glycérol (Luo and Liu, 2016). La lipolyse fournit ainsi du glycérol au foie pour la néoglucogenèse et des AGs pour la β -oxydation mitochondriale afin de produire de l'ATP en fonction des demandes énergétiques des autres organes pour maintenir l'homéostasie énergétique

(Bodis and Roden, 2018). En période éloignée des repas, les niveaux d'insuline diminuent au profit de l'augmentation des taux de glucagon et de catécholamines. La lipogenèse n'est donc plus activée et c'est la lipolyse qui est induite par la voie AMPc / protéine kinase A (PKA) en phosphorylant l'enzyme clé de ce processus de la lipolyse, la lipase hormonosensible (HSL) et certaines protéines associées aux gouttelettes lipidiques, les périlipines (PLIN) (Carmen and Victor, 2006; Luo and Liu, 2016) (**Figure 13**).

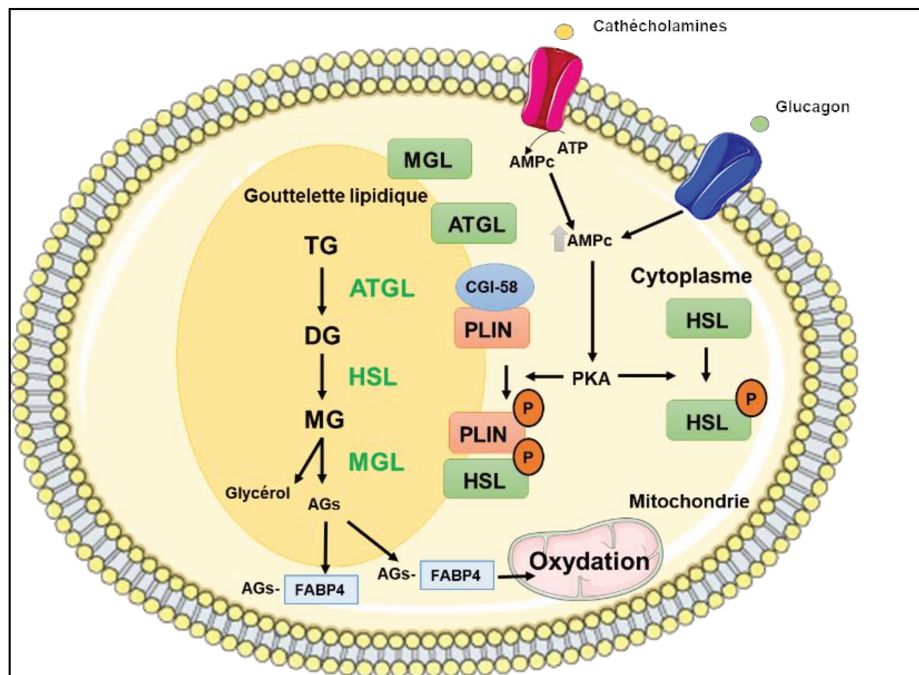


Figure 13 : Libération des Acides Gras par la lipolyse (Adapté de Calderon-Dominguez et al., 2017)

Concrètement, une fois phosphorylées les périlipines situées autour de la gouttelette lipidique se réorganisent et rendent accessible les TG pour permettre la lipolyse qui nécessitera l'action de deux autres lipases (Brasaemle, 2007; Brasaemle et al., 2009). Premièrement, la lipase ATGL (adipocyte triglyceride lipase) convertit les TGs en diglycérides (DGs) (Calderon-Dominguez et al., 2016; Zimmermann et al., 2004). Elle est associée aux gouttelettes lipidiques et nécessite un co-activateur, CGI-58 pour une activité hydrolytique complète. Cette enzyme joue un rôle critique dans la lipolyse puisque son inactivation dans un modèle murin diminue la lipolyse et l'oxydation des AGs (Lass et al., 2006). L'HSL catalyse la deuxième réaction de la lipolyse et permet l'hydrolyse des DGs en monoglycérides (MGs) (Haemmerle et al., 2002; Luo and Liu, 2016). Bien que les DGs soient les substrats préférés de l'HSL, elle peut également hydrolyser des TGs ainsi que des esters de cholestérol (Fredrikson and Belfrage, 1983). Pour finir, la lipase MGL (monoacylglycérol lipase), également associée à la gouttelette lipidique, catalyse la dernière réaction en chaîne pour aboutir à la libération d'AGs libres et de glycérol (**Figure 13**).

Les AGs nouvellement formés peuvent être pris en charge par la protéine FABP4 pour être transportés à la membrane et exportés dans la circulation ou dans les organelles de la cellule, par exemple la mitochondrie où ils pourront être oxydés.

❖ Oxydation des Acides Gras

L'oxydation des AGs se déroule dans la matrice mitochondriale, mais en fonction de la longueur de la chaîne aliphatique des AGs, une étape intermédiaire sera nécessaire. En effet, les AG à chaîne courte peuvent directement traverser la membrane mitochondriale contrairement aux AGs à moyenne ou longue chaîne (**Figure 14**).

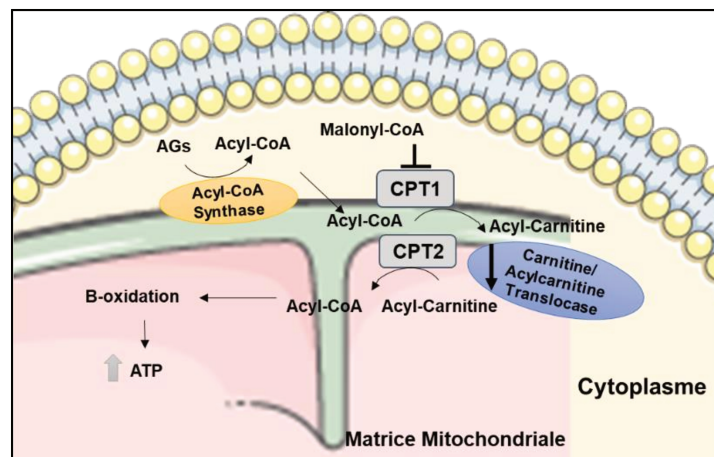


Figure 14 : Devenir mitochondrial des Acides Gras pour produire de l'énergie (Adapté de Virmani et al., 2015)

Dans ce cas, une acyl-coA synthase située à la surface de la membrane mitochondriale externe permet la transformation des AGs en acyl-CoA (Ellis et al., 2010). Cependant, les membranes mitochondriales étant imperméables au coenzyme A, un système de navette sera nécessaire pour permettre le passage de ces AGs : le système carnitine palmitoyltransférase (CPT). La première composante du système est l'enzyme CPT1 localisée sur la membrane mitochondriale externe et permet le transfert du groupement acyl sur la carnitine dans l'espace intermembranaire mitochondrial (Calderon-Dominguez et al., 2016; McGarry et al., 1989). Par ailleurs, il est important de noter que l'activité de CPT1 est négativement régulée par le malonyl-CoA produit lors de la lipogenèse. Grâce au système de transport carnitine/acylcarnitine translocase, les acyl-carnitines peuvent pénétrer dans la matrice mitochondriale. Ensuite, l'enzyme CPT2 localisée sur la membrane interne de la mitochondrie permet le transfert inverse à savoir le groupement acyl de la carnitine sur le coenzyme A. Les acyl-CoA ainsi reformés dans la matrice mitochondriale peuvent être métabolisés via la β -oxydation qui consiste en la répétition d'une séquence de 4 réactions. A chaque tour de β -oxydation, une molécule d'acétyl-CoA

sera libérée pour être convertie en ATP via le cycle de Krebs couplé à la phosphorylation oxydative (Calderon-Dominguez et al., 2016) (**Figure 14**).

Le TA est donc un réservoir de substrats énergétiques qui joue un rôle vital dans la régulation des flux d'AGs et qui régule la clairance des TGs plasmatiques pour éviter leur accumulation dans d'autres tissus.

3.1.6 Le tissu adipeux comme organe endocrine

En plus d'exercer une fonction de stockage des substrats énergétiques, le TA possède une fonction endocrine et produit une variété de facteurs circulants qui jouent un rôle dans le métabolisme et l'inflammation (Luo and Liu, 2016). Parmi ceux-ci, les adipokines ont été ainsi nommées car ce sont des cytokines sécrétées par le TA. La leptine fut la première adipokine découverte en 1994 (Zhang et al., 1994), suivi par l'adiponectine en 1995 (Scherer et al., 1995). Depuis, plusieurs autres adipokines ont été identifiées comme le Tumor Necrosis Factor α (TNF α) et l'Interleukine-6 (IL-6), la résistine, l'apéline, ou encore la visfatine. L'adiponectine et la leptine jouent un rôle essentiel dans la régulation du métabolisme, respectivement impliquées dans la sensibilité à l'insuline ou la prise de nourriture (Luo and Liu, 2016). Par ailleurs, elles sont toutes deux impliquées dans la dépense énergétique (Bluher and Mantzoros, 2015). La leptine, comme la résistine ou la chémérine, toutes deux impliquées dans l'inflammation (Luo and Liu, 2016), ont été longtemps décrites comme des cytokines spécifiques du TA mais de récentes études ont montré que ces trois cytokines pouvaient être présentes dans d'autres types cellulaires. Par exemple, la leptine est retrouvée dans des tissus tels que l'estomac, le muscle et l'intestin, la résistine dans les cellules de la moëlle épinière humaine et la chémérine dans les cellules endothéliales (Luo and Liu, 2016). L'apéline quant à elle améliore la sensibilité à l'insuline chez des souris obèses et insulino-résistantes notamment en augmentant la capacité oxydative du muscle et sa biogenèse mitochondriale (Attane et al., 2012). De plus, la transposition de cette découverte a récemment été faite chez l'homme et démontre que le système apéline/ APJ (récepteur de l'apéline) contribue à l'amélioration de la sensibilité à l'insuline (Gourdy et al., 2018).

Le TNF α et l'IL-6 sont sécrétées par les cellules immunitaires du TA. Elles sont principalement impliquées dans l'inflammation et contribuent fortement à la résistance à l'insuline (Luo and Liu, 2016). Au vu de la diversité des effets induits par les adipokines, il est important de noter qu'une production dérégulée de celles-ci peut être impliquée dans l'altération de l'homéostasie énergétique. De plus, une nouvelle classe d'adipokines

sécritée par le TABr, nommées « Batokines », a récemment été découverte et celles-ci pourraient contribuer à la régulation positive du métabolisme.

3.2 Quelles spécificités pour le Tissu Adipeux Brun ?

Bien qu'ils partagent certaines similitudes au niveau organisationnel et voies de signalisation utilisées, les adipocytes blancs et bruns sont tout de même très différents. Les particularités de l'adipocyte brun notamment au niveau de la différenciation, du métabolisme et de la fonctionnalité seront détaillées dans ce chapitre.

3.2.1 Les facteurs de la différenciation adipocytaire brune

Comme cité précédemment, les adipocytes bruns émergent de populations précurseurs différentes de celles des adipocytes blancs mais communes aux cellules musculaires et qui expriment les facteurs transcriptions Myf5 et Pax7 (Pradhan et al., 2017).

La différenciation des pré-adipocytes bruns partage un programme transcriptionnel fondamental commun avec les pré-adipocytes blancs, dépendant de PPAR γ et des protéines C/EBPs (Lynes and Tseng, 2015), qui ciblent des gènes requis pour la formation d'adipocytes matures. Cependant, un programme de différenciation thermogénique spécifique aux adipocytes bruns existe et fait intervenir plusieurs acteurs dont le plus connu est le facteur de transcription PRDM16 (PRD1-BF-1-RIZ1 Homologous-Domain Member 16) qui se démarque comme inducteur de la différenciation brune. En effet, en 2008, Seale et al., ont montré que ce régulateur transcriptionnel est le commutateur requis pour l'engagement vers la différenciation adipocytaire brune plutôt que myoblastique (Park et al., 2015). L'expression de PRDM16 dans des précurseurs myogéniques favorise la différenciation adipocytaire brune. De la même manière, l'inhibition de ce facteur de transcription bloque la différenciation adipocytaire brune et favorise la différenciation des cellules musculaires (Seale et al., 2007). En 2009, PRDM16 a été décrit comme formant un complexe avec C/EBP β initiant alors la différenciation adipocytaire brune (Kajimura et al., 2009). Concernant le mécanisme d'action, il semblerait que PRDM16 possède une activité de méthylation des histones (Histone 3 Lysine 9 ou H3K9) dans les cellules souches embryonnaires humaines, permettant une modification de la chromatine associée au programme de différenciation thermogénique (Barski et al., 2007; Lynes and Tseng, 2015). En plus de sa propre activité de modification des histones, PRDM16 s'associe également avec des enzymes qui recrutent des histones déacétylases, les

protéines Ctbp 1 et 2, qui répriment quant à elles le programme d'expression des adipocytes blancs (Kajimura et al., 2008; Park et al., 2015) (**Figure 15**). De plus, le complexe PRDM16 contient une méthyltransférase EHMT1 (euchromatin histone-lysine N-methyltransferase 1) permettant la méthylation des histones au niveau des promoteurs de gènes myogéniques et réprimant la différenciation des cellules musculaires (Lynes and Tseng, 2015). Il existe des facteurs de transcription régulant l'expression de PRDM16, comme Ebf2 (Early b cell factor 2), qui recrute PPAR γ au niveau de la région promotrice de PRDM16 pour permettre l'activation de son expression (Park et al., 2015) (**Figure 15**). En effet, les souris invalidées pour Ebf2, possèdent une expression non-altérée des marqueurs adipocytaires PPAR γ ou adiponectine, mais une inhibition spécifique des marqueurs de l'adipocyte brun, suggérant qu'Ebf2 régule l'expression génique spécifique de ces marqueurs du TABr (Park et al., 2015; Wang et al., 2014b).

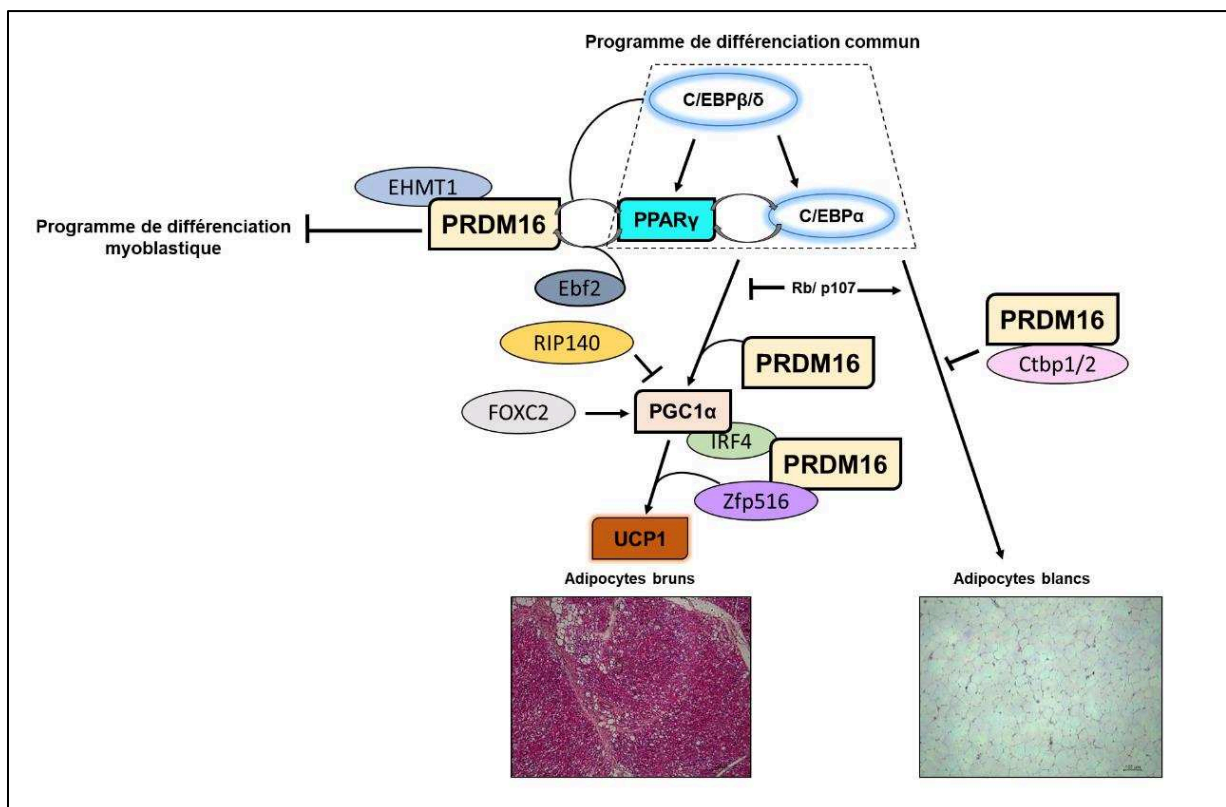


Figure 15 : Cascade transcriptionnelle de la différenciation adipocytaire brune (Adapté de Park et al., 2015) (Images représentatives de coupes de TABr et de TAB après coloration HE-grossissement 20X)

Le recrutement des co-activateurs de PPAR γ , PGC1 α et PGC1 β (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1), est également requis pour induire l'expression des gènes caractéristiques de l'adipocyte brun comme la protéine découplante UCP1 (Uncoupling Protein 1) ou la protéine CIDEA (Cell death inducing DFFA like effector a) (Luo and Liu, 2016). Bien que PRDM16 et PGC1 α soient des antagonistes de

l'adipogenèse brune, PGC1 α est aussi requis pour l'expression de gènes impliqués dans la biogenèse mitochondriale comme TFAM (Mitochondrial Transcription Factor A), faisant de ce co-activateur transcriptionnel un acteur de la différenciation mais aussi de l'activité de l'adipocyte brun (Lynes and Tseng, 2015). Par ailleurs, le facteur de transcription FOXC2 est lui aussi nécessaire à la différenciation brune car il active l'expression de PGC1 α . IRF4 (Interferon Regulatory Factor 4) interagit avec PGC1 α et permet l'activation de l'expression d'UCP1. De la même manière, le facteur de transcription Zfp516 (Park et al., 2015), interagit avec PRDM16 et IRF4 et permet l'activation des gènes thermogéniques (Pradhan et al., 2017). Enfin, les protéines de la famille Rb (Retinoblastoma susceptibility), Rb et p107 ou encore RIP140, répriment la différenciation adipocytaire brune et activent l'adipogenèse blanche (Park et al., 2015) (**Figure 15**).

3.2.2 Les particularités de l'adipocyte brun

Outre le programme de différenciation, les adipocytes bruns diffèrent également des adipocytes blancs au niveau morphologique. Tout d'abord, ils sont plus petits que leurs homologues blancs et de forme polygonale (15 à 60 μm de diamètre versus 100 à 150 μm pour un adipocyte blanc) (Cedikova et al., 2016). Les adipocytes bruns sont dits « multiloculaires » c'est-à-dire qu'ils possèdent plusieurs gouttelettes lipidiques comparé aux adipocytes blancs qui n'en possèdent qu'une seule. Ils ont également de nombreuses mitochondries très actives et sont spécialisés dans la dissipation de l'énergie grâce à la thermogenèse (**Figure 16**). Les nombreuses mitochondries confèrent aux adipocytes et au TA correspondant sa couleur « brune ».

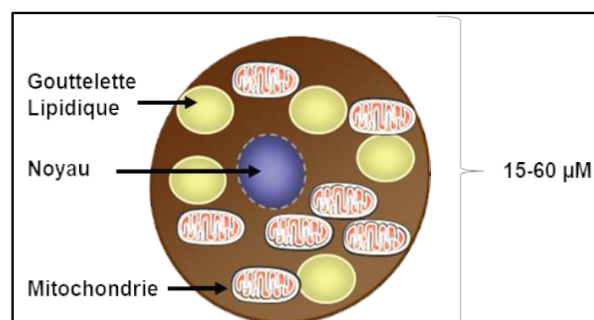


Figure 16 : Morphologie des adipocytes bruns

❖ *Les marqueurs de l'adipocyte brun*

A ce titre, des marqueurs de l'adipocyte spécialisé dans la thermogenèse sont également beaucoup plus exprimés que dans les adipocytes blancs. C'est le cas, entre autres, du transporteur de glucose GLUT-1, de CPT1M (Carnitine palmitoyltransferase I- isoforme musculaire également très exprimé dans le TABr), de CIDEA, de PLIN5 (Perilipin-5), de

PDK4 (Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4), de la CS (Citrate Synthase) ou encore de PRMD16 (Cedikova et al., 2016). Zic1 est également spécifique des adipocytes bruns. C'est un facteur de transcription en doigt de zinc qui se lie et trans-activer le gène de l'Apolipoprotéine E (de Jong et al., 2015). Tous ces marqueurs participent activement et contribuent au bon fonctionnement du métabolisme de l'adipocyte brun mais le marqueur signature reste aujourd'hui la protéine mitochondriale UCP1 encore appelée thermogénine.

❖ La mitochondrie

Que serait l'adipocyte brun sans son organe central impliqué dans la fonction thermogénique: la mitochondrie ? Les mitochondries sont des organites vitaux pour les adipocytes bruns car elles jouent un rôle critique dans de multiples processus cellulaires notamment le contrôle de l'oxydoréduction, le métabolisme des AGs via la β -oxydation, la production d'espèce réactive de l'oxygène (ROS), souvent nécessaires aux mécanismes d'apoptose, et enfin et surtout la production d'énergie cellulaire sous forme d'ATP dont elle produit plus de 95% (Cedikova et al., 2016). A ce titre, elles sont souvent appelées les « centrales énergétiques » des cellules (Kauppila et al., 2017). Il est important de noter que les mitochondries possèdent leur propre génome mais seulement 1% du protéome mitochondrial est codé par ce dernier. Néanmoins, ceci n'enlève rien à l'importance du génome mitochondrial puisqu'il code pour des protéines essentielles de la fonction mitochondriale, notamment la phosphorylation oxydative nécessaire à la production d'ATP (Kauppila et al., 2017). La mitochondrie contient une double membrane. La membrane extérieure est perméable aux petits métabolites comme les protons, alors que la membrane intérieure contrôle le passage de ces métabolites en vue de créer un gradient électrochimique nécessaire pour la production d'ATP.

La phosphorylation oxydative implique dans un premier temps l'oxydation de cofacteurs tels que le NADH (Nicotinamide adenine dinucleotide) et le FADH₂ (Flavin adenine dinucleotide) provenant du cycle de Krebs et dont les substrats ont notamment été apportés par la β -oxydation des AGs. Dans un deuxième temps, elle comprend la phosphorylation de l'ADP (Adénosine diPhosphate) en ATP. Le NADH et le FADH₂ sont oxydés par une série de réactions « Rédox » impliquant des protéines de la membrane interne de la mitochondrie. Ces protéines constituent la chaîne respiratoire mitochondriale qui s'organise autour de 5 complexes majeurs : le complexe I (NADH déshydrogénase), le complexe II (succinate déshydrogénase), le complexe III (ubiquinol-cytochrome c oxydoréductase), le complexe IV (Cytochrome c oxidase) et enfin le complexe V aussi connu sous le nom d'ATP synthase (**Figure 17**).

La réduction du NADH et du FADH₂ libère des électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale. Le processus de transport des électrons à travers les complexes I à IV est couplé à un transport de protons de la matrice à l'espace inter membranaire mitochondriale. La conséquence du transport d'électrons à travers la chaîne respiratoire mitochondriale est l'établissement d'une différence de potentiel électrochimique à travers la membrane, appelée la force proton motrice (ou « Proton Motive Force », PMF). Cette PMF comporte à la fois un gradient électrique (qui constitue le potentiel de membrane) et un gradient chimique dû à une différence de pH induite par la répartition différentielle des protons de part et d'autre de la membrane mitochondriale interne. L'énergie conservée dans le gradient de protons est utilisée par le complexe V pour permettre aux protons de rejoindre la matrice mitochondriale et provoquer la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique (Pi). Les électrons encore présents dans la chaîne respiratoire se lient à des molécules d'oxygène pour être ainsi réduits en H₂O par le complexe IV. Le complexe de transport d'électrons et les propriétés uniques de la PMF ont été déterminés grâce à un nombre important d'inhibiteurs de la chaîne respiratoire comme la roténone, l'antimycine A ou encore l'oligomycine qui inhibent respectivement les complexes I, III et V (ATP synthase).

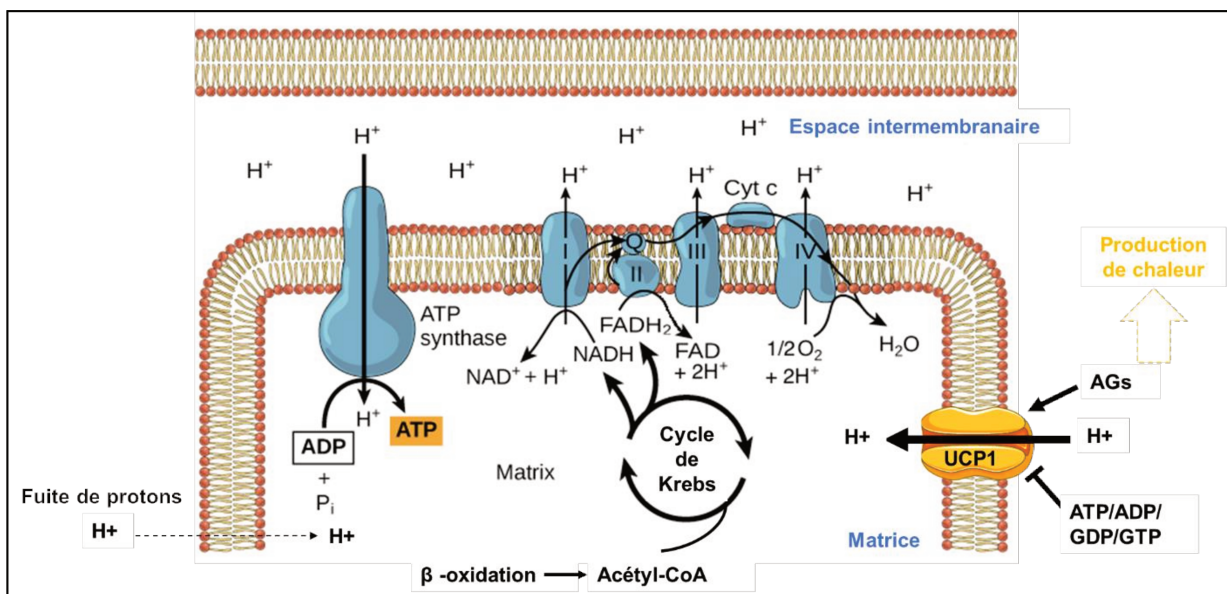


Figure 17 : La phosphorylation oxydative mitochondriale et découplage par la protéine spécifique des adipocytes bruns, UCP1 (Adapté de "Oxidative phosphorylation" by Openstax College, Biology)

Par ailleurs, la synthèse d'ATP est contrôlée par les niveaux d'ADP dans la matrice mitochondriale. Etant donné que la conversion d'ADP en ATP requiert une molécule d'oxygène comme accepteur final du transport d'électrons, il existe une association directe entre la concentration d'ADP au sein de la matrice mitochondriale et la consommation d'oxygène. Par ailleurs, toute l'énergie présente dans le gradient n'est pas

destinée à la synthèse d'ATP puisqu'à l'état basal chaque cellule présente une fuite de protons qui diffuse à travers la membrane mitochondriale interne et arrive dans la matrice sans passer par l'ATP synthase. Cette fuite représente 20 à 25 % du métabolisme basal.

Il existe une autre protéine spécialisée dans la fuite de protons en grande quantité et présente uniquement dans les adipocytes bruns de certains mammifères : c'est la protéine UCP1.

❖ **La protéine thermogénique par excellence : UCP1**

▪ **Découverte et rôle d'UCP1**

UCP1 a été isolée pour la première fois en 1978 par Nicholls et al., à partir du TABr de hamsters. A cette époque elle est décrite comme une protéine de 32 kDa (kDaltons) capable de se lier aux purines des nucléotides (Nicholls et al., 1978). Après cette découverte, ce n'est que 20 ans plus tard qu'Enerback et al. démontrent le rôle d'UCP1 dans la régulation de la température corporelle d'animaux acclimatés au froid. En effet, les auteurs démontrent que les souris invalidées pour UCP1 sont incapables de maintenir leur température corporelle et développent une hypothermie indiquant que leur thermorégulation est défectueuse (Enerback et al., 1997). Cette étude met en lumière le rôle primordial d'UCP1 et du TABr dans la thermogénèse. Comme son nom l'indique UCP1 est une protéine de découplage de protons localisée au sein de la membrane interne de la mitochondrie. Elle détourne donc le gradient de protons établi par la chaîne respiratoire mitochondriale ayant pour but la production d'ATP et favorise leur passage dans la matrice mitochondriale. Ceci provoque une suractivation du métabolisme mitochondrial qui s'emploie à renvoyer les protons dans l'espace inter membranaire et engendre une perte d'énergie sous forme de chaleur (Cannon and Nedergaard, 2004) (**Figure 17**).

UCP1 appartient à la famille des protéines mitochondriales découplantes. Les mammifères en expriment 5 isoformes (UCP1-5) dont la plus connue est UCP1 exprimée presque exclusivement dans les adipocytes bruns matures (Cannon and Nedergaard, 2004; Cedikova et al., 2016). UCP2 est très largement distribuée dans différents tissus de l'organisme comme le thymus, l'estomac, les testicules, les cellules β pancréatiques et joue un rôle dans le contrôle de l'activation des cellules immunitaires et la production de ROS mitochondrial alors qu'UCP3 semble protéger les mitochondries du muscle squelettique contre le stress oxydatif induit par les lipides. Enfin, très peu d'études se focalisent sur le rôle d'UCP4 et 5 qui seraient également impliquées dans la protection contre le stress oxydatif mitochondrial au niveau des cellules neuronales (Liu et al., 2013a).

Comme cité précédemment, UCP1 joue un rôle critique dans la thermogénèse, c'est pourquoi elle est plus largement retrouvée dans les espèces acclimatées au froid comme notamment les rongeurs (Cannon and Nedergaard, 2004). Outre son rôle dans la thermogénèse dont les mécanismes seront expliqués par la suite, cette protéine unique peut également impacter le métabolisme puisqu'au début des années 2000 une étude a montré que l'inactivation d'UCP1 dans un modèle murin favorise l'apparition d'une obésité induite par une alimentation riche en graisses avec l'âge (Kontani et al., 2005).

▪ Activation d'UCP1

A l'état basal, UCP1 est présente dans les adipocytes bruns mature mais sous forme inactive et ne peut donc pas exercer son rôle de découplage du gradient de protons. Cette protéine qui possède une forte affinité pour les purines est basiquement inactivée par l'ADP, l'ATP le GTP ou encore le GDP classiquement utilisés expérimentalement pour mesurer la respiration découplée liée à UCP1. Le modèle standard postule que cette inhibition peut être levée par les AGs libres relargués des TGs provenant des gouttelettes lipidiques via la lipolyse lorsque les adipocytes bruns sont activés. Parmi les signaux à l'origine de l'activation des adipocytes bruns, les catécholamines et en particulier la noradrénaline, se distinguent comme des hormones contrôlant la thermogénèse et dont les voies de signalisation sont activées par le froid pour stimuler notamment la lipolyse. Des concentrations très faibles d'AGs de l'ordre du nanomolaire seront suffisantes pour lever l'inhibition de la protéine engendrée par la fixation des purines. En 2012, Fedorenko et al., ont détaillé le mécanisme de transport des protons à travers la membrane interne mitochondriale grâce à la technique de patch-clamp (Fedorenko et al., 2012). Les auteurs ont mis en évidence un symport des AGs libres à chaîne longue et des protons H⁺ de l'espace inter membranaire mitochondrial vers la matrice. Par ailleurs, il est communément accepté que la liaison des AGs est nécessaire et suffisante pour activer UCP1 (Cannon and Nedergaard, 2004). Cependant, une étude de Chouchani et al. publiée en 2016 a émis des doutes sur cette idée (Chouchani et al., 2016). En effet, les auteurs ont mis en évidence le rôle des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans l'activation d'UCP1. L'augmentation des niveaux de ROS (peroxide ou hyperoxide) provoquée par le switch métabolique de la glycolyse à la β -oxydation des AGs intervient lors de l'activation des adipocytes bruns. D'autre part, cette étude montre qu'une acclimatation de 3h à 4°C active les adipocytes bruns et par conséquent UCP1 mais augmente également de manière considérable la quantité de ROS mitochondrial (Chouchani et al., 2016), cause ou conséquence ? Une administration préalable d'antioxydants (MitoQ⁵ ou N-AcétylCystéine) bloque l'accumulation de ROS dans la mitochondrie et provoque une profonde hypothermie chez des animaux acclimatés au

froid, suggérant un échec de l'activation d'UCP1 en absence de production de ROS. En disséquant les mécanismes d'action, les auteurs démontrent que l'accumulation de ROS induit la sulfonylation d'un résidu cystéine (Cys523) de la protéine UCP1 nécessaire à l'activation de cette dernière par les AGs. Cette étude est notamment appuyée par le fait que plusieurs protéines mitochondriales clés (enzymes du cycle de Krebs et de la fusion/fission mitochondriale) sont régulées par des modifications des résidus cystéines (Murphy, 2012).

De manière intéressante, deux études ont récemment montré que la thermogénèse peut être induite dans les adipocytes bruns sans activation au préalable par la noradrénaline (Schreiber et al., 2017; Shin et al., 2017). Les deux groupes ont d'abord généré des souris invalidées pour le processus de lipolyse intracellulaire dans le TABr. En stimulant les souris avec un activateur de la voie β adrénergique, comme peut l'être la noradrénaline, les auteurs n'ont pas détecté de différence entre les souris dans lesquelles la lipolyse, et donc le relargage des AGs qui activent UCP1, était inhibée et le groupe contrôle. In vitro, les cellules provenant de souris invalidées pour le processus de lipolyse présentent une respiration découplée de 50% diminuée par rapport aux cellules contrôle et non une inhibition totale de celle-ci étant donné la nécessité des AGs pour l'activation d'UCP1. Pour tenter d'expliquer cette surprenante découverte, les auteurs ont fait plusieurs hypothèses : les AGs qui viennent activer UCP1 proviendraient directement de la lipolyse des TGs qui a lieu dans le TAB sous-cutané suite à une stimulation adrénergique, d'autres composés dérivés d'AGs comme les cardiolipines (phospholipides localisés dans la membrane interne des mitochondries) (Sustarsic et al., 2018) ou des dérivés perfluorés peuvent activer UCP1 ou encore d'autres lipases différentes de la lipolyse classique peuvent produire des AGs qui à leur tour peuvent activer UCP1 (Shin et al., 2017). Il existe donc plusieurs hypothèses quant au mécanisme précis de l'activation d'UCP1 expliquant la thermogénèse, mais qui convergent toutes vers une implication des AG.

❖ **La biogenèse mitochondriale**

Lors de l'activation des adipocytes bruns par la voie β -adrénergique, la biogenèse mitochondriale est augmentée de plus de trois fois et implique le coactivateur transcriptionnel PGC1 α qui est le régulateur clé de la biogenèse mitochondriale (Klingenspor et al., 1996; Wu et al., 1999a). Ce dernier induit les facteurs de transcription mitochondriaux COX2 et 4 (mitochondrially encoded cytochrome c oxidase II et cytochrome c oxidase subunit), impliqués dans la chaîne respiratoire mitochondriale. PGC1 α renforce aussi l'expression de facteurs nucléaires de la respiration (NRF-1, NRF-2). Parmi les cibles des NRF, les facteurs de transcription TFAM se lient aux régions

promotrices de l'ADN mitochondrial et engendrent des ARNm codant des protéines nécessaires à la réplication de l'ADN (Scarpulla, 2011; Zamora and Villena, 2014).

3.2.3 La thermogénèse adaptative non-frissonnante

La thermogénèse consiste en la production de chaleur par l'organisme dû à une augmentation du métabolisme cellulaire et se décompose en deux sous-catégories. Tout d'abord, la thermogénèse dite « obligatoire » se définit comme l'énergie utilisée pour le fonctionnement basique des cellules (métabolisme basal) (Calderon-Dominguez et al., 2016), alors que la thermogénèse dite « adaptative » implique la production de chaleur en réponse à des stimuli environnementaux. La thermogénèse « adaptative » implique la thermogénèse « frissonnante » induite par le froid et qui survient principalement dans le muscle squelettique, et la thermogénèse « non frissonnante » induite par le froid ou par l'excès de disponibilité des substrats suite à un repas riche en calories et qui se déroule principalement dans le TABr, à laquelle nous allons plus particulièrement nous intéresser (Calderon-Dominguez et al., 2016).

❖ *L'organisme face au froid et la voie β -adrénergique*

L'activité thermogénique des adipocytes bruns est premièrement induite par le système nerveux sympathique (SNS) (Cannon and Nedergaard, 2004; Kooijman et al., 2015; Townsend and Tseng, 2014). Historiquement, la présence d'une innervation sympathique du TABr a été mise en évidence dans les années 1960 dans différents modèles animaux de laboratoires (rats, souris et hamsters) et est caractérisée par la présence de neurones post-ganglionnaires du SNS innervant les deux lobes du TABr interscapulaire (5 fibres nerveuses intercostales pour chaque lobe) (Bartness et al., 2010; Vaughan et al., 2014; Wirsén, 2011). Des études pionnières ont montré que la dénervation unilatérale du TABr, altère profondément l'absorption de glucose dans les adipocytes bruns ainsi que la mitochondriogenèse et les niveaux d'UCP1 (Bartness et al., 2010; Takahashi et al., 1992). L'innervation par le SNS et la voie adrénérgique agissent de concert dans l'activation de la thermogénèse induite par le froid.

Lors d'une exposition au froid, les thermorécepteurs envoient une information afférente aux noyaux hypothalamiques ce qui a pour conséquence une libération de noradrénaline par les neurones post-ganglionnaires du SNS, suggérant une communication bien établie entre le cerveau et le TABr. Par la suite, la noradrénaline active les récepteurs β -adrénergiques situés sur la membrane plasmique des adipocytes bruns. La famille des récepteurs β -adrénergiques comprend plusieurs isoformes (isoformes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ ainsi que

les β_1 , β_2 , β_3). Dans le TABr, le récepteur β -3 adrénergique est le plus abondant et semble être l'isoforme le plus sollicité lors de la réponse au froid chez les rongeurs, alors que chez l'homme ce serait plutôt le récepteur β_1 qui serait stimulé (Mattsson et al., 2011). Le récepteur β -2 adrénergique quant à lui semble être impliqué dans la vasodilatation. En effet, ces derniers sont plus largement localisés au niveau des nombreux vaisseaux sanguins qui vascularisent le TABr (Bengtsson et al., 2000). Suite à la stimulation des neurones du SNS, un modèle proposé par Kooijman et al., en 2015, postule que la noradrénaline et des molécules d'ATP libérées par les fibres nerveuses se lient à leurs récepteurs respectifs à la surface des adipocytes bruns et activent des voies de signalisation aboutissant à l'activation d'UCP1 (Kooijman et al., 2015) (**Figure 18**). Conjointement, l'ATP converti en adénosine via sa liaison au récepteur A2A et la noradrénaline via sa liaison au récepteur β -3 adrénergique activent la production d'AMPc induite par l'adénylate cyclase. L'AMPc active à son tour la PKA qui engendre le processus de lipolyse premièrement via la phosphorylation de l'enzyme HSL et deuxièmement via la transcription de gènes impliqués dans la biosynthèse mitochondriale et la thermogénèse. Notamment, la PKA phosphoryle le facteur de transcription CREB (cAMP Response Element Binding Protein) et induit la phosphorylation d'ATF2 (Activating Transcription Factor) via la MAP Kinase p38. Ces deux facteurs de transcription se fixent sur le promoteur du gène UCP1 et induisent sa transcription (Cao et al., 2004; Kooijman et al., 2015). En plus de l'activation d'ATF2, p38 phosphoryle PGC1 α un acteur clé pour l'adipocyte brun comme vu précédemment (Harms and Seale, 2013).

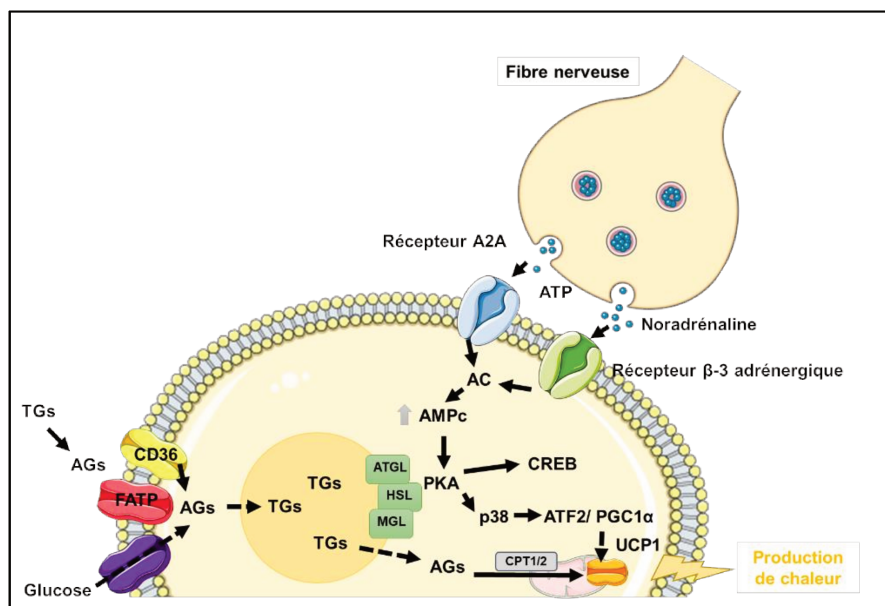


Figure 18 : Activation de l'adipocyte brun via le système nerveux sympathique (Adapté de Kooijman et al., 2015)

Plus spécifiquement, l'invalidation des récepteurs β -1 et -2 adrénergiques induit une diminution de l'activité du TABr dans des modèles murins mais aussi dans des modèles cellulaires humains (Collins et al., 1994). En revanche, des souris invalidées pour le récepteur β -3 adrénergique ne sont pas intolérantes au froid très certainement à cause de l'augmentation de l'expression du récepteur β -1 dans le TABr, suggérant l'établissement d'une compensation (Susulic et al., 1995). L'activation in vivo des récepteurs β -3 adrénergiques par des agents pharmacologiques (CL 316-243) induit la thermogenèse dans le TABr aussi bien chez des rongeurs que chez des humains, alors que l'activation des deux autres isoformes (β -1 et 2) présents dans d'autres types cellulaires, coïncide avec l'apparition de troubles cardiovasculaires (Cypess et al., 2015; Kooijman et al., 2015). C'est pourquoi les recherches se sont plutôt focalisées sur le récepteur β -3 adrénergique avec des études cliniques qui évaluent l'effet d'agonistes de ce récepteur sur la dépense énergétique pour le traitement de l'obésité.

❖ ***L'importance du métabolisme lipidique***

▪ **Absorption et stockage**

Les lipides qui alimentent la thermogenèse proviennent principalement de la circulation sanguine. En effet, chez les rongeurs le TABr est considéré comme l'organe majeur responsable de la clairance des lipides plasmatiques. Lors d'une exposition au froid, la voie β -adrénergique favorise l'entrée d'AGs dans le TABr grâce à l'augmentation de l'expression et de l'activité de la LPL (Bartelt et al., 2011; Bartelt et al., 2012; Calderon-Dominguez et al., 2016). L'augmentation de l'activité de la LPL peut également être ciblée de manière spécifique par les agonistes de PPAR γ comme la rosiglitazone. Cette dernière favorise la clairance des TGs plasmatiques au détriment de la lipogenèse, suggérant ainsi que le traitement par la rosiglitazone induit le métabolisme des AGs dérivés des TGs via les lipoprotéines (Laplane et al., 2007). Paradoxalement, il a aussi été montré que l'augmentation de l'activité de la LPL aboutit à une augmentation de l'adiposité et favorise l'insulino-résistance (Calderon-Dominguez et al., 2016; Duivenvoorden et al., 2005).

Une fois que les AGs sont libérés par la LPL, ils sont absorbés par des récepteurs à la surface de la membrane plasmique et transportés pour être utilisés ou stockés en fonction des stimuli. Notamment, la famille des récepteurs couplés aux protéines G sont considérés comme des « senseurs » d'AGs. L'isoforme 120 (GPR120) de la famille est activé par les AGs à longues et moyennes chaînes dans le TABr et joue un rôle dans la translocation des récepteurs GLUT-4 pour augmenter l'absorption de glucose (Townsend and Tseng, 2014). GPR120 est très exprimé dans les TABr de souris acclimatées au froid, suggérant son rôle dans la thermogenèse (Rosell et al., 2014). Par ailleurs, l'invalidation

de GPR120 chez des souris nourries avec un régime riche en graisses induit une obésité associée à une intolérance au glucose et une stéatose hépatique chez ces animaux (Ichimura et al., 2012). Récemment, une étude a mis en évidence le mécanisme d'action de la stimulation de GPR120 par les AGs grâce à un agoniste du récepteur, le TUG-891 (Schilperoort et al., 2018). Cette étude a montré que l'activation de GPR120 par le TUG-891 induit une libération de calcium du réticulum endoplasmique vers le cytoplasme, provoquant une dépolarisation mitochondriale et une fragmentation consécutive. De plus, le TUG-891 active UCP1, ce qui pourrait contribuer à l'augmentation de la respiration mitochondriale et de la clairance des lipides par les adipocytes bruns (Schilperoort et al., 2018).

En ce qui concerne le stockage des AGs, j'ai déjà mentionné les protéines de la famille des CIDE. CIDEA est exprimée de manière continue dans des adipocytes bruns si bien que son expression est couramment suivie comme marqueur moléculaire thermogénique. CIDEA est présente au niveau de la gouttelette lipidique et favorise l'élargissement de celles-ci en facilitant l'incorporation des TGs dans la monocouche de phospholipides et en se liant à l'acide phosphatidique (Barneda et al., 2015). De plus, CIDEA facilite le couplage étroit de la lipolyse et de la lipogenèse, suggérant l'importance de cette protéine dans les graisses brunes activées. De manière surprenante, de récentes études ont montré que CIDEA régule négativement l'activité d'UCP1 de manière indirecte (Calderon-Dominguez et al., 2016; Fischer et al., 2017a; Shimizu and Yokotani, 2009). Toutefois, chez les souris surexprimant CIDEA l'inhibition d'UCP1 est physiologiquement compensée par l'augmentation de la quantité totale d'UCP1 et permet de conserver une capacité thermogénique non altérée (Fischer et al., 2017a).

- **Dégradation des triglycérides intracellulaires**

Etape importante et complémentaire de l'action de la LPL, la lipolyse est essentielle pour la thermogénèse puisqu'elle permet l'hydrolyse des TGs stockés dans les gouttelettes lipidiques via différentes lipases et le relargage d'AGs pour l'activation d'UCP1. En effet, la délétion d'ATGL dans les adipocytes induit un blanchissement du TABr et altère fortement la thermogénèse (Ahmadian et al., 2011; Townsend and Tseng, 2014). Plus spécifiquement, l'inactivation d'ATGL dans des adipocytes bruns en culture révèle que cette protéine est requise pour l'induction de l'expression des gènes de l'oxydation des AGs et de la chaîne respiratoire mitochondriale (Mottillo et al., 2012). En revanche, des souris invalidées pour l'HSL présentent une thermogénèse normale et ne sont pas sensibles au froid. Néanmoins, ces souris présentent des adipocytes bruns hypertrophiés dû à une accumulation de TGs et de DGs (Osuga et al., 2000).

▪ Oxydation des Acides Gras

Comme cité précédemment, le système CPT permet l'entrée des AGs à chaînes moyennes et longues dans la matrice mitochondriale où ils peuvent ensuite être oxydés. Il existe trois isoformes de la première composante du système CPT localisé au niveau de la membrane mitochondriale externe pour permettre aux AGs d'entrer dans la mitochondrie: CPT1A, CPT1B, CPT1C qui diffèrent par leur séquence, leur distribution tissulaire et leur localisation intracellulaire (Calderon-Dominguez et al., 2016). CPT1B, aussi connu sous le nom de CPT1M (forme musculaire) est la forme la plus exprimée dans le TABr, le muscle squelettique et le cœur (Brown et al., 1997; Townsend and Tseng, 2014). Une étude pionnière a tout d'abord montré une forte corrélation entre les taux d'oxydation du palmitate dans le TABr et l'activité de CPT1B (Doh et al., 2005). De plus, Ji et al. ont démontré que les souris invalidées pour CPT1B meurent après une exposition au froid dû à leur incapacité à utiliser les AGs pour la thermogénèse (Ji et al., 2008), suggérant ainsi que CPT1B joue un rôle essentiel dans la thermogénèse qui se déroule dans le TABr. La surexpression de CPT1B dans des modèles d'études obèses aboutit à une amélioration de la sensibilité à l'insuline, suggérant que l'activation de l'oxydation des AGs pourrait constituer un terrain d'étude intéressant pour le traitement de l'obésité (Bruce et al., 2009; Calderon-Dominguez et al., 2016). L'oxydation des AGs peut aussi survenir dans les peroxisomes, mais elle n'est pas complète car les peroxisomes ne possèdent ni les enzymes du cycle de Krebs ni la chaîne respiratoire mitochondriale. L'oxydation peroxisomale est activée dans le TABr de rats exposés au froid mais sa contribution à la thermogénèse n'est pas clairement établie (Nedergaard et al., 1980).

❖ Le métabolisme du glucose

Durant la thermogénèse, la dynamique d'activation de lipolyse est étroitement couplée à celle de la lipogénèse, ces deux processus métaboliques agissent en série et en parallèle de manière flexible (Hankir and Klingenspor, 2018; Mottillo et al., 2014). En effet, au-delà des substrats lipidiques, le glucose est également une source d'énergie nécessaire au bon fonctionnement des adipocytes bruns puisqu'il est le substrat de départ de la lipogénèse. Basée sur des études in vivo chez le rat la contribution du glucose à la thermogénèse a été établie entre 2-16 % (Hankir and Klingenspor, 2018). Cependant, le glucose est à l'origine du G3P nécessaire à la lipogénèse pour la génération de nouveaux AGs, mais il peut également être métabolisé en pyruvate par la glycolyse. Ce pyruvate a plusieurs destinées en fonction des besoins métaboliques de la cellule (**Figure 19**):

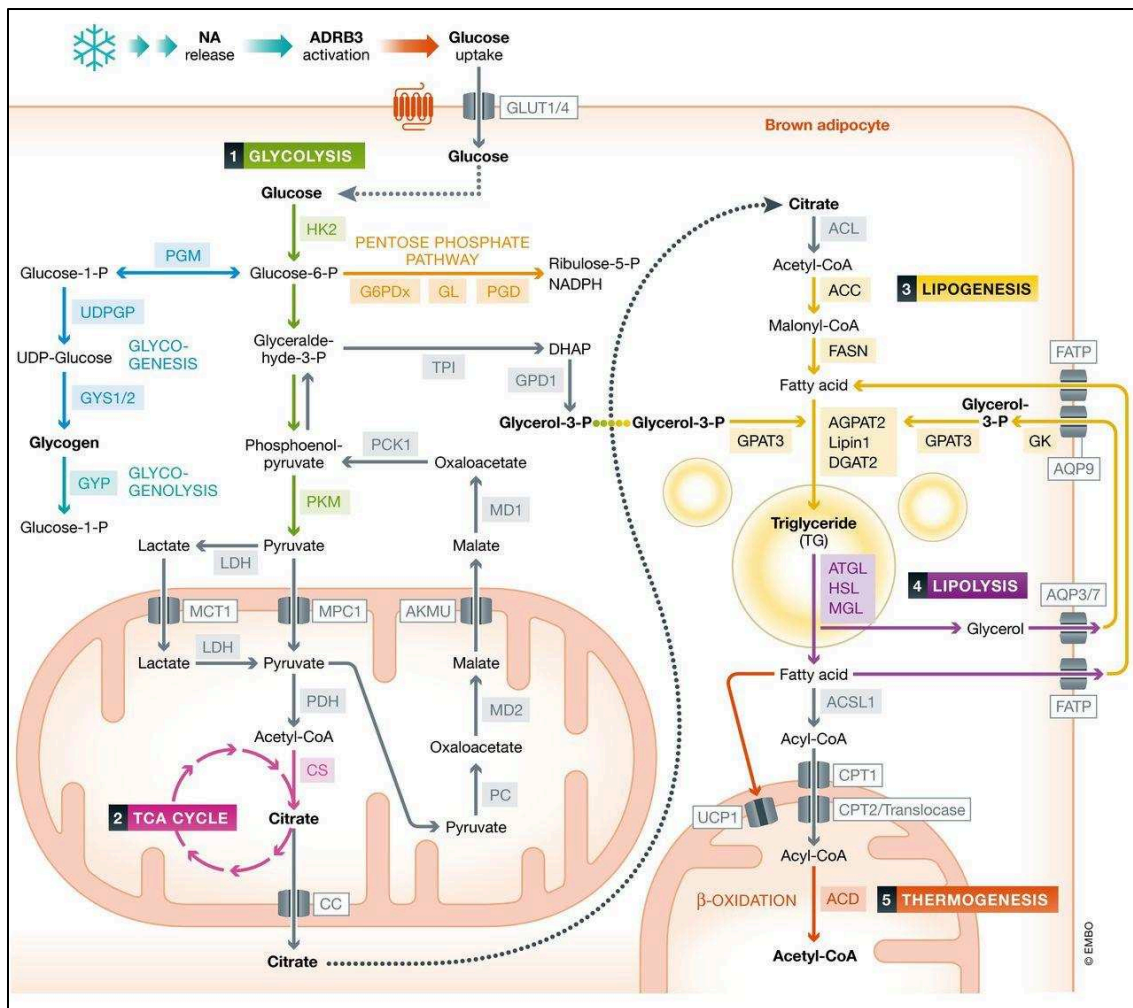


Figure 19 : Le métabolisme du glucose dans les adipocytes bruns (Source : Mohammed K Hankir, and Martin Klingenspor EMBO Rep, 2018)

Après phosphorylation par l'hexokinase 2(HK2), il peut être stocké sous forme de glycogène, il peut entrer dans la voie des pentoses phosphates où être métabolisé via la glycolyse. Le pyruvate issu de la glycolyse ira à la mitochondrie ou sera transformé en lactate par la lactate déshydrogénase (LDH) pour potentiellement re-pénétrer dans la mitochondrie et donner de l'acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase (PDH). Le cycle de Krebs prend alors le relais comme vu précédemment pour aboutir à la production de citrate qui sortira de la mitochondrie par ses transporteurs spécifiques et rejoindra le processus de lipogenèse. Une autre option pour le pyruvate présent dans la mitochondrie est de ressortir de la mitochondrie sous forme de malate, être transformé en oxaloacétate puis en PEP, et remonter la glycolyse pour aboutir au produit final qu'est le glycérol-3 phosphate important pour la lipogenèse.

Afin de réévaluer la nécessité de l'absorption de glucose dans la thermogénèse du TABr, des expériences récentes de pertes de fonctions sur des cultures immortalisées d'adipocytes bruns murins ont été réalisées (Winther et al., 2018). Elles ont montré que

l'activation de la consommation d'oxygène (reflétant une activité supérieure des adipocytes bruns) induite par une stimulation adrénérgique pouvait être inhibée par des siRNA dirigés contre les transporteurs de glucose spécifique du TABr, GLUT-4 et GLUT-1 (Winther et al., 2018). L'entrée de glucose via GLUT-4 requiert un stimulus tel que l'insuline ou la noradrénaline, ce qui n'est pas le cas via GLUT-1. Des résultats similaires ont été obtenus en inhibant l'HK2 ou la pyruvate kinase, respectivement première et dernière enzymes de la glycolyse, suggérant un rôle essentiel de la métabolisation du glucose pour le fonctionnement des adipocytes bruns. Bien que quantitativement parlant, le glucose ne contribue que modestement à la thermogénèse comparé aux substrats lipidiques, il est néanmoins essentiel (Held et al., 2018; Winther et al., 2018). En effet, une étude réalisée sur des souris où l'absorption et l'oxydation des AGs a été inhibée, montre une augmentation de l'incorporation de 2-deoxy-2-[18F]-fluoro-d-glucose, qui reflète l'absorption de glucose, et suggère donc que le glucose peut augmenter sa contribution à la thermogénèse en cas de besoin (Caron et al., 2017).

Bien que de nombreuses études se soient penchées sur la manière dont le TABr utilise les substrats lipidiques lors d'une exposition au froid, certains travaux suggèrent la contribution du glucose circulant durant la thermogénèse induite par un régime riche en graisses (Hankir and Klingenspor, 2018; Vosselman et al., 2013).

❖ ***La thermogénèse induite par l'excès de substrats***

Dans les sociétés dites industrielles où l'obésité est un problème majeur de santé publique caractérisé par une augmentation de l'apport énergétique par rapport à la dépense, la thermogénèse induite par l'alimentation (DIT pour Diet-induced thermogenesis) se caractérise par une énergie dissipée sous forme de chaleur après un repas riche en graisses (Liao et al., 2016). Historiquement, elle a été mise en évidence par Rothwell and Stock en 1981, montrant que des rats nourris avec un régime gras pendant deux semaines présentaient une augmentation de la dépense énergétique associée à une augmentation de l'activité de leur TABr et de leur température corporelle de manière insulino-dépendante (Rothwell and Stock, 1981). En effet, l'insuline semble être un acteur majeur de la DIT postprandiale et stimulerait l'entrée de glucose et d'acides gras non-estérifiés libérés par les LPL (M et al., 2018).

De plus, le TABr est considéré comme un acteur majeur de la DIT puisque des souris invalidées pour UCP1 sous régime standard hébergées à thermo neutralité souffrent d'obésité en l'absence d'une capacité thermogénique (Feldmann et al., 2009). A ce titre, la DIT est considérée comme une « défense » physiologique contre l'obésité induite par un régime riche en graisses (Bachman et al., 2002; Liao et al., 2016). Les mécanismes

moléculaires impliqués dans la thermogénèse induite par une alimentation riche ne sont pas clairement élucidés. Certaines études prônent le rôle de l'insuline cependant le SNS et la voie β -adrénergique semblent également contribuer à l'activation du TABr (M et al., 2018; Rothwell and Stock, 1981). Dans le cas de la DIT, ce ne sont pas les thermorécepteurs qui envoient un signal à l'hypothalamus. Un des mécanismes mis en avant serait la production d'acides gras à chaîne courtes par les bactéries du genre Firmicutes du microbiote enrichies dans l'intestin lors d'un régime obésogène. Leur production engendre une acidification du pH détectée par les canaux cationiques TRPV1 (transient receptor potential Vanilloïde 1) bien exprimés dans l'intestin qui envoient un message afférent à l'hypothalamus, aboutissant à l'activation du TABr par la voie β -adrénergique (Liao et al., 2016). Les voies de signalisation précédemment décrites induites à partir de la stimulation adrénérge sont donc les mêmes pour aboutir à une activation du TABr mais leur origine diffère. Il est donc primordial de comprendre quels sont les mécanismes adaptatifs mis en place lorsque l'organisme fait face à un excès de substrats énergétiques.

3.2.4 Activation du BAT par d'autres voies (endogènes et exogènes)

Jusqu'à présent, nous nous sommes principalement focalisés sur l'activation de la thermogénèse suite à une exposition au froid ou à un excès de fuels mais il peut être activé par d'autres stimuli physiologiques comme l'exercice, via la sécrétion de différents facteurs comme l'irisine, le lactate, l'IL-6 ou la METRL (Meteorin-Like protein) secrétés par le muscle squelettique (Harms and Seale, 2013; Liao et al., 2016; Pradhan et al., 2017). Plus récemment mis en évidence, il semble que le rythme circadien participe également à l'activation du TABr en jouant notamment sur l'adipogenèse brune (Froy and Garaulet, 2018). En effet, la protéine d'horloge BMAL-1 inhibe la capacité thermogénique en contrôlant la transcription de protéines impliquées dans la différenciation des adipocytes bruns, comme les BMP, suggérant l'importance des oscillations circadiennes sur le métabolisme du TABr (Nam et al., 2015).

Ces dernières années, différents facteurs endocrines régulant l'activité du TABr via des mécanismes systémiques, autocrines ou paracrines ont été mis en évidence (Harms and Seale, 2013) (**Figure 20**) : le peptide Natriurétique (NP) et le VEGF (Vasculaire Endothelial Growth Factor) respectivement secrétés par les tissus cardiaques et les vaisseaux sanguins, les prostaglandines secrétées par le TAB, le facteur de croissance fibroblastique FGF 21 secrété par le foie et le TABr, la Thyroxine (T4) peu active et secrétée par la thyroïde et converti en Triiodothyronine (T3) active dans le TABr grâce à l'expression spécifique de l'enzyme DIO2 (Deiodinase 2), ou encore l'orexine et la BMP8b

produites au niveau central ou au niveau du TABr et favorisant la fonction thermogénique (Pradhan et al., 2017). Une autre protéine de la famille des BMP, BMP7, est secrétée par les pré-adipocytes bruns et agit de manière autocrine sur l'adipocyte thermogénique en favorisant l'adipogenèse brune (Tseng et al., 2008).

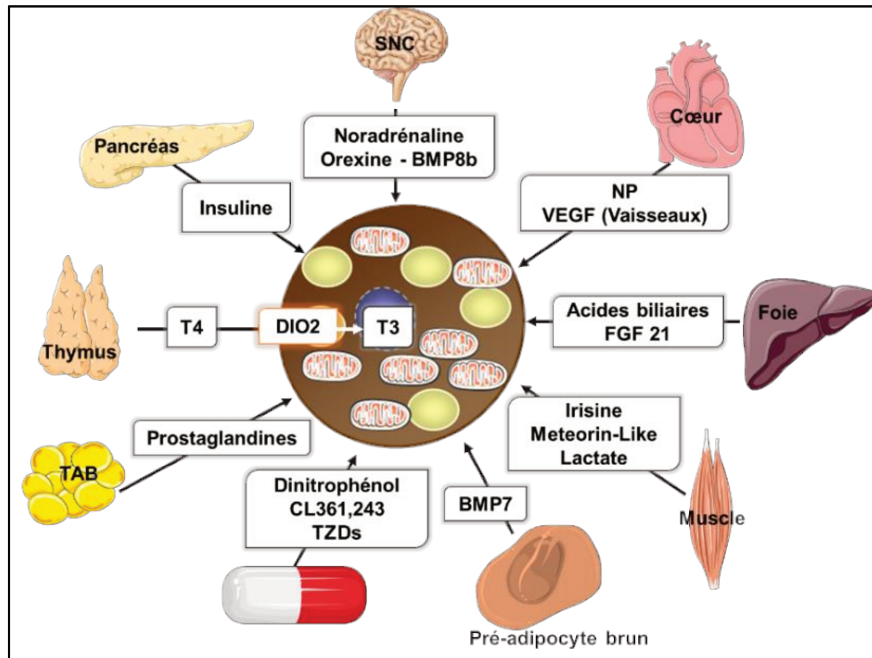


Figure 20: Induction de l'activité du TABr par différents acteurs endogènes/exogènes (Adapté de Pradhan et al., 2017)

Dans les cellules adipocytaires brunes, la T3 se lie aux récepteurs des hormones thyroïdiennes pour les activer et exerce une boucle de rétrocontrôle positif sur DIO2. De plus, il a été démontré que le récepteur à la T3 est aussi un régulateur de l'expression d'UCP1 (Martinez de Mena et al., 2010). Plus récemment mise en évidence, une communication semble également exister entre le foie et le TABr via les acides biliaires et intervient spécifiquement lors de la thermogénèse induite par l'alimentation (Hankir and Klingenspor, 2018). Plus précisément, les lipoprotéines riches en cholestérol qui ne sont pas prises en charge par la LPL au niveau du TABr sont redirigées vers le foie où le cholestérol est transformé en acides biliaires (AB) dans les hépatocytes par un membre de la famille des Cytochrome P450 (CYP7B1) (Hankir and Klingenspor, 2018). Le potentiel clinique des AB dans l'activation du TABr n'a cessé de croître depuis l'étude pionnière qui a montré que l'administration de ces derniers à des sujets humains améliore la dépense énergétique de l'organisme et est associée à une augmentation de l'activité du TABr (Broeders et al., 2015). Il semblerait que les effets des AB sur le TABr soient médiés par le récepteur TGR5 (Takeda-G-Protein Receptor) à la surface des adipocytes bruns (Broeders et al., 2015).

Enfin, l'augmentation de la prévalence mondiale de l'obésité et l'implication directe du TABr dans la thermogénèse et la dépense énergétique a conduit au développement de thérapies qui emploient des agents pharmacologiques pour activer le TABr lorsque les stratégies basiques de restriction alimentaire et d'exercice ne sont pas suffisantes pour promouvoir l'activité de ce dernier (Pradhan et al., 2017). Ces thérapies incluent des agents chimiques découplant comme le dinitrophénol, qui après un usage intensif a été abandonné dû aux complications engendrées. D'autres molécules comme des agonistes de PPAR γ , les Thiazolidinediones (TZDs), ou des agonistes spécifiques des récepteurs β -3 adrénergiques (CL316,243 ou Mirabegron) ont été reconnues pour activer le TABr. Le Mirabegron est aujourd'hui un candidat de poids car il ne présente pas d'effets secondaires cardiovasculaires suite à un traitement chronique (Cypess et al., 2015; Pradhan et al., 2017).

3.2.5 La sécrétion de « Batokines »

Comme cité précédemment, le TAB est un organe sécrétant des adipokines qui jouent un rôle primordial dans l'homéostasie métabolique. Etant donné que ces adipokines sécrétées par le TAB ne sont que très faiblement relarguées par le TABr (Cannon and Nedergaard, 2004), la communauté scientifique a d'abord pensé que le potentiel sécrétoire du TABr était limité. Cependant, il a été mis en évidence que le TABr a son propre panel d'expression d'adipokines appelées « batokines » (**Figure 21**). La plupart de ces facteurs favorisent l'hypertrophie et l'hyperplasie du TABr, la vascularisation et l'innervation, qui sont des processus associés au recrutement du TABr lorsque l'activité thermogénique est renforcée (Villarroya et al., 2017).

En effet, lors de l'activation du TABr, une hyperplasie des adipocytes bruns est associée à une augmentation de l'innervation et de la vascularisation de ceux-ci (Bartness et al., 2010). Cette augmentation de la vascularisation est notamment possible grâce à la sécrétion importante du facteur de croissance vasculaire, le VEGF-A, qui cible les cellules endothéliales pour induire la vascularisation accrue du TABr (Villarroya et al., 2017). En effet, la surexpression spécifique du VEGF-A dans le TABr de souris conduit à une augmentation de la thermogénèse induite par le froid (Sun et al., 2014), associée à une augmentation de la vascularisation et de l'expression de PGC1 α et UCP1 dans le TABr. Dans un contexte de thermogénèse induite par un régime obésogène, le VEGF-A améliore les effets néfastes induits par ce régime notamment le métabolisme du glucose et des lipides (Sun et al., 2014). Dans ce même contexte, les adipocytes bruns sécrètent la

NRG4 (Neuregulin 4) pour communiquer avec le foie et via la liaison avec ErbB3/4 (epidermal growth Factor Receptor), inhiber des enzymes lipogéniques comme FAS (Wang et al., 2014a), suggérant le rôle de NRG4 dans l'inhibition de l'accumulation de lipides intracellulaires dans les hépatocytes contribuant au développement de l'insulino-résistance (Hankir and Klingenspor, 2018).

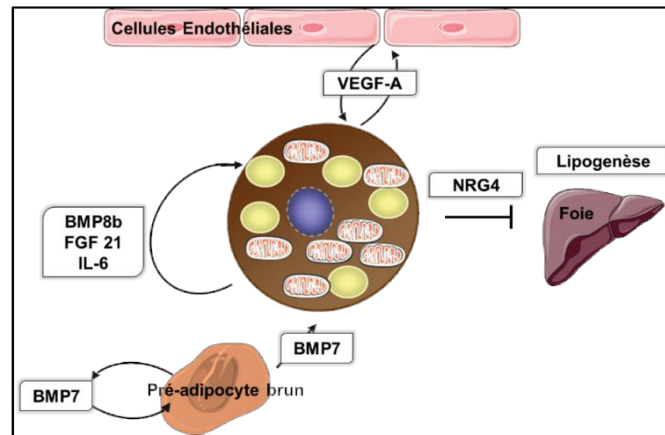


Figure 21 : Sécrétion de Batokines et effets autocrines/paracrines
(Adapté de Villarroya et al., 2017)

Un autre exemple de la communication entre le foie et le TABr est le FGF 21 pour « Fibroblast Growth Factor » qui peut être sécrété par ces deux tissus. Bien que le foie soit la source majeure de FGF 21, l'activation des adipocytes bruns conduit à la sécrétion de ce dernier en grande quantité. Par exemple, une exposition au froid induit l'augmentation des taux plasmatiques de FGF 21 dû à une libération conséquente de ce dernier par le TABr et associé à une diminution de l'expression de fgf21 dans le foie (Hondares et al., 2011), suggérant que la balance de sécrétion entre le foie et le TABr peut être réversible en fonction des stimuli environnementaux. Par ailleurs, le FGF 21 peut avoir un rôle autocrine étant donnée son rôle primordial dans l'activation de la thermogenèse et l'oxydation des substrats énergétiques (Fisher et al., 2012; Hondares et al., 2010).

Par ailleurs, l'activation du TABr est aussi associée à la sécrétion d'IL-6 (Interleukine 6), ce qui peut paraître surprenant étant donné le rôle bien établi pro-inflammatoire de cette cytokine dans un contexte d'obésité. Depuis 2016, l'IL-6 n'est plus considérée comme une cytokine pro-inflammatoire en tant que telle car une étude a montré qu'elle était sécrétée par le muscle squelettique en réponse à l'exercice et qu'elle jouait un rôle dans l'amélioration de la sensibilité à l'insuline (Ikeda et al., 2016). Pour le TABr, il semblerait que l'IL-6 joue un rôle de médiateur pour promouvoir une complète efficacité du métabolisme glucidique lors d'une transplantation de TABr (Stanford et al., 2013).

Une autre famille de protéines impliquées dans l'activation du TABr sont les BMPs, notamment la BMP7 et la BMP8b qui possèdent toutes deux un rôle autocrine (Villarroya et al., 2017). Ces deux protéines signalent via l'activation de leur récepteur BMPRII et des facteurs de transcription SMAD en aval (Modica and Wolfrum, 2013). La BMP7 est produite par les cellules de la fraction stroma-vasculaire et agit de manière autocrine et/ou paracrine sur les progéniteurs adipocytaires pour induire l'expression de PRDM16 et de PGC1 α , deux facteurs requis pour la différenciation adipocytaire brune (Tseng et al., 2008). En effet, la surexpression de cette protéine chez des souris adultes est associée à une augmentation de la dépense énergétique et de la perte de poids dû à une augmentation du recrutement des progéniteurs adipocytaires bruns au niveau du TABr (Tseng et al., 2008). La BMP8b, quant à elle est produite plus largement par les adipocytes bruns matures et son expression est induite en réponse au froid ou à un régime riche en graisses (Whittle et al., 2012). De manière autocrine, la BMP8b augmente la réponse du TABr à l'activation adrénergique via SMAD1/5/8. Elle peut également signaler à l'hypothalamus pour induire une augmentation de la thermogenèse du TABr via le SNS (Whittle et al., 2012).

Chez les humains, les études portant sur le sécrétome du TABr sont très rares. Cependant, certaines études ont corroboré la sécrétion du FGF 21 par le TABr humain lors d'une exposition au froid et ces dernières indiquent que les taux plasmatiques de FGF 21 reflètent l'activité du TABr chez les hommes (Hanssen et al., 2015a). Néanmoins, d'autres études sont nécessaires pour permettre d'affirmer avec plus de conviction que le TABr humain peut également être une source de FGF 21 systémique, à l'instar du foie.

L'identification des molécules sécrétées par le TABr a permis non seulement, d'apporter de nouvelles informations sur la physiologie et le métabolisme du tissu mais cette découverte a également permis de d'identifier de nouvelles cibles pouvant être utilisées comme stratégie thérapeutique pour le traitement de l'obésité et du DT2.

3.2.6 Le browning

Les études réalisées par la communauté scientifique s'accordent jusqu'à présent pour dire que le TA est un organe malléable (Bartelt and Heeren, 2014). Cette plasticité phénotypique tissulaire importante semble être un facteur d'adaptation aux conditions physiologiques et/ou pathologiques. En effet, comme c'est le cas pour le TABr, des changements de l'environnement tels qu'une exposition au froid ou l'ingestion d'un régime riche en graisses induisent un remodelage profond des fonctionnalités de ce tissu de

manière à dissiper l'énergie sous forme de chaleur. Cependant, le TABr, n'est pas le seul tissu à pouvoir adapter sa réponse aux stimuli environnementaux. Malgré la découverte d'adipocytes multiloculaires riche en mitochondrie exprimant UCP1 au sein de dépôts blancs au début des années 1990 (Cousin et al., 1992), ce n'est que 20 ans plus tard que la communauté scientifique prend la mesure de l'importance de cette découverte, notamment grâce à l'identification de dépôts de TABr actifs chez les humains et du potentiel thérapeutique que représentent les adipocytes bruns (Cypess et al., 2009; van Marken Lichtenbelt et al., 2009; Virtanen et al., 2009).

Ces nouveaux adipocytes possèdent plusieurs dénominations telles que les adipocytes brites pour « brown-in-white », adipocytes beiges ou encore adipocytes inductibles. Ils sont caractérisés par une morphologie similaire à un adipocyte blanc mais peuvent se différencier en une cellule exprimant UCP1 avec les caractéristiques d'un adipocyte brun (Bartelt and Heeren, 2014). Ces adipocytes brites apparaissant sous forme d'îlots au niveau du TAB, notamment sous cutané (TABsc). L'origine des adipocytes brites diffère de celles des adipocytes bruns « classiques » du TABr exprimant le facteur de transcription Myf5 et sont issus de précurseurs Myf5 - qui peuvent se différencier en adipocyte blanc ou brun (Seale et al., 2008). Certaines études démontrent que les adipocytes brites localisés dans le TABsc pourraient provenir de cellules endothéliales (Tran et al., 2012), suggérant une génération de novo de ces cellules, alors que d'autres montrent une trans-différenciation de précurseurs blancs (Rosenwald et al., 2013) (**Figure 22**). Bien que des débats subsistent encore quant à l'origine réelle des adipocytes brites, les deux mécanismes mis en évidence pourraient coexister, d'autant plus que ce sont deux processus indépendants.

Historiquement, les adipocytes brites et leurs marqueurs spécifiques (TBX1, TMEM26, HOXC8/9, CITED1, Cox8b, Cd137) ont été caractérisés suite à une stimulation d'adipocytes blancs primaires par un agoniste des récepteurs PPAR γ , la rosiglitazone (Petrovic et al., 2010), suggérant l'implication de la voie β -adrénergique. Cette hypothèse a été validée grâce notamment à deux études in vivo où une forte induction de l'expression d'UCP1 est observée dans le TABsc de souris exposées au froid (Walden et al., 2012; Ye et al., 2013). De manière surprenante, la dernière étude suggère un recrutement des adipocytes bruns du TABsc (« browning ») de souris exposées au froid mais invalidées pour les trois isoformes des récepteurs β -adrénergiques, suggérant que la thermogenèse induite par les adipocytes brites peut également résulter d'un nouveau mécanisme, qui n'est pas à l'heure actuelle pas clairement défini (Bartelt and Heeren, 2014; Ye et al., 2013).

Concernant la différenciation adipocytaire brite, elle partage de nombreux facteurs de transcription avec l'adipogenèse brune comme notamment PRDM16 et PGC1 α (Bartelt and Heeren, 2014), qui aboutit à l'expression spécifique d'UCP1 dans les adipocytes brites (**Figure 22**). Cependant, il semblerait que certains facteurs soient plus spécifiques de l'adipogenèse brune au sein du TAB. Par exemple, la protéine SHOX2 (Short Sature Homebox Protein 2) est très fortement exprimée dans le TABsc de souris et réprime C/EBP α . Son invalidation spécifique dans les adipocytes induit une augmentation du britening associée à une augmentation des récepteurs β -3 adrénergiques à la surface des cellules conduisant à une augmentation de la lipolyse dans ce même tissu (Bartelt and Heeren, 2014; Lee et al., 2013b). De la même manière, le gène Hoxc8 exprimé par le TAB est réprimé durant l'adipogenèse brune (Mori et al., 2012a). Plus précisément, Hoxc8 agit de concert avec l'histone déacétylase (HDAC3) pour réprimer C/EBP β , facteur de transcription majeur de l'adipogenèse, et une stimulation β -adrénergique induit l'inhibition d'Hoxc8 et favorise le développement d'adipocytes brites fonctionnels.

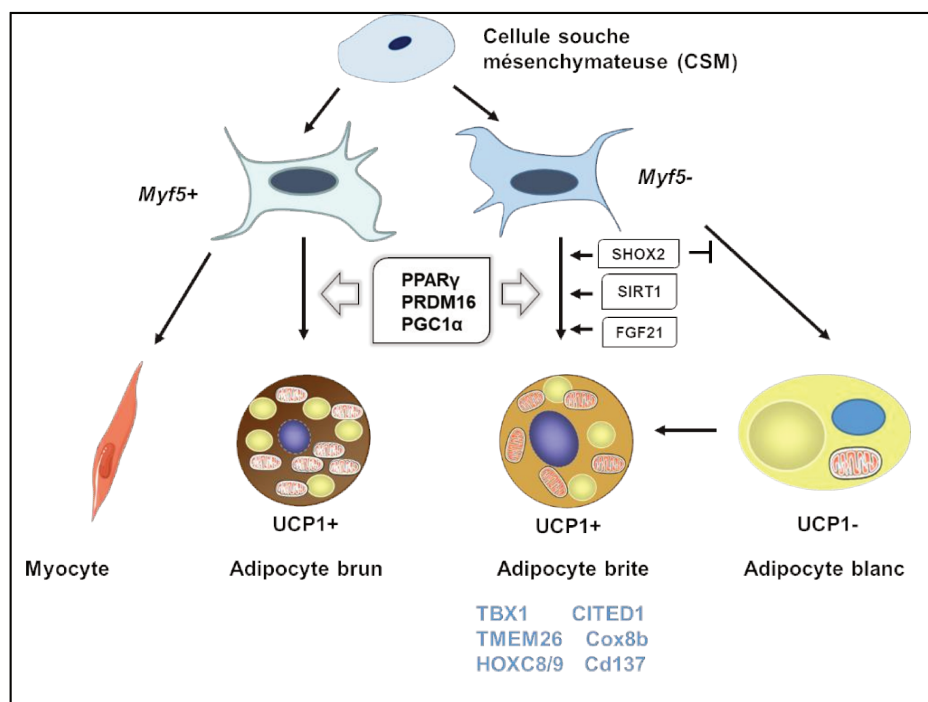


Figure 22 : Facteurs influençant la différenciation brite (Adapté de Bartelt, A. and Heeren, J. 2014)

Une autre protéine impliquée dans le britening est la protéine SIRT1 (Sirtuine 1 ou Déacétylase Sirtuine 1 dépendante du NAD) appartenant à la famille des Sirtuine connues pour réguler de nombreuses voies de signalisation comme la transcription, l'inflammation, l'apoptose ou le vieillissement. La protéine SIRT1 induit la déacétylation de PPAR γ permettant sa liaison à PRDM16 et l'expression consécutive de protéines thermogéniques comme UCP1 ou CIDEA (Qiang et al., 2012) (**Figure 22**). Bien que le sujet soit source de

nombreux débats, des études ont également suggéré un rôle de SIRT-1 sur PGC1 α via une voie dépendante de l'AMP Kinase, de manière corrélative à ce qui avait été observé dans le foie et le muscle squelettique (Gaidhu et al., 2011; Rodgers et al., 2005; Vila-Bedmar et al., 2010), deux tissus impliqués dans le métabolisme énergétique. Par ailleurs, une récente étude de 2018 a proposé que SIRT1, via l'inhibition des facteurs de transcription p53 et p21 favoriserait la différenciation en adipocyte brite dans un contexte de vieillissement cellulaire (Khanh et al., 2018).

L'exposition au froid est l'inducteur le mieux décrit des adipocytes brites via le relargage de noradrénaline par le SNS. De plus, une étude a montré que les macrophages M2 anti-inflammatoires résidents du TAB pourraient être une autre source de catécholamines en réponse au froid (Nguyen et al., 2011), mais cette idée a depuis été réfutée en 2017 par une étude affirmant que ces macrophages n'étaient pas capables de produire des catécholamines et donc de contribuer à la thermogénèse induite par le briting du TABsc (Fischer et al., 2017b). Cependant, en réponse à une stimulation β -adrénergique, les adipocytes du TABsc produisent une multitude de facteurs comme notamment le FGF 21, qui en agissant sur PGC1 α est capable de promouvoir le recrutement des adipocytes brites (Fisher et al., 2012). D'autre part, il semble que d'autres conditions physiologiques, telles que l'exercice physique, puissent induire un phénomène de briting via la sécrétion d'une hormone, l'irisine et l'expression de PGC1 α dans les fibres musculaires lui-même capable d'induire la biogénèse mitochondriale et le switch de types de fibres musculaires (Bartelt and Heeren, 2014; Handschin and Spiegelman, 2008).

Le potentiel thermogénique des adipocytes brites présente donc un intérêt majeur d'un point de vue thérapeutique, en particulier considérant la masse volumique que représente le TABsc.

3.3 Redécouverte chez l'homme et cible thérapeutique émergente

Le TABr a d'abord été identifié chez les rongeurs puis chez les humains et chez les nouveau-nés, où l'activation de sa capacité thermogénique permet le maintien de la température corporelle une fois le fœtus en dehors de l'utérus. La communauté scientifique a longtemps pensé que ce tissu se désactivait et/ou involuait rapidement après la naissance (Gilsanz et al., 2013). Cependant, un trio d'articles publiés dans New England Journal of Medicine en 2009 a indéniablement démontré la présence d'un TABr fonctionnel à l'âge adulte dans les régions principalement supra claviculaires chez l'homme (Cypess et al., 2009; van Marken Lichtenbelt et al., 2009; Virtanen et al., 2009). Cette découverte a été possible grâce l'utilisation de la technique d'imagerie par émission

de positrons associée à de la tomographie ou PET-CT Scan (Positron-Emission Tomography and Computed Tomography), historiquement utilisée pour la détection de cancers métaboliquement actifs et permettant la mesure de l'absorption dans les tissus de glucose radiomarqué (2-deoxy-2-[fluorine-18]fluoroD-glucose ou ¹⁸FDG) (Betz and Enerback, 2015). Depuis, le nombre de publications concernant le TABr et le métabolisme énergétique a augmenté de manière exponentielle et pour cause, celui-ci est considéré aujourd'hui comme une cible thérapeutique potentielle du fait de son rôle important dans l'homéostasie grâce à sa capacité à dissiper l'énergie apportée par les substrats lipidiques et glucidiques sous forme de chaleur (Symonds et al., 2018).

3.3.1 L'intérêt thérapeutique du tissu adipeux brun

Les études précédemment citées menées sur des sujets humains ont notamment montré que suite à une exposition au froid durant 2 heures, un TABr actif était détectable chez 96% des individus et cette activité est associée à une augmentation de l'absorption du glucose et de la sensibilité à l'insuline (Cypess et al., 2009; van Marken Lichtenbelt et al., 2009; Virtanen et al., 2009). Par ailleurs, ces études ont démontré que l'activité du TABr détecté était inversement corrélée à l'indice de masse corporelle (IMC) et au pourcentage total de masse grasse dans l'organisme. En effet, ce TABr est plus détectable et plus actif (activité 4 fois plus élevée) chez les individus de poids normal (IMC à 18.5-25) comparé aux individus en surpoids (IMC à 25-30) ou obèses (IMC>30) (van Marken Lichtenbelt et al., 2009). De plus, des études plus récentes ont montré une augmentation de 43% de la sensibilité à l'insuline chez des patients en surpoids et diabétiques de type 2 soumis à une acclimatation au froid pendant 10 jours (Hanssen et al., 2015b). De la même manière, une exposition au froid de 6h par jour pendant 10 jours a permis l'identification d'un TABr actif chez des patients obèses (Hanssen et al., 2016). L'ensemble de ces études suggère qu'une augmentation de l'activité des adipocytes bruns pourrait contribuer à un phénotype métaboliquement sain chez l'homme. Elles révèlent également que la transplantation du TABr pourrait constituer une approche thérapeutique pour augmenter la dépense énergétique. Bien que cette approche soit difficile à mettre en place chez l'homme, une étude réalisée en 2013 a permis de montrer que la transplantation de TABr d'une souris mâle dans la cavité viscérale d'une autre souris (ajusté pour l'âge et le sexe) améliore non seulement la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline de cette dernière ainsi que l'insulino-résistance induite par un régime riche en graisse (Stanford et al., 2013). Bien que les mécanismes moléculaires ne soient pas clairement définis, les auteurs

suggèrent une augmentation de l'absorption de glucose dans le TABr et le TAB (Stanford et al., 2013).

Au cours des dernières années, l'activation du TABr a suscité de nombreuses recherches concernant un rôle potentiel dans la régulation de certains paramètres métaboliques impliqués dans les maladies cardiovasculaires, notamment le métabolisme du glucose (Marlatt and Ravussin, 2017). Bien que les effets cardioprotecteurs du TABr chez l'homme restent à déterminer, une étude récente a montré que les substrats principalement utilisés par le TABr actif sont les AGs (Blondin et al., 2015; M et al., 2018; Marlatt and Ravussin, 2017). Le glucose, deuxième substrat de prédilection du TABr, peut quant à lui être oxydé par ce dernier à hauteur de 36g par jour selon une récente étude (Gerngross et al., 2017; Symonds et al., 2018).

Bien que l'intérêt thérapeutique du TABr soit sans équivoque, les scientifiques s'interrogent sur la capacité de ce tissu à engendrer une perte de poids effective dans des contextes d'obésité et de DT2 chez l'homme (Marlatt and Ravussin, 2017).

3.3.2 La controverse du tissu adipeux brun

Bien que, dans un premier temps, les dépôts de TABr actifs identifiés chez les humains dans les régions supra claviculaires aient été apparentés au TABr interscapulaire des rongeurs, certaines études ont mis en évidence que ces dépôts humains contenaient principalement des adipocytes bruns associés à leur signature génique spécifique plutôt que des adipocytes bruns à proprement parler (Sharp et al., 2012; Wu et al., 2012), faisant du TABr humain un tissu inductible. Cependant, ces adipocytes bruns exprimant faiblement UCP1 à l'état basal sont tout à fait capables d'augmenter de manière considérable l'expression de la protéine thermogénique lors d'une exposition au froid (Wu et al., 2012). De plus, les adipocytes beiges constituent une large cible thérapeutique pour la prévention des troubles métaboliques comme l'obésité ou le DT2 car ils apparaissent sous forme de clusters dans des TABs spécifiques comme notamment le TABsc, dont la masse est supérieure au TABr (Symonds et al., 2018).

Dans un deuxième temps, les études réalisées sur le TABr de souris ont également été sujet à controverses suite à l'utilisation de conditions expérimentales drastiques. Par exemple, les expositions au froid sont souvent réalisées dans des conditions extrêmes et ne comprennent pas de déclin graduel de la température, comme cela aurait été le cas dans notre environnement, ce qui peut être discutable (Symonds et al., 2018). Très peu

d'études réalisées chez la souris dont la thermo neutralité est de 30°C respectent ces conditions d'hébergement, or la température est un facteur essentiel de l'activation du TABr.

Enfin, concernant les études réalisées chez l'homme, la technique de PET/CT Scan est néanmoins critiquée car elle nécessite une exposition à des radiations chez des sujets sains. C'est pourquoi la communauté scientifique s'emploie à développer de nouveaux outils équivalents pour la mesure de l'activité du TABr (Cypess et al., 2014). Récemment, l'imagerie thermique par infrarouge a été développée et les résultats obtenus sont en adéquation avec ceux observés par la technique de PET Scan (Law et al., 2018). Pour exemple, l'imagerie thermique est capable de détecter une augmentation de l'activité du TABr humain suite à une administration de glucocorticoïdes (Scotney et al., 2017).

3.3.3 Les essais cliniques en cours

Bien que le TABr ait été controversé, son potentiel thermogénique est aujourd'hui exploité dans 3 essais cliniques dont le cheval de bataille est l'obésité (NCT03327168, NCT03096535, NCT03359824). Parmi ceux-ci, une étude cherche à déterminer si l'administration d'un complément alimentaire composé de capsinoides peut activer le TABr d'individus obèses. En effet, une étude de 2016 réalisée chez les rongeurs a montré que l'administration de capsinoides est associée à une augmentation de la thermogénèse via l'activation des récepteurs TRPV1 (Baskaran et al., 2016).

3.4 Différents modèles cellulaires

Le TABr étant devenu un organe cible clé pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques, plusieurs modèles cellulaires primaires ou immortalisés ont été développés à partir de ce dernier afin d'étudier in vitro son métabolisme. Comme cité précédemment, le modèle d'étude dans mon laboratoire est le rat. La préparation d'adipocytes bruns matures dérivés de la fraction stroma vasculaire de TABr de rat a constitué durant cette thèse mon principal modèle d'étude. Cependant, il existe bien d'autres modèles disponibles pour étudier le métabolisme des adipocytes bruns, notamment des lignées cellulaires.

3.4.1 La culture primaire : adipocytes bruns dérivés de la fraction stroma vasculaire

La culture primaire d'adipocytes consiste à extraire la fraction stroma vasculaire (SVF) des adipocytes du tissu fraîchement prélevé pour laisser proliférer les cellules souches avant d'induire leur différenciation en adipocytes matures. Pour ce faire, le TABr interscapulaire, caractérisé par une forme de « papillon » (**Figure 23 A**), est prélevé chez l'animal anesthésié et séparé des tissus adipeux blancs et musculaires qui y sont attachés. Le tissu est ensuite émincé dans un tampon adéquat et digéré par de la collagénase spécifiquement développée pour la digestion des tissus adipeux. La préparation est ensuite filtrée et centrifugée, ceci dans le but de séparer les adipocytes matures de la fraction stroma-vasculaire. Cette fraction stromale contient des précurseurs adipocytaires ainsi que plusieurs autres types cellulaires tels que les cellules endothéliales, les cellules sanguines et les macrophages (Lee et al., 2014). Un traitement lysant les érythrocytes permet d'obtenir une préparation de précurseurs mis en culture (**Figure 23 B**).

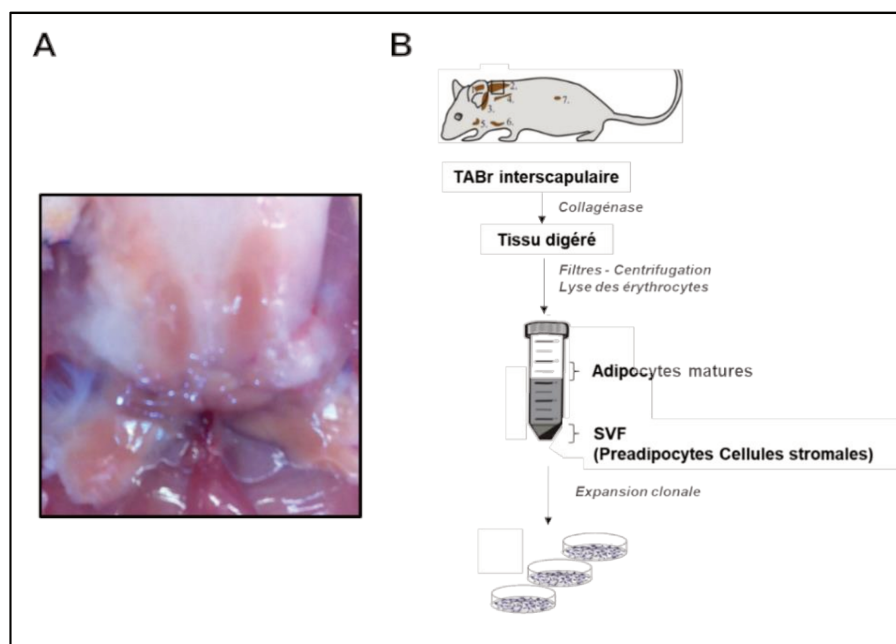


Figure 23 : TABr interscapulaire chez le rat et protocole de préparation de la fraction stroma-vasculaire (A : Photo du TABr interscapulaire, B : Protocole de préparation des SVF) (Source : Dumortier et al., 2017)

Après une phase d'expansion clonale, les cellules sont différenciées en deux étapes deux jours après l'établissement de la confluence (**Figure 24 A**). Tout d'abord, la phase d'engagement des cellules s'étale sur les trois premiers jours (Jour 0 à Jour 2) de la différenciation où un cocktail de cinq hormones est ajouté au milieu (**Figure 24 A**) (Hanssen et al., 2016). Les principaux agents requis pour induire la différenciation adipocytaire *in vitro* sont l'insuline, la dexaméthasone (Dex) et l'isobutylmethylxantine

(IBMX). L'insuline sera importante tout au long des étapes de la différenciation adipocytaire autant pour induire l'expression de marqueurs précoces que tardifs. L'insuline stimule notamment la translocation des transporteurs de glucose GLUT-4 à la membrane et permet l'activation de PPAR γ via la voie de signalisation IGF1/PI3K/AKT/mTOR. La Dex est un glucocorticoïde de synthèse qui se fixe à ses récepteurs GR (Glucocorticoïd Receptor), alors que l'IBMX induit une augmentation des niveaux d'AMPc et active la PKA mais tout deux induisent la transcription de PPAR γ nécessaire à l'amorçage de la différenciation des cellules. Il s'en suit une régulation transcriptionnelle complexe de la différenciation adipocytaire qui s'organise selon une cinétique d'activation de différentes protéines dont des facteurs de transcription décrits précédemment. Enfin deux autres hormones qui confèrent à l'adipogenèse brune sa spécificité sont ajoutées : la Triiodothyronine (T3) qui induit entre autres des enzymes lipogéniques et la rosiglitazone, agoniste de PPAR γ qui favorise la différenciation en adipocyte bruns notamment via la stabilisation du facteur de transcription PRMD16 (Ohno et al., 2012). Après ces trois jours d'engagement, les cellules sont maintenues dans un milieu de différenciation spécifique de l'adipogenèse brune contenant de l'insuline, de la rosiglitazone et de la T3. Ils acquièrent un phénotype d'adipocytes via l'accumulation de gouttelettes lipidiques dans les cellules et la spécificité brune est acquise via l'augmentation de l'expression du marqueur spécifique des adipocytes bruns, UCP1, fortement exprimé à partir du 5^{ème} jour de la différenciation (**Figure 24 B**).

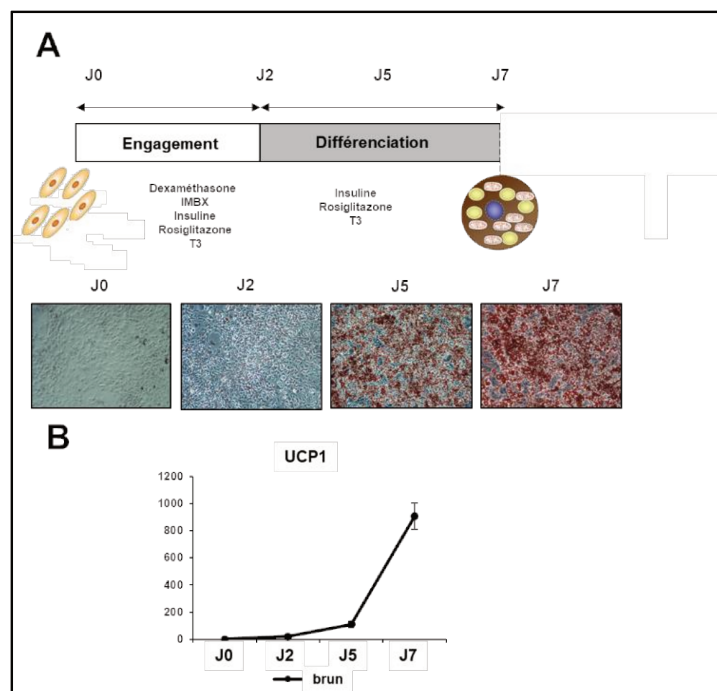


Figure 24: Différenciation d'adipocytes bruns matures dérivés de la fraction stroma vasculaire de TABr de rat (A : Photos représentatives après coloration ORO, B : Induction de l'expression d'UCP1 (axe Y) au cours de la différenciation (axe X))

A partir du 7^{ème} jour de la différenciation, les adipocytes bruns sont considérés comme « matures », c'est-à-dire qu'ils expriment tous les marqueurs des adipocytes bruns fonctionnels précédemment décrits. C'est à partir d'adipocytes bruns matures que j'ai étudié le métabolisme du TABr au cours de mes travaux de thèse.

3.4.2 Les autres modèles cellulaires d'adipocytes bruns

La plupart des études utilisant des modèles *in vivo* pour étudier le métabolisme du TABr (invalidation d'une protéine par différentes techniques ou encore administration de composés pharmacologiques) mettent souvent à profit ces mêmes modèles pour leurs études *in vitro*, notamment via la préparation d'adipocytes matures ou de cellules de la fraction stroma vasculaire. Cependant, les observations faites à partir de modèles *in vivo* sont la plupart du temps corroborées dans des modèles cellulaires mieux décrits. Dans le cadre du TABr, les premières lignées BFC-1 et HB2 ont été générées à partir de cellules de la fraction stroma-vasculaire du TABr de souris (Klein et al., 2002), mais ces cellules ont vite été remplacées par des modèles plus puissants et mieux décrits. Plus particulièrement, certaines études font appel aux cellules souches mésenchymateuses murines C3H10T1/2 qui possèdent la capacité de se différencier en adipocytes bruns en réponse aux thiazolidinediones et à l'insuline. De plus, le besoin de transposer les résultats présentés dans les modèles murins chez l'homme a permis le développement de lignées cellulaires humaines comme par exemple la lignée PAZ6, dérivée du TABr humain (Kazantzis et al., 2012). Aujourd'hui, les cellules souches mésenchymateuses humaines capables de se différencier en adipocytes blancs ou bruns ont été caractérisées de manière approfondie et les études exploitant leur capacité sont de plus en plus nombreuses. C'est le cas des cellules hMADS (human Multipotent human multipotent adipose derived stem cells) mis en place à partir de biopsies pédiatriques de TABsc, que j'ai eu l'opportunité de découvrir pendant ma thèse grâce à notre collaboration avec l'équipe du Dr EZ Amri (Barquissau et al., 2016; Beranger et al., 2013). Ces cellules se différencient suite à une activation prolongée de PPAR γ aboutissant à des adipocytes présentant un phénotype multiloculaire et un grand nombre de mitochondries exprimant UCP1. Ce modèle cellulaire permet non seulement d'étudier la capacité des cellules à se différencier en adipocytes bruns thermogéniques, mais permet aussi l'étude de la conversion des adipocytes blancs en adipocytes bruns. L'équipe du Dr EZ Amri a complètement caractérisé ces cellules hMADS et a démontré l'implication de différents facteurs dans le processus de conversion, plus particulièrement l'importance des miRNAs dans ce processus (Giroud et al., 2016a; Giroud et al., 2016b).

4. Les microARNs

Les miARNs sont considérés aujourd'hui comme des acteurs majeurs de la régulation transcriptionnelle et traductionnelle et sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires : prolifération, apoptose, organogenèse, ou encore différenciation. Avec la découverte des miARNs, le paradigme d'une corrélation linéaire établie entre un ARN messager (ARNm) et l'expression de la protéine correspondante a complètement évolué.

4.1 Historique

Bien que l'histoire des miARNs commence au début des années 1980 dans le laboratoire de Sydney Brenner avec Robert Horvitz (Horvitz and Sulston, 1980), c'est véritablement en 1993 que deux études indépendantes publiées dans *Cell* par Victor Ambros et Gary Ruvkun, démontrent que le gène *lin-4* identifié chez *C.elegans* ne code pas pour une protéine (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993). En effet, ce gène impliqué dans le développement larvaire est à l'origine de deux transcrits non codants de petite taille (22 et 61 nucléotides) dont la séquence du premier est incluse dans le deuxième (Lee et al., 1993). Ces petits transcrits non codants issus de *lin-4* ont une séquence complémentaire anti sens à de multiples sites de la région 3'UTR (untranslated region) du gène *lin-14* (Wightman et al., 1993). Ceci a suggéré un nouveau mécanisme de régulation par lequel la fixation de *lin-4* inhibe la traduction de *lin-14* via une interaction anti sens entre ces deux ARNs, faisant de *lin-4* un des membres fondateurs de la famille grandissante des petits ARNs nommés miARNs (Orellana and Kasinski, 2015). Cependant, ce n'est que 7 ans plus tard qu'un nouveau membre de la famille des miARNs fut découvert chez *C.elegans* : *Let-7* (*lethal-7*), codant également pour un ARN de petite taille qui contrôle la transition du stade larvaire au stade adulte de *C.elegans* en se fixant au 3'UTR de ces cibles (*lin-41* et *hbl-1*) et en inhibant leur traduction (Reinhart et al., 2000). La découverte de *Let-7* ajoute une nouvelle dimension à l'importance des miARNs car contrairement à *lin-4*, ce miARN est conservé à travers les Métazoaires et est retrouvé dans plusieurs espèces comme les mollusques, les oursins, les mouches, les souris et enfin les humains (Orellana and Kasinski, 2015). La conservation de ces miARNs à travers les espèces et la découverte d'autres miARNs chez les invertébrés et les mammifères suggère qu'ils pourraient fortement contribuer au mécanisme de régulation génique général chez les eucaryotes.

Aujourd'hui, les miARNs sont définis comme des ARNs simple brins d'environ 22 nucléotides dérivés de transcrits endogènes qui possèdent une structure dite « en épingle à cheveux ». Les miARNs se lient majoritairement à des séquences complémentaires des régions 3'UTR de leur(s) ARNm(s) « cible(s) », de manière à impacter négativement les niveaux protéiques

et certaines études suggèrent que ceux-ci pourraient réguler l'expression de plus de 30 % des protéines codées par l'organisme humain (Kreth et al., 2018). La découverte des miARNs a suscité l'engouement de la communauté scientifique se traduisant par un nombre de publications toujours plus élevé chaque année (Orellana and Kasinski, 2015). Il est important de noter que, plusieurs autres classes d'ARNs non codants ont été identifiées comme les siARN (small interference) ou les piwi-ARNs pour les petits ARNs ou encore les ARNs longs non codants mais dans cette partie, nous nous focaliserons sur les miARNs. Enfin, dans le but de répertorier les miARNs existants et les nouveaux découverts pour chaque espèce, le laboratoire Griffiths-Jones de l'université de Manchester a créé une base de données recensant les miARNs connus pour plus de 60 espèces (Griffiths-Jones et al., 2006; Su et al., 2016). A titre d'exemple, la dernière version de miRBase (n°22) contient plus de 1900 séquences de miARNs seulement pour l'espèce « Homo Sapiens ».

4.2 Nomenclature

La mise en place de base de données relatives aux miARNs (miRBase, Microna.org, Starbase, miRDB ...) fut dans certains cas postérieure à l'identification de ceux-ci, c'est pourquoi certains miARNs issus d'études pionnières sont nommés après leur caractérisation (lin-4 ou Let-7), alors que d'autres issus du clonage ou du séquençage se sont vus attribuer des noms numériques. Par exemple, l'orthologue de lin-4 dans les autres espèces se nomme miR-125 (Ha and Kim, 2014). La communauté scientifique a tout de même voulu établir une nomenclature universelle codée décrite à travers un exemple (Budak et al., 2016) : le hsa-miR-219a-2-3p (**Figure 25**).

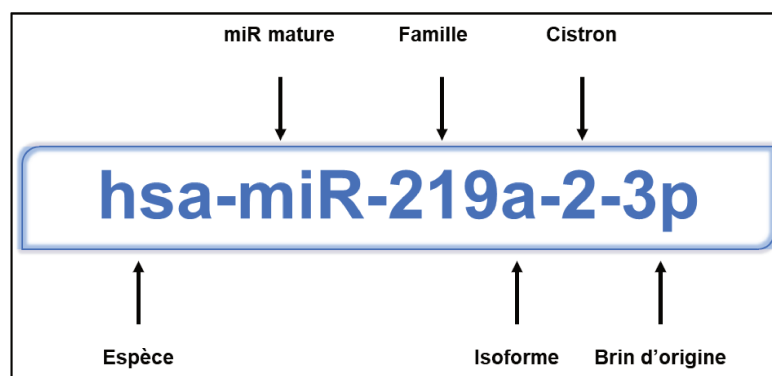


Figure 25 : Nomenclatures des miARNs (Source : miRNA naming convention-miRBase)

« hsa » : ce préfixe composé de trois lettres définit l'espèce d'appartenance du miARN, ici hsa signifie Homo Sapiens. Pour notre modèle d'étude qui est le rat, le préfixe utilisé est « rno » pour Rattus Norvegicus.

miR correspond à la forme mature du miARN. De sa forme précurseur à sa forme mature, le miARN va être mûri par différents acteurs qui seront décrits ultérieurement. Les formes précurseurs des miARNs sont notées en minuscules et en caractère italique, dans notre cas *mir-219*.

219 est le nom du miR, qu'il ait été attribué à la suite d'une caractérisation phénotypique ou à la suite d'un séquençage.

Le suffixe composé d'une lettre après le numéro 219, ici 219a, désigne des séquences de miARN matures étroitement apparentées, exprimées à partir de différents précurseurs ou locus génomiques, et représentent les membres d'une même famille, ce sont des isoformes. Dans notre cas, il existe le miR-219a mais aussi le miR-219b chez l'homme.

2 signifie que les deux miARNs matures (*miR-219a-2* et *miR-219a-1*) sont identiques en termes de séquences mais proviennent de deux cistrons différents et souvent de deux chromosomes différents.

3p désigne le sens du brin du pré-miR auquel il appartient. Un miARN peut donc être 3p ou 5p. Il est rare de trouver les deux formes en même quantité. La plupart du temps l'une est minoritaire sur l'autre.

4.3 Machinerie et action des miARNs

4.3.1 La biogenèse et maturation des miARNs

Les séquences codant pour les miARNs ont à l'origine été découvertes dans des régions non-codantes intergéniques, laissant penser qu'elles étaient des unités transcriptionnelles indépendantes. Cependant, les études menées dans plusieurs espèces ont montré que les miARNs pouvaient être dérivés de régions non seulement intergéniques mais aussi exoniques ou introniques (Kim and Nam, 2006; Kim and Kim, 2007). Dans la plupart des génomes de mammifères, les séquences des miARNs sont localisées dans les introns de gènes codants (Rodriguez et al., 2004), ils partagent alors le promoteur du gène « hôte » (Baskerville and Bartel, 2005). Par ailleurs, il est important de noter que certains miARNs s'organisent en « cluster » dans les régions intergéniques ou introniques et sont transcrites à partir d'une même unité de transcription nommée polycistron (Ratnadiwakara et al., 2018). De plus, les

gènes des miARNs possèdent souvent de multiples sites d'initiation de la transcription, et des études génomiques récentes ont montré que 35 % des miARNs introniques sont transcrits à partir de promoteurs spécifiques aux miARNs indépendamment du promoteur de leur gène hôte (Monteys et al., 2010; Oszolak et al., 2008).

Ces dernières données révèlent la complexité de la régulation des miARNs à l'échelle de la transcription et il existe aujourd'hui plusieurs zones d'ombres concernant notamment l'implication de l'organisation génomique de ces miARNs (Ratnadiwakara et al., 2018).

❖ La voie canonique (Figure 26)

Tout d'abord, la transcription des miARNs est prise en charge par l'ARN polymérase II régulée par certains facteurs de transcription (p53, MYC) ou régulateurs épigénétiques (méthylation de l'ADN ou modifications des histones) (Ha and Kim, 2014). Le produit de la transcription est appelé pri-miARN (primary miARN), il possède une structure en épingle à cheveux, sa longueur peut dépasser 1kb et il est confiné dans le noyau à cause d'une queue Poly-A. Ce pri-miR est pris en charge par un complexe protéique nucléaire appelé le « Microprocessor » incluant l'endonucléase RNase de type III, DROSHA (160 kDa) qui coupe spécifiquement les doubles brins et son cofacteur DGCR8 (90 kDa) pour DiGeorge syndrome chromosomal region 8, recruté au niveau de la région centrale de DROSHA. Typique de l'activité des RNase de type III, DROSHA clive les extrémités du double brin, aboutissant à un précurseur d'environ 70 nucléotide en forme d'épingle à cheveux (Ha and Kim, 2014; Kreth et al., 2018), nommé pré-miARN. A la suite du clivage effectué par DROSHA, le pré-miRNA est exporté dans le cytoplasme où le processus de maturation se poursuit. Cet export est possible grâce à la karyophérine Exportine 5 (EXP 5 codée par le gène XPO5) qui reconnaît une paire de 2 nucléotides à l'extrémité 3' - du pré-miARN laissée libre par le clivage de DROSHA. Cette protéine forme un complexe de transport entre le pré-miARN et une protéine nucléaire liée au GTP (RAN-GTP) (Ha and Kim, 2014). Suite à la translocation du complexe à travers le pore nucléaire, le GTP est hydrolysé, aboutissant au désassemblage du complexe et à la libération du pré-miARN dans le cytosol.

Au sein du cytoplasme, un complexe protéique formé d'une autre enzyme de la famille des RNases III, DICER (200 kDa), de TRBP (TAR-RNA binding protein) et de PACT (Protein Kinase R-activation Protein) permet le clivage de la « boucle » de l'épingle à cheveux, laissant un duplex de miARNs double brin sens et anti-sens (Gebert and MacRae, 2018). Généralement, ce duplex est pris en charge par le complexe pré-RISC (RNA-induced silencing complex, serine carboxypeptidase 1) permettant la libération du brin passager qui sera par la suite dégradé, alors que l'autre brin appelé le « brin guide »

sera dirigé vers l'ARNm cible grâce au complexe RISC mature, généralement composé de DICER, TRBP, des protéines Argonautes (AGO1-4) et de leurs co-facteurs DCP et Gw182 (Kreth et al., 2018). Le miARN est apparié au niveau de la région 3'UTR l'ARNm, ce qui aboutit à la répression de ce dernier (Kreth et al., 2018). Le brin guide est déterminé sur la base de règles thermodynamiques (Ha and Kim, 2014). Par ailleurs, les protéines AGO peuvent également intervenir dans la sélection du brin guide, en choisissant le brin dont le premier nucléotide est un U (Gebert and MacRae, 2018; Ha and Kim, 2014). Cependant, cette sélection n'est pas complètement stricte et le brin passager appelé miARN* peut également être sélectionné, bien qu'il soit décrit comme moins puissant dans le processus de silencing.

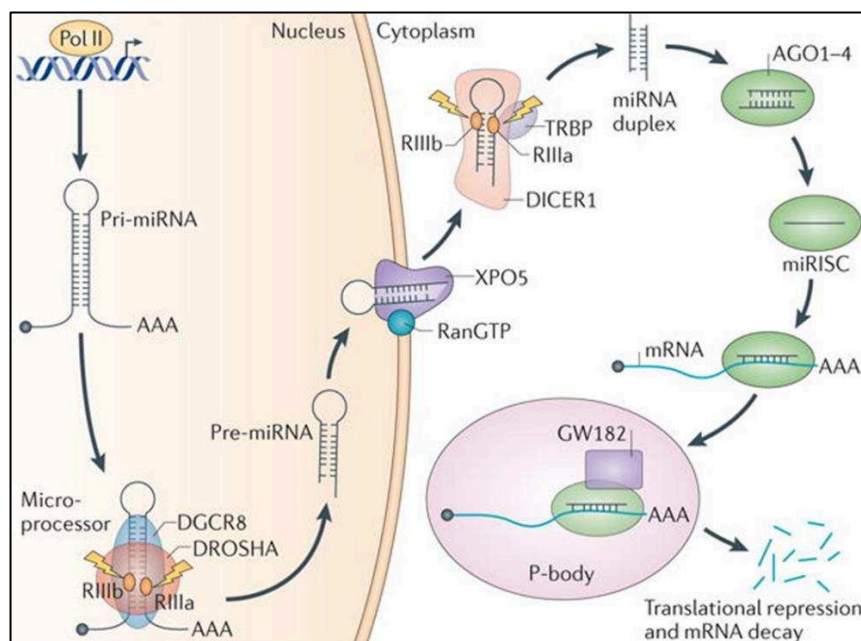


Figure 26 : Biogenèse canonique des miARNs (Source : Lin, S et al., 2015)

Bien que ce ne soit pas le cas chez les plantes, un appariement seulement imparfait du miARN au niveau de sa séquence cible est observée chez les mammifères (Kreth et al., 2018). Une complémentarité parfaite de Watson-Crick est seulement requise au niveau de la séquence dite SEED, composée de 2 à 8 nucléotides en 5' du miARN, très importante pour la reconnaissance de la région cible et sa répression consécutive (Ruegger and Grosshans, 2012). Les miARNs présentant une séquence SEED identique mais des différences de nucléotides dans le reste de la séquence constituent généralement une « famille » de miARNs, et partagent des cibles communes (Ruegger and Grosshans, 2012).

❖ **L'importance de la machinerie des miARNs et sa régulation**

Les miARNs ont un rôle primordial dans le développement, mis en évidence par l'invalidation de DROSHA dans les lignées germinales et la létalité consécutive de l'embryon (Chong et al., 2010). De même, le KO de DGCR8 dans des embryons de souris altère le développement de ceux-ci et chez l'homme, la délétion de la région génomique incluant DGCR8 aboutit au Syndrome de Di Georges, caractérisé par une dysmorphie faciale, une cardiopathie et une endocrinopathie (hypoparathyroïdie et hypocalcémie) (Shiohama et al., 2003; Wang et al., 2007). Au niveau cellulaire, de multiples mécanismes contrôlent les niveaux d'expression, l'activité et la spécificité de DROSHA avec entre autres des modifications post-traductionnelles (acétylation) qui inhibent sa dégradation (Ha and Kim, 2014; Tang et al., 2013). De même, deux études ont montré que l'ARNm de DICER contenait des sites des séquences complémentaires à let-7, suggérant une boucle de régulation négative entre DICER et let-7 qui pourrait contribuer à la régulation homéostatique de l'activité de DICER (Forman et al., 2008; Ha and Kim, 2014; Tokumaru et al., 2008). Les protéines AGO peuvent également être modulées par de nombreuses modifications : parmi elles, l'hydroxylation et la phosphorylation d'AGO2 sur le résidu Ser387 stabilise la protéine, alors que sa phosphorylation sur les résidus Tyr393 et Tyr529 altère l'activité d'AGO2 (Gebert and MacRae, 2018; Ha and Kim, 2014). De manière intéressante, il semblerait que les protéines AGOs soient stabilisées en présence de miARN mature, et que la dégradation des protéines non-occupées soit médiée par le protéasome et le processus d'autophagie (Ha and Kim, 2014).

❖ **La voie non canonique**

Bien que les introns soient une source majeure de miARNs maturés par la voie canonique chez les humains, ils contiennent également un petit groupe de miARNs maturés indépendamment du complexe DROSHA/DGCR8 et sont appelés les « mirtrons » (Westholm and Lai, 2011). Il semblerait que ces mirtrons soient dépendants de l'épissage et fassent intervenir des facteurs d'épissage de deux grandes familles (SR proteins et hnRNPs) pour aboutir à la génération d'un pré-miARN. Celui-ci sera ensuite pris en charge par les membres de la machinerie des miARNs en aval de DROSHA, EXP5, DICER, et le complexe RISC comprenant les protéines AGOs (Ratnadiwakara et al., 2018). Récemment, un autre sous-ensemble de miARNs dérivés de petits introns a été identifié : les agotrons. Les agotrons matures sont similaires à des pré-miARNs en terme de longueur et de structure et leur maturation est indépendante non seulement de DROSHA mais aussi de DICER (Hansen et al., 2016). Tout comme les miARNs, il semblerait que les agotrons aient un effet post-transcriptionnel suite à l'appariement d'une séquence SEED au niveau du 3'UTR de l'ARNm cible (Catalanotto et al., 2016; Hansen et al., 2016).

4.3.2 Les mécanismes d'actions

Depuis leur découverte il y a plus de vingt ans, les miARNs associés au complexe RISC ont été décrits pour réguler l'ARNm au niveau post-transcriptionnel dans le cytoplasme (Catalanotto et al., 2016). En général, ils empêchent la traduction de protéines ou favorisent la dégradation de leur ARNm cible (**Figure 27-28**). En 2013, Meijer et al., ont établi que ces deux mécanismes alternatifs pouvaient être consécutifs, impliquant d'abord la répression de la traduction de l'ARNm puis sa dégradation (Meijer et al., 2013). En termes quantitatifs, il semblerait que les miARNs exercent principalement leurs effets via la dégradation des ARNm, alors que la simple répression traductionnelle ne représenterait que 10 à 25 % de l'inhibition globale de l'expression protéique (Catalanotto et al., 2016; Eichhorn et al., 2014). En ce qui concerne la dégradation des ARNm, le complexe RISC est composé à minima d'une protéine AGO et d'un miARN, qui reconnaît la cible qu'il doit moduler. Bien que les protéines AGOs présentent une similitude de séquence élevée, AGO2 a longtemps été considérée comme étant la seule à avoir une activité d'endonucléase permettant la dégradation de l'ARNm (Catalanotto et al., 2016). Récemment, une étude a mis en évidence que AGO3 serait également capable de cliver, mais cette activité dépendrait du substrat (Park et al., 2017). AGO2 peut également recruter au sein du complexe RISC la protéine Glycine-Tryptophane de 182 kDa (GW182). Celle-ci interagit avec la PABPC (Polyadenylated-binding protein) pour promouvoir la déadénylation de l'ARNm via le recrutement des complexes PAN2-PAN3 et CCR4-NOT, puis le décoiffage grâce aux enzymes DCP1-DCP2, rendant l'ARNm plus susceptible à une dégradation rapide (Gebert and MacRae, 2018).

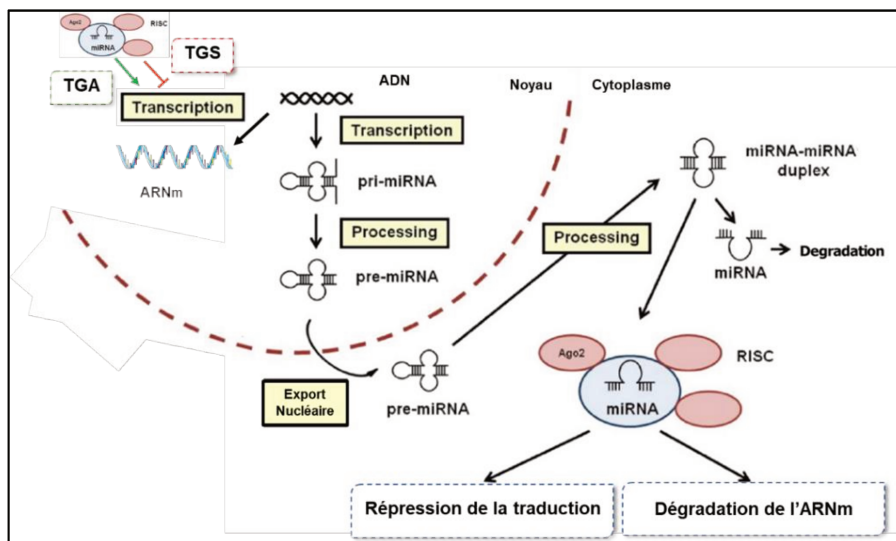


Figure 27 : Mécanisme d'action des miARNs (Adapté de Gin et al., 2013)

Concernant la répression de la traduction, des expériences de séquençage à haut débit ont également permis de mettre en évidence les effets de la liaison d'un miARN à sa séquence cible, notamment l'inhibition de l'assemblage des ribosomes ou le désassemblage prématuré de ceux-ci lors de la traduction d'une protéine (Catalanotto et al., 2016; Valinezhad Orang et al., 2014). Dans la plupart des cas, les répressions induites par les miARNs sont subtiles avec des facteurs compris entre 2 et 5, et les effets biologiques sont souvent obtenus grâce à une forte redondance (Kreth et al., 2018). En effet, chaque miARN peut réguler plusieurs dizaines voire centaines de cibles et un ARNm peut être ciblé par plusieurs miARNs. Par conséquent, c'est souvent l'action concomitante de plusieurs miARNs qui permet d'influencer une voie de signalisation (Kreth et al., 2018).

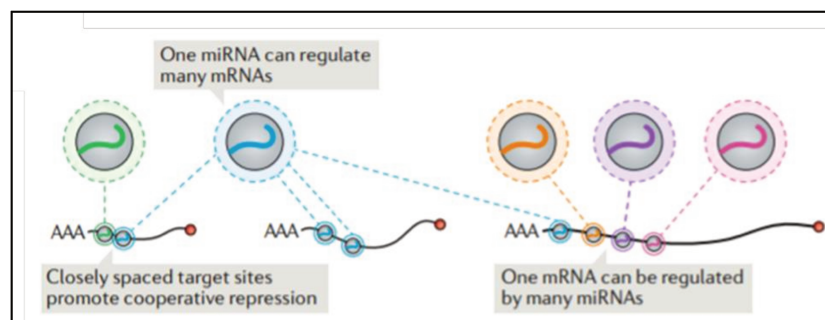


Figure 28 : Les miARNs forment des réseaux complexes d'interaction (Source : Gebert et al., 2018)

Enfin, ces dernières années, plusieurs études ont révélé la présence de complexes RISC associés aux miARNs dans le noyau des cellules (**Figure 27**) (Catalanotto et al., 2016; Gagnon et al., 2014; Nishi et al., 2013). La taille comparable des miARNs à celle des siARNs, capables de réguler la transcription, et leur présence dans le noyau a permis de mettre en évidence leur rôle dans la régulation de l'expression génique au niveau transcriptionnel (Catalanotto et al., 2016). En effet, un nombre important d'études ont montré que les miARNs peuvent médier l'activation (TGA : transcriptional gene activation) ou l'inhibition (TGS : Transcriptional Gene Silencing) transcriptionnelle, élargissant de ce fait le spectre d'activités des miARNs de l'échelle post-transcriptionnelle à l'échelle transcriptionnelle (Catalanotto et al., 2016; Liu et al., 2013b; Majid et al., 2010; Place et al., 2008).

4.3.3 La dégradation des microARNs

Les mécanismes par lesquels les miARNs contrôlent l'expression de leurs gènes cibles sont maintenant bien définis mais les mécanismes par lesquels ils sont dégradés semblent

encore obscurs. Les miARNs sont généralement stables in vivo (demi-vie > 24h). Leur turnover généralement miARN-spécifique, peut s'étendre de quelques minutes à plusieurs jours et dépend également du contexte tissulaire (Gebert and MacRae, 2018; Ruegger and Grosshans, 2012). Un des mécanismes de déstabilisation des miARNs est appelé TMTD (target RNA-directed miRNA degradation) et requiert une complémentarité du miARN et de sa cible en 5' mais aussi en 3'. Une étape d'ajout de nucléotides à l'extrémité 3' du miARN appelée « Tailing » intervient alors, et favorise le recrutement de nucléases impliquées dans la dégradation du complexe l'ARNm/miARN (Gebert and MacRae, 2018). Chez les humains, ces nucléases sont des exo-nucléases et sont au nombre de trois : XRN1, RRP41 et PNPase old-35 (mitochondrie). Suite à sa déadénylation, l'ARNm est soumis à la dégradation exonucléotidique de 3' en 5' par les exo-nucléases : PNPase old-35 (Gebert and MacRae, 2018; Ruegger and Grosshans, 2012). Au contraire, l'ARNm peut être décoiffé en 5' par les protéines DCP1 et DCP2 et dégradé de 5' en 3' par l'exonucléase XRNP1 (Gebert and MacRae, 2018; Ruegger and Grosshans, 2012). Dans les rares cas où la complémentarité du miARN sur sa cible est parfaite, AGO2 utilise son activité d'endonucléase pour dégrader le miARN et l'ARNm, mais une telle complémentarité peut aussi aboutir au déchargement du miARN par le complexe RISC (De et al., 2013; Gebert and MacRae, 2018).

4.4 miARNs et métabolisme

Comme cité précédemment, les miARNs sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques incluant la prolifération, l'apoptose, ou encore la différenciation. De plus, chaque type cellulaire possède un répertoire de miARN qui lui est spécifique et qui peut contribuer à la fonctionnalité de la cellule suivant le contexte tissulaire (Kreth et al., 2018). Il n'est donc pas étonnant que la dérégulation de certains miARNs soit associée au développement de certaines pathologies chez l'homme. Dans ce manuscrit, nous nous focaliserons sur l'implication des miRNAs dans la régulation de l'homéostasie énergétique ainsi que sur leur dérégulation associée aux désordres métaboliques tels que le DT2.

4.4.1 La régulation du métabolisme énergétique par les miARNs

Les nombreuses voies de signalisation régulées par les miARNs impliquent également le métabolisme énergétique et les tissus associés : le pancréas, le foie, les muscles et le tissu adipeux. Pour revue voir : (Dumortier et al., 2013; Vienberg et al., 2017). Ces dernières années un nombre important de miARNs et leurs cibles ont été mis en évidence dans les différents tissus de l'homéostasie énergétique. Ces derniers influent sur le

métabolisme du glucose et des lipides. Une vue globale de l'implication des miARNs dans le métabolisme glucidique et lipidique est présentée en **Figure 29**.

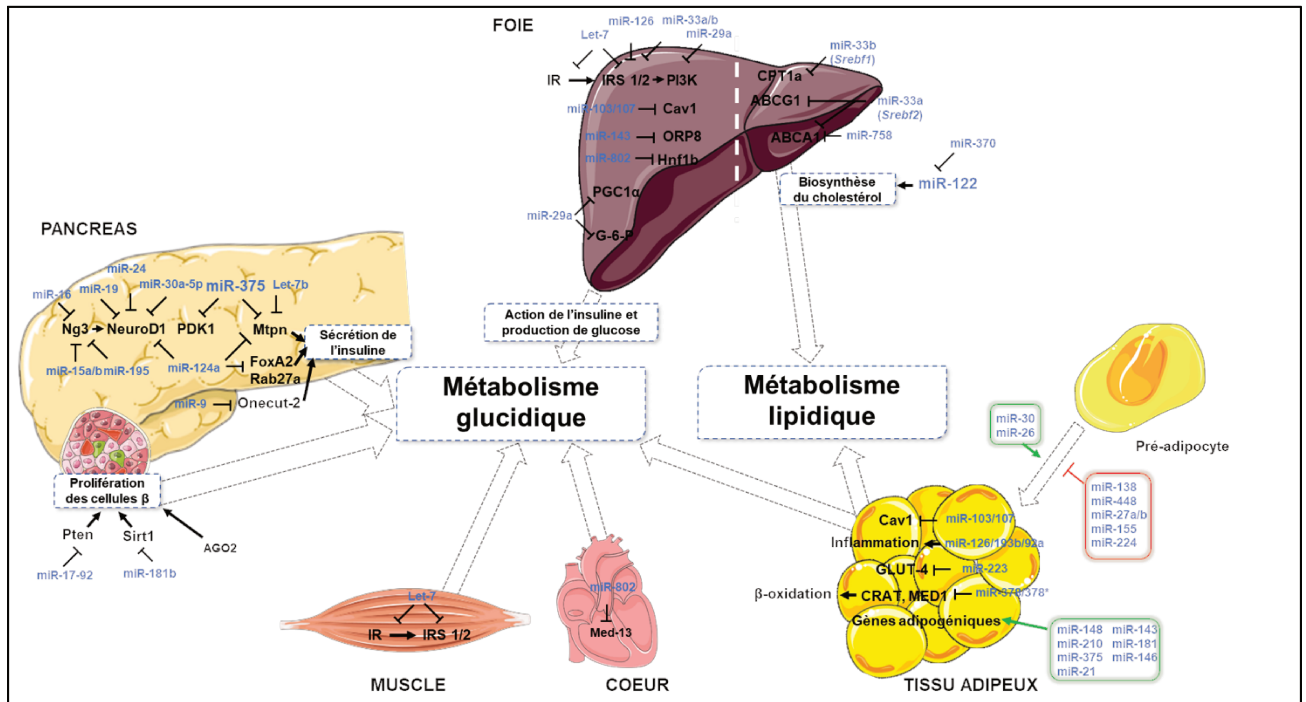


Figure 29 : L'implication des miARNs dans le métabolisme (Adapté de Dumortier et al., 2013, Filios et al., 2015, Price et al., 2016, Vienberg et al., 2017)

Dans le pancréas, de nombreux miARNs sont impliqués dans la sécrétion d'insuline ou dans la prolifération des cellules β (Filios and Shalev, 2015). Parmi les miARNs présents, le miR-375 qui est le plus abondant, cible entre autres la myotrophine (Mtpn) (Krek et al., 2005), impliquée dans l'exocytose de l'insuline et PDK1 (Phospho-inositide Dependante Kinase-1), impliqué notamment dans l'expression du gène de l'insuline et la prolifération (Dumortier et al., 2014; El Ouaamari et al., 2008). Sa surexpression in vitro entraîne une diminution de la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose et l'inhibition de son expression dans des îlots pancréatiques dissociés restaure la sécrétion d'insuline et la prolifération cellulaire, suggérant l'importance du miR-375 dans le métabolisme du glucose et son potentiel rôle en tant que biomarqueur d'une altération de la fonction pancréatique (Dumortier et al., 2014). En ce qui concerne le foie, de nombreux miARNs ont également été impliqués dans son fonctionnement. Le rôle du miARN le plus abondant, le miR-122, a largement été commenté et les études cliniques utilisent actuellement ses fonctionnalités pour lutter contre l'hépatite C. Une autre famille de miARNs joue un rôle pivot dans le foie puisqu'elle impacte à la fois le métabolisme glucidique et lipidique : les miR-33a/b. Ils inhibent à la fois l'action de l'insuline dans les hépatocytes en ciblant IRS-2 mais aussi l'efflux de cholestérol des cellules en inhibant leurs transporteurs Abca1 et Abcg1, suggérant également leur rôle important dans le

métabolisme du cholestérol (Dumortier et al., 2013; Vienberg et al., 2017). D'autres études se sont intéressées à l'implication des miARNs dans le métabolisme du tissu adipeux et plus particulièrement dans sa différenciation (Hilton et al., 2013). La régulation de l'adipogenèse par les miARNs, et plus particulièrement de l'adipogenèse brune sera détaillée dans la section suivante.

4.4.2 Les miRNAs impliqués dans la différenciation adipocytaire brune

L'étude de l'implication des miARNs dans la différenciation adipocytaire et particulièrement en adipocyte brun apparaît aujourd'hui comme un domaine de recherche intéressant au vu des capacités métaboliques positives du TABr dans la gestion des substrats énergétiques.

❖ La machinerie des miARNs

Le TA exprime une grande variété de petits ARNs non codants et les miARNs représentent presque 70 % de l'ensemble des ARNs non codants (Brandao et al., 2017). La preuve que les miARNs sont importants pour la fonction du TA provient des études pionnières de perte et gain de fonction de la machinerie des miARNs (Kim et al., 2014a; Mori et al., 2012b; Mori et al., 2014; Mudhasani et al., 2010; Mudhasani et al., 2011; Oliverio et al., 2016). Tout d'abord, deux études initiales publiées par Mudhasani et al., ont montré que DICER était requis pour la différenciation adipocytaire (Mudhasani et al., 2010; Mudhasani et al., 2011). La première étude met en lumière l'importance de DICER dans les phases précoces de la différenciation in vitro en étudiant la capacité de fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) à se différencier en adipocyte (Mudhasani et al., 2010). Les auteurs démontrent que l'inactivation de DICER inhibe l'expression de PPAR γ , régulateur primordial de la différenciation adipocytaire précoce. La seconde établit in vivo que le KO spécifique de DICER dans les tissus adipeux sous le promoteur aP2 donc dans les phases tardives de la différenciation, inhibe la formation du tissu adipeux blanc et de la lipogenèse dans ce tissu et diminue l'expression des gènes impliqués dans les gènes de thermorégulation dans le TABr (Mudhasani et al., 2011). D'autre part, Mori et al., ont montré que l'expression de DICER et des miARNs diminue avec l'âge dans le TAB et peut être restaurée par la restriction calorique, suggérant le rôle important des miARNs et de la machinerie des miARNs dans la préservation de TAB actif et fonctionnel (Mori et al., 2012b). En 2014, cette même équipe a démontré l'implication de DICER dans la détermination du phénotype brun des adipocytes. En effet, l'inactivation de DICER dans les adipocytes aboutit à une augmentation de la masse et du « whitening » du TABr, associée à une diminution des marqueurs thermogéniques (UCP1, CIDEA, DIO2) et une augmentation des marqueurs de l'adipocyte blanc comme la leptine in vivo

(Mori et al., 2014). De plus, *in vitro*, les pré-adipocytes bruns invalidés pour DICER présentent une diminution des marqueurs thermogéniques et de la réponse β -adrénergique suite à une stimulation de cette voie de signalisation (Mori et al., 2014). Ces résultats suggèrent l'importance de la machinerie des miARNs dans la détermination du phénotype brun des adipocytes du TABr (Mori et al., 2014). Enfin, une étude parue en 2016 montre qu'une délétion partielle de DICER dans le TABr de souris induit une diminution de l'expression des miARNs dans ce tissu comme c'est le cas chez les souris obèse ou âgées (Oliverio et al., 2016). De plus, cette délétion partielle dans le TABr des souris entraîne une détérioration de l'homéostasie glucidique, suggérant ainsi que DICER est important pour la différenciation mais aussi pour la fonction du TABr dans le métabolisme du glucose (Oliverio et al., 2016).

A ce jour, il semblerait que l'implication de DROSHA dans l'adipogenèse brune n'est pas encore été étudiée. Cependant, une étude parue en 2014 montre que l'inactivation spécifique des adipocytes de son cofacteur DGCR8 altère la fonction du TABr avec une diminution de l'expression de la protéine thermogénique UCP1 et rend les souris intolérantes à une exposition au froid (Kim et al., 2014a). De même que pour DICER, DGCR8 est requis pour l'adipogenèse brune, et également pour le browning du TABsc lors d'une exposition au froid (Kim et al., 2014a). Enfin, peu d'études se sont intéressées au rôle d'AGO2. L'inactivation d'AGO2 dans une lignée d'adipocytes blancs a montré que qu'il n'a pas de rôle prépondérant sur l'adipogenèse blanche mais entraîne une diminution de la fonction lipogénique. Cependant, le rôle d'AGO2 dans la fonction thermogénique des adipocytes bruns n'a pas été investiguée et fait l'objet du second manuscrit présenté dans cette thèse.

❖ Les miARNs

Si la biogenèse des miARNs semble essentielle pour la fonction du TA et plus particulièrement du TABr, la contribution de certains miARNs de manière individuelle semble également indéniable (Brandao et al., 2017; Chen et al., 2017; Price and Fernandez-Hernando, 2016) (**Figure 30**). Notamment, les miR-27 a et 27-b sont décrits comme des inhibiteurs de la différenciation adipocytaire en diminuant l'expression de PPAR γ , alors que le miR-30 a été décrit comme un activateur de la différenciation adipocytaire en inhibant RunX2, protéine clé que la différenciation ostéoblastique (Karbiener et al., 2009; Zaragosi et al., 2011). Concernant le TABr, l'étude montrant que l'inactivation partielle de DICER aboutit à une altération du métabolisme glucidique à l'échelle de l'organisme a identifié un miARN en particulier, le miR-328 qui cible BACE1 impliqué dans l'inhibition de la fonction thermogénique (Oliverio et al., 2016). Le miR-328 partage des homologies de séquence avec le cluster de

miRs 193b/365, qui proviennent du même locus. Ce cluster a pour cibles des facteurs pro-myogéniques (Runx1t1, Cdon, Igfb5). Ainsi, il favorise la différenciation en adipocytes bruns et est positivement régulé par PRDM16, créant de ce fait une boucle d'autorégulation en faveur de l'adipogenèse brune (Sun et al., 2011). Un autre miR, qui apparaît spécifique au TABr selon l'étude qui l'a mise en évidence, est le miR-455. Il est notamment induit par une exposition au froid ou la BMP7 et cible HIF1 α . Ceci a pour conséquence l'activation de l'AMP kinase et de sa cible en aval PGC1 α , qui lui-même contribue au phénotype brun en activant la biogenèse mitochondriale et l'expression de la protéine UCP1 (Zhang et al., 2015). Par ailleurs, comme attendu, son inhibition au moyen d'un LNA-antagomir-455 altère la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes bruns. Les miARNs décrits ci-dessus ne sont pas les seuls à influencer sur l'adipogenèse brune et une vue d'ensemble plus complète des miRNAs « à effet positif » est présentée en **Figure 30**.

Il existe aussi des miARNs connus pour agir en tant qu'inhibiteurs de la différenciation des adipocytes bruns (Brandao et al., 2017; Chen et al., 2017; Price and Fernandez-Hernando, 2016). Parmi eux, le miR-133 cible un des facteurs centraux de l'adipogenèse brune, PRDM16, alors que le miR-155 inhibe CEBP/ β , crucial pour l'adipogenèse brune (Trajkovski et al., 2012). La surexpression du miR-155 altère la différenciation en adipocytes bruns et aboutit à une diminution de l'accumulation des lipides et à une diminution de l'expression des marqueurs thermogéniques (Chen et al., 2013b). De manière intéressante, miR-155 est négativement régulé par sa cible CEBP/ β créant une boucle de rétrocontrôle doublement négative entre miR-155 est sa cible (Chen et al., 2017). La famille des miR-27 freine également la différenciation brune en ciblant deux membres de la famille des PPAR (PPAR γ/α), mais aussi PRDM16 et CREB1. Son expression est diminuée en réponse au froid ou à une stimulation β -adrénergique et son inhibition entraîne une augmentation des marqueurs de l'adipogenèse brune (Sun and Trajkovski, 2014).

L'ensemble de ces études suggère l'importance du rôle de la machinerie des miARNs (sans laquelle les miARNs ne verraient pas le jour) et des miARNs dans le fonctionnement effectif du TABr et de ses adipocytes. C'est pourquoi le fait de jouer sur les niveaux d'expression de miARNs individuels ou à un niveau plus global sur la machinerie permettrait de maintenir le TABr dans un état actif. De manière plus générale, nous avons vu que les miARNs sont donc d'importants facteurs au cœur des régulations de l'homéostasie énergétique. Par conséquent, leur dérégulation va entraîner des pathologies métaboliques telles que l'obésité ou le diabète de type 2.

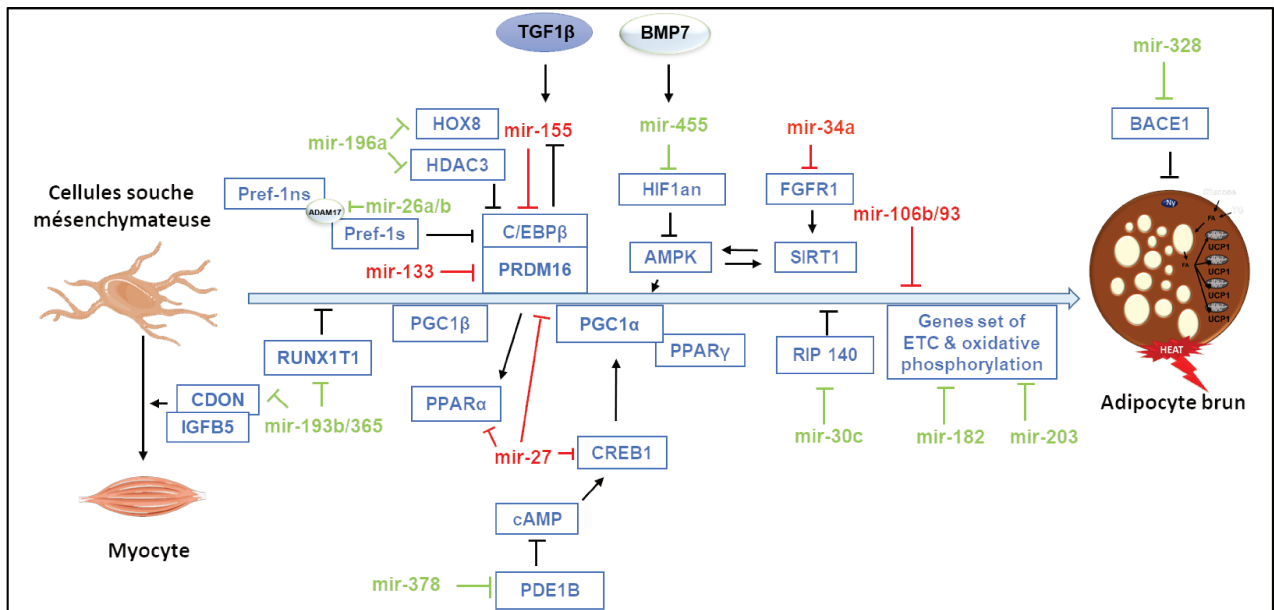


Figure 30 : Les miARNs dans la différenciation adipocytaire brune (Adapté de Chen et al., 2016, Price et al., 2016, Brandao et al., 2017)

4.4.3 Les miARNs dans le diabète et la prédisposition au diabète

Compte tenu de la forte influence des miARNs sur la fonction des différents tissus de cibles de l'insuline, les modèles animaux et les données humaines ont permis de mettre en évidence une série de miARNs dont l'expression est dérégulée quand les individus sont insulino-résistants et atteints de DT2. Par exemple, chez les rats GK (modèle polygénique Goto-Kakizaki de DT2), l'expression du miR-125a est accrue dans le foie (Herrera et al., 2009; Hinault et al., 2013). De même dans le foie de souris obèses et diabétiques de type 2, l'expression du miR-15b est augmenté. Ce miARN va aller se fixer sur sa cible INSR (Insulin Receptor), aboutissant à une altération de la signalisation insulinique dans les hépatocytes (Yang et al., 2015). Chez l'homme, le miR-124a régule négativement la sécrétion d'insuline en ciblant la GTPase Rab27a et FoxA2 (Baroukh et al., 2007; Sebastiani et al., 2015). De plus, dans le cadre du DT2, les interactions entre miARN et ARNm cible(s) sont de plus en plus étudiées grâce à la mise en place des puces et du séquençage à haut débit, permettant d'établir des réseaux de régulation et d'identifier de nouveaux candidats thérapeutiques (Feng et al., 2016).

Parmi les facteurs de risque associés au DT2, nous avons vu précédemment qu'un environnement intra-utérin délétère prédispose la progéniture au développement de troubles métaboliques comme l'insulino-résistance. Concernant les mécanismes d'action de la programmation fœtale des troubles métaboliques, le rôle de l'épigénétique est indéniable et dans ce chapitre, nous allons nous focaliser sur l'implication des miARNs

Notre équipe a été la première à mettre en évidence dans le modèle de carence protéique maternelle le rôle du miR-375 dans la prolifération et la sécrétion d'insuline des îlots dissociés. En effet, l'expression augmentée du miR-375-3p dans les îlots néoformés dérivés de fœtus et dans les îlots de la jeune progéniture CP adulte est associé à une diminution de la prolifération des cellules β pancréatiques et de la sécrétion d'insuline. Si l'expression du miR-375-3p est réprimée dans les îlots dérivés de jeunes animaux CP, la prolifération cellulaire ainsi que la sécrétion d'insuline sont rétablies (Dumortier et al., 2014).

Le muscle squelettique est également un tissu dans lequel la dérégulation de l'expression des miARNs est une conséquence d'un petit poids de naissance (Fernandez-Twinn et al., 2015). Par exemple, Bork-Jensen et al., observent une augmentation de l'expression du miR-15b dans le muscle squelettique de rats dont les mères ont subi une carence protéique durant la gestation et la lactation (Bork-Jensen et al., 2015). Cette observation est d'autant plus intéressante que l'augmentation de l'expression de ce microARN a déjà été montré chez les jumeaux monozygotes dont l'un des deux développe un DT2 à l'âge adulte. En effet, les biopsies de muscles du jumeau diabétique montrent une augmentation de l'expression du mir-15b associé à une diminution de l'expression de ses cibles, le récepteur à l'insuline et son substrat IRS-1, acteurs clés de la signalisation insulinique et donc de l'homéostasie glucidique.

Au niveau du TAB, il a été montré chez la progéniture CP que l'augmentation de l'expression du miR-483-3p associé à une diminution consécutive de son gène cible, le Growth Differentiation Factor-3 (GDF-3) (Ferland-McCollough et al., 2012), déterminant de la taille cellulaire. L'inhibition de la transcription du gène GDF-3 mène à une inhibition de la différenciation et de la maturation adipocytaire et limite donc le stockage des lipides dans ce tissu adipeux. De plus, l'augmentation de l'expression du miR-483-3p associé à une diminution de l'expression de GDF-3 a aussi été mise en évidence dans des biopsies de tissu adipeux blanc humain provenant d'hommes nés avec un petit poids de naissance (Ferland-McCollough et al., 2012). L'ensemble de ces données suggère que les modifications épigénétiques observées sont conservées entre les espèces, faisant de ces dernières des processus fondamentalement importants pour le conditionnement nutritionnel suite à un RCIU (Fernandez-Twinn et al., 2015).

4.4.4 Les miARNs : Outils thérapeutiques et Biomarqueurs ?

Aujourd'hui, le concept de l'inhibition ou de la surexpression des miARNs à des fins thérapeutiques représente un nouveau challenge pour la médecine clinique. Certaines approches fondamentales ont permis de mettre en place des essais cliniques et c'est notamment le cas du miR-122. En 2008, une étude parue dans Nature réalisée chez les primates non humains a montré que l'inhibition du miR-122 par des oligonucléotides inhibiteurs anti sens chimiquement modifiés (LNA = Locked-nucleic-acid) engendrait une diminution des niveaux de cholestérol, molécule essentielle pour le virus de l'hépatite C (Elmen et al., 2008). De manière intéressante, aucun effet secondaire toxique n'a été observé sur ces primates, ce qui a permis le développement du Miravirsén en clinique (antagomiR-122) dont la phase IIa a récemment été validée (NCT01200420). Au-delà de cette étude, cinq autres essais cliniques impliquant directement des mimétiques ou inhibiteurs de miARNs sont en cours (Kreth et al., 2018). La surexpression du miR-34a dans le cadre du cancer pour inhiber la prolifération et l'évasion de la tumeur ainsi que l'inhibition du miR-155 dans le cadre du lymphome cutané pour réduire la prolifération cellulaire aberrante sont toutes deux testées en Phase Clinique de type I. Les thérapies basées sur les miARNs sont aujourd'hui en phase d'études cliniques mais un certain nombre de défis doivent encore être relevés, notamment en ce qui concerne la délivrance du miARN ou de l'antago-miARN aux cellules cibles (Rupaimoole and Slack, 2017; Tutar et al., 2015).

Outre leur utilisation dans des pathologies spécifiques humaines, les miARNs sont également considérés comme des biomarqueurs valides (Kreth et al., 2018). En effet, plusieurs d'entre eux ont été détectés dans des fluides biologiques (sang, urine, salive, lait maternel) permettant leur collection par des méthodes non-invasives et leur quantification rapide par RT-qPCR (Raffort et al., 2015). Leur utilité est d'autant plus importante pour le diagnostic de pathologies dont le développement est rapide comme la septicémie, où une augmentation des miR-155 et miR-21 et une diminution du miR-150 est observée, ce qui constitue une véritable signature (Kreth et al., 2018 ; Liu et al., 2015; Wang et al., 2016). Dans un autre contexte, une étude a récemment mis en évidence des taux élevés de miR-223 chez les patients atteints de colopathie fonctionnelle. Ces résultats corrélerent avec une étude réalisée sur les rongeurs mettant en évidence le rôle du miR-223 et validant l'aspect biomarqueur de ce miARN. Les miARNs circulants peuvent aussi être de potentiels biomarqueurs des maladies métaboliques telles que le diabète. En effet, la signature spécifique des miARNs dans les fluides biologiques peut informer sur l'état d'avancement de la pathologie (Raffort et al., 2015). Par exemple,

l'expression d'une série de 7 miARNs impliqués dans la sécrétion et l'action de l'insuline (miR-9, miR-29a, miR-30d, miR-34a, miR-124a, miR-146a et miR-375) est significativement augmentée dans le sérum de patients atteints de DT2 (Kong et al., 2011). De plus, l'expression du miR-126 est significativement diminuée chez les patients atteints de DT2 et constitue donc un biomarqueur valable pour le pronostic précoce du DT2 (Feng et al., 2016). A l'heure actuelle, certains miARNs circulants sont mêmes utilisés pour la détection précoce des complications diabétiques comme la néphropathie ou les maladies coronariennes (Feng et al., 2016).

L'ensemble des données présentées et les futurs résultats des essais cliniques en cours permettront de trancher sur le potentiel thérapeutique des miARNs. Par ailleurs, il serait intéressant d'étendre la stratégie thérapeutique basée sur les miARNs au domaine du métabolisme et de ces pathologies associées.

II. Résultats

1. Présentation du travail- Contexte scientifique

Au début de mes travaux de thèse, je ne réalisais pas l'importance de l'environnement intra-utérin sur le développement de la progéniture et sur le conditionnement du développement de pathologies métaboliques à l'âge adulte. Il se trouve que les périodes de gestation et de lactation sont primordiales pour assurer le bon développement du fœtus. C'est pourquoi l'induction d'un stress, entre autres nutritif, durant ces périodes aboutit au développement parfois irréversible de maladies métaboliques telles que le diabète de type 2 ou l'obésité. Le modèle de carence protéique maternelle (CP) a justement été choisi par mon laboratoire car il s'agit d'un modèle bien caractérisé de retard de croissance intra-utérin (RCIU) conduisant plus tard dans la vie au diabète. La progéniture de mères nourries avec un régime isocalorique contenant 8% de protéines (comparé à 20% chez les témoins) présente un retard de croissance général (poids et taille corporels) avec des tissus dont le poids est diminué comme le foie et le pancréas, alors que celui du cerveau reste inchangé (phénotype d'épargne). La progéniture LP a notamment un défaut de sécrétion d'insuline associée à un défaut de prolifération des cellules β pancréatiques pour autant ces animaux sont normoglycémiques. C'est seulement à l'âge de 18 mois, correspondant à 50-60 ans chez l'homme, que la progéniture LP devient insulino-résistante et hyperglycémique.

Lors de mon arrivée au laboratoire, l'équipe cherchait à comprendre comment avec si peu d'insuline les animaux LP parvenaient à maintenir leur glycémie normale. Deux tissus métaboliquement actifs capables de développer une adaptation métabolique suite à un stress ont particulièrement été étudiés : le muscle et le tissu adipeux brun (TABr). Plusieurs expériences in vivo et in vitro nous ont permis d'écarter rapidement la piste du muscle comme régulateur métabolique et nous nous sommes focalisés sur le TABr. En effet, ces dix dernières années, plusieurs laboratoires se sont particulièrement intéressés au TABr en raison de sa capacité à dissiper l'énergie apportée par les substrats glucidiques et lipidiques sous forme de chaleur (thermogenèse). De plus, le fait que le développement du TABr intervienne à la fin de la gestation chez les hommes comme chez les rongeurs suggère que ce tissu pourrait être reprogrammé par un environnement délétère et participerait à l'adaptation métabolique chez la jeune progéniture CP. Concrètement, chez les mammifères, la capacité thermogénique du TABr permet aux nouveau-nés de s'adapter face à l'environnement extra-utérin puis cette capacité régresse avec l'âge. Cela correspond à l'« involution » du TABr qui devient un organe de stockage à l'image du TAB.

Par ailleurs, face à un excès de substrats dans l'organisme, le TABr actif permet une clairance de ceux-ci, et c'est dans ce contexte que nous nous y sommes intéressés. Durant ma thèse, mon premier objectif a été de démontrer l'importance du TABr dans le maintien de l'homéostasie glucidique chez les jeunes animaux CP. Après avoir observé que le TABr des rats CP était hyperactif à 3 mois par rapport aux animaux contrôles, et inactif, chez animaux âgés de 18 mois des expériences de calorimétrie et de challenge par régime riche en graisses ont été réalisées. De plus, nous avons réalisé des expériences d'exposition de nos animaux au froid, procédure classique pour mesurer l'activité du TABr, et utilisée pour démontrer la présence de TABr actif chez l'homme. Afin de montrer un rôle direct du TABr dans le maintien de la normoglycémie chez nos jeunes animaux CP, nous avons procédé à l'ablation chirurgicale du tissu. Nos résultats ont montré que la jeune progéniture CP est mieux protégée que les animaux contrôles face à une obésité induite par un régime riche en graisse et une exposition au froid grâce à l'activité thermogénique accrue de leur TABr. En revanche, l'ablation du TABr induit une hyperglycémie chez les jeunes animaux CP montrant que ce tissu est requis pour maintenir leur normoglycémie. Ces travaux, publiés dans le journal Diabetes en Mars 2017, suggèrent qu'un environnement intra-utérin défavorable pourrait reprogrammer le métabolisme du TABr (**Article I**).

Par la suite, le deuxième objectif de ma thèse a été d'identifier les mécanismes moléculaires permettant de maintenir le TABr actif chez la jeune progéniture CP. Plusieurs études pionnières ont montré un rôle important de l'épigénétique dans la programmation fœtale des maladies métaboliques développées avec l'âge. De plus, avant mon arrivée, mon laboratoire avait mis en évidence qu'une dérégulation de l'expression des microARNs (miARNs) dans le pancréas des animaux CP participait à l'altération de la sécrétion d'insuline et de son action. Etant donné le rôle bien décrit des miARNs dans la modulation de la différenciation du TABr, nous avons réalisé une étude comparative du profil d'expression des miARNs dans le TABr des animaux CP âgés de 3 mois (TABr actif et normoglycémiques) versus 18 mois (TABr inactif et hyperglycémiques). L'analyse de ce profil a montré une augmentation globale de leur expression associée à un accroissement de leur machinerie, et en particulier de la protéine AGO2. Il est à noter que le miARNs positivement dérégulés sont faiblement exprimés dans le TABr inactif de rats contrôles. Par ailleurs, les miARNs connus pour être impliqués dans l'adipogenèse brune sont bien exprimés mais pas différenciellement régulés chez les animaux CP. De manière intéressante, lorsque le TABr est inactif chez les animaux CP âgés, l'expression des miARNs ainsi que celle de la machinerie revient à un niveau contrôlé.

Pour confirmer les observations faites dans notre modèle, nous avons examiné l'expression des miARNs et de la machinerie dans un modèle bien décrit d'activation du TABr. Dans ce modèle, les rats sont quotidiennement injectés pendant une semaine avec un agoniste des récepteurs β -3 adrénergiques. Une augmentation de l'expression de la machinerie des miARNs et des miARNs est observée dans le TABr actif de ces animaux. Nous avons ensuite stimulé avec un agoniste des récepteurs β -3 adrénergiques des adipocytes bruns matures dérivés de la fraction stroma vasculaire de TABr de rats in vitro. Nous avons observé une augmentation de l'expression d'AGO2. Enfin, des expériences de pertes de fonction d'AGO2 dans ces adipocytes bruns matures, révèlent qu'une délétion partielle de la protéine de chargement des miARNs diminue leur activité thermogénique. Ces travaux suggèrent que la protéine AGO2 et les miARNs contribuent à l'activation du TABr. Ces travaux font l'objet d'un second manuscrit accepté en révision à *Molecular Metabolism* (**Article II**).

Enfin, différentes études ont également souligné le rôle de miARNs particuliers dans l'adipogenèse brune ou la fonction thermogénique. Bien que la majorité des miARNs soient significativement surexprimés dans le TABr actif des jeunes animaux CP, quelques miARNs ont une expression sensiblement diminuée. Ces miARNs figurent parmi les miARNs fortement présents dans le tissu. Après des analyses bio-informatiques focalisées sur le métabolisme glucidique, lipidique et la fonction mitochondriale importants pour les adipocytes bruns, nous avons étudié plus particulièrement deux miARNs : le let-7c-1-3p et le miR-22-3p. La délétion simultanée de ces deux miARNs dans des adipocytes bruns matures engendre une augmentation de leur activité thermogénique, reflétée par une élévation de l'expression du marqueur UCP1, et leur action semble synergique. Ceci suggère une action globale de chacun des miARNs sur plusieurs cibles ou des deux miARNs de façon plus intense sur les mêmes cibles. De plus, nos données préliminaires portent à croire que le miR-22-3p agit comme régulateur négatif de l'activation des adipocytes bruns in vitro. Ces résultats feront l'objet d'un troisième article mais requièrent des expériences complémentaires (**Article III**).

Ainsi, l'ensemble de mes travaux de thèse suggère qu'un stress survenu durant la période prénatale et post-natale précoce, peut induire la reprogrammation de la physiologie et du métabolisme du TABr impliqué dans l'homéostasie énergétique. Cette reprogrammation permettra à la progéniture de faire face aux futurs challenges énergétiques dès leur sevrage, aboutissant à la mise en place d'une compensation métabolique. Enfin, les miARNs et leur machinerie semblent jouer un rôle primordial dans la reprogrammation du TABr. C'est pourquoi, la découverte de méthodes pour stimuler la machinerie des miARNs menant à l'activation du TABr pourrait constituer un atout prometteur pour la prévention et/ou les thérapies futures des désordres métaboliques comme l'obésité et le diabète de type 2.

Article I (Diabetes, Mars 2017)

« Contrôle de l'homéostasie énergétique par le tissu adipeux brun en fonction de l'âge dans un modèle de programmation fœtale induite par le régime maternel »

Article II (Revue à Molecular Metabolism, 2018)

« L'augmentation de l'expression des microARNs et d'Argonaute-2 est associée à l'activation du tissu adipeux brun »

Article III (à finaliser pour publication)

« Mir-22 and let-7c inhibent de manière synergique l'activité thermogénique des adipocytes bruns »

Contrôle de l'homéostasie énergétique par le tissu adipeux brun en fonction de l'âge dans un modèle de programmation fœtale induite par le régime maternel

Olivier Dumortier, **Estelle Roger**, Didier F. Pisani, Virginie Casamento, Nadine Gautier, Patricia Lebrun, Hereroa Johnston, Pasal Lopez, Ez-Zoubir Amri, Céline Jousse, Pierre Fafournoux, Marc Prentki, Charlotte Hinault, and Emmanuel Van Obberghen

Diabetes. 2017 Mar;66(3):627-639

« Différentes études épidémiologiques ou réalisées dans les modèles expérimentaux montrent qu'un environnement maternel délétère prédispose la progéniture au développement de troubles métaboliques et au diabète de type 2 avec l'âge. La jeune progéniture issue d'une mère carencée en protéines (CP) durant la gestation et la lactation est normoglycémique malgré une très faible sécrétion d'insuline. Cependant, sans aucune autre détérioration du défaut de sécrétion d'insuline, l'homéostasie glucidique se dérègle avec l'âge chez les descendants CP. Dans cette étude, nos résultats montrent que la jeune progéniture CP normoglycémique et insulinopénique présente une augmentation de la température corporelle et de la dissipation de l'énergie associées à une activité accrue du tissu adipeux brun (TABr). De plus, ces animaux sont protégés d'une exposition au froid et d'une obésité induite par un régime riche en graisses, généralement associée consécutivement à l'insulino-résistance et à l'hyperglycémie. L'ablation chirurgicale du TABr chez la progéniture âgée de trois mois normalise la température corporelle et provoque une hyperglycémie postprandiale. A l'âge de 10 mois, l'activité du TABr décline chez la progéniture CP, ce qui est associée à une diminution de la protection contre l'obésité induite par un régime riche en graisses. Enfin, à 18 mois, l'activité du TABr chez la progéniture CP est comparable à celle des animaux contrôles associée à l'apparition de l'insulino-résistance et de l'hyperglycémie.

Dans leur l'ensemble, nos résultats démontrent que l'activité du TABr est un déterminant physiologique décisif de l'apparition d'une dérégulation métabolique chez la progéniture, présentant une altération de la fonction β -pancréatique conduisant à une hyperglycémie. Ainsi le TABr apparaît comme un régulateur critique de la programmation fœtale des pathologies métaboliques développées à l'âge adulte ».



Olivier Dumortier,¹ Estelle Roger,¹ Didier F. Pisani,² Virginie Casamento,¹ Nadine Gautier,¹ Patricia Lebrun,¹ Hereroa Johnston,¹ Pascal Lopez,¹ Ez-Zoubir Amri,² Céline Jousse,³ Pierre Fafournoux,³ Marc Prentki,⁴ Charlotte Hinault,⁵ and Emmanuel Van Obberghen⁵

Age-Dependent Control of Energy Homeostasis by Brown Adipose Tissue in Progeny Subjected to Maternal Diet-Induced Fetal Programming



Diabetes 2017;66:627–639 | DOI: 10.2337/db16-0956

Epidemiological and animal studies show that deleterious maternal environments predispose aging offspring to metabolic disorders and type 2 diabetes. Young progenies in a rat model of maternal low-protein (LP) diet are normoglycemic despite collapsed insulin secretion. However, without further worsening of the insulin secretion defect, glucose homeostasis deteriorates in aging LP descendants. Here we report that normoglycemic and insulinopenic 3-month-old LP progeny shows increased body temperature and energy dissipation in association with enhanced brown adipose tissue (BAT) activity. In addition, it is protected against a cold challenge and high-fat diet (HFD)-induced obesity with associated insulin resistance and hyperglycemia. Surgical BAT ablation in 3-month-old LP offspring normalizes body temperature and causes postprandial hyperglycemia. At 10 months, BAT activity declines in LP progeny with the appearance of reduced protection to HFD-induced obesity; at 18 months, LP progeny displays a BAT activity comparable to control offspring and insulin resistance and hyperglycemia occur. Together our findings identify BAT as a decisive physiological determinant of the onset of metabolic dysregulation in offspring predisposed to altered β -cell function and hyperglycemia and place it as a critical regulator of fetal programming of adult metabolic disease.

Although in postnatal life sedentary lifestyle and overfeeding contribute to the pandemic of metabolic disorders

and associated type 2 diabetes (T2D), environmental factors acting early in life have emerged as additional influential actors in long-term health (1–3). Indeed, epidemiological studies have established that offspring with low birth weight due to deleterious maternal environment, when faced with a nutritional mismatch in postnatal life, have an increased propensity to develop impaired glucose tolerance and T2D with age (4,5). Several animal models, including maternal protein restriction, have been generated to study the impact of the prenatal milieu on the risk of metabolic diseases in adult age (6). The progenies of these models suffer from intrauterine growth retardation and display profound alterations in organs that play a major role in metabolism, such as the pancreas and the liver (7–9).

An intriguing observation of the maternal protein restriction model is that when the low-protein (LP) diet is given throughout gestation and lactation, a phenotype arises with two distinct phases. The young LP progeny is normoglycemic and only glucose intolerant despite a severely reduced β -cell mass and low insulin secretion (7,8,10–13). However, with aging, insulin resistance and moderate hyperglycemia develop (14,15). Remarkably, in young LP progeny, normoglycemia is maintained due to metabolic adaptation, allowing fuel homeostasis. It stands to reason that the chief energy burner, brown adipose tissue (BAT), could be involved in the age-related changes of the metabolic profile of LP progeny. The precise role of the environment-sensitive BAT in impaired

¹Université Côte d'Azur, INSERM, CNRS, IRCAN, Nice, France

²Université Côte d'Azur, CNRS, INSERM, iBV, Nice, France

³Université Clermont, INRA, Clermont-Ferrand, France

⁴CRCHUM and Montreal Diabetes Research Center and Departments of Nutrition and Biochemistry and Molecular Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

⁵Université Côte d'Azur, CHU, INSERM, CNRS, IRCAN, Nice, France

Corresponding authors: Charlotte Hinault, hinault@unice.fr, and Emmanuel Van Obberghen, vanobbeg@unice.fr.

Received 5 August 2016 and accepted 27 November 2016.

This article contains Supplementary Data online at <http://diabetes.diabetesjournals.org/lookup/suppl/doi:10.2337/db16-0956/-/DC1>.

C.H. and E.V.O. are co-senior authors.

© 2017 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>.

metabolic homeostasis and diabetes remains to be deciphered. A chief feature of BAT is that, in contrast to white adipose tissue (WAT), which stores excess lipids, BAT dissipates energy in the form of heat (thermogenesis) by uncoupling mitochondrial electron transport chain activity from ATP formation (16,17). This is achieved through uncoupling protein-1 (UCP-1), which allows highly efficient glucose and lipid oxidation and heat production. In humans and other mammals, BAT development occurs predominantly at the end of gestation and the tissue becomes fully functional at birth (18). With age, BAT remains present but its activity decreases (16,19,20). Cold-activated BAT has been shown to contribute to the regulation of energy balance in mice by burning a considerable amount of ingested triglycerides and glucose (21,22). Further, transplantation of active BAT in mice has beneficial effects on the control of body composition and metabolism, and results in a reversal of high-fat diet (HFD)-induced insulin resistance (23). Importantly, several recent studies in humans have found that BAT activation by cold acclimation improves insulin sensitivity in obese patients and patients with T2D, suggesting that BAT is a promising novel treatment of obesity and associated disorders (24–26).

Our previous work contributed to decoding the molecular mechanisms induced by intrauterine protein restriction leading to β -cell failure in LP progeny (12). Here we sought to understand how 3-month-old LP progeny programmed to develop deficient insulin secretion is able to maintain normoglycemia. We hypothesized that at this age, characterized by normal insulin sensitivity, glucose homeostasis is preserved by increased BAT activity. To test for such a role of BAT, we delved into the metabolism of LP progeny until the appearance of insulin resistance and increased glycemia. Our work reveals a new dimension for the role of BAT in energy metabolism, as it appears to be involved in the adaptive response in young animals and the failure with aging to maintain glucose homeostasis after fetal programming of prediabetes.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Animals and Diets

Pregnant 200–250-g Wistar rats (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) were fed during gestation and lactation with a control (C) diet (20% [weight for weight] protein) or an isocaloric LP diet (8% [weight for weight] protein) (Hope Farm, Woerden, the Netherlands) (27). After weaning at 4 weeks, male offspring were fed ad libitum with a standard diet (SD) or HFD during either 8 or 40 weeks (Western diet, 42% calories from fat/43% from carbohydrate; Research Diets). At least six rats from three different litters were studied in each group and results confirmed in three independent cohorts. Animals were housed two per cage and subjected to a 12-h light/dark cycle at 22–23°C, which is close to rat thermoneutrality (28). Body temperature was recorded with a digital thermometer. Body length was measured from nose tip to tail base (last hairs). Body surface area was calculated as previously described (29). Blood was

collected from tail veins before anesthesia. WAT was removed around the epididymis (eWAT) and subcutaneously (scWAT); interscapular BAT (iBAT) was collected from the interscapular region and separated from attached WAT. All procedures followed INSERM guidelines and were approved by the Research Ministry (MESR 00825 and APAFIS 3897-2016012217578333) and local ethics committee (CNREEA no. 28).

Surgical iBAT Ablation

BAT was removed from the interscapular region of 3-month-old C and LP progenies as previously described (30). We performed the same procedure for the sham-operated group except that no iBAT was removed. Fast and refeed experiments were performed at days 6 and 14 postsurgery. Fed glycemia was measured before overnight fasting and before and 1 h after ad libitum refeeding. Data were expressed as percentage of fed glycemia.

Metabolic Assays

For oral glucose tolerance test (OGTT) and glucose-stimulated insulin secretion (GSIS), C and LP progenies were given an oral glucose bolus (2 g) after an overnight fast. For insulin tolerance test (ITT), rats were starved for 6 h and injected intraperitoneally with 1 unit/kg (<10 months) and 0.75 units/kg (\geq 10 months) of insulin. Blood was collected from the tail vein at different times. Glycemia was measured using the OneTouch glucometer (Lifescan Inc., Milpitas, CA). Circulating levels of insulin, leptin, T3, and FGF21 were measured with ELISA kits from Mercodia (Uppsala, Sweden), Linco (St Charles, MO), Alpha Diagnostic International (San Antonio, TX), and BioVendor (Brno, Czech Republic), respectively. Total cholesterol and triglycerides were measured in serum and catecholamines in 24-h urine samples by the Clinical Chemistry Department (University Hospital, Nice, France).

Indirect calorimetry was performed in the INRA animal facility of Clermont-Ferrand Theix on progenies after 3 weeks of adaptation to the local environment maintained at 22–23°C as previously described (31). Lean and fat mass were quantified using a SkyScan-1178 X-ray microcomputed tomography system. After anesthesia, rats were scanned as previously described (32).

To measure cold-induced thermogenesis, rats were placed in individual cages at 4°C. Rectal temperature was monitored before and every 2 h during cold exposure of 6 h.

Immunohistochemical and Morphological Analysis

After overnight fixation in a 3.7% (weight for volume) formalin solution, tissues were dehydrated and embedded in paraffin for immunohistochemistry (IHC) of UCP-1 (Santa Cruz, Dallas, TX) and perilipin-1 (Acris Antibodies, Herford, Germany) or for hematoxylin-eosin staining to assess morphology. Tissues were sectioned (5 μ m) and immunostained as previously described (12).

Lipolysis and Triglyceride Content Measurement

Minced BAT (50 mg) from fed animals was placed in DMEM containing 1% (weight for volume) FBS. After 1 h,

the medium was replaced without or with isoproterenol (1 $\mu\text{mol/L}$) and collected 2 h later for glycerol measurements (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Triglyceride content was assessed on 50 mg of BAT tissue powder using a Sigma-Aldrich kit.

RNA Extraction and RT-qPCR

RNA from BAT was isolated with TRIzol reagent (Invitrogen) using a Precellys homogenizer (Ozyme, St. Quentin, France). Total RNA (1 μg) was reverse transcribed and analyzed with SYBR Green (ABI PRISM 7000 Sequence Detector System). The cDNA amount used in each reaction was normalized to the housekeeping gene 36B4. The primers and qPCR assay conditions are available upon request.

Protein Extraction and Western Blotting

BAT was processed for protein extraction and Western blotting as previously described (33). Antibody to UCP-1 was from Calbiochem (Merck KGA, Darmstadt, Germany), to tubulin from Sigma-Aldrich, and to p85 from Millipore (Billerica, Massachusetts). Western blots were quantified by densitometry with ImageQuant software.

Statistical Analysis

Results shown are means \pm SEM; n represents the number of rats from different litters. Student t test was used to compare two conditions (unpaired), and two-way ANOVA test followed by post hoc Fisher test when more than two conditions were analyzed. A P value of <0.05 was considered to be significant and annotated with an asterisk in the figures.

RESULTS

Despite Reduced Insulin Secretion, Young LP Progeny Is Normoglycemic and Has Increased Energy Expenditure

As expected, 3-month-old LP progeny showed low fasting insulinemia with normoglycemia and markedly reduced GSIS during an OGTT compared with C (Fig. 1A–C). However, the LP descendants were moderately glucose intolerant (Fig. 1D), which is likely due to the insulin secretion defect, as insulin sensitivity was unchanged according to the ITT (Supplementary Fig. 1).

To decrypt the paradox between the deficient insulin secretion and the normoglycemia in the face of unchanged insulin sensitivity, we analyzed the energy metabolism. Indirect calorimetry showed that energy expenditure (EE) was increased during both day and night in young LP progeny (Fig. 1E and I). This augmented EE was even more pronounced when transitioning from a fasted to a refed state, with a peak immediately after food was reintroduced (Fig. 1G and J). The LP progeny has lower body weight (BW) and length due to its intrauterine growth retardation status (8,10), but its adiposity is not different from C (Supplementary Table 1). Therefore, irrespective of the analytic procedure used, EE remains increased in LP progeny (Supplementary Fig. 2). The respiratory exchange ratio (RER) over 24 h was overall higher in LP progeny compared with C, with a value of ~ 1 , reflecting preferential use of carbohydrate energy sources (Fig. 1F and J). During fasting,

this quotient decreased in both C and LP progenies to a value close to 0.7, resulting from preferential lipid consumption. Upon refeeding, whereas the RER of both progenies climbed to values close to 1, it was higher for LP progeny (Fig. 1H and J). In addition, at 3 months, LP offspring displayed hyperthermia (Fig. 1K). In parallel, the two groups of animals had the same food intake (Supplementary Fig. 3A) and physical activity (Supplementary Fig. 3B). Muscle weight relative to BW was similar for C and LP progenies for EDL and soleus (Supplementary Fig. 4A), and little or no difference was found in mRNA and protein levels of several metabolic and fiber type markers (Supplementary Fig. 4B–I). As a whole, the data indicate that nonshivering thermogenesis is increased, suggesting a role of BAT in the maintaining of normoglycemia in the insulinopenic LP offspring.

BAT Is Hyperactive in Young LP Progeny

To study BAT activation in the LP descendants, we assessed the expression of the specific BAT marker UCP-1 in iBAT. UCP-1 gene and protein expression was higher in iBAT from 3-month-old LP progeny compared with C (Fig. 2A, B, and D). Consistent with this, iBAT from LP progeny presented the key characteristics of a hyperactive tissue with rare lipid droplets compared with C progeny (Fig. 2A). In addition, mRNA expression levels of key markers of BAT activation or lipid metabolism were robustly augmented in iBAT of LP versus C descendants (Fig. 2B and C), suggesting an increase in lipid production and consumption by iBAT. Basal lipolysis in 3-month-old LP iBAT explants was increased compared with C, as shown by a 2.5-fold higher glycerol release (Fig. 2E), suggesting augmented intrinsic activity. This lipolysis level was comparable to that of BAT explants from C offspring stimulated with the adrenergic receptor agonist isoproterenol. Further, BAT activity was evaluated in offspring during a cold challenge (Fig. 2F). The young LP progeny, which displayed hyperthermia at thermoneutrality, increased and preserved its body temperature when challenged by cold for 6 h. This was in contrast to the C offspring, which maintained its temperature with great difficulty. Together these observations further indicate that BAT is hyperactive in 3-month-old LP progeny compared with C. This is in contrast with 21-day-old fetuses (F21) in which no obvious difference was found between C and LP fetuses, either in UCP-1 protein and mRNA expression or in iBAT morphology (Supplementary Fig. 5A and B and Supplementary Fig. 6). Interestingly, whereas UCP-1 gene expression was lower in C progeny at 3 months compared with F21, its expression was enhanced in 3-month-old LP progeny compared with fetal LP (Supplementary Fig. 6). Together our data suggest that maternal protein restriction leads to a hyperactive iBAT in 3-month-old LP progeny, unlike in C descendants, where its activity decreases relative to F21.

Young LP Progeny Is Protected From HFD-Induced Obesity

To further examine the possibility that BAT safeguards energy homeostasis in young LP progeny, we challenged

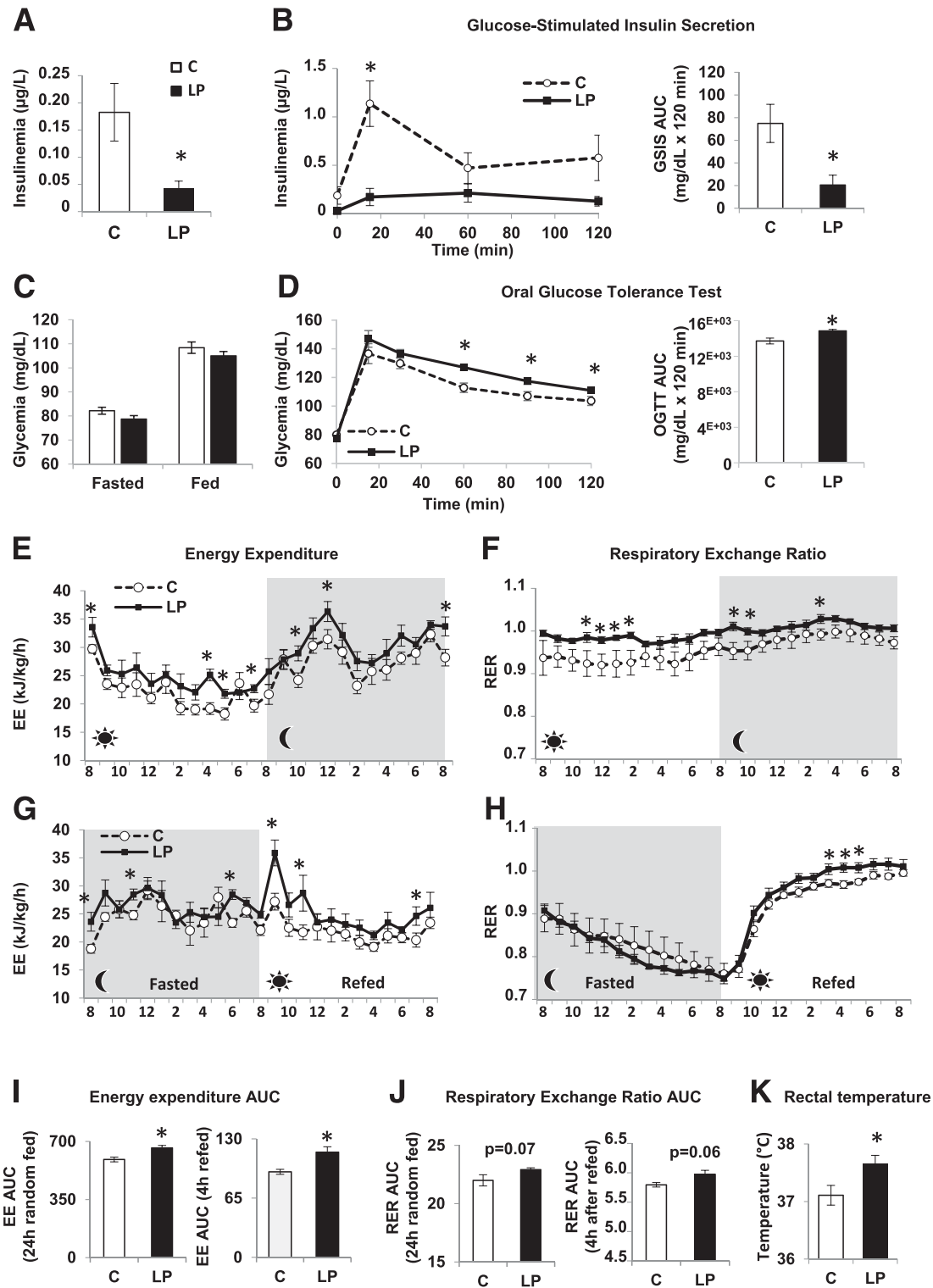


Figure 1—Three-month-old insulin-deficient LP progeny has increased EE. Three-month-old progenies from rat dams fed during gestation and lactation with C or LP diet were used. **A**: Fasting insulinemia ($n = 13$ rats). **B**: GSIS performed during an OGTT after overnight fasting ($n = 6$ rats) with its calculated area under the curve (AUC). **C**: Fasted/fed glycemia ($n = 26$ rats). **D**: OGTT performed after overnight fasting ($n = 13$ rats) and its calculated AUC. EE (**E** and **G**) and RER (**F** and **H**) ($n = 6$ rats) measured during a 24-h ad libitum–fed period (**E** and **F**) and during a 12-h fast period followed by 12-h refeeding period (**G** and **H**). Gray and light zones correspond to dark and light phases, respectively. Data of EE are normalized to BW. **I**: AUC for EE during a 24-h random fed and a 4-h refed period from **E** and **G**. **J**: AUC for RER during a 24-h random fed and a 4-h refed period from **F** and **H**. **K**: Rectal temperature ($n = 12$ rats). Data are presented as mean \pm SEM. * $P < 0.05$.

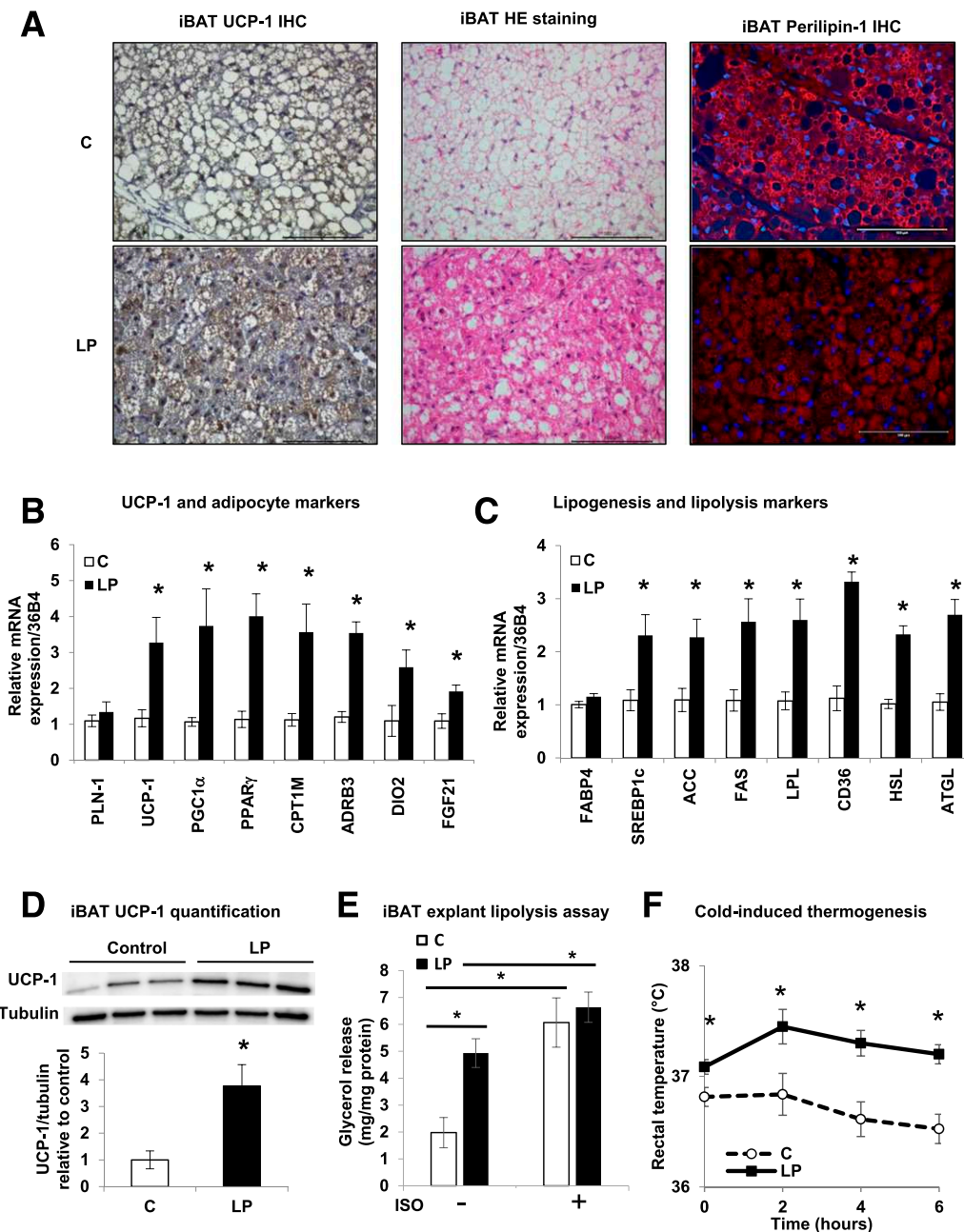


Figure 2—iBAT is hyperactive in 3-month-old LP progeny. *A*: Representative IHC of UCP-1 with hematoxylin and eosin (HE) staining of iBAT in C and LP rats ($n = 6$) of 3-month-old progenies. Scale bars: 100 μm . *B* and *C*: Relative mRNA expression levels of UCP-1 and markers of adipocytes, lipogenesis, and lipolysis from iBAT of C and LP rats ($n = 6$). Data are normalized to 36B4 gene expression and expressed as fold increase relative to C. *D*: Immunoblots for UCP-1 and tubulin on iBAT protein lysates and its quantification ($n = 3$). Data are expressed relative to C as ratios of UCP-1 and tubulin protein expression (arbitrary units). *E*: Glycerol release from iBAT explants after a 2-h incubation without or with 1 $\mu\text{mol/L}$ isoproterenol (ISO) ($n = 4$). Data are expressed per milligram of protein. *F*: Rectal temperature from C and LP progeny during 6 h at 4°C. Data are presented as mean \pm SEM. * $P < 0.05$.

the descendants with an HFD. Compared with 3-month-old C offspring, LP rats gained little weight on HFD (Fig. 3A and B) and did not develop hyperglycemia or compensatory hyperinsulinemia, although they were glucose intolerant (Fig. 3C–E). Proportionally to its BW, LP progeny had the same food intake as C progeny (Supplementary Fig. 7A–C). Further, LP descendants displayed lower serum levels of cholesterol and triglycerides with lower

leptinemia (Fig. 3F and G), the latter being consistent with less eWAT (Fig. 3B). Interestingly, under HFD, BAT from LP and C progenies is morphologically active and associated with a high expression of UCP-1 with similar triglyceride contents (Supplementary Fig. 7D and Fig. 3H and I). Strikingly, only LP progeny expands its BAT weight, and this amounts to a 1.6-fold increase (relative to BW) (Fig. 3J). To sum up, under HFD, young LP progeny increases its

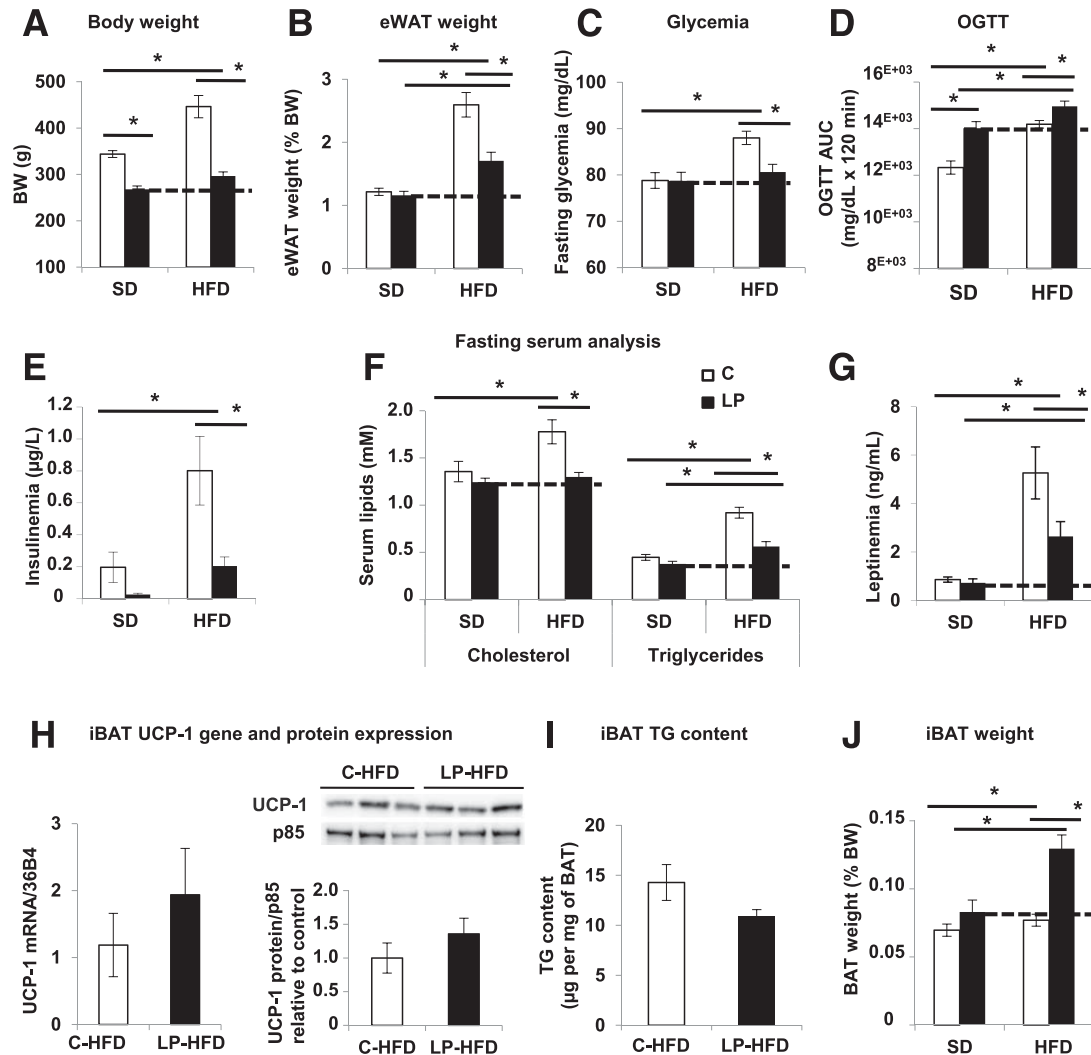


Figure 3—Three-month-old LP progeny is protected against HFD-induced obesity, insulin resistance, and hyperglycemia. C and LP progenies were fed starting at weaning during 8 weeks with HFD ($n = 12$ rats per group). **A** and **B**: BW and eWAT weight expressed as a percentage of BW ($n = 12$ rats). **C** and **D**: Fasting glycemia ($n = 12$ rats) and area under the curve (AUC) of glycemia (mg/dL) from OGTT performed after overnight fasting ($n = 5$ rats). **E–G**: Fasting serum levels of insulin, cholesterol, triglycerides, and leptin ($n = 6$ rats). **H**: mRNA expression levels of UCP-1 from iBAT of C-HFD and LP-HFD progenies ($n = 6$). Data are normalized to 36B4 mRNA and expressed in arbitrary units. Quantification of immunoblots for UCP-1 and p85 proteins on iBAT lysates ($n = 3$). Data are expressed relative to C as ratios of UCP-1 and p85 protein expression (arbitrary units). **I**: iBAT triglyceride contents expressed per milligram wet iBAT weight ($n = 5$). **J**: iBAT weight expressed as a percentage of BW ($n = 12$ rats). Data are presented as mean \pm SEM. * $P < 0.05$, TG, triglyceride.

mass of BAT, which is already active, whereas C progeny solely augments its BAT activity. It is likely that this LP progeny attribute enables it to protect itself against HFD-induced obesity and associated perturbations.

Old LP Progeny With Decreased BAT Activity Becomes Insulin Resistant and Hyperglycemic

We next investigated whether the iBAT-associated protection against HFD-induced obesity of young LP progeny was preserved in older animals. At 10 months of age, iBAT from LP and C progenies under HFD appeared morphologically active with similar levels of UCP-1 protein (Fig. 4A and B). However, iBAT mass in 10-month-old LP progeny

was equal to that of C offspring (Fig. 4C). In addition, 10-month-old HFD-LP progeny gained weight and augmented its eWAT (Fig. 4D and E and Supplementary Fig. 8C), reaching values seen in C-HFD progeny. Importantly, LP offspring showed a significantly increased fasting glycemia under HFD compared with SD (Fig. 4F). At this age, LP progeny maintained a low fasting insulinemia compared with C, independently of the diet type (Fig. 4G). Finally, the LP rats were less sensitive to insulin under HFD than under SD (Fig. 4H). Taken together, the data on HFD show that 10-month-old LP descendants, which present a waning of iBAT mass compared with 3-month-old animals, were less protected against diet-induced obesity, insulin

resistance, and hyperglycemia than younger LP progeny. On SD, 10-month-old LP progeny remained normoglycemic (Fig. 4F), possibly due to BAT activity, which is sufficiently maintained at this age. Indeed, UCP-1 protein expression is still augmented in iBAT from LP progeny at this age (Fig. 4A and B), even though the increase was less marked at 10 than at 3 months.

At 18 months, LP descendants under SD, with still a lower BW (Fig. 5A), continued to suffer from reduced insulin secretion with low insulinemia (Fig. 5B). Notably, they developed insulin resistance (Fig. 5C) and

displayed an increased glycemia in the fed state (Fig. 5D). Remarkably, in this older LP progeny under SD, the morphological characteristics of iBAT and UCP-1 protein expression and gene expression of active BAT markers were comparable to C (Supplementary Figs. 6 and 9 and Fig. 5E and F). In addition, glycerol release from iBAT explants was comparable in the 18-month-old rats from both groups under basal and isoproterenol-stimulated conditions (Fig. 5G). At this age, no difference in iBAT mass was seen in LP compared with C progeny (Fig. 5H). These converging morphological and functional

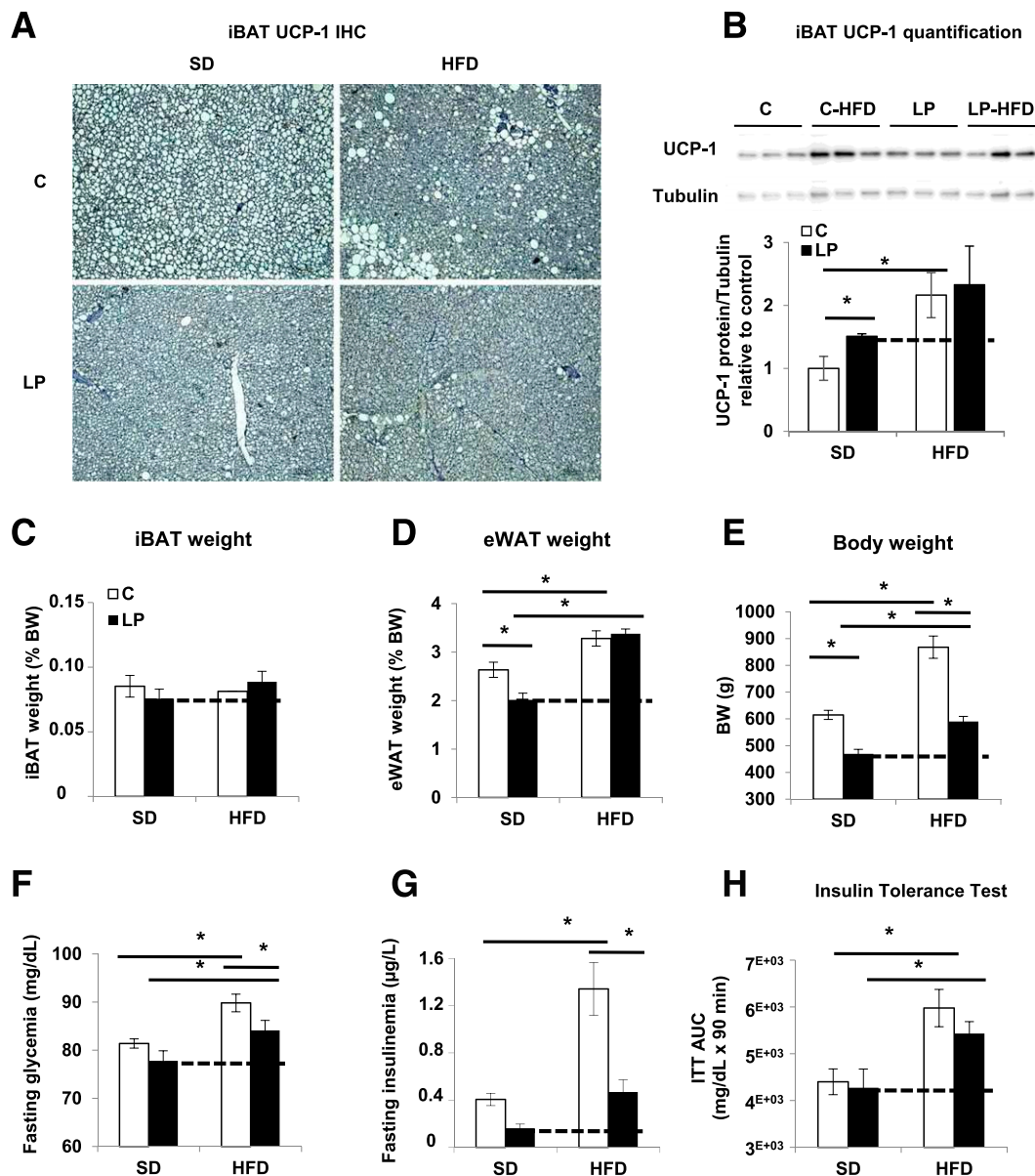


Figure 4—Ten-month-old LP progeny with waning iBAT is less protected against HFD-induced obesity. C and LP progenies were fed at weaning during 40 weeks with an HFD or SD ($n = 12$ rats per group). **A**: Representative IHC of UCP-1 in iBAT ($n = 6$). **B**: Quantification of immunoblots for UCP-1 and tubulin proteins on iBAT lysates ($n = 3$). Data are expressed relative to C as ratios of UCP-1 and tubulin protein expression (arbitrary units). BW (**E**) with iBAT and eWAT weight expressed as a percentage of BW (**C** and **D**) ($n = 12$ rats). **F** and **G**: Fasting glycemia and insulinemia ($n = 12$ rats). **H**: Area under the curve (AUC) of glycemia (mg/dL) from intraperitoneal ITT performed after 6 h fasting ($n = 6$ rats). Data are presented as mean \pm SEM. * $P < 0.05$.

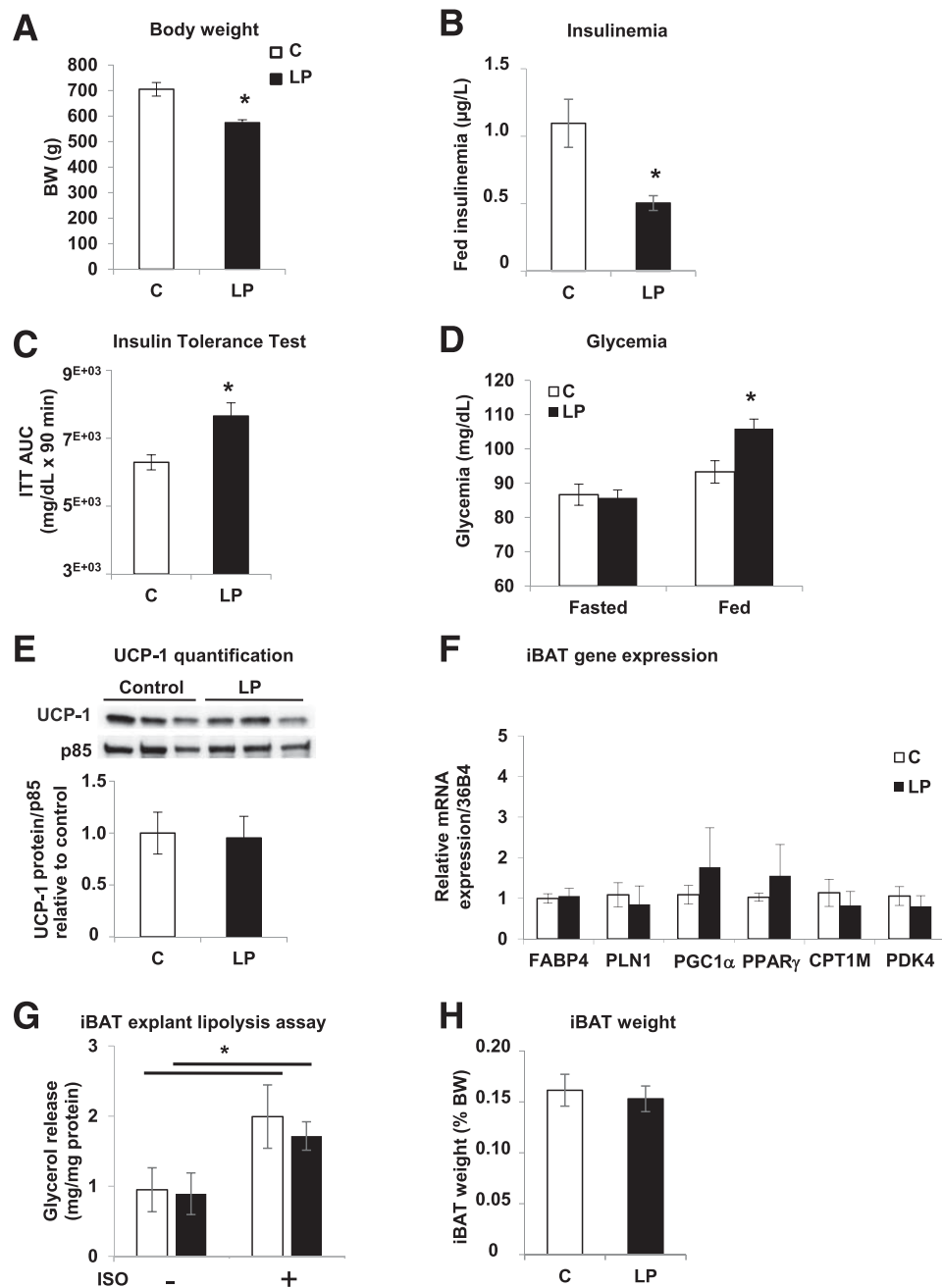


Figure 5—With decline of iBAT activity, insulin resistance and hyperglycemia appear in 18-month-old LP progeny. *A*, *B*, and *D*: BW, fed insulinemia, and fasted/fed glycemia of 18-month-old progeny ($n = 12$ rats). *C*: Area under the curve (AUC) of glycemia (mg/dL) from intraperitoneal ITT performed after 6 h fasting on 15–17-month-old progeny and glycemia of 18-month-old progeny ($n = 12$ rats). *E*: Quantification of immunoblots for UCP-1 and p85 proteins on iBAT lysates ($n = 3$). Data are expressed relative to C as ratios of UCP-1 and p85 protein expression (arbitrary units). *F*: mRNA expression levels in iBAT of 18-month-old C and LP progenies ($n = 6$). Data are normalized to 36B4 gene expression and expressed relative to C. *G*: Glycerol release from iBAT explants after 2 h of incubation without or with 1 µmol/L isoproterenol (ISO) ($n = 3$). Data are expressed per milligram of protein. *H*: iBAT weight expressed as a percentage of BW ($n = 12$ rats). Data are presented as mean \pm SEM. * $P < 0.05$.

observations indicate that with age, iBAT of LP progeny becomes deactivated and henceforth resembles iBAT of C progeny with low activity. In summary, with aging, the LP progeny presents progressively decreased iBAT activity coupled to dysregulated glucose homeostasis.

Surgical Ablation of iBAT in Young LP Progeny Hampers Postprandial Glycemia Regulation

To directly evidence the involvement of BAT in the maintenance of metabolic homeostasis in 3-month-old LP progeny, we surgically removed the accessible BAT depot in the interscapular region, representing at most 40% of

total BAT in rats (30). Two days postsurgery, the BWs of iBAT-ablated and sham-operated C and LP groups were similar (Fig. 6A). Whereas rectal temperature was significantly increased in sham-operated LP versus C rats, no difference was measured after iBAT ablation (Fig. 6B). Importantly, iBAT-ablated LP descendants presented increased fed glycemia compared with sham-operated LP offspring or C groups (Fig. 6C). To evaluate the ability of iBAT from LP progeny to regulate postprandial glucose, fasting-refeeding was performed 1 and 2 weeks postsurgery (Fig. 6D). No difference was observed in the fasting response between the four groups 1 or 2 weeks postsurgery. Remarkably, 1 week after iBAT ablation, LP descendants showed a dysregulated postprandial response 1 h after refeeding, with a glycemia higher

than that of sham-operated LP and C offspring (Fig. 6D, left panel). However, 2 weeks after surgery, perturbed glycemia was no longer found in the LP progeny subjected to BAT ablation (Fig. 6D, right panel). At this time, partial regeneration of BAT tissue was observed without noticeable difference between C and LP progenies (Supplementary Fig. 10). Therefore, we measured UCP-1 gene expression in scWAT to evaluate potential browning (34,35). Whereas UCP-1 was weakly detected in scWAT from sham-operated C rats, its level was robustly increased in iBAT-ablated LP offspring 2 weeks postsurgery (Fig. 6E). Note that 1 week postsurgery, UCP-1 gene expression was comparable in the four groups (data not shown). Overall, the results show that removal of iBAT normalized body temperature in LP

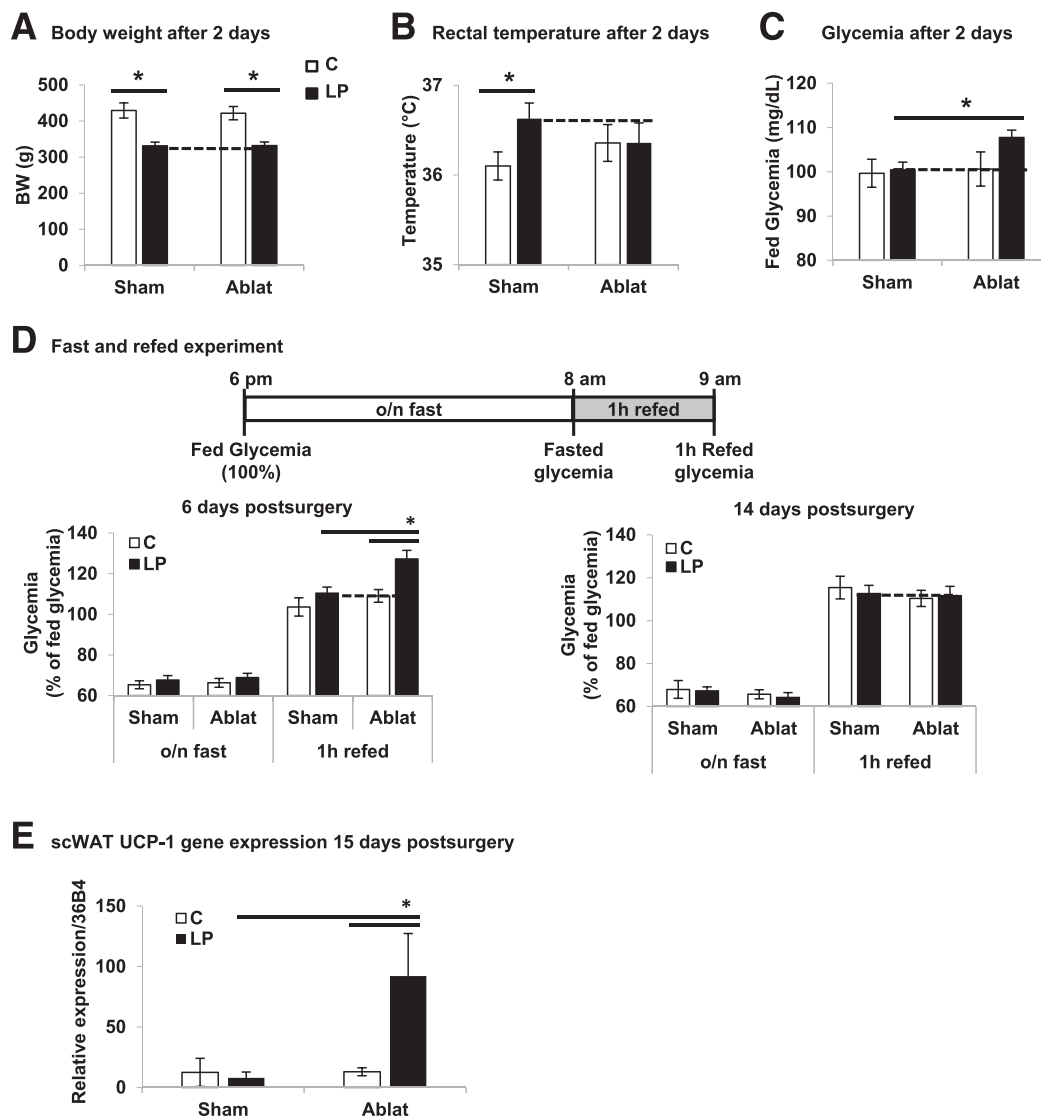


Figure 6—Surgical ablation of iBAT in 3-month-old LP progeny results in dysregulated postprandial glycemia. Three-month-old C and LP progenies ($n = 9/12$ rats per group) were exposed to surgical removal of iBAT (Ablat) and compared with sham C and LP progenies. A–C: BW, rectal temperature, and fasted/fed glycemia 2 days postsurgery ($n = 9/12$ rats). D: Glycemia before and 1 h after refeeding 6 days and 14 days postsurgery ($n = 9/12$ rats). Data are expressed as a percentage of fed glycemia for each rat. E: UCP-1 gene expression levels in scWAT of C and LP progenies sham or Ablat ($n = 6$). o/n fast, overnight fast. Data are presented as mean \pm SEM. * $P < 0.05$.

progeny compared with C and led to dysregulation of postprandial glycemia. This effect is reversible within 2 weeks after iBAT ablation when compensations occurred, notably through scWAT browning. These data reinforce the view that iBAT plays a key role in energy and glucose homeostasis of 3-month-old LP progeny.

Circulating and Intrinsic BAT Modulators Are Augmented in Young LP Progeny

To approach the mechanism by which BAT activity is enhanced in young LP progeny, we investigated the possible implication of hormones and growth factors known to participate in BAT regulation. Thus, we measured catecholamines in 24-h urine samples to evaluate their secretion during an extended period. Whereas adrenaline and dopamine levels were similar in 3-month-old C and LP progenies, noradrenaline levels were significantly increased in LP offspring (Table 1). Moreover, in BAT itself from LP descendants, the expression of the gene encoding for the β -3 adrenergic receptor (ADRB3), which is the subtype more responsive to noradrenaline and involved in stimulating BAT lipolysis (16), was augmented compared with C (Fig. 2B). Whereas circulating levels of FGF21 and T3 were comparable in both offsprings (Table 1), the gene expression levels of FGF21 and deiodinase-2 (DIO2), the enzyme converting in cells the less active T4 into the more active T3 (16), were higher in LP BAT than in C BAT (Fig. 2B). To sum up, the adrenergic, thyroid hormone, and FGF21 machineries appear to function at an amplified level in the young LP offspring.

DISCUSSION

A remarkable feature of the LP model predisposed to diabetes with aging is that young offspring displays severely reduced insulin secretion but only modestly perturbed glucose homeostasis (7–15). Thus, this initial mild phenotype with only glucose intolerance suggests that the descendants are able to compensate for the insulinopenia at a young age. However, with age, they fail to do so, leading to the appearance of a prediabetes phenotype with mild hyperglycemia. Previous reports have tentatively correlated this apparent paradox in the young LP progeny to

an adaptive process in peripheral tissues, resulting in enhanced insulin sensitivity with increased insulin receptor expression in WAT, muscle, and liver (36–38). At variance with this, we and others did not observe differences in insulin sensitivity in 3-month-old LP progeny compared with C (39,40). We report here that compared with the C, 3-month-old LP progeny has a hyperactive iBAT, which provides protection to a cold challenge and HFD-induced obesity and hyperglycemia. Indeed, these descendants present enhanced EE in association with increased iBAT UCP-1 expression and lipolytic activity.

Augmented EE and resistance to obesity development have been reported in young LP mouse progeny (31,41), and attributed to increased muscle metabolism (31). However, in this mouse model and at this age, the possible protective role of BAT against hyperglycemia cannot be excluded, particularly considering that the mice were studied 8° below their thermoneutrality since the experiments were run at 22°C. Indeed, thermoneutrality for mice lies around 30°C, whereas for rats, it is close to 22°C (28). Therefore, these colder conditions for mice, which are expected to enhance BAT activity (42), could have blunted a potential difference of BAT activity between C and LP mice. Further, in our young LP rat progeny, we did not detect contribution from muscle in increased energy metabolism.

Our results support the idea that in young LP the augmented functioning of iBAT, by actively metabolizing glucose and transforming its calories into heat, prevents hyperglycemia that otherwise would result from the marked insulinopenia. In accordance with this view, 3-month-old LP offspring showed a higher respiratory quotient than C, indicating a preference for glucose versus lipid metabolism. As predicted by our hypothesis that enhanced BAT activity has a decisive impact on the glucose homeostasis compensation process of young LP progeny, iBAT ablation in 3-month-old LP progeny resulted in mild hyperglycemia in the fed state and more pronounced hyperglycemia in the postprandial state. Importantly, and consistent with a key role of BAT, the perturbation of glucose homeostasis was associated with the loss of hyperthermia.

One week after iBAT removal, the LP progeny was unable to maintain postprandial glucose homeostasis, but 2 weeks postsurgery, it was again able to do so. This return of glycemic homeostasis is likely due to the concurrence of browning of scWAT with some regrowth of iBAT or compensation by other BAT depots (30). Brown-like cells have indeed been found to develop within WAT-forming clusters of thermogenic-competent cells able to burn fuels (43,44). Hence, WAT browning under certain physiological conditions and in animal models is now well documented and preferentially observed in scWAT (43,44). Interestingly, we noticed that UCP-1 gene expression was almost not detected in the scWAT of LP sham-operated descendants, supporting the view that normoglycemia in young LP progeny results from enhanced BAT activity rather than from WAT browning.

Table 1—Circulating levels of BAT modulators in 3-month-old C and LP progenies

	C	LP	P value
Urinary noradrenaline (nmol/L)	333 ± 69	562 ± 53*	0.038
Urinary adrenaline (nmol/L)	16 ± 5	30 ± 8	0.161
Urinary dopamine (nmol/L)	1.169 ± 215	1.387 ± 381	0.640
Serum T3 (ng/mL)	0.8 ± 0.055	0.7 ± 0.033	0.317
Serum FGF21 (pg/mL)	244 ± 51	222 ± 28	0.736

Data are means ± SEM. * $P < 0.05$.

Both in animals and in humans, BAT content and activity are high in newborns and young subjects but regress with aging (16,19). We found that the BAT activity of LP progeny is maintained for a longer time than in C but eventually declines to C levels. Indeed, whereas in C progeny, UCP-1 expression gradually decreased starting at F21, in LP progeny there was an initial increase at 3 months followed by a drop to reach levels equivalent to those of C progeny by 18 months. Linked to the progressive reduction of iBAT mass and activity with age, the LP progeny becomes less protected against HFD-induced obesity and develops insulin resistance with mild hyperglycemia at 18 months. Although a series of observations indicate that BAT can combat the occurrence of obesity and insulin resistance due to its ability to burn fuels (23,24,45), its impact on diabetes predisposition remains ill-defined. Our findings strongly support the concept that the fetal development and the lactation period form a critical window for BAT adaptation and that the maintenance of an active BAT delays fetal programming of dysregulated glucose homeostasis. Indeed, exposure to maternal LP diet only during gestation leads to accelerated catch-up followed by obesity (6), whereas no obesity occurs after LP exposure until the end of lactation. Remarkably, the iBAT of the young LP has in addition a built-in resilience to dietary stress, as it is able to increase its mass on HFD. The impact of these adaptive properties of young LP iBAT has significant physiological consequences, as by modulation of not only the iBAT activity

but also its mass, the animals are protected against HFD-induced obesity and associated hyperglycemia. It is particularly noteworthy that in the young LP offspring, the adaptive BAT response suffices to govern glucose homeostasis despite severely reduced insulin secretion.

An urgent challenge is to identify how BAT senses the need to ramp up its machinery and by doing so preserves energy homeostasis. scWAT browning 2 weeks after BAT removal suggests that the reprogramming of thermogenic function in young LP progeny is likely due to circulating factors without excluding a direct reprogramming of BAT. Indeed, the burning question is whether the high BAT activity persisting in young insulinopenic LP descendants results from an adaptive tuning of progenitor cells or from postnatal metabolic adaptation. Needless to say, these non-mutually exclusive scenarios could act in concert.

Congruent with the emerging status of BAT as an integrator of complex regulation provided by both central and peripheral cues, our analysis of biological fluids and BAT itself reveals that the catecholamine, thyroid hormone, and FGF21 signaling pathways are amplified in BAT of LP versus C descendants. In response to stimuli such as noradrenaline, which increases thermogenic gene expression, activated BAT produces and secretes FGF21, which could exert an autocrine role (46). Similarly, catecholamines induce in BAT gene expression and activity of deiodinase-2, which is expected to increase the active T3 hormone (46). Hence, the amplified occurrence of these key actors in young LP offspring could explain its enhanced BAT activity.

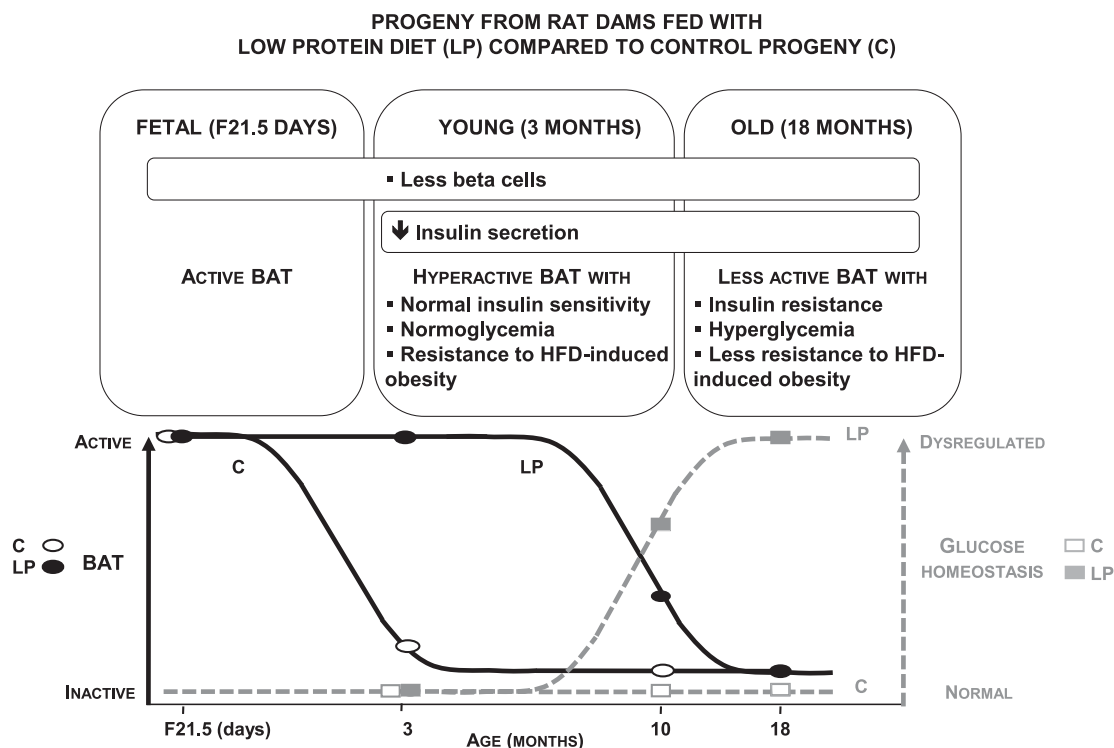


Figure 7—Schematic view of age-dependent control of energy homeostasis by BAT in progeny of rat dams fed an LP diet.

To conclude, in a rat model of maternal malnutrition, the level of iBAT activity appears to control the onset of metabolic dysregulation in predisposed LP offspring, with an initial phase showing enhanced iBAT activity at young age followed by a deactivation phase in older animals (Fig. 7). Targeting BAT-dependent energy dissipation is likely a promising means to fight obesity and associated diabetes. This could be achieved by maintaining BAT in an active state in human adults. Hence we anticipate that the discovery of the mechanisms underlying sustained activation of BAT is poised to lead to novel therapeutic interventions to manipulate EE in situations with altered metabolism such as obesity and diabetes. Finally, the improved understanding of the role of BAT in energy homeostasis will spur the discovery of prevention and remediation strategies concerning the increased risk of metabolic diseases in the descendants having suffered from a deleterious maternal nutritional environment.

Acknowledgments. The authors thank IRCAN animal housing facility and genomics core facility. The authors also thank Dr. Elise Corsetti (Université Côte d'Azur) for help with animal work and constructive discussions and Christophe Mautaurier (Université Clermont) for help with indirect calorimetry experiments.

Funding. E.-Z.A. was supported by the EU FP7 project DIABAT (HEALTH-F2-2011-278373). M.P. holds the Canada Research Chair in Diabetes and Metabolism. E.V.O. was supported by INSERM, Université Côte d'Azur, Conseil Régional PACA, Conseil Général des Alpes-Maritimes, Aviesan/AstraZeneca (Diabetes and the vessel wall injury program), the Agence Nationale de la Recherche (ANR) through ANR-RPV12004AAA (DIAMIR) "Investments for the Future" LABEX SIGNALIFE ANR-11-LABX-0028-01, and the European Foundation for the Study of Diabetes (EFS/D/Lilly, European Diabetes Research Program). E.V.O. team members are affiliated with the FHU OncoAge (<http://www.oncoage.org/>).

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

Author Contributions. O.D., E.R., D.F.P., and C.H. designed the study, researched data, and contributed to discussions and the manuscript. V.C., N.G., P.Le., H.J., and P.Lo. researched data. E.-Z.A. and M.P. contributed to discussions and the manuscript. C.J. and P.F. helped with animal work and contributed to discussions. E.V.O. designed the study and contributed to discussions and the manuscript. E.V.O. is the guarantor of this work and, as such, had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

References

- Nolan CJ, Damm P, Prentki M. Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. *Lancet* 2011;378:169–181
- Patel MS, Srinivasan M. Metabolic programming in the immediate postnatal life. *Ann Nutr Metab* 2011;58(Suppl. 2):18–28
- Rando OJ, Simmons RA. I'm eating for two: parental dietary effects on offspring metabolism. *Cell* 2015;161:93–105
- Hales CN, Barker DJ, Clark PM, et al. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ* 1991;303:1019–1022
- Ravelli AC, van der Meulen JH, Michels RP, et al. Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *Lancet* 1998;351:173–177
- Martin-Gronert MS, Ozanne SE. Experimental IUGR and later diabetes. *J Intern Med* 2007;261:437–452
- Petrik J, Reusens B, Arany E, et al. A low protein diet alters the balance of islet cell replication and apoptosis in the fetal and neonatal rat and is associated with a reduced pancreatic expression of insulin-like growth factor-II. *Endocrinology* 1999;140:4861–4873
- Snoeck A, Remacle C, Reusens B, Hoet JJ. Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas. *Biol Neonate* 1990;57:107–118
- Remacle C, Dumortier O, Bol V, et al. Intrauterine programming of the endocrine pancreas. *Diabetes Obes Metab* 2007;9(Suppl. 2):196–209
- Dahri S, Snoeck A, Reusens-Billen B, Remacle C, Hoet JJ. Islet function in offspring of mothers on low-protein diet during gestation. *Diabetes* 1991;40(Suppl. 2):115–120
- Dumortier O, Blondeau B, Duvillière B, Reusens B, Bréant B, Remacle C. Different mechanisms operating during different critical time-windows reduce rat fetal beta cell mass due to a maternal low-protein or low-energy diet. *Diabetologia* 2007;50:2495–2503
- Dumortier O, Hinault C, Gautier N, Patouraux S, Casamento V, Van Obberghen E. Maternal protein restriction leads to pancreatic failure in offspring: role of misexpressed microRNA-375. *Diabetes* 2014;63:3416–3427
- Merezak S, Reusens B, Renard A, et al. Effect of maternal low-protein diet and taurine on the vulnerability of adult Wistar rat islets to cytokines. *Diabetologia* 2004;47:669–675
- Petry CJ, Dorling MW, Pawlak DB, Ozanne SE, Hales CN. Diabetes in old male offspring of rat dams fed a reduced protein diet. *Int J Exp Diabetes Res* 2001;2:139–143
- Ozanne SE, Olsen GS, Hansen LL, et al. Early growth restriction leads to down regulation of protein kinase C zeta and insulin resistance in skeletal muscle. *J Endocrinol* 2003;177:235–241
- Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 2004;84:277–359
- Frontini A, Cinti S. Distribution and development of brown adipocytes in the murine and human adipose organ. *Cell Metab* 2010;11:253–256
- Odegaard JI, Lee MW, Sogawa Y, et al. Perinatal licensing of thermogenesis by IL-33 and ST2. *Cell* 2016;166:841–854
- Symonds ME. Brown adipose tissue growth and development. *Scientifica (Cairo)* 2013;2013:305763
- Sellayah D, Sikder D. Orexin restores aging-related brown adipose tissue dysfunction in male mice. *Endocrinology* 2014;155:485–501
- Bartelt A, Bruns OT, Reimer R, et al. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat Med* 2011;17:200–205
- Nedergaard J, Cannon B. The changed metabolic world with human brown adipose tissue: therapeutic visions. *Cell Metab* 2010;11:268–272
- Stanford KI, Middelbeek RJ, Townsend KL, et al. Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *J Clin Invest* 2013;123:215–223
- Chondronikola M, Volpi E, Børshiem E, et al. Brown adipose tissue improves whole-body glucose homeostasis and insulin sensitivity in humans. *Diabetes* 2014;63:4089–4099
- Hanssen MJ, Hoeks J, Brans B, et al. Short-term cold acclimation improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes mellitus. *Nat Med* 2015;21:863–865
- Hanssen MJ, van der Lans AA, Brans B, et al. Short-term cold acclimation recruits brown adipose tissue in obese humans. *Diabetes* 2016;65:1179–1189
- Bieswal F, Hay SM, McKinnon C, et al. Prenatal protein restriction does not affect the proliferation and differentiation of rat preadipocytes. *J Nutr* 2004;134:1493–1499
- Cannon B, Nedergaard J. Nonshivering thermogenesis and its adequate measurement in metabolic studies. *J Exp Biol* 2011;214:242–253
- Glider W. Using mammal study skins to investigate the relationship between surface area to volume ratio and mass of two size classes of mammals. *Proceedings of the Association for Biology Laboratory Education* 2011;32:346–353
- Rothwell NJ, Stock MJ. Surgical removal of brown fat results in rapid and complete compensation by other depots. *Am J Physiol* 1989;257:R253–R258
- Jousse C, Muranishi Y, Parry L, et al. Perinatal protein malnutrition affects mitochondrial function in adult and results in a resistance to high fat diet-induced obesity. *PLoS One* 2014;9:e104896
- Pisani DF, Beranger GE, Corinus A, et al. The K⁺ channel TASK1 modulates β -adrenergic response in brown adipose tissue through the mineralocorticoid receptor pathway. *FASEB J* 2016;30:909–922

33. Pisani DF, Ghandour RA, Beranger GE, et al. The ω 6-fatty acid, arachidonic acid, regulates the conversion of white to brite adipocyte through a prostaglandin/calcium mediated pathway. *Mol Metab* 2014;3:834–847
34. Schulz TJ, Huang P, Huang TL, et al. Brown-fat paucity due to impaired BMP signalling induces compensatory browning of white fat. *Nature* 2013;495:379–383
35. Lin JZ, Martagón AJ, Cimini SL, et al. Pharmacological activation of thyroid hormone receptors elicits a functional conversion of white to brown fat. *Cell Reports* 2015;13:1528–1537
36. Ozanne SE, Wang CL, Coleman N, Smith GD. Altered muscle insulin sensitivity in the male offspring of protein-malnourished rats. *Am J Physiol* 1996;271:E1128–E1134
37. Ozanne SE, Smith GD, Tikerpae J, Hales CN. Altered regulation of hepatic glucose output in the male offspring of protein-malnourished rat dams. *Am J Physiol* 1996;270:E559–E564
38. Shepherd PR, Crowther NJ, Desai M, Hales CN, Ozanne SE. Altered adipocyte properties in the offspring of protein malnourished rats. *Br J Nutr* 1997;78:121–129
39. Lee YY, Lee HJ, Lee SS, et al. Taurine supplementation restored the changes in pancreatic islet mitochondria in the fetal protein-malnourished rat. *Br J Nutr* 2011;106:1198–1206
40. Tang C, Marchand K, Lam L, et al. Maternal taurine supplementation in rats partially prevents the adverse effects of early-life protein deprivation on β -cell function and insulin sensitivity. *Reproduction* 2013;145:609–620
41. Sellayah D, Dib L, Anthony FW, et al. Effect of maternal protein restriction during pregnancy and postweaning high-fat feeding on diet-induced thermogenesis in adult mouse offspring. *Eur J Nutr* 2014;53:1523–1531
42. Sanchez-Gurmaches J, Hung CM, Guertin DA. Emerging complexities in adipocyte origins and identity. *Trends Cell Biol* 2016;26:313–326
43. Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med* 2013;19:1252–1263
44. Rosenwald M, Wolfrum C. The origin and definition of brite versus white and classical brown adipocytes. *Adipocyte* 2014;3:4–9
45. Sidossis L, Kajimura S. Brown and beige fat in humans: thermogenic adipocytes that control energy and glucose homeostasis. *J Clin Invest* 2015;125:478–486
46. Villarroya F, Cereijo R, Villarroya J, Giralt M. Brown adipose tissue as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol* 2017;13:26–35

L'augmentation de l'expression des microARNs et d'Argonaute-2 est associée à l'activation du tissu adipeux brun

Estelle Roger, Olivier Dumortier, Didier F Pisani, Nadine Gautier, Emmanuel Van Obberghen, and Charlotte Hinault

Soumis à Metabolism, Novembre 2018

Les microARNs (miARNs) sont d'importants modulateurs du tissu adipeux brun (TABr) qualifié de thermogénique. Notamment, ils ont été impliqués dans le processus d'adipogenèse brune et affectant par conséquent la fonction du TABr. L'action des miARNs nécessite au préalable la coordination de plusieurs acteurs de leur machinerie. Bien que différents acteurs de cette machinerie soient essentiels pour la différenciation du TABr, peu d'études se sont focalisées sur leur rôle dans l'activation du TABr. Le but de cette étude est d'évaluer le rôle des miARNs et d'AGO2, le médiateur en chef de l'action de répression des miARNs, dans l'activation du TABr.

Dans deux modèles non-génétiques d'activation du TABr, nous avons analysé la machinerie des miARNs et l'expression de ces derniers dans le TABr. Nous avons utilisé l'analyse en composante principale (ACP) pour avoir une vue générale de l'expression des miARNs en fonction de l'état d'activation du TABr. In vitro, nous avons évalué l'expression d'AGO2 au cours de la différenciation et de l'activation des adipocytes bruns. Finalement, nous avons bloqué l'expression AGO2 pour révéler sa contribution dans l'activation de la fonction thermogénique des adipocytes bruns.

L'ACP nous a permis de séparer les animaux en différents groupes en fonction de leur signature d'expression des miARNs. De plus, une analyse de classification hiérarchique d'expression des miARNs a révélé une corrélation positive entre la sur-expression globale des miARNs et l'état actif du TABr dans nos deux modèles. En accord avec cela, la machinerie des miARNs et particulièrement AGO2 sont surexprimés in vivo dans un TABr actif et in vitro dans des adipocytes matures. Enfin, la délétion partielle d'AGO2 dans les adipocytes bruns matures engendre une diminution de leur capacité thermogénique, reflétée par une diminution de l'expression d'UCP1 associée à une diminution de la respiration découplée.

Au-delà de l'implication de la machinerie des miARNs dans l'adipogenèse brune, notre étude révèle la contribution des miARNs et d'AGO2 dans l'activation du TABr. Tenant compte de l'importance du TABr dans la dépense énergétique, ces données suggèrent de nouvelles cibles thérapeutiques dans le domaine de l'homéostasie énergétique plus particulièrement, dans le traitement et/ou la prévention de l'obésité et du diabète de type 2.

Argonaute-2 is associated to brown adipose tissue activation

Estelle Roger^{4,5}, Olivier Dumortier⁴, Didier F Pisani⁶, Nadine Gautier^{4,6},
Emmanuel Van Obberghen^{1,3,7*} and Charlotte Hinault^{1,2,7*}

¹ University Côte d'Azur, CHU, Inserm, CNRS, IRCAN, France.

² Université Côte d'Azur, CHU, Inserm, C3M, France.

³ University Côte d'Azur, CNRS, LP2M, France.

⁴ University Côte d'Azur, Inserm, CNRS, IRCAN, France.

⁵ Université Côte d'Azur, Inserm, C3M, France.

⁶ University Côte d'Azur, CNRS, Inserm, iBV, France.

⁷ Co-senior authors.

*Correspondence:

hinault@unice.fr

C3M, Team 5

151 Route de St Antoine de Ginestière

06204 Nice cedex 3

vanobbeg@unice.fr

LP2M, Medical Faculty

27 avenue Valombrose

06107 Nice cedex 2

Keywords: Brown adipose tissue, UCP1, microRNAs, AGO2

Highlights:

- microRNA expression profile is globally upregulated in active BAT.
- AGO2 and microRNAs are enhanced in active BAT while unchanged in inactive tissue.
- The activation of brown adipocytes is associated to increased AGO2 levels.
- AGO2 knock-down is linked to reduced UCP1 levels and brown adipocyte function.

ABSTRACT

Objective: microRNAs (miRNAs) are important modulators of thermogenic brown adipose tissue (BAT). They have been involved in its differentiation and hence its function. While different regulators of the miRNA machinery have been shown to be essential for BAT differentiation, little is known about their implication in BAT activation. The aim of this work was to evaluate the role of AGO2, the chief miRNA mediator, in BAT activation.

Methods: We took advantage of two non-genetic models of BAT activation to analyze the miRNA machinery and miRNA expression in BAT. We used principal component analysis (PCA) to obtain a general overview of miRNA expression according to the BAT activation state. In vitro, we examined AGO2 expression during brown adipocyte differentiation and activation. Finally, we downregulated AGO2 to reveal its potential role in the thermogenic function of brown adipocytes.

Results: PCA analysis allowed us to cluster animals based on their miRNA signature in active BAT. Moreover, hierarchical clustering showed a positive correlation between global upregulation of miRNA expression and active BAT in our two rat models. Consistent with this, the miRNA machinery and particularly AGO2 was upregulated in vivo in active BAT and in vitro in mature brown adipocytes. Finally, the partial loss-of-function of AGO2 in mature brown adipocytes is sufficient to lead to a diminished expression of UCP1 associated to a decreased uncoupled respiration.

Conclusions: Beyond the role of miRNA machinery regulators in brown adipogenesis, our study shows the potential contribution of AGO2 in BAT activation. Since BAT is a calorie-burning tissue these data have a translational potential in terms of therapeutic target in the field of altered fuel homeostasis associated to obesity and diabetes.

1. INTRODUCTION

Organismal homeostasis allowing regulation of body weight and adiposity is achieved through a fine-tuned balance between energy expenditure and energy intake. Contrary to the white adipose tissue (WAT) specialized in energy storage, brown adipose tissue (BAT) mainly dissipates energy by producing heat via the perturbation of the mitochondrial electron transport chain through the tissue specific expression of uncoupling protein1 (UCP1), a process called non-shivering thermogenesis [1, 2]. This tissue is specialized in the maintenance of body temperature in response to cold, and in the dissipation of fuel excess under specific conditions [1, 3-5]. As BAT appears to be present and active in various regions of the adult human body [6-10], it sparks speculation of novel treatments of obesity and/or diabetes by virtue of its energy-wasting function [10-13].

The development and function of brown adipocytes are tightly regulated by non-coding RNAs [14, 15]. Among these non-coding RNAs are microRNAs (miRNAs) acting as single-stranded 20- to 22-nucleotide-long RNAs. Generally speaking, they regulate gene expression by specifically binding to the 3' untranslated region of targeted mRNAs to tailor the protein output by mRNA destabilization and/or translational repression [16, 17]. In animals, miRNAs are synthesized and regulated by a specific machinery, which includes as main players DROSHA, Exportin-5 (EXP5), DICER and Argonaute-2 (AGO2). The mammalian genome encodes several hundreds of miRNAs amongst which several have been implicated in cardinal cellular processes such as proliferation, differentiation and metabolism [16]. In the field of BAT metabolism, specific miRNAs including the miR-193b-365 cluster, miR-133 or miR-455 have been found to be involved in brown adipocyte differentiation fostering glucose and lipid oxidation [18-22]. At a more general level, the miRNA-processing machinery has been implicated in brown adipocyte determination and differentiation. In a pioneer study, Mori et al reported that DICER invalidation in BAT induces its inactivation [23]. Further, in vivo partial DICER deficiency in BAT predisposes mice to obesity-associated deterioration of glucose homeostasis, highlighting the importance of the miRNA machinery in the differentiation of brown adipocytes [24].

Despite these clear advances in our knowledge on the role of miRNAs and their machinery in BAT differentiation, a conceptual gap remains as far as the role of the miRNA machinery in BAT activation is concerned.

In this study, we examined two non-genetically modified rat models in which BAT is activated either by β -3 adrenergic receptor agonist treatment or as occurring at young age in BAT from fetal-programmed diabetic rats. In the latter, insulinopenic young offspring of rat dams exposed to a low protein diet (LP) during pregnancy and lactation benefit from metabolic

1 adaptation through BAT activation securing normoglycemia [5]. Taking advantage of these
2 models, together with additional cellular in vitro approaches, we sought to directly examine
3 the miRNA machinery and particularly AGO2, the chief mediator of miRNA function, in BAT
4 activation.
5
6
7
8

9 2. MATERIALS AND METHODS

10 2.1. Animals

11 All procedures were conducted in accordance with EU directives for animal experiments and
12 INSERM guidelines and were approved by the Research Ministry (MESR 00825, MESR
13 0521, MESR-00500.02 and APAFIS 3897- 2016012217578333) and local ethics committee
14 (CNREEA no. 28). The Wistar rats were provided by Janvier (Le Genest Saint Isle, France),
15 housed two per cage and subjected to a 12-h light/dark cycle at 22–23°C, which is close to
16 the rat thermoneutrality [25]. For the pharmacological BAT activation model, 3 month-old
17 Wistar male rats were daily injected intraperitoneally with a β -3 adrenergic receptor agonist
18 CL316, 243 (1 mg/kg in physiologic NaCl solution, C5976, Sigma-Aldrich) for 7 days. Control
19 rats were injected with vehicle only. For the LP model, pregnant 200-250 g Wistar rats were
20 fed during gestation and lactation with a control (C) diet (20% [weight for weight] protein) or
21 an isocaloric LP diet (8% [weight for weight] protein) (Hope Farm, Woerden, the Netherlands)
22 [5, 26]. After weaning at 4 weeks, male offspring were fed ad libitum with the animal facility
23 standard diet. At least three different litters were studied in each group for all experiments [5,
24 27]. For adipose tissue-derived stromal vascular fraction (SVF) isolation, 3 month-old Wistar
25 rats were used.
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

41 2.2. Adipose tissue-derived SVF culture

42 Animals were euthanized by the intraperitoneal injection of Dolethal (1mL/kg). Adipose
43 tissue-derived SVF culture was performed as described [28]. Briefly, interscapular brown fat
44 depots (iBAT) separated from the attached white adipose tissue (WAT) were excised, rinsed
45 in bovine serum albumin (BSA)-buffer medium and minced. Minced samples were then
46 digested in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM, Life Technologies) containing 2
47 mg/mL Type IV collagenase (Sigma-Aldrich, 125 U/mg) and 20 mg/mL BSA (Fraction V,
48 Fatty Acid Free, Ig Free, EUROMEDEX) with mild agitation for 45 min à 37°C. After the
49 addition of DMEM containing 10% (v/v) FBS (Fetal Bovine Serum), digested tissues were
50 filtered through 250, 100 and 37 μ m nylon mesh (SEFAR Nitex), and centrifuged for 10 min
51 at 1000 rpm. The pellet containing SVF cells was submitted to red blood lysis buffer (Sigma-
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 Aldrich). SVF cells were seeded and maintained in DMEM 4.5 g/L glucose-glutamax-I (Life
2 Technologies) containing 10% (v/v) FBS and 15 mM HEPES (Gibco, Life Technologies) until
3 confluence. The brown adipocyte differentiation was induced in the same medium using a
4 cocktail of 1 μ M dexamethasone (Sigma-Aldrich), 500 μ M isobutyl-methylxanthine (IBMX-
5 Sigma), 860 nM insulin (Novo Nordisk), 2 nM triiodothyronine (T3, Sigma-Aldrich) and 1 μ M
6 rosiglitazone (Cayman Chemical). After two days, dexamethasone and IBMX were removed
7 and cells were maintained in a medium changed every two days containing 20 nM insulin, 2
8 nM thyroid hormone T3 and 1 μ M rosiglitazone for 5 to 8 additional days.
9

10
11
12
13 siRNA transfections were performed in iBAT-derived SVF mature adipocytes at day 7 with 50
14 nmol/L of siAGO2 (siRNA SMART Pool ON-Target plus Rat AGO2, 59117, Dharmacon) or
15 siControl (ON-TARGETplus Non-targeting Pool D-001810-10, Dharmacon) according to
16 manufacturer's procedure using Lipofectamine RNAimax (Thermofischer Scientific) adapted
17 from previously described procedures [29, 30]. Cells were analyzed 72 h after transfection
18 corresponding to day 10 of differentiation.
19
20
21
22
23

24 25 26 27 2.3. RNA extraction and RT-qPCR

28
29 The procedures were carried out according to MIQE recommendations [31]. Total RNA from
30 iBAT, scWAT or adipose-derived SVF cells were isolated with TRIzol reagent (Invitrogen).
31 For tissue dissociation, a Precellys homogenizer (Ozyme, St. Quentin, France) was used.
32 Total RNA (1 μ g) was reverse transcribed with RT kit (Qiagen/Promega) and qPCR analyses
33 performed with SYBR Green (StepOnePlus ABI Detector System). The cDNA amount used
34 in each reaction was normalized to the housekeeping gene 36B4. The relative expression
35 was determined using a comparative method of 2-ddCt and the relative abundance with 2-
36 dCt. Primer sequences used are described in Supplementary Table 1.
37
38
39
40
41
42
43
44

45 46 2.4. miRNA expression profile

47
48 miRNA quantitative PCR array analysis was performed using the rno-mirNome miRNA
49 profiling kit (RA680A-1 for 390 rat-specific miRNAs or RA680B-1 for 723 rat-specific miRNAs,
50 System Biosciences). Briefly, 1 μ g of total RNA for each sample was reverse transcribed with
51 the Quanti-mir Kit (System Biosciences). The amplification of miRNAs was performed with
52 miRNA-specific rat primers using SybrGreen technology (Applied Biosystem). Expression
53 levels were normalized to U6 reference gene as endogenous control since its melting curve
54 was more satisfactorily compared with that obtained for the two other reference genes. The
55 relative expression was determined using a comparative method of 2-ddCt and the relative
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 abundance with 2-dCt. Principal Component Analysis (PCA) plots based on detected
2 miRNAs and hierarchical clustering analyses with significantly dysregulated miRNAs were
3 created using Phantasus (<https://artyomovlab.wustl.edu/phantasus/>).
4
5
6

7 2.5. Western blotting

8 Homogenized iBAT or iBAT-derived SVF cells were processed for protein extraction and
9 western blotting as described [23]. Antibody to AGO2 was from Cell Signaling Technology, to
10 UCP1 from Calbiochem (Merck KGA, Darmstadt, Germany) and to tubulin from Sigma (St
11 Louis, USA). Western blots were quantified by densitometry with Image Quant software.
12
13
14
15
16
17

18 2.6. Oxygen consumption measurement

19 For the respirometry quantifications, iBAT-derived SVF cells were seeded into Seahorse
20 XFe96 microplate-based respirometry plates (Agilent) and grown to confluency in the
21 proliferation medium. After 7 days of differentiation, cells were transfected. 72 hours post-
22 transfection, medium was replaced by prewarmed unbuffered Seahorse Assay Medium
23 (Agilent) supplemented with 2 mM glutamine (Gibco, Life Technologies), 1 mM pyruvate
24 (Gibco, Life Technologies) and 10 mM glucose, pH 7.4. Oxygen Consumption Rate (OCR)
25 was determined using an XFe96 Extracellular Flux Analyzer at 37°C (Seahorse Bioscience,
26 Agilent). Uncoupled and maximal OCR were determined using oligomycin (Sigma-Aldrich,
27 1.2 µM) and FCCP injection (Sigma-Aldrich, 0.8 µM) after treatment or not with isoproterenol
28 (Cayman Chemicals, 1 µM) incubations, and rotenone and antimycin A (Sigma-Aldrich, 1µM
29 each) were used to inhibit Complex I and Complex III dependent respiration, respectively, to
30 assess the contribution of non-mitochondrial respiration. All data presented are mean values
31 +/- SEM of three independent experiments with 8-12 replicate wells each.
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43

44 2.7. Lipolysis assay

45 72 h post-transfection, cells were changed with medium containing 0.5 % (w/v) fatty acid-free
46 BSA (Euromedex) and incubated with 1 µM isoproterenol (Cayman Chemicals) during 1h30.
47 Glycerol content was analyzed in 50 µl of incubating medium at the beginning and the end of
48 the experiment. At the end of the experiment, cells were rinsed with PBS 1X and protein
49 content was determined using BCA Protein assay (Interchim).
50
51
52
53
54

55 2.8. Statistical analyses

56 Significant differences between two groups were assessed by unpaired or paired Student's t-
57 test and two-way ANOVA test followed by post hoc Fisher test when more than two
58
59
60
61
62
63
64
65

1 conditions were analyzed. A p-value <0.05 was considered as statistically significant. All bars
2 shown represent mean +/- Standard Error Mean (SEM).
3
4
5

6 3. RESULTS 7

8 3.1. The miRNA machinery and miRNAs are upregulated in drug-activated iBAT. 9

10 To investigate whether the miRNA machinery is involved in the regulation of the iBAT
11 activity, we daily intra-peritoneally injected 3 month-old control rats for 1 week with the β -3
12 adrenergic receptor agonist, CL316,243, well-known to activate brown adipocytes [4, 32]. As
13 expected, an increase in the iBAT mass is observed in CL316,243-treated rats in addition to
14 the key characteristics of an hyperactive BAT with rare lipid droplets associated with
15 upregulated UCP1 expression (Supplementary Figure 1 A-E). By measuring gene expression
16 of major players in the miRNA machinery we observed that DROSHA, EXP5 and AGO2 are
17 increased in the iBAT of CL316,243-treated rats with the highest fold for AGO2 (Fig. 1A).
18 AGO2 is also augmented at the protein level concomitantly with increased UCP1 protein
19 (Fig. 1B). We then performed a global miRNA expression profile in this active iBAT using a
20 quantitative PCR-based miRNA profiler for which 99 % of 390 available rat-specific analyzed
21 miRNAs were detected. Among these miRNAs, 38 miRNAs are dysregulated corresponding
22 to 9.7% of detectable miRNAs in CL316,243-treated rats compared to controls. The principal
23 component analysis (PCA) shows that biological replicates in each condition are clustered
24 close together on the plot and reveals a distinct pattern of the miRNA expression profile
25 between CL316,243-treated rats and NaCl-injected rats (Fig. 1C). The volcano plot depicting
26 the relationship between the fold change of the miRNA expression and their statistical
27 significance shows that 74% of the significantly dysregulated miRNAs are upregulated in the
28 iBAT of CL316,243-treated rats, with 28 upregulated miRNAs for 10 downregulated miRNAs
29 (Fig.1D, Supplementary Table 2). Specifically, the PCA plot and hierarchical clustering of
30 these significantly dysregulated miRNAs clearly identify the two experimental groups
31 (Supplementary Figure 1F-G), which are even more apart than in the analysis of all detected
32 miRNAs (Fig.1.C). Moreover, the upregulated miRNAs are globally among the weakly
33 expressed miRNAs in the iBAT, while the downregulated ones are among the most abundant
34 ones (Supplementary Table 2). Taken as a whole, these data unveil that in active iBAT the
35 over-all upregulation of miRNA expression occurs together with an augmented miRNA
36 machinery, particularly concerning AGO2.
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

3.2. The expression of the miRNA machinery correlates with the iBAT activation state in LP progeny.

We next took advantage of the LP model in which we have recently reported that the iBAT is a decisive determinant of metabolic dysregulation [5]. We observed that the gene expression levels of miRNA machinery elements, including DROSHA, EXP5, DICER and AGO2, are increased in the active iBAT of the young LP progeny compared to their controls (Fig. 2A), with the highest increment for AGO2. Importantly, in the inactive iBAT of the old LP progeny their gene expression levels are similar to those of the control progeny. However, in LP progeny DICER stands out with a nearly significant decrease (Fig. 2B), which is consistent with a previous report [33]. In the young LP descendants, AGO2 is also increased at the protein level correlated with the increase in UCP1 (Fig. 2C). Importantly, both AGO2 and UCP1 show no difference in their protein expression levels in the iBAT of the 18 month-old LP progeny compared to their controls (Fig. 2D). Further, we measured the gene expression levels of the miRNA machinery in scWAT of young C and LP descendants. We have previously published the absence of browning in the scWAT of young LP progeny [5]. Consistent with this we did not observe differences between both groups for any of the miRNA machinery actors (Supplementary Figure 2A). However, the surgical ablation of the iBAT in these LP animals was able to induce the expression of UCP1 in the scWAT [5]. Interestingly, the gene expression level of AGO2 is significantly augmented in the scWAT of the iBAT-ablated LP progeny compared to the sham-operated rats (Supplementary Figure 2B). To sum up, the increased expression of the miRNA machinery ties in with the active thermogenic state of the iBAT in young LP progeny and the browning of the scWAT in the iBAT-ablated LP progeny.

3.3. In young LP progeny the upregulation of miRNAs in iBAT is linked to its active state

We performed a side-by-side analysis of the miRNA expression profile between the active iBAT of young normoglycemic LP progenies and the inactive iBAT of old hyperglycemic LP progenies compared to their respective controls (Fig.3). We were able to detect respectively 90% and 95% of the 723 available rat-specific miRNAs screened. The PCA on all detected miRNAs clearly differentiates LP progeny samples from those from controls at 3 months of age (Fig. 3A), whereas they are mixed at 18 months of age (Fig. 3B). The volcano plot shows that 85% of miRNAs are upregulated in the iBAT of the young LP progeny, with 53 upregulated miRNAs and 9 downregulated ones (Fig. 3 C, Supplementary Table 3). In the iBAT of the old LP progeny three times less miRNAs are significantly dysregulated (Fig. 3 D).

1 Consistent with the global analysis, both the PCA plot and hierarchical clustering of the
2 significantly dysregulated miRNAs identify two clearly separated groups in young progenies,
3 contrary to old progenies, having overlapping patterns. (Supplementary Figure 3A-D).
4 Interestingly, upregulated miRNAs with the highest fold of induction are among the most
5 weakly expressed in the iBAT of young progenies, and those downregulated are among the
6 most robustly expressed (Supplementary Table 3). Remarkably, of the 62 miRNAs
7 dysregulated in the young LP iBAT only 2 miRNAs remain dysregulated in the old LP iBAT
8 but with a lower fold-change. The expression of the other miRNAs drops back to control
9 levels (Supplementary Figure 3C-D, Table 3). To summarize, these data gathered in the
10 young LP progeny benefitting from metabolic adaptation through iBAT activation indicate that
11 upregulation of miRNA expression and of its machinery is intimately associated to an active
12 iBAT.
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22

23 3.4. AGO2 mRNA and protein levels are increased during brown adipocyte 24 differentiation and activation. 25

26 While generally speaking the miRNA machinery has already been implicated in the process
27 of brown adipogenesis, notably for DICER [23], here we focused on AGO2. We firstly
28 measured the gene expression level of the players in the miRNA machinery during the brown
29 adipocyte differentiation of progenitor cells from SVF isolated from the iBAT of control rats
30 (Fig. 4A). The characterization of these cells is presented in Supplementary Figure 4
31 showing notably the induction of UCP1 expression from day 0 to day 7 of the brown
32 adipocyte differentiation process. We observed a progressive induction of the miRNA
33 machinery gene expression during the brown differentiation for DICER and AGO2 with a
34 significant fold in the terminal days (D5-7) when adipocytes become mature (Fig. 4B).
35 Consistent with this, a gradual increase in AGO2 protein expression was found during brown
36 adipocyte differentiation (Fig. 4C). Increased AGO2 gene expression was also seen in the
37 terminal phase (D7) of brown-like adipocyte differentiation obtained with scWAT-derived SVF
38 (Supplementary Figure 4F). Next we were interested to establish whether AGO2 is involved
39 in the activation of brown adipocytes by treating iBAT-derived mature adipocytes at day 7 of
40 the differentiation with isoproterenol (Fig. 4D-E). Remarkably, AGO2 gene and protein levels
41 are augmented after 6h treatment with the β 3-adrenergic receptor-agonist isoproterenol
42 concomitantly with the expected increase in UCP1 gene and protein levels. In aggregate,
43 AGO2 augments not only during differentiation of brown adipocytes, but also during their
44 activation.
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 3.5. AGO2 contributes to efficient mitochondrial respiration in brown
5 adipocytes.
6
7

8 To directly assess the involvement of AGO2 in brown adipocyte activation we transfected
9 siRNA to AGO2 in mature iBAT-derived SVF adipocytes (Fig. 5A). 72h post-transfection,
10 AGO2 gene and protein expression levels are decreased by 50% (Fig. 5B-C). Interestingly,
11 the inhibition of AGO2 causes a decrease in UCP1 gene and protein expression levels (Fig.
12 5B-C). To examine the impact of diminished UCP1 levels on brown adipocyte activity,
13 lipolysis was analyzed by measuring glycerol content after isoproterenol treatment (Fig. 5D).
14 No difference between siAGO2 and siCTRL transfected cells was observed. We next
15 evaluated the mitochondrial function by measuring the oxygen consumption rate (Fig. 5 E-H).
16 Strikingly, the downregulation of AGO2 leads to a significant drop in the basal oxygen
17 consumption rate without affecting maximal mitochondrial respiration (Fig. 5 E-F). Moreover,
18 uncoupled respiration, unstimulated but also after isoproterenol treatment, is decreased in
19 siAGO2 transfected mature brown adipocytes (Fig. 5 G-H). In conclusion, the transfection of
20 siAGO2 in mature brown adipocytes leads to half inhibition of UCP1 expression resulting in a
21 decrement in the basal mitochondria activity and the uncoupling activity. As a whole, the data
22 are compatible with the idea that downregulation of AGO2 in mature brown adipocytes could
23 result in a partial loss of their thermogenic activity.
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37

38 4. DISCUSSION
39
40
41

42 BAT has received increasing attention the past decade owing to its ability to burn fuels
43 through uncoupling of the mitochondrial proton gradient. Both in animals and humans, BAT
44 content and activity are high in newborns but regress with aging. The understanding of the
45 mechanisms by which BAT can be maintained in adulthood in an active state is hoped to
46 lead to novel means to combat the development of metabolic disorders due to fuel excess.
47 Our study unveils the potential role of the chief miRNA mediator, AGO2, [16, 17], in the
48 activation of BAT. We found that among the different miRNA machinery regulators, AGO2
49 levels are increased with the highest fold in active iBAT of rats chronically-injected with β -
50 adrenergic receptor agonist. Such treated rats are a well-accepted physiological model for
51 BAT activation [4, 32]. Similarly, using the LP rat model in which we have previously shown
52 that BAT plays an important role in energy homeostasis, we report now that AGO2 levels are
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 also positively correlated to the iBAT activation state [5]. Interestingly, the increase in AGO2
2 is associated to the induction of low abundant miRNAs in iBAT. Remarkably, we found that
3 after its gradual increase during brown adipogenesis, the AGO2 level further augments
4 during the activation of mature brown adipocytes. To delve into the consequences of
5 changes in AGO2 level we focused on BAT thermogenic activity in mature iBAT-derived SVF
6 adipocytes. Of note, the siRNA-induced downregulation of AGO2 in mature brown
7 adipocytes results in the decrease in UCP1 levels to the same extent. Consequently, the
8 mitochondrial oxygen consumption is diminished in basal condition and after oligomycin
9 treatment in presence or in absence of isoproterenol. As oligomycin allowed the evaluation of
10 respiration uncoupled to ATP synthesis, this measurement partly reflects the UCP1
11 uncoupling activity of mature brown adipocytes.
12
13
14
15
16
17
18
19

20 Among the chief proteins of the miRNA machinery, DICER and DGCR8 have previously
21 been shown to play a key role in adipocyte metabolism [23, 33-35]. Indeed, the partial
22 deletion of DICER specifically in BAT, to comparable levels observed during aging or obesity,
23 alters the differentiation of brown adipocytes and consequently the function of the tissue,
24 eventuating in deterioration of organismal glucose homeostasis [24]. In particular, this
25 deletion coincides with global miRNA downregulation associated with decreased BAT
26 activity, leading to increased sensitivity to cold and high fat diet in these mice [24]. In this
27 study, the comparative analysis of miRNA expression profile in iBAT from different animal
28 models has shown that long-lived mice benefit from upregulation of miRNAs with more active
29 BAT, while progeroid mice present downregulation of these miRNAs with inactive BAT [24].
30 These data are consistent with our work demonstrating the upregulation of more than 70% of
31 miRNAs in the active iBAT of both CL316,243-injected rats, and of young LP rat progeny. In
32 stark contrast, this miRNA set has returned to control levels in the inactive iBAT of old LP
33 progeny. Importantly, among the key elements of the miRNA machinery AGO2 is
34 systematically robustly increased in active BAT, whereas the others, including DICER, are
35 less impacted. This observation fits with the idea that the augmented number of miRNAs
36 need more AGO2 to be functional.
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

50 Using differentiated adipocytes we avoid possible confounding effects of AGO2 on the
51 process of adipogenesis. Indeed, a previous study performed in stable 3T3-L1 preadipocytes
52 has found that AGO2 downregulation does not substantially influence white adipogenesis.
53 MiRNAs previously described to be involved in brown adipocyte terminal differentiation or
54 browning induction, such as miR133, miR-27, miR-378, miR455 or miR193b-365 cluster, are
55 well expressed in the active iBAT from CL316,243-injected rats or young LP progeny [18-22].
56 However, no significantly increased expression was observed for these miRNAs compared to
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 their respective controls, while AGO2 levels are enhanced. In fact, the two situations that we
2 studied correspond to BAT activation models through either pharmacological drug treatment
3 or adaptive response rather than models of BAT differentiation or of WAT browning
4 induction. Indeed, to observe clearly detectable WAT browning in these models CL316,243
5 treatment has to be longer than 7 days [32, 36] or iBAT has to be removed in the LP progeny
6 [5]. This could explain why miRNAs involved in BAT terminal differentiation or browning
7 induction are not enhanced in iBAT of these models. Taken as a whole our data suggest the
8 involvement of AGO2 in the activation of iBAT rather than in the promotion of brown tissue
9 differentiation. Further investigations are required to decipher how AGO2 is able to regulate
10 brown adipocyte activity through modulation of UCP1 levels.
11
12
13
14
15
16
17

18 Importantly, in mammals BAT development occurs predominantly at the end of gestation [13,
19 37, 38]. It becomes fully functional at birth, when it is needed for the effective adaptation to
20 the extra-uterine environment. This suggests that the in utero environment plays an
21 important role in preparing the peri-natal functional development of BAT. We have recently
22 reported that young offspring of rat dams exposed to a LP diet during pregnancy and
23 lactation benefit from metabolic adaptation through BAT activation allowing the maintenance
24 of organismal glucose homeostasis despite a pronounced insulin secretion defect [5]. We
25 have provided solid evidence that the normoglycemia, despite collapsed insulin secretion,
26 seen in the young LP progeny is likely due for the greater part to hyperactive BAT.
27 Observations concerning developmental programming of adult disease are being gathered in
28 favor of a key role for miRNAs in gene expression regulation [26, 39-41]. Here, we show that
29 the increase in miRNA machinery, particularly AGO2, is closely associated to active iBAT,
30 which is instrumental in maintaining glucose homeostasis in young LP progeny. Our data
31 dovetail with recent reports showing AGO2 involvement in the adaptive response to face an
32 environmental stress in β -cells [42] or in hepatocytes [43, 44]. Indeed, the loss of AGO2 in β -
33 cells during insulin resistance inhibits compensatory β -cell hyperplasia [42] and in
34 hepatocytes, it leads to reduced hepatic glucose production coupled to decreased fasting
35 glycemia [43, 44]. Note that in the study by Nakamura et al. in mice the liver-specific
36 knockout of AGO2 leads to increased mitochondrial metabolism [44], which is different from
37 our observations in rats showing partial siRNA-induced AGO2 insufficiency in BAT to be
38 associated to decreased mitochondrial respiration. This divergence could be due to several
39 factors including the obviously different role of the liver versus the BAT in energy
40 expenditure, the organ specific miRNA targets as well as miRNA environment affecting the
41 miRNA/AGO2 interactions and the animal species.
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57

58 To summarize, the above-mentioned publications together with our study highlight the crucial
59 importance of AGO2, the key RNA-binding protein mediating miRNA functioning, in adaptive
60
61
62
63
64
65

1 responses to environmental stress. Therefore, we would like to suggest that a deleterious
2 intra-uterine fetal setting or a post-natal environmental stress could reprogram BAT's
3 physiology and metabolism through the miRNA machinery to face forthcoming or present
4 energetic challenges.
5
6
7
8
9

10 11 5. CONCLUSION

12
13
14 The key message of our work is that the AGO2 protein potentially contributes to BAT
15 activation. The coordinated increase in AGO2 protein and miRNA expression correlate with
16 the active state of iBAT in two non-genetic rat models. Conversely, the downregulation of
17 AGO2 in mature brown adipocytes induces a phenotype compatible with decreased
18 thermogenic activity. While the fundamental mechanistic underpinnings have to be parsed
19 out, our findings have translational potential in the field of altered fuel homeostasis
20 associated to obesity and diabetes. It stands to reason that the discovery of means to
21 enhance the miRNA machinery leading to BAT activation could be a promising asset for
22 future therapies of conditions with dysregulated energetic metabolism.
23
24
25
26
27
28
29

30 31 ACKNOWLEDGEMENTS

32
33 The authors thank IRCAN animal housing facility and genomics core facility.
34
35
36
37

38 39 DECLARATION OF INTERESTS

40
41 The authors declare that there is no conflict of interest associated with the manuscript.
42
43
44

45 46 AUTHOR CONTRIBUTIONS

47
48 E.R., O.D., D.F.P. designed the study, researched data, and contributed to discussions and
49 manuscript. N.G. researched data. E.V.O. designed the study, contributed to the discussions
50 and manuscript. C.H. designed the study, researched data, and contributed to discussions
51 and manuscript.
52
53
54

55 56 FUNDING

57
58 E.V.O team was supported by Inserm, University Côte d'Azur, Conseil Régional PACA,
59 Conseil Général des Alpes-Maritimes, Aviesan/AstraZeneca, "Diabetes and the vessel wall
60
61
62
63
64
65

1 injury” program, by the Agence Nationale de la Recherche (ANR) through ANR-
2 RPV12004AAA (DIAMIR) ‘Investments for the Future’ LABEX SIGNALIFE #ANR-11-LABX-
3 0028-01, European Foundation for the Study of Diabetes (EFSD/Lilly; European Diabetes
4 Research Program). EVO team members are affiliated to the FHU OncoAge
5 (<http://www.oncoage.org/>).
6
7
8
9

10 REFERENCES

- 11 [1] Cannon B., Nedergaard J., 2004. Brown adipose tissue: function and physiological
12 significance. *Physiological reviews* 84:277-359.
- 13 [2] Townsend K.L., Tseng Y.H., 2014. Brown fat fuel utilization and thermogenesis. *Trends in*
14 *endocrinology and metabolism: TEM* 25:168-177.
- 15 [3] Schulz T.J., Tseng Y.H., 2013. Brown adipose tissue: development, metabolism and
16 beyond. *The Biochemical journal* 453:167-178.
- 17 [4] Pradhan R.N., Zachara M., Deplancke B., 2017. A systems perspective on brown
18 adipogenesis and metabolic activation. *Obesity reviews : an official journal of the*
19 *International Association for the Study of Obesity* 18 Suppl 1:65-81.
- 20 [5] Dumortier O., Roger E., Pisani D.F., Casamento V., Gautier N., Lebrun P., Johnston H.,
21 Lopez P., Amri E.Z., Jousse C., Fafournoux P., Prentki M., Hinault C., Van Obberghen E.,
22 2017. Age-Dependent Control of Energy Homeostasis by Brown Adipose Tissue in Progeny
23 Subjected to Maternal Diet-Induced Fetal Programming. *Diabetes* 66:627-639.
- 24 [6] Cypess A.M., Lehman S., Williams G., Tal I., Rodman D., Goldfine A.B., Kuo F.C., Palmer
25 E.L., Tseng Y.H., Doria A., Kolodny G.M., Kahn C.R., 2009. Identification and importance of
26 brown adipose tissue in adult humans. *The New England journal of medicine* 360:1509-1517.
- 27 [7] Saito M., Okamatsu-Ogura Y., Matsushita M., Watanabe K., Yoneshiro T., Nio-Kobayashi
28 J., Iwanaga T., Miyagawa M., Kameya T., Nakada K., Kawai Y., Tsujisaki M., 2009. High
29 incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of
30 cold exposure and adiposity. *Diabetes* 58:1526-1531.
- 31 [8] van Marken Lichtenbelt W.D., Vanhommerig J.W., Smulders N.M., Drossaerts J.M.,
32 Kemerink G.J., Bouvy N.D., Schrauwen P., Teule G.J., 2009. Cold-activated brown adipose
33 tissue in healthy men. *The New England journal of medicine* 360:1500-1508.
- 34 [9] Virtanen K.A., Lidell M.E., Orava J., Heglind M., Westergren R., Niemi T., Taittonen M.,
35 Laine J., Savisto N.J., Enerback S., Nuutila P., 2009. Functional brown adipose tissue in
36 healthy adults. *The New England journal of medicine* 360:1518-1525.
- 37 [10] Chondronikola M., Volpi E., Borsheim E., Porter C., Saraf M.K., Annamalai P., Yfanti C.,
38 Chao T., Wong D., Shinoda K., Labbe S.M., Hurren N.M., Cesani F., Kajimura S., Sidossis
39 L.S., 2016. Brown Adipose Tissue Activation Is Linked to Distinct Systemic Effects on Lipid
40 Metabolism in Humans. *Cell metabolism* 23:1200-1206.
- 41 [11] Mukherjee J., Baranwal A., Schade K.N., 2016. Classification of Therapeutic and
42 Experimental Drugs for Brown Adipose Tissue Activation: Potential Treatment Strategies for
43 Diabetes and Obesity. *Current diabetes reviews* 12:414-428.
- 44 [12] Thyagarajan B., Foster M.T., 2017. Beiging of white adipose tissue as a therapeutic
45 strategy for weight loss in humans. *Hormone molecular biology and clinical investigation* 31.
- 46 [13] Betz M.J., Enerback S., 2015. Human Brown Adipose Tissue: What We Have Learned
47 So Far. *Diabetes* 64:2352-2360.
- 48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1 [14] Amri E.Z., Scheideler M., 2017. Small non coding RNAs in adipocyte biology and
2 obesity. *Molecular and cellular endocrinology* 456:87-94.
- 3 [15] Goody D., Pfeifer A., 2018. MicroRNAs in brown and beige fat. *Biochimica et biophysica*
4 *acta*.
- 5 [16] Bartel D.P., 2018. Metazoan MicroRNAs. *Cell* 173:20-51.
- 6 [17] Creugny A., Fender A., Pfeffer S., 2018. Regulation of primary microRNA processing.
7 *FEBS letters* 592:1980-1996.
- 8 [18] Sun L., Xie H., Mori M.A., Alexander R., Yuan B., Hattangadi S.M., Liu Q., Kahn C.R.,
9 Lodish H.F., 2011. Mir193b-365 is essential for brown fat differentiation. *Nature cell biology*
10 13:958-965.
- 11 [19] Trajkovski M., Ahmed K., Esau C.C., Stoffel M., 2012. MyomiR-133 regulates brown fat
12 differentiation through Prdm16. *Nature cell biology* 14:1330-1335.
- 13 [20] Zhang H., Guan M., Townsend K.L., Huang T.L., An D., Yan X., Xue R., Schulz T.J.,
14 Winnay J., Mori M., Hirshman M.F., Kristiansen K., Tsang J.S., White A.P., Cypess A.M.,
15 Goodyear L.J., Tseng Y.H., 2015. MicroRNA-455 regulates brown adipogenesis via a novel
16 HIF1an-AMPK-PGC1alpha signaling network. *EMBO reports* 16:1378-1393.
- 17 [21] Price N.L., Fernandez-Hernando C., 2016. miRNA regulation of white and brown
18 adipose tissue differentiation and function. *Biochimica et biophysica acta* 1861:2104-2110.
- 19 [22] Chen Y., Pan R., Pfeifer A., 2017. Regulation of brown and beige fat by microRNAs.
20 *Pharmacology & therapeutics* 170:1-7.
- 21 [23] Mori M.A., Thomou T., Boucher J., Lee K.Y., Lallukka S., Kim J.K., Torriani M., Yki-
22 Jarvinen H., Grinspoon S.K., Cypess A.M., Kahn C.R., 2014. Altered miRNA processing
23 disrupts brown/white adipocyte determination and associates with lipodystrophy. *The Journal*
24 *of clinical investigation* 124:3339-3351.
- 25 [24] Oliverio M., Schmidt E., Mauer J., Baitzel C., Hansmeier N., Khani S., Konieczka S.,
26 Pradas-Juni M., Brodesser S., Van T.M., Bartsch D., Bronneke H.S., Heine M., Hilpert H.,
27 Tarcitano E., Garinis G.A., Frommolt P., Heeren J., Mori M.A., Bruning J.C., Kornfeld J.W.,
28 2016. Dicer1-miR-328-Bace1 signalling controls brown adipose tissue differentiation and
29 function. *Nature cell biology* 18:328-336.
- 30 [25] Cannon B., Nedergaard J., 2011. Nonshivering thermogenesis and its adequate
31 measurement in metabolic studies. *J Exp Biol* 214:242-253.
- 32 [26] Dumortier O., Hinault C., Gautier N., Patouraux S., Casamento V., Van Obberghen E.,
33 2014. Maternal protein restriction leads to pancreatic failure in offspring: role of
34 misexpressed microRNA-375. *Diabetes* 63:3416-3427.
- 35 [27] Rothwell N.J., Stock M.J., 1989. Surgical removal of brown fat results in rapid and
36 complete compensation by other depots. *The American journal of physiology* 257:R253-258.
- 37 [28] Pisani D.F., Beranger G.E., Corinus A., Giroud M., Ghandour R.A., Altirriba J.,
38 Chambard J.C., Mazure N.M., Bendahhou S., Durantou C., Michiels J.F., Frontini A.,
39 Rohner-Jeanrenaud F., Cinti S., Christian M., Barhanin J., Amri E.Z., 2016. The K⁺ channel
40 TASK1 modulates beta-adrenergic response in brown adipose tissue through the
41 mineralocorticoid receptor pathway. *FASEB journal : official publication of the Federation of*
42 *American Societies for Experimental Biology* 30:909-922.
- 43 [29] Karbiener M., Neuhold C., Opriessnig P., Prokesch A., Bogner-Strauss J.G., Scheideler
44 M., 2011. MicroRNA-30c promotes human adipocyte differentiation and co-represses PAI-1
45 and ALK2. *RNA Biol* 8:850-860.
- 46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1 [30] Lundh M., Plucinska K., Isidor M.S., Petersen P.S.S., Emanuelli B., 2017. Bidirectional
2 manipulation of gene expression in adipocytes using CRISPRa and siRNA. *Molecular*
3 *metabolism* 6:1313-1320.
- 4 [31] Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellems J., Huggett J., Kubista M., Mueller R.,
5 Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T., 2009. The MIQE
6 guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments.
7 *Clinical chemistry* 55:611-622.
- 8 [32] Himms-Hagen J., Cui J., Danforth E., Jr., Taatjes D.J., Lang S.S., Waters B.L., Claus
9 T.H., 1994. Effect of CL-316,243, a thermogenic beta 3-agonist, on energy balance and
10 brown and white adipose tissues in rats. *The American journal of physiology* 266:R1371-
11 1382.
- 12 [33] Reis F.C., Branquinho J.L., Brandao B.B., Guerra B.A., Silva I.D., Frontini A., Thomou
13 T., Sartini L., Cinti S., Kahn C.R., Festuccia W.T., Kowaltowski A.J., Mori M.A., 2016. Fat-
14 specific Dicer deficiency accelerates aging and mitigates several effects of dietary restriction
15 in mice. *Aging* 8:1201-1222.
- 16 [34] Mudhasani R., Imbalzano A.N., Jones S.N., 2010. An essential role for Dicer in
17 adipocyte differentiation. *Journal of cellular biochemistry* 110:812-816.
- 18 [35] Mudhasani R., Puri V., Hoover K., Czech M.P., Imbalzano A.N., Jones S.N., 2011. Dicer
19 is required for the formation of white but not brown adipose tissue. *Journal of cellular*
20 *physiology* 226:1399-1406.
- 21 [36] Ghorbani M., Teimourian S., Farzad R., Asl N.N., 2015. Apparent histological changes of
22 adipocytes after treatment with CL 316,243, a beta-3-adrenergic receptor agonist. *Drug*
23 *design, development and therapy* 9:669-676.
- 24 [37] Frontini A., Cinti S., 2010. Distribution and development of brown adipocytes in the
25 murine and human adipose organ. *Cell metabolism* 11:253-256.
- 26 [38] Schosserer M., Grillari J., Wolfrum C., Scheideler M., 2018. Age-Induced Changes in
27 White, Brite, and Brown Adipose Depots: A Mini-Review. *Gerontology* 64:229-236.
- 28 [39] Barres R., Zierath J.R., 2016. The role of diet and exercise in the transgenerational
29 epigenetic landscape of T2DM. *Nature reviews. Endocrinology* 12:441-451.
- 30 [40] Marciniak A., Patro-Malysza J., Kimber-Trojnar Z., Marciniak B., Oleszczuk J.,
31 Leszczynska-Gorzela B., 2017. Fetal programming of the metabolic syndrome. *Taiwanese*
32 *journal of obstetrics & gynecology* 56:133-138.
- 33 [41] Sutton E.F., Gilmore L.A., Dunger D.B., Heijmans B.T., Hivert M.F., Ling C., Martinez
34 J.A., Ozanne S.E., Simmons R.A., Szyf M., Waterland R.A., Redman L.M., Ravussin E.,
35 2016. Developmental programming: State-of-the-science and future directions-Summary
36 from a Pennington Biomedical symposium. *Obesity* 24:1018-1026.
- 37 [42] Tattikota S.G., Rathjen T., McAnulty S.J., Wessels H.H., Akerman I., van de Bunt M.,
38 Hausser J., Esguerra J.L., Musahl A., Pandey A.K., You X., Chen W., Herrera P.L., Johnson
39 P.R., O'Carroll D., Eliasson L., Zavolan M., Gloyn A.L., Ferrer J., Shalom-Feuerstein R.,
40 Aberdam D., Poy M.N., 2014. Argonaute2 mediates compensatory expansion of the
41 pancreatic beta cell. *Cell metabolism* 19:122-134.
- 42 [43] Yan X., Wang Z., Bishop C.A., Weitkunat K., Feng X., Tarbier M., Luo J., Friedlander
43 M.R., Burkhardt R., Klaus S., Willnow T.E., Poy M.N., 2018. Control of hepatic
44 gluconeogenesis by Argonaute2. *Molecular metabolism*.
- 45 [44] Zhang C., Seo J., Murakami K., Salem E.S.B., Bernhard E., Borra V.J., Choi K., Yuan
46 C.L., Chan C.C., Chen X., Huang T., Weirauch M.T., Divanovic S., Qi N.R., Thomas H.E.,
47 Mercer C.A., Siomi H., Nakamura T., 2018. Hepatic Ago2-mediated RNA silencing controls
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

energy metabolism linked to AMPK activation and obesity-associated pathophysiology.
Nature communications 9:3658.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

FIGURE LEGENDS

1
2 Figure 1: miRNA machinery and miRNAs are upregulated in iBAT of rats chronically-
3 injected with β -adrenergic receptor agonist. 3 month-old rats were daily intraperitoneally
4 injected with CL 316,243 (1 mg/kg) or a saline solution (NaCl 0.9% w/v) (n=4). A: Relative
5 mRNA expression levels of miRNA machinery. B: Immunoblots of AGO2, UCP1 and tubulin
6 on iBAT protein lysates and its quantification. C: Global view of miRNA expression by using
7 PCA plot. Clustering of samples are indicated by ellipses. D: Volcano plot showing the fold
8 change in the expression of all detected miRNAs according to their p-value. The solid
9 horizontal line indicates zero change in miRNA expression, the points above correspond to
10 upregulated miRNAs while the points below are downregulated miRNAs. Data points to the
11 right of the dotted line are significant ($p \leq 0.05$). Data are presented as mean \pm SEM. *p-
12 value < 0.05 .
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22

23 Figure 2: The miRNA machinery is increased in the active iBAT of young LP progeny
24 but unchanged in the inactive iBAT of old LP progeny. A and B: Relative mRNA
25 expression levels of miRNA machinery from iBAT of C and LP progenies at 3 months (n=9)
26 and 18 months of age (n=6). Data are normalized to 36B4 mRNA and expressed in arbitrary
27 units. C and D: Immunoblots of AGO2, UCP1 and tubulin in iBAT protein lysates and its
28 quantification at (C) 3- and 18-months (n=4). Data are presented as mean \pm SEM. *p-value
29 < 0.05 .
30
31
32
33
34
35
36
37

38 Figure 3: The miRNA expression profile displays a specific signature for the active
39 iBAT of young LP progeny. miRNA expression analysis in iBAT of 3 month-old C and LP
40 progenies (n=3/4) and 18 month-old C and LP progenies. A and B: Global view of miRNA
41 expression by using PCA plot. Clustering of samples are indicated by ellipses. C and D:
42 Volcano plot showing the fold change in the expression of detected miRNAs according to
43 their p-value. The solid horizontal line indicates zero change in miRNA expression, the points
44 above correspond to upregulated miRNAs while the points below are downregulated
45 miRNAs. Data points to the right of the dotted line are significant ($p \leq 0.05$).
46
47
48
49
50
51
52
53

54 Figure 4: The miRNA machinery, particularly AGO2, is upregulated during brown
55 adipocyte differentiation and activation. A: Scheme of the brown adipocyte differentiation
56 stages from SVF progenitors isolated from iBAT during 7 days (D0 to D7). B: Relative
57 abundance of mRNA expression of miRNA machinery in iBAT-derived SVF during brown
58
59
60
61
62
63
64
65

1 adipocyte differentiation (n=5). Data are normalized to 36B4 mRNA and expressed in
2 arbitrary units. C: Immunoblots of AGO2 and tubulin and its quantification in protein lysates
3 from iBAT-derived SVF during brown adipocyte differentiation (n=3). D: Relative mRNA
4 expression levels of AGO2 and UCP1 in iBAT-derived SVF mature brown adipocytes treated
5 at D7 with or without 1 μ M isoproterenol during 6h (n=3). E: Immunoblots of AGO2 and
6 tubulin and its quantification in protein lysates from iBAT-derived SVF mature brown
7 adipocytes treated at D7 with or without 1 μ M isoproterenol during 6h (n=3). Data are
8 presented as mean +/- SEM. *p-value < 0.05.
9

10
11
12
13
14
15
16 Figure 5: The partial deletion of AGO2 in mature brown adipocytes impacts their
17 thermogenic function.
18

19
20 A: Scheme of AGO2 siRNA transfection at day 7 in iBAT-derived SVF mature brown
21 adipocytes for 72h. B: Relative mRNA expression levels of miRNA machinery and UCP1.
22 Data are normalized to 36B4 mRNA and expressed in arbitrary units (n=5). C: Immunoblots
23 of AGO2, UCP1 and tubulin and their quantification (n=3). D: Glycerol release after a 1h30
24 incubation without or with 1 μ mol/L isoproterenol (ISO) (n= 3). Data are expressed per
25 milligram of protein. E-H: Representative histograms obtained for oxygen consumption
26 measurements (n=3). Histograms show (E) mitochondrial respiration and (F) maximal
27 respiration values under basal condition, (G) shows unstimulated and (H) isoproterenol-
28 stimulated uncoupled mitochondrial respiration. Data are presented as mean +/- SEM. *p-
29 value < 0.05.
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figure 1

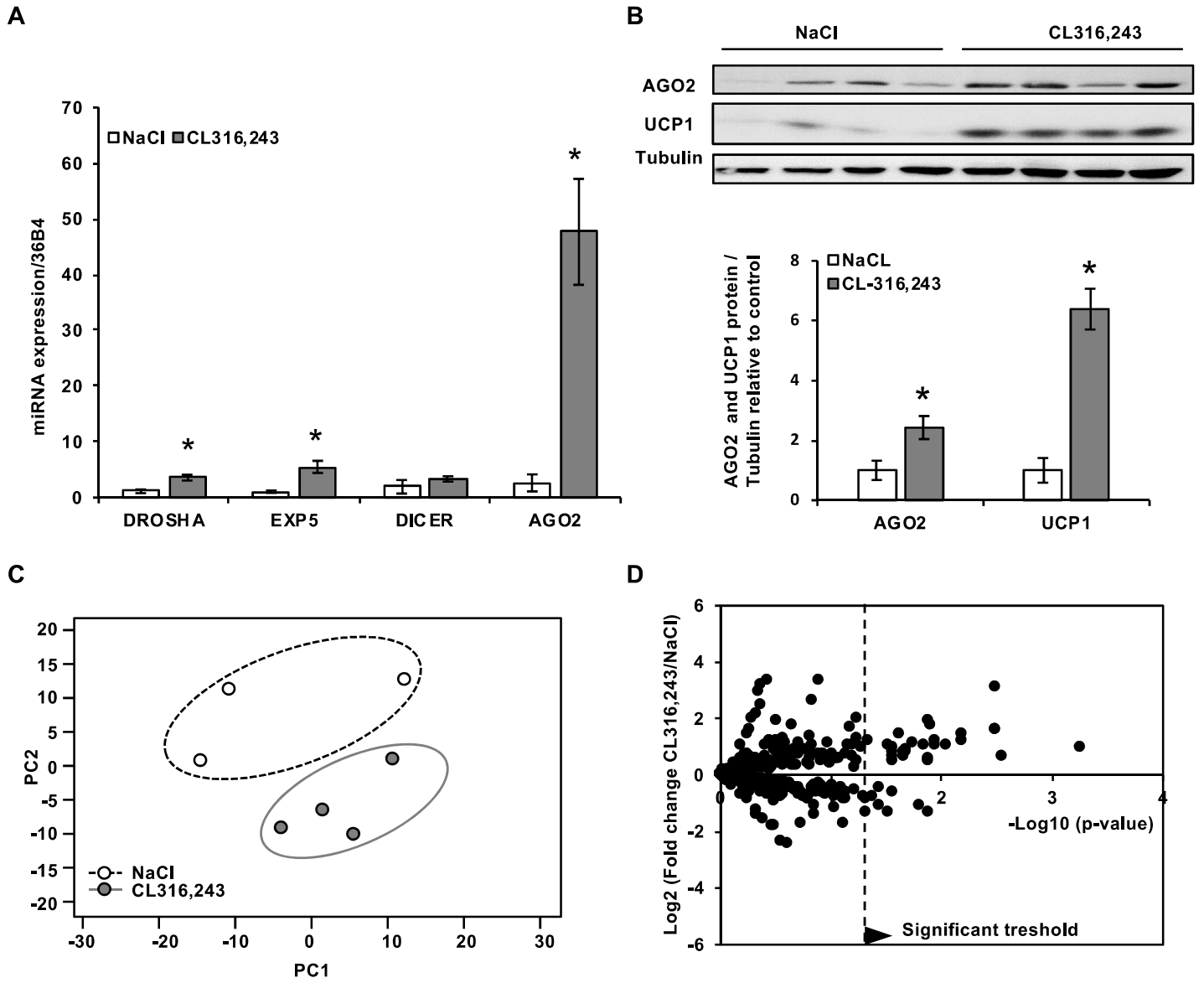


Figure 1

Figure 2

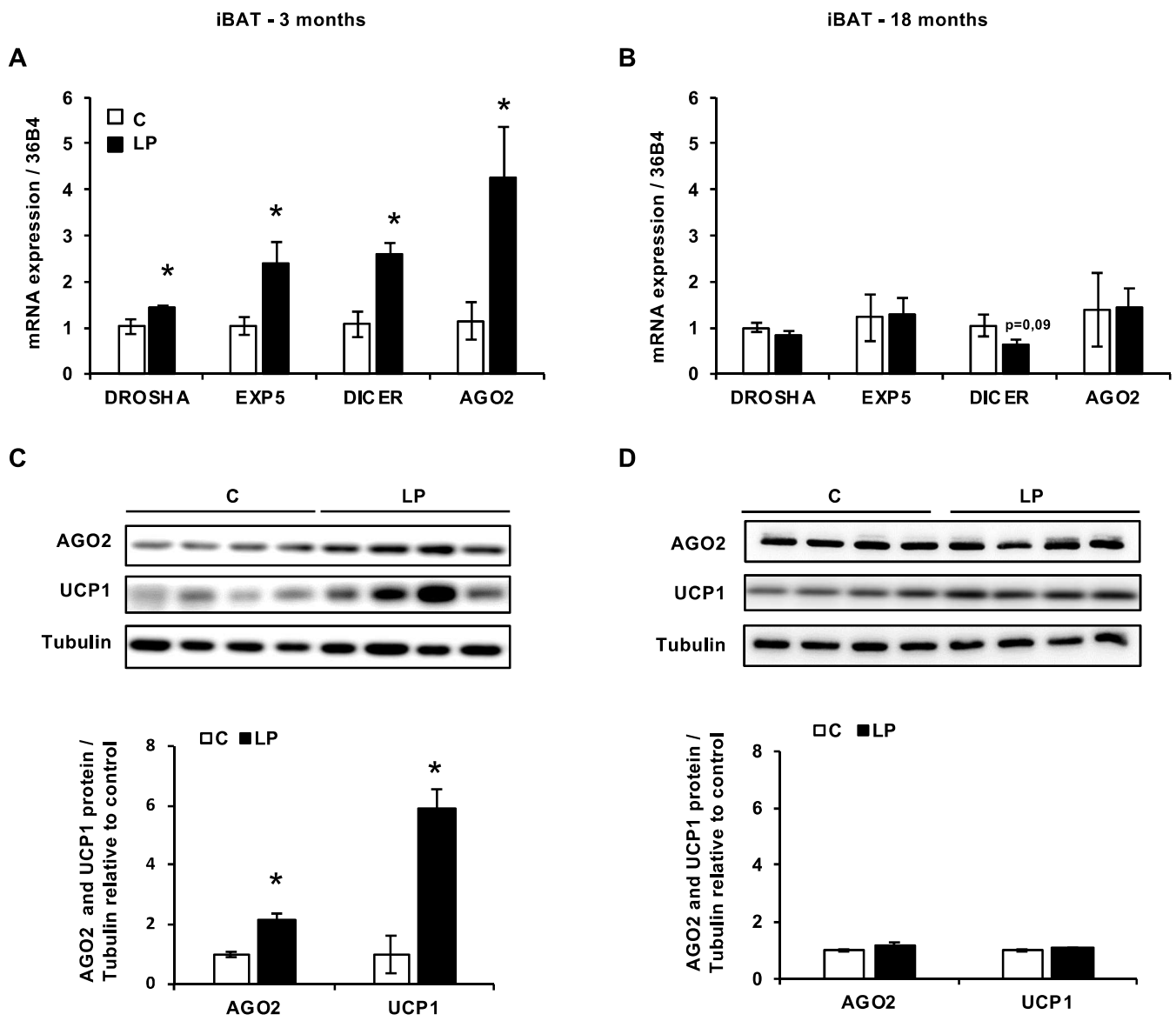


Figure 2

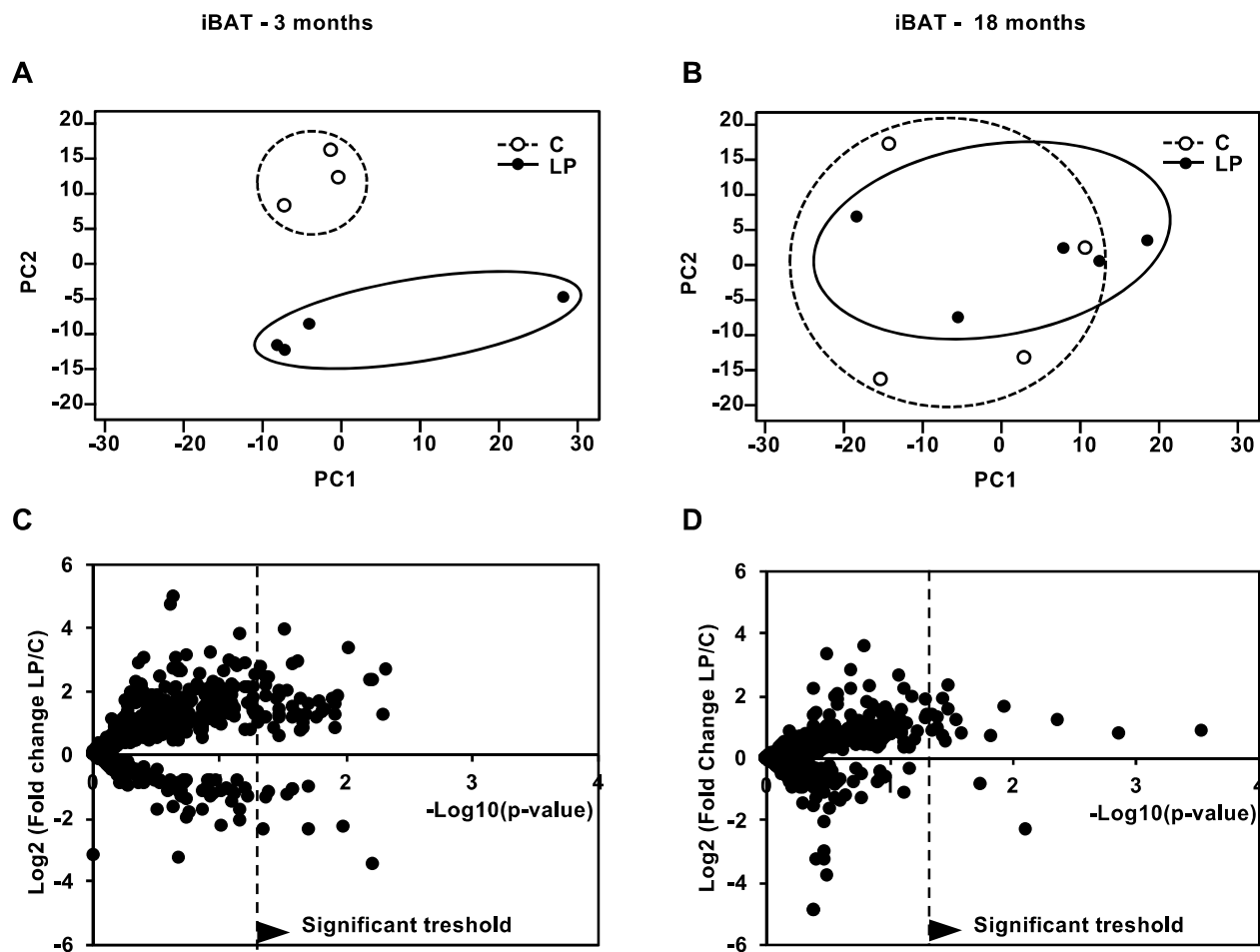


Figure 3

Figure 4

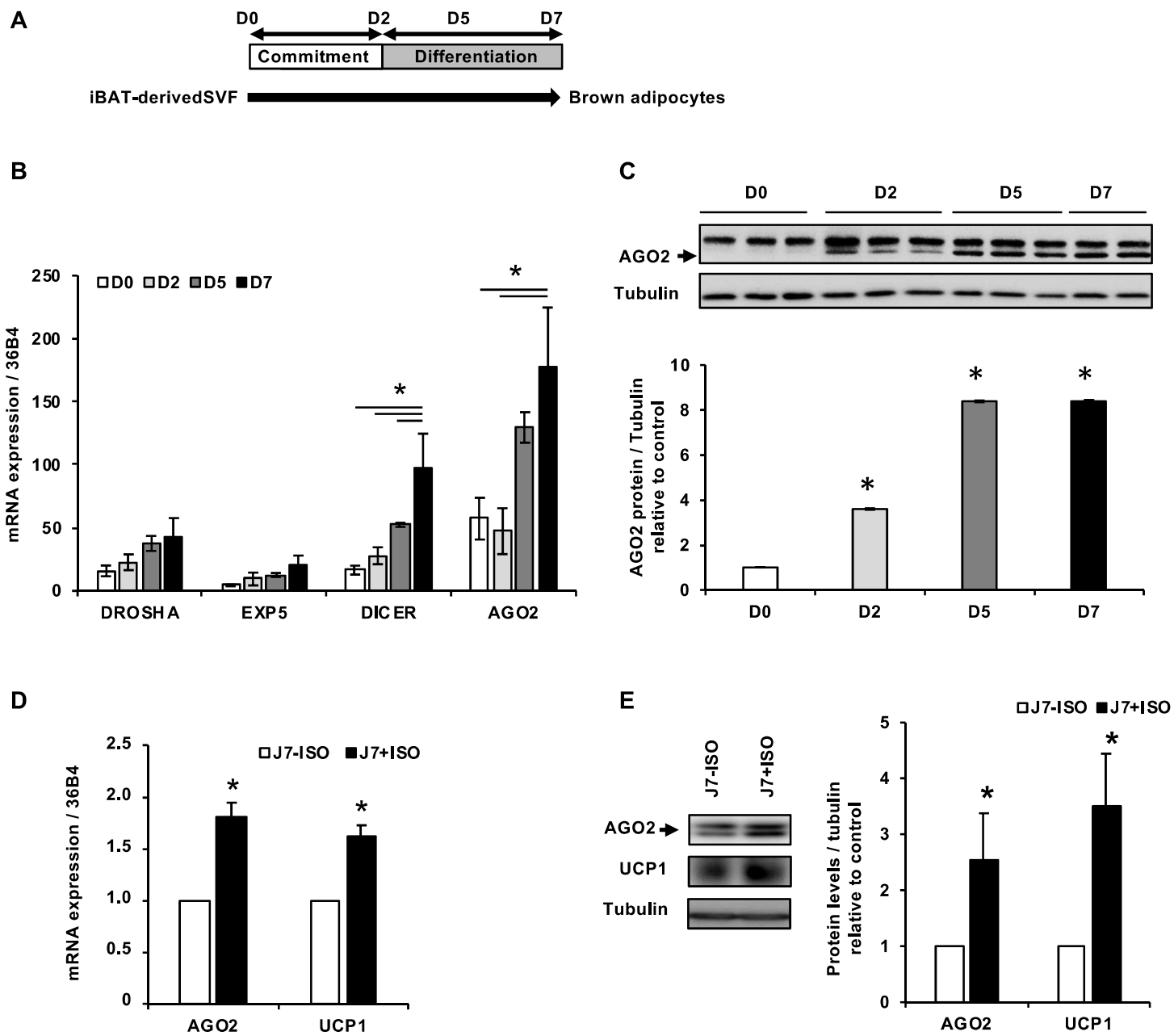


Figure 4

Figure 5

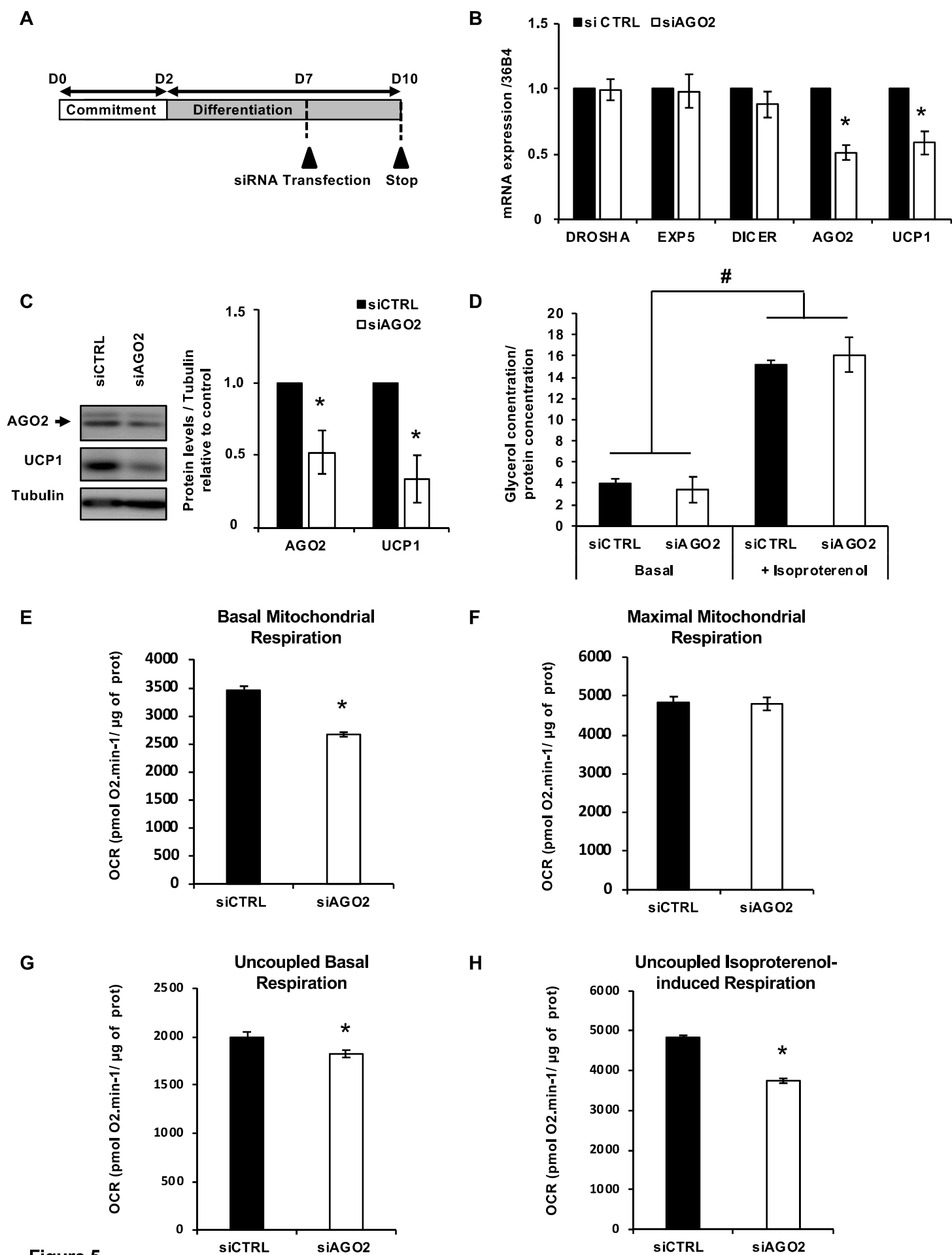


Figure 5

Supplementary Table 1

Gene Name	Foward Sequence (5'->3')	Reverse Sequence (5'->3')
rUCP1	TGCAATGACCATGTACACCA	CATAGGAGCCCAGCATAGGA
rACC	TGCAGGTATCCCCACTCTTC	TTCTGATTCCCTCCCTCCT
rHSL	GTGGCACAGACCTCCAAATC	AGCCCAGCAGTAGGCAAAA
rLPL	TATCCCAATGGAGGCACTTT	TGCTGGGGTTTTCTTCATTC
rFABP4	GTCGTCATCCGGTCAGAGAG	CCCCACCATCCAGGGTTATG
rPPARg	AGGAGCAGAGCAAAGAGGTG	AGGCCAGCATGGTGTAGATG
rPGC1a	TATGAAGCCAATGAGCACGA	GTGCATTCTCAATTTCCACC
rATGL	GCCTACTGAACCAACCCAAC	CAGGTCTTTCCGTTCCACAC
rCREB	GTAATCGGGGTTGGCACTG	AGGAGTCTGTGGATAGTGTAAC
rCPT1M	TGAGTGACTGGTGGGAAGAA	ACAGCAGTATGGCGTGGATG
rCytC	AACCTCCATGGTCTGTTTGG	GTCTGCCCTTTCTCCCTTCT
r36B4	TCGGAGGAATCCGATGAGGA	TAAGCAGGCTGACTTGGTGT
rAGO2	AGTGTGGTTTGGCTTCCATC	TGGGAATCTGTCAGAGGTTTTT
rDICER	AGACCCACGGCAGCATTCT	GCGACGCAAAGATGGTGTAT
rDROSHA	GGTGGCCGTTTACTTCAAAGG	GTCCATTGCTGCTCCCATTT
rEXP5	AGTTGGCCGAAAAAACACAAA	TCCACCGAAACTTGACAACGT

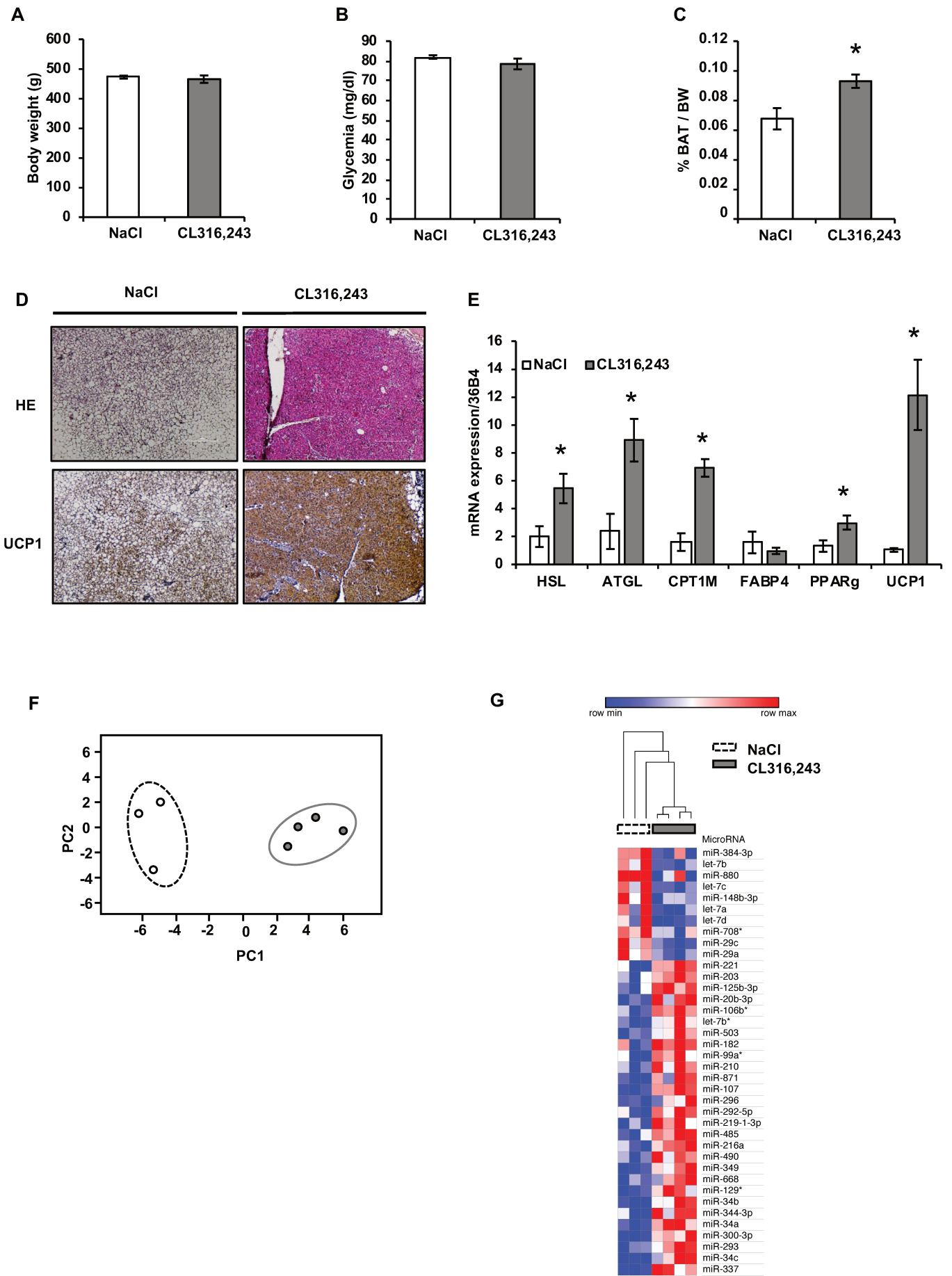
Supplementary Table 2

MicroRNA (2-dCt)	C	CL	Fold (CL/C)	T.Test
rno-miR-337	0.2	1.8	8.3	0.00
rno-miR-880	0.4	0.2	0.4	0.05
rno-miR-300-3p	3.0	9.2	3.0	0.00
rno-miR-349	3.5	7.9	2.2	0.01
rno-miR-708*	4.9	2.8	0.6	0.05
rno-miR-99a*	6.6	11.8	1.8	0.03
rno-miR-216a	6.7	14.1	2.1	0.01
rno-miR-485	9.5	19.1	2.0	0.01
rno-miR-384-3p	13.5	5.2	0.4	0.03
rno-miR-292-5p	15.2	30.6	2.0	0.03
rno-miR-20b-3p	17.3	26.4	1.5	0.03
rno-miR-125b-3p	19.6	28.6	1.5	0.01
rno-miR-503	21.5	37.7	1.8	0.02
rno-miR-490	33.4	72.3	2.2	0.02
rno-miR-34b	35.3	95.9	2.7	0.01
rno-miR-219-1-3p	38.6	77.7	2.0	0.01
rno-miR-293	50.3	171.6	3.4	0.01
rno-miR-129*	59.9	135.5	2.3	0.01
rno-miR-106b*	62.1	98.5	1.6	0.00
rno-miR-210	70.5	128.5	1.8	0.02
rno-miR-344-3p	73.8	202.7	2.7	0.02
rno-miR-668	76.1	172.0	2.3	0.05
rno-miR-182	86.6	152.0	1.8	0.02
rno-miR-871	104.6	201.5	1.9	0.03
rno-miR-221	105.9	147.3	1.4	0.01
rno-miR-34c	186.5	678.7	3.6	0.01
rno-miR-107	298.5	577.9	1.9	0.00
rno-let-7b*	537.4	854.5	1.6	0.02
rno-miR-34a	874.9	2583.1	3.0	0.00
rno-miR-29a	1284.7	907.3	0.7	0.04
rno-miR-29c	1307.0	821.6	0.6	0.03
rno-miR-203	1396.7	1964.0	1.4	0.03
rno-let-7d	3152.0	1776.7	0.6	0.04
rno-let-7a	4632.3	2515.8	0.5	0.05
rno-let-7b	4741.3	1859.9	0.4	0.01
rno-let-7c	8302.1	3780.1	0.5	0.02
rno-miR-296	10864.0	21361.2	2.0	0.05
rno-miR-148b-3p	14647.8	6972.1	0.5	0.04

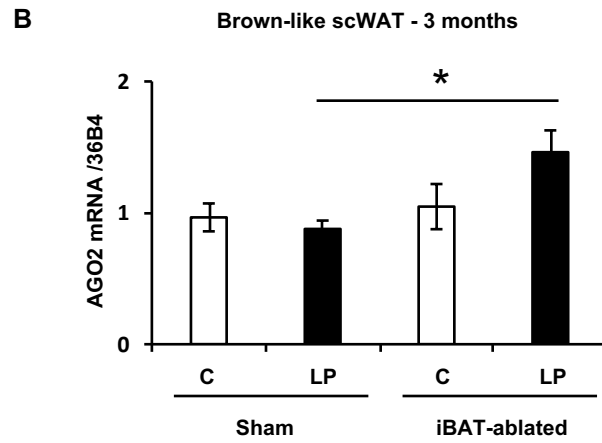
Supplementary Table 3

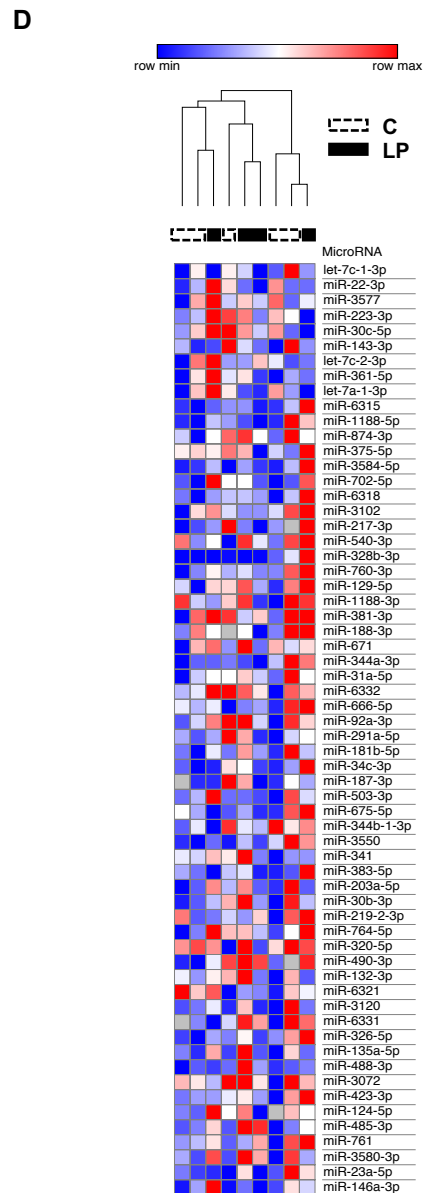
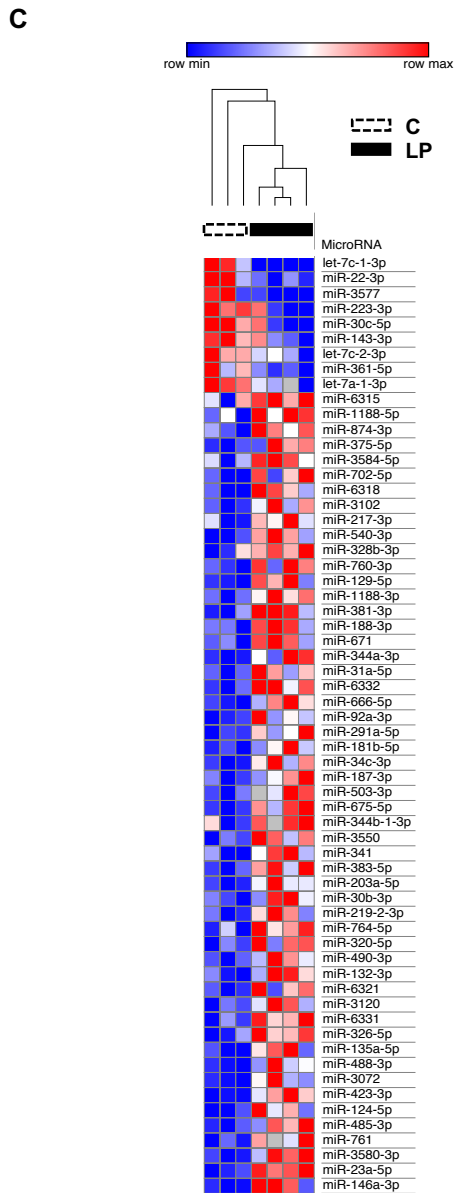
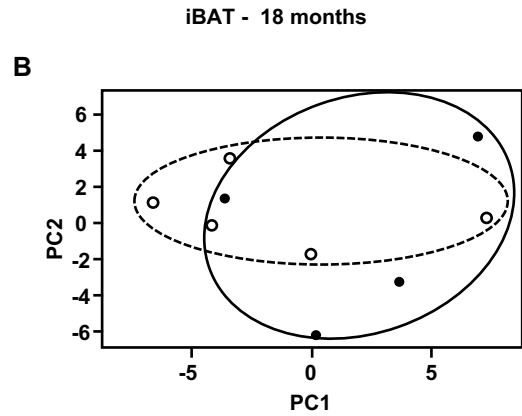
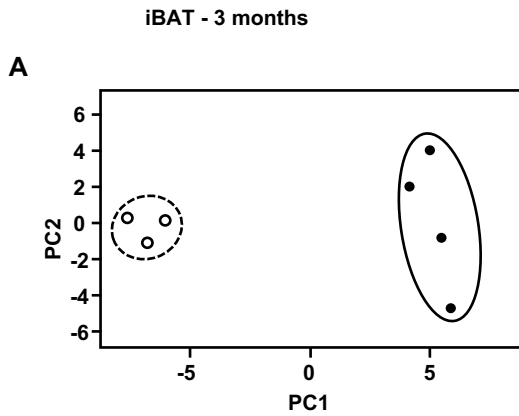
MicroRNA (2-dCt)	C	LP	Fold (LP/C)	T.TEST
rno-miR-6321	0.1	0.2	4.3	0.05
rno-miR-146a-3p	0.1	0.8	15.1	0.03
rno-miR-761	0.1	0.6	7.2	0.02
rno-miR-666-5p	0.2	0.4	2.4	0.01
rno-miR-124-5p	0.2	1.2	6.5	0.04
rno-miR-488-3p	0.2	1.1	5.2	0.04
rno-miR-326-5p	0.2	1.1	5.0	0.01
rno-miR-3580-3p	0.2	2.1	9.9	0.01
rno-miR-675-5p	0.2	0.7	2.9	0.01
rno-miR-23a-5p	0.3	2.7	10.7	0.00
rno-miR-6331	0.3	1.3	5.0	0.01
rno-miR-3072	0.3	1.5	5.5	0.05
rno-miR-423-3p	0.3	1.8	6.3	0.00
rno-miR-764-5p	0.4	1.3	3.5	0.01
rno-let-7c-1-3p	0.4	0.0	0.1	0.01
rno-miR-3120	0.4	1.8	4.4	0.04
rno-miR-219-2-3p	0.4	1.4	3.4	0.04
rno-miR-383-5p	0.4	1.3	3.2	0.01
rno-miR-344b-1-3p	0.4	1.3	2.9	0.02
rno-miR-485-3p	0.5	3.4	7.1	0.02
rno-miR-30b-3p	0.5	1.7	3.4	0.05
rno-miR-320-5p	0.5	1.9	3.6	0.03
rno-miR-6318	0.7	1.3	1.9	0.02
rno-miR-135a-5p	0.8	3.8	5.1	0.04
rno-miR-490-3p	0.8	3.1	3.8	0.03
rno-miR-3550	0.9	2.7	3.1	0.02
rno-miR-375-5p	1.0	1.6	1.7	0.04
rno-miR-760-3p	1.1	2.5	2.2	0.04
rno-miR-540-3p	1.2	2.6	2.1	0.02
rno-miR-1188-5p	1.4	2.3	1.6	0.02
rno-miR-381-3p	1.4	3.2	2.3	0.02
rno-miR-874-3p	1.5	2.5	1.7	0.01
rno-miR-31a-5p	1.6	3.8	2.3	0.03
rno-miR-6332	1.8	4.3	2.4	0.00
rno-miR-187-3p	2.2	5.8	2.6	0.05
rno-miR-291a-5p	2.4	6.0	2.5	0.03
rno-miR-129-5p	2.4	5.4	2.2	0.02
rno-miR-702-5p	2.7	5.1	1.9	0.05
rno-miR-3584-5p	2.8	4.9	1.8	0.02
rno-miR-1188-3p	2.8	6.3	2.2	0.01

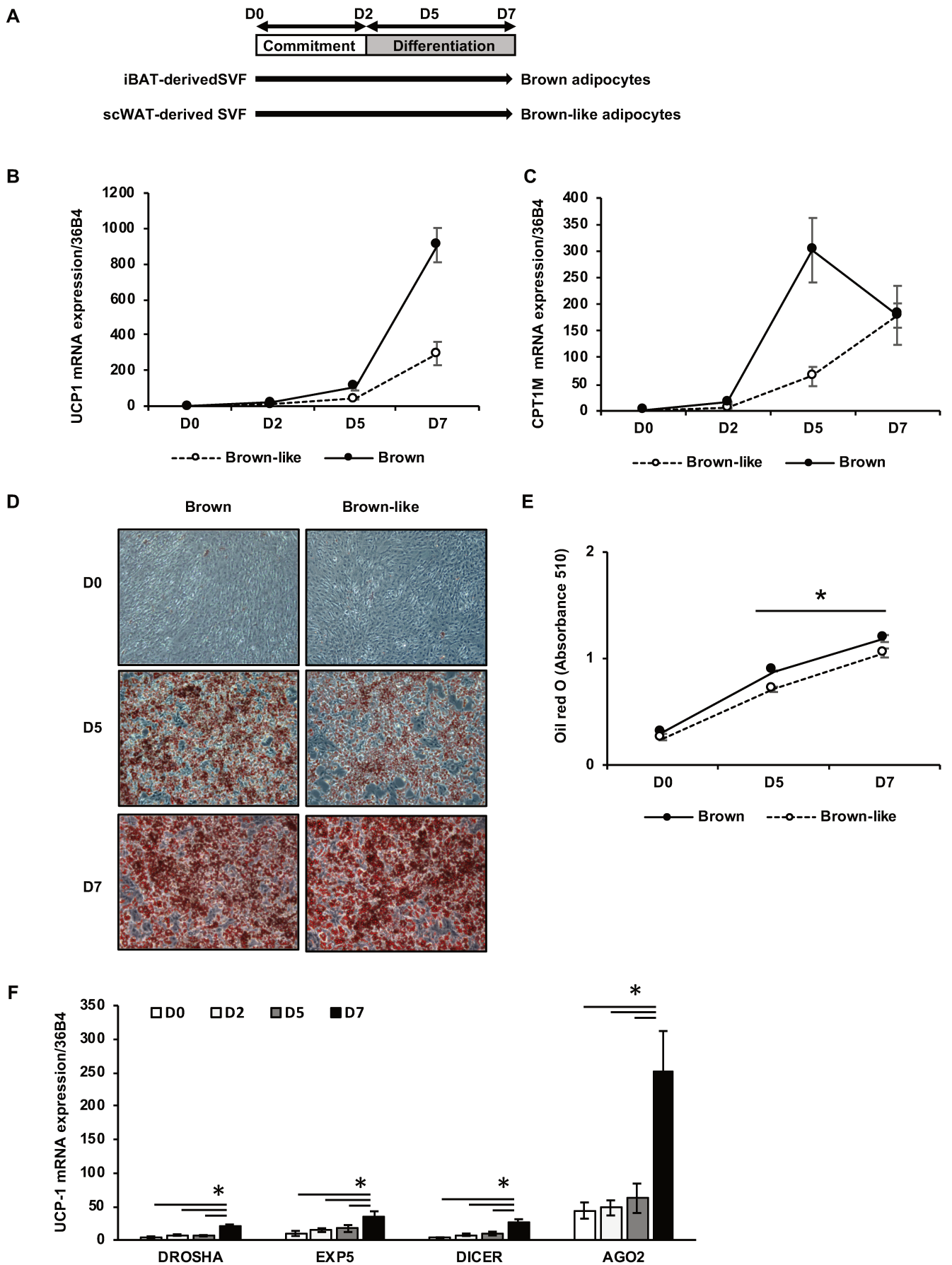
rno-miR-181b-5p	3.1	7.8	2.5	0.05
rno-miR-6315	3.1	4.6	1.5	0.03
rno-miR-34c-3p	3.1	8.1	2.6	0.01
rno-miR-188-3p	3.2	7.3	2.3	0.02
rno-miR-503-3p	3.3	9.1	2.8	0.02
rno-miR-671	3.4	7.7	2.3	0.02
rno-miR-361-5p	3.4	1.6	0.5	0.02
rno-miR-217-3p	3.9	8.2	2.1	0.04
rno-miR-22-3p	3.9	0.7	0.2	0.02
rno-miR-92a-3p	4.9	12.1	2.5	0.05
rno-let-7a-1-3p	5.5	2.5	0.5	0.02
rno-miR-328b-3p	5.7	12.2	2.1	0.03
rno-miR-344a-3p	5.7	13.1	2.3	0.05
rno-let-7c-2-3p	8.1	3.7	0.5	0.03
rno-miR-143-3p	9.0	3.7	0.4	0.04
rno-miR-3102	10.0	21.0	2.1	0.03
rno-miR-132-3p	21.9	86.1	3.9	0.03
rno-miR-341	23.5	75.1	3.2	0.03
rno-miR-3577	27.5	5.3	0.2	0.04
rno-miR-203a-5p	43.4	145.5	3.4	0.02
rno-miR-223-3p	88.0	33.3	0.4	0.04
rno-miR-30c-5p	1036.8	413.0	0.4	0.03



Supplementary Figure 1







Supplementary Figure 4

Supplementary figure 1: Expression analysis of significantly dysregulated miRNAs in iBAT of rats chronically-injected with β -adrenergic receptor agonist. 3 month-old rats were daily intraperitoneally injected with CL 316,243 (1 mg/kg) or a saline solution (NaCl 0.9% w/v) (n=4). **A-C** : (A) Body weight, (B) glycemia and (C) iBAT weight expressed as a percentage of BW. **D** : Representative immunohistochemistry of UCP1 with hematoxylin and eosin staining of iBAT. **E**: Relative mRNA expression levels of UCP1 and markers of adipocytes, lipogenesis and lipolysis from iBAT. Data are presented as mean +/- SEM. *p-value < 0.05. **F**. Global view of the significantly dysregulated miRNA expression by using principal component analysis (PCA). One minus Pearson correlation was used as a metric distance. Clustering of samples are indicated by ellipses. **G**: Hierarchical clustering heat map of significantly deregulated miRNAs with p-value < 0.05 between between NaCl versus CL 316,243 injected rats. Columns represent samples and rows miRNAs. Color labelling for up- and down-regulated miRNAs is indicated.

Supplementary figure 2: Increased AGO2 mRNA expression in brown-like scWAT from iBAT-ablated LP progeny: **A**: Relative mRNA expression level of miRNA machinery in scWAT of 3 month-old C and LP progenies (n=4). **B**: Relative mRNA expression level of AGO2 in scWAT of 3 month-old sham or iBAT-ablated C and LP progenies (n=5). Data are presented as mean +/- SEM. *p-value < 0.05.

Supplementary figure 3: Expression analysis of significantly dysregulated miRNAs in iBAT of young and old LP progeny. **A and B**: Global view of the significantly dysregulated miRNA expression by using principal component analysis (PCA). Clustering of samples are indicated by ellipses. **C and D**: Hierarchical clustering heat map of significantly deregulated miRNAs with p-value < 0.05 between C and LP progenies at 3 months of age and their expression at 18 months. Columns represent samples and rows miRNAs. Color labelling for up- and down-regulated miRNAs is indicated.

Supplementary figure 4: Increased miRNA machinery during brown-like differentiation of scWAT-derived SVF progenitors. **A**: Scheme of the brown and brown-like adipocyte differentiation stages from SVF progenitors isolated respectively from iBAT and scWAT during 7 days (D0 to D7) (n=6). **B-C**: Relative mRNA expression levels of (B) UCP1 and (C) CPT1M in iBAT-derived or scWAT-derived SVF during brown adipocyte differentiation. Data are normalized to 36B4 mRNA and expressed in arbitrary units. **D-E**: (D) Representative pictures

of oil red O staining in iBAT-derived or scWAT-derived SVF during brown adipocyte differentiation and (F) quantification its absorbance at 510 nm. **F** : Relative mRNA expression levels of miRNA machinery in scWAT-derived SVF during brown adipocyte differentiation. Data are presented as mean +/- SEM. *p-value < 0.05.

Mir-22 and let-7c inhibent de manière synergique l'activité thermogénique des adipocytes bruns

Estelle Roger, Olivier Dumortier, Didier F Pisani, Nadine Gautier, Charlotte Hinault and Emmanuel Van Obberghen

« Au cours des dernières années, les pandémies d'obésité et de diabète de type 2 ont connu une croissance alarmante. Pour ces deux pathologies étroitement liées, il existe un déséquilibre de la balance entre apports et dépenses énergétiques. Le tissu adipeux brun (TABr) est une cible thérapeutique prometteuse permettant de lutter contre ce déséquilibre, en raison de sa grande capacité d'oxydation des substrats et la dissipation consécutive de l'énergie sous forme de chaleur. Ce processus appelé thermogénèse dépend de l'expression mitochondriale de la protéine découplante, UCP1, spécifiquement dans les adipocytes bruns et beiges. Les microARNs (miARNs), sont considérés comme d'importants régulateurs de la différenciation des adipocytes bruns, impactant également leur activation. Dans un modèle d'activation compensatoire du TABr induite par la restriction protéique maternelle durant la gestation et la lactation, nous avons précédemment identifié dans le TABr de la progéniture deux miARNs dont l'expression est fortement diminuée : miR-22-3p et let-7c-3p. Dans la présente étude, nous évaluons in vitro le rôle potentiel de ces miARNs dans l'activation du TABr. Nous montrons que miR-22-3p et let-7c-3p agissent de manière synergique et régulent négativement l'activité thermogénique des adipocytes bruns matures. De plus, l'examen du rôle de chaque miARN individuellement, indique qu'une délétion partielle de miR-22-3p sauvegarde le phénotype d'adipocyte brun. Pour conclure, les deux miRs, let-7c-3p et miR-22-3p sont impliqués dans l'activation du TABr et semblent contribuer, au moins en partie, à l'amélioration compensatoire de l'activité du TABr chez une progéniture insulino-pénique soumise à une restriction alimentaire. »

MiR-22 and let-7c synergistically block brown adipocyte thermogenic activity

Estelle Roger^{4,5}, Olivier Dumortier⁴, Didier F Pisani⁶, Nadine Gautier^{4,6}, Charlotte Hinault^{1,2,7*}
and Emmanuel Van Obberghen^{1,3,7*}

¹ University Côte d'Azur, CHU, Inserm, CNRS, IRCAN, France.

² Université Côte d'Azur, CHU, Inserm, C3M, France

³ University Côte d'Azur, CNRS, LP2M, France.

⁴ University Côte d'Azur, Inserm, CNRS, IRCAN, France.

⁵ Université Côte d'Azur, Inserm, C3M, France

⁶ University Côte d'Azur, CNRS, Inserm, iBV, France.

⁷ Co-senior authors

* Correspondence:

vanobbeg@unice.fr
LP2M, Medical Faculty
27 avenue Valombrose
06107 Nice cedex 2
+33 4 93 37 77 85

hinault@unice.fr
Team 5 C3M
151 Route de St Antoine de Ginestière
06204 Nice cedex 3
+33 4 89 06 42 18

Keywords: microRNAs, BAT, synergetic effect, SVF-derived brown adipocytes

Abstract

Over the last years, the obesity and type 2 diabetes pandemic have grown at an alarming pace. For both intertwined disease situations an imbalance exists between energy intake and expenditure. The brown adipose tissue (BAT) is a promising target for improving this imbalance due to its high capacity of substrate oxidation and subsequent energy dissipation as heat. This process called thermogenesis is driven by mitochondrial expression of uncoupling protein 1 (UCP1) specifically in brown and beige/brite adipocytes. MicroRNAs (miRNAs) have emerged as important regulators of brown adipocyte differentiation and hence also of their activation. In a rat model of compensatory BAT activation induced by maternal protein restriction during gestation and lactation, we previously identified in the BAT of the progeny two robustly downregulated miRNAs, miR-22-3p and let-7c-3p. Here, we evaluate in vitro the potential role of both miRNAs in BAT activation. We show that miR-22-3p and let-7c-3p act synergistically to negatively regulate mature BAT thermogenic activity. Moreover, by examining the action of each miRNA separately, we show that partial deletion of miR-22-3p has the potential to rescue the active BAT phenotype. To conclude, let-7c-3p and miR-22-3p are involved in BAT activation and appear to participate, at least in part, in compensatory BAT boosting in diet restricted insulinopenic rat progeny.

Introduction

The current pandemic of type 2 diabetes (T2D) is caused by the combination of several factors including sedentary lifestyle and overfeeding, which is often associated to obesity due to a dysregulation of the balance between energy intake and energy expenditure (1, 2). Hyperplasia and especially hypertrophy of the white adipose tissue (WAT) specialized in energy storage are associated to the obesity disease process. As weight loss is among the main objectives to prevent obesity and T2D by life-style intervention, intensive world-wide research is focused on brown adipose tissue (BAT). Indeed, BAT is a chief energy burner having a high oxidative capacity thanks to the uncoupling protein 1 (UCP1), which diverts the mitochondrial proton gradient to convert chemical energy stored in carbohydrates and lipids into heat (3, 4). This energy dissipation, called non-shivering thermogenesis, occurs in response to cold or to fuel excess (3, 5-7). Since it is now well accepted that BAT/Beige depots are present in adult humans, the identification of cellular and molecular mechanisms allowing its activation constitutes a promising research area and is anticipated to lead to the development of novel therapeutic tools to prevent and/or treat obesity and T2D (3, 5-11).

Several factors can impact BAT development and function, among which microRNAs (miRNAs) defined as endogenous, small, 21-22 nucleotide non-coding RNAs that regulate stability and/ or translational capacity of target messenger RNAs through base-pairing to their 3' untranslated region (3'UTR) (12, 13). The importance of miRNAs as a novel class of BAT modulators emerged from the specific deletion of key actors of miRNA biogenesis (DGRC8, DICER) resulting in impairment of BAT differentiation and function (14-16). In a murine model of maternal nutritional deficiency (Low Protein diet , LP) and predisposition to T2D, we have shown that enhanced expression of AGO2 , the chief miRNA mediator, and upregulated miRNA expression contribute to BAT activation allowing maintenance of fuel homeostasis in the young progeny despite collapsed insulin secretion(6, 17). While most of miRNAs (85%) were increased in BAT of the young LP descendants, few miRNAs were downregulated. Interestingly, these downregulated miRNAs were among the most abundant miRNAs in BAT.

We were struck by the fact that two miRNAs are robustly downregulated miRNAs, ie let-7c-3p by 90% and miR-22-3p by 80% compared to controls (17). As both miRNAs have already been implicated in energy homeostasis and adipogenic determination, we sought here to decipher the role of let-7c-3p and miR-22-3p in BAT activation (18-20). In brief, we show that these miRNAs have a synergistic effect to inhibit brown adipocyte function. Importantly, we reveal that partial deletion of miR-22-3p enhances brown adipocyte function particularly by rescuing thermogenic capacity in absence of inducers of brown adipogenesis.

Materials and Methods

Animals

All procedures were conducted in accordance with EU directives for animal experiments and INSERM guidelines and were approved by the Research Ministry (MESR 00825, MESR 0521, MESR-00500.02 and APAFIS 3897- 2016012217578333) and local ethics committee (CNREEA no. 28). The Wistar rats were provided by Janvier (Le Genest Saint Isle, France), housed two per cage and subjected to a 12-h light/dark cycle at 22–23°C, which is close to the rat thermoneutrality (Cannon and Nedergaard, 2011). Adipose tissue-derived stromal vascular fraction (SVF) isolation were performed using 3 month-old Wistar rats.

Adipose tissue-derived SVF culture

Animals were euthanized by the intraperitoneal injection of Dolethal (1mL/kg). Adipose tissue-derived SVF culture was performed as described (21). Briefly, interscapular brown fat depots (iBAT) separated from the attached white adipose tissue (WAT) were excised, rinsed in bovine serum albumin (BSA)-buffer medium and minced. Minced samples were then digested in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM, Life Technologies) containing 2 mg/mL Type IV collagenase (Sigma-Aldrich, 125 U/mg) and 20 mg/mL BSA (Fraction V, Fatty Acid Free, Ig Free, EUROMEDEX) with mild agitation for 45 min à 37°C. After the addition of DMEM containing 10% (v/v) FBS (Fetal Bovine Serum), digested tissues were filtered through 250, 100 and 37 µm nylon mesh (SEFAR Nitex), and centrifuged for 10 min at 1000 rpm. The pellet containing SVF cells was submitted to red blood lysis buffer (Sigma-Aldrich) during 1 min at room temperature. SVF cells were seeded and maintained in DMEM 4.5 g/L glucose-glutamax-I (Life Technologies) containing 10% (v/v) FBS and 15 mM HEPES (Gibco, Life Technologies) until confluence. The brown adipocyte differentiation was induced in the same medium using a cocktail of 1 µM dexamethasone (Sigma-Aldrich), 500 µM isobutyl-methylxanthine (IBMX-Sigma), 860 nM insulin (NovoNordisk), 2 nM triiodothyronine (T3, Sigma-Aldrich) and 1 µM rosiglitazone (Cayman Chemical). After two days, dexamethasone and IBMX were removed and cells were maintained in a medium changed every two days containing 20 nM insulin, 2 nM T3 and 1µM rosiglitazone for 5 to 8 additional days.

miRNA transfections were performed in iBAT-derived SVF mature adipocytes at day 7 with 40 nmol/L of anti-miR-control (Anti-Neg) or anti-miR-22-3p / anti-let-7c-1-3p/ pool of anti-miR-22-3p and anti-let-7c-1-3p (Exiqon, Qiagen) according to manufacturer's procedure using High Perfect (Qiagen) adapted from previously described procedures (22, 23). Cells were analyzed 72 h after transfection corresponding to day 10 of differentiation.

RNA extraction and RT-qPCR

Total RNA from adipose-derived SVF cells were isolated with TRIzol reagent (Invitrogen). Total RNA (1 µg) was reverse transcribed with a RT kit (Qiagen/Promega) and qPCR analyses were performed with SYBR Green (StepOnePlus ABI Detector System). The cDNA amount used in each reaction was normalized to the housekeeping gene 36B4. For miRNAs, 10 ng of RNA were reverse transcribed with Exiqon/ Qiagen RT kit (Exiqon/Qiagen) and expression levels were normalized to U6. The relative expression was determined using a comparative method of 2^{-ddCt}.

Western blotting

Homogenized iBAT-derived SVF cells were processed for protein extraction and western blotting as described (24). Antibody to UCP1 was from Abcam, P-HSL from Cell Signaling Technologies (Phospho-HSL (Ser563) Antibody #4139) and Clathrin heavy chain (CHC-BD Bioscience). Western blots were quantified by densitometry with Image Quant software.

Oxygen consumption measurement

For the respirometry quantifications, iBAT-derived SVF cells were seeded into Seahorse XFe96 microplate-based respirometry plates (Agilent) and grown to confluency in the proliferation medium. After 7 days of differentiation, cells were transfected. 72 hours post-transfection, medium was replaced by prewarmed unbuffered Seahorse Assay Medium (Agilent) supplemented with 2 mM glutamine (Gibco, Life Technologies), 1 mM pyruvate (Gibco, Life Technologies) and 10 mM glucose, pH 7.4. Oxygen Consumption Rate (OCR) was determined using an XFe96 Extracellular Flux Analyzer at 37°C (Seahorse Bioscience, Agilent). Uncoupled OCR was determined using oligomycin (Sigma-Aldrich, 1.2 µM) after treatment or not with isoproterenol (Cayman Chemicals, 1 µM) incubations and rotenone and antimycin A (Sigma-Aldrich, 1µM each) were used to inhibit Complex I and Complex III dependent respiration, respectively, to assess the contribution of non-mitochondrial respiration. All data presented are mean values +/- SEM of three independent experiments with 8-12 replicate wells each.

Statistical analyses

Significant differences between two groups were assessed by unpaired or paired Student's t-test. A p-value <0.05 was considered as statistically significant. All bars shown represent mean +/- Standard Error Mean (SEM).

Results

The downregulation of both miR-22-3p and let-7c-3p enhances thermogenic capacity of mature brown adipocytes

As mentioned in the Introduction miR-22-3p and let-7c-3p are robustly downregulated in the BAT of young progenies having been exposed to a LP diet during lactation and in utero (17). To investigate their potential role in BAT activation, we firstly measured their expression during brown adipogenesis (Fig 1A). We observed that let-7c-3p expression was significantly downregulated during the first two days of differentiation corresponding to the commitment of preadipocytes. On the contrary, miR-22-3p expression is severely decreased during the late stages of differentiation from day 5 to day 8 when brown adipocytes become mature (Fig 1A). To study the combined involvement of these two miRNAs in BAT activation, we transfected their antagomiRs together at the same concentration at day 7 of the differentiation when brown adipocytes are mature and when these 2 miRNAs are both well expressed (Fig 1B). Strikingly, 72 hours post-transfection, we observed an increase at the mRNA and protein level of UCP1, the thermogenic marker of brown adipocytes (Fig 1C and D). To evaluate the impact of augmented UCP1 levels on brown adipocyte activity, we examined the mitochondrial function by measuring the oxygen consumption rate. Our data show that co-transfection of the 2 antagomiRs leads to an increment in basal mitochondrial and uncoupled isoproterenol-stimulated respiration (Fig 1E and G). No significant difference was observed when we measured the isoproterenol response (Fig 1F). These data suggest that let-7c-3p and miR-22-3p act in concert to improve the thermogenic function of brown adipocytes in vitro.

Loss of let-7c-3p does not affect mature brown adipocyte function

We next wanted to assess whether each miRNA individually has an impact on the thermogenic function of mature brown adipocytes. For this purpose, we first transfected the antagomiR of let-7c-3p at day 7 of the differentiation and stopped the experiment 72h thereafter (Fig 2A). Our analysis of the gene expression of different adipocyte markers, including UCP1, did not reveal differences (Fig 2B). Moreover, the unstimulated- or isoproterenol-stimulated mitochondrial respiration was unchanged. We interpret these results to mean that let-7c-3p requires the help of miR-22-3p to modulate BAT functions.

Loss of miR-22-3p in mature brown adipocytes increases expression of lipid metabolism genes and enhances mitochondrial respiration

We next investigated the potential impact of miR-22-3p on specific thermogenic functions exerted by mature brown adipocytes. We used the same protocol as before and transfected antagomiR of miR-22-3p at day 7 of differentiation (Fig 3A). Interestingly, we observed an increased expression of lipogenic and lipolytic enzymes, including FAS and HSL. This is

associated to a significant increment in CPT1M gene expression, the first component of the system translocating fatty acids from the cytoplasm to the mitochondria to supply mitochondrial respiration (Fig 3B). Importantly, UCP1 gene expression was 2-fold enhanced even though it did not reach statistical significance. The loss of miR-22-3p in mature brown adipocytes significantly augmented the mitochondrial basal respiration without modifying any of the other metabolic parameters (Fig 3 C-E). Taken as a whole, these data show that the downregulation of miR-22 bolsters the thermogenic function of mature brown adipocytes and that this effect is amplified by the inhibition of let-7c. Therefore, to improve the thermogenic function of mature brown adipocytes these two miRNAs appear to act synergistically.

Loss of miR-22-3p rescues a brown thermogenic phenotype in de-differentiated mature adipocytes

To further untangle the role of miR-22-3p in the activation of brown adipocytes, we transfected mature brown adipocytes with anti-miR-22-3p. At the same time we removed from the differentiation cocktail rosiglitazone and T3 (R/T3), which are needed to maintain the brown adipocyte phenotype (Fig 4A). T3 induces lipogenic enzymes and rosiglitazone (R), agonist of PPAR γ , promotes brown adipogenesis by stabilizing the PRDM16 transcription factor (25). No difference was observed at the gene expression level of UCP1 and different adipocyte markers in absence of R/T3 (Fig 4B). However, at the protein level, the transfection of miR-22-3p antagomiR in the absence of R/T3 leads to enhanced phosphorylation of HSL to a level comparable to that seen in presence of R/T3 with no difference on UCP1 (Fig 4C). Concerning mitochondrial respiration, in the absence of R/T3, the downregulation of miR-22-3p results in the increase of both basal unstimulated- and isoproterenol-stimulated uncoupled respiration without affecting basal mitochondrial respiration (Fig 4 D-F). These data suggest that blunted miR-22-3p expression is able to partially mimic the effect of R/T3 to maintain the brown phenotype of adipocytes.

Discussion - Conclusion

Beyond the contribution of the liver, muscle and white adipose tissue (WAT) to energy homeostasis, BAT is gaining growing attention over the past years, especially since its rediscovery in adult humans (8, 10, 11). Indeed, it is hoped that its capacity to dissipate excess energy as heat by uncoupling mitochondrial electron transport chain activity from ATP formation could be harnessed to improve organismal energy homeostasis. Among the mechanisms that affect BAT development and function, several miRNAs have emerged as prime players (26). For example, the miR-193b-365 cluster has been described as a regulator in the commitment to brown or myogenic lineages (27). Likewise, miR-328, sharing sequence similarities with miR-193b, controls brown adipogenesis by repressing the β -secretase Bace1 (16). By these and other findings, miRNAs have been incorporated in the brown adipogenesis landscape. In contrast, their role in BAT activation is virtually unexplored. Here we reveal that downregulation of miR-22-3p and let7-c-3p improves the thermogenic phenotype of mature brown adipocytes reflected by increased UCP1 mRNA and protein levels associated to enhanced uncoupled mitochondrial respiration after isoproterenol treatment. Interestingly, the reduced expression of let-7c-3p alone did not induce any effect on brown adipocyte function contrary to miR-22-3p. Therefore, these two miRNAs seem to act synergistically since the miR-22-3p effects are enhanced when they are both downregulated, suggesting the existence potential common targets for both miRNAs. Indeed, CREB1, a transcriptional regulator of UCP1, is a bioinformatically predicted target of both let-7c-3p and miR-22-3p. Hence downregulation of both miRNAs could lead to augmented CREB1 levels resulting in increased UCP1 expression and enhanced activity of brown adipocytes. Similarly, PTEN and SIRT1 involved in brown adipocyte differentiation and function, are also predicted targets of both miRNAs, which could further support the potential synergistic effect of miR-22-3p and let-7c-3p.

The expression of several members of the let-7-3p family have been found to be downregulated from day 0 to day 1 of 3T3-L1 adipocytes and thereafter increased, suggesting that this transient drop in let-7c-3p expression could be permissive for clonal expansion and further differentiation (18, 26). Moreover, one member of the let-7 family represses human brite adipocyte function and recruitment in subcutaneous WAT (24). Here, we observed the same profile for let-7c-3p in iBAT derived SVF cells during differentiation with a half drop in its gene expression at day 2 and a rise from day 5. The antagomiR-induced inhibition by half of let-7c-3p at day 7 in mature brown adipocytes fail to affect brown tissue function. Therefore, these data reinforce the idea that let-7c-3p plays a critical role during the initiation steps of brown adipocyte differentiation rather than in their activation.

Concerning miR-22-3p, previous studies reported that this miRNA can be a negative regulator of energy metabolism notably in the heart and in the liver (19, 28-30). Particularly, in a context of cardiac hypertrophy, miR-22-3p targets peroxisome proliferator-activated receptor γ , co-activator 1 α (Pgc-1 α) and Sirtuin 1 (Sirt-1) which are important players in fatty acid metabolism and mitochondrial biogenesis (19, 28, 29). Moreover, systemic deletion of miR-22-3p in mice decreased the gain of fat mass and prevented inflammation of adipose tissue and dyslipidemia induced by high-fat diet feeding. This means that the effects mediated by miR-22-3p play a critical role in the control of metabolic dysregulation (20). Our data are consistent with these studies since its deletion in mature brown adipocytes leads to augmented basal mitochondrial respiration. Moreover, miR-22-3p downregulation is able to partially mimic the effect of T3/R, which are normally required to maintain a brown phenotype. Further investigations are however required to confirm its role in lipolysis notably concerning the increased phosphorylation of HSL. Other potential targets of miR-22-3p needs to be examined such as PPAR γ or PGC1a. Interestingly, two others studies have identified PTEN and BMP7 as targets of miR-22-3p in the kidney (31, 32). Since these two proteins are also known to be positive regulators of BAT, these findings reinforce the idea of a potential role for miR-22-3p in BAT activity. Interestingly, in a model of predisposition to type 2 diabetes, we revealed a strong drop in miR-22-3p expression in active BAT from young progeny of protein restricted mothers (LP) (17). With their active BAT these young LP offspring display normoglycemia despite insulinopenia, but when their BAT has become inactive with age they are hyperglycemic without change in their insulinopenia. Furthermore, miR-22-3p was identified as a negative regulator of TCF7 in the liver of diabetic db/db mice, leading to an increase in hepatic gluconeogenesis and aggravating their hyperglycemia, which points to the role of miR-22-3p in the pathogenesis of diabetes (30). Since miR-22 appears to have a global negative effect on energy metabolism with different targets depending on tissues, it could be a potential target notably to face the challenge of intake of excessive substrates in the context of obesity and type 2 diabetes.

The key message of our present work is that at least two miRNAs, let-7c-3p and miR-22-3p, are operational in the molecular mechanisms leading to BAT activation, and that they act in concert. As we have certainly just scratched the surface of the role of miRNAs in the complex process of BAT activation, it is currently difficult to gauge the translational potential of our findings. However, they provide stimulus for further research efforts aimed at discovering means to maintain BAT active at adulthood and hence combat dysregulation of metabolic homeostasis due to fuel excess.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare that there is no conflict of interest associated with the manuscript.

Author contributions

E.R., O.D., D.F.P. designed the study, researched data, and contributed to discussions and manuscript. N.G. researched data. C.H. designed the study, researched data, and contributed to discussions and manuscript. E.V.O. designed the study, contributed to the discussions and manuscript.

Funding

E.V.O team was supported by Inserm, University Côte d'Azur, Conseil Régional PACA, Conseil Général des Alpes-Maritimes, Aviesan/AstraZeneca, "Diabetes and the vessel wall injury" program, by the Agence Nationale de la Recherche (ANR) through ANR-RPV12004AAA (DIAMIR) 'Investments for the Future' LABEX SIGNALIFE #ANR-11-LABX-0028-01, European Foundation for the Study of Diabetes (EFSD/Lilly; European Diabetes Research Program). EVO team members are affiliated to the FHU OncoAge (<http://www.oncoage.org/>).

References

1. Al-Goblan, A. S., Al-Alfi, M. A., and Khan, M. Z. (2014) Mechanism linking diabetes mellitus and obesity. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity : targets and therapy* **7**, 587-591
2. Bhupathiraju, S. N., and Hu, F. B. (2016) Epidemiology of Obesity and Diabetes and Their Cardiovascular Complications. *Circulation research* **118**, 1723-1735
3. Cannon, B., and Nedergaard, J. (2004) Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiological reviews* **84**, 277-359
4. Townsend, K. L., and Tseng, Y. H. (2014) Brown fat fuel utilization and thermogenesis. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **25**, 168-177
5. Schulz, T. J., and Tseng, Y. H. (2013) Brown adipose tissue: development, metabolism and beyond. *Biochem J* **453**, 167-178
6. Dumortier, O., Roger, E., Pisani, D. F., Casamento, V., Gautier, N., Lebrun, P., Johnston, H., Lopez, P., Amri, E. Z., Jousse, C., Fafournoux, P., Prentki, M., Hinault, C., and Van Obberghen, E. (2017) Age-Dependent Control of Energy Homeostasis by Brown Adipose Tissue in Progeny Subjected to Maternal Diet-Induced Fetal Programming. *Diabetes* **66**, 627-639
7. Pradhan, R. N., Zachara, M., and Deplancke, B. (2017) A systems perspective on brown adipogenesis and metabolic activation. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* **18 Suppl 1**, 65-81
8. Cypess, A. M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A. B., Kuo, F. C., Palmer, E. L., Tseng, Y. H., Doria, A., Kolodny, G. M., and Kahn, C. R. (2009) Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *The New England journal of medicine* **360**, 1509-1517
9. Saito, M., Okamatsu-Ogura, Y., Matsushita, M., Watanabe, K., Yoneshiro, T., Nio-Kobayashi, J., Iwanaga, T., Miyagawa, M., Kameya, T., Nakada, K., Kawai, Y., and Tsujisaki, M. (2009) High

- incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes* **58**, 1526-1531
10. van Marken Lichtenbelt, W. D., Vanhommerig, J. W., Smulders, N. M., Drossaerts, J. M., Kemerink, G. J., Bouvy, N. D., Schrauwen, P., and Teule, G. J. (2009) Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *The New England journal of medicine* **360**, 1500-1508
 11. Virtanen, K. A., Lidell, M. E., Orava, J., Heglind, M., Westergren, R., Niemi, T., Taittonen, M., Laine, J., Savisto, N. J., Enerback, S., and Nuutila, P. (2009) Functional brown adipose tissue in healthy adults. *The New England journal of medicine* **360**, 1518-1525
 12. Bartel, D. P. (2018) Metazoan MicroRNAs. *Cell* **173**, 20-51
 13. Gebert, L. F. R., and MacRae, I. J. (2018) Regulation of microRNA function in animals. *Nature reviews. Molecular cell biology*
 14. Kim, H. J., Cho, H., Alexander, R., Patterson, H. C., Gu, M., Lo, K. A., Xu, D., Goh, V. J., Nguyen, L. N., Chai, X., Huang, C. X., Kovalik, J. P., Ghosh, S., Trajkovski, M., Silver, D. L., Lodish, H., and Sun, L. (2014) MicroRNAs are required for the feature maintenance and differentiation of brown adipocytes. *Diabetes* **63**, 4045-4056
 15. Mori, M. A., Thomou, T., Boucher, J., Lee, K. Y., Lallukka, S., Kim, J. K., Torriani, M., Yki-Jarvinen, H., Grinspoon, S. K., Cypess, A. M., and Kahn, C. R. (2014) Altered miRNA processing disrupts brown/white adipocyte determination and associates with lipodystrophy. *The Journal of clinical investigation* **124**, 3339-3351
 16. Oliverio, M., Schmidt, E., Mauer, J., Baitzel, C., Hansmeier, N., Khani, S., Konieczka, S., Pradas-Juni, M., Brodesser, S., Van, T. M., Bartsch, D., Bronneke, H. S., Heine, M., Hilpert, H., Tarcitano, E., Garinis, G. A., Frommolt, P., Heeren, J., Mori, M. A., Bruning, J. C., and Kornfeld, J. W. (2016) Dicer1-miR-328-Bace1 signalling controls brown adipose tissue differentiation and function. *Nature cell biology* **18**, 328-336
 17. Roger, E. D., O.; Pisani, D.F.; Gautier, N.; Amri, E.Z.; Van Obberghen, E.; Hinault, C. . (2018) Increased expression of miRNAs and of Argonaute-2 is associated to brown adipose tissue activation *Under Submission at Molecular Metabolism*
 18. Sun, T., Fu, M., Bookout, A. L., Kliewer, S. A., and Mangelsdorf, D. J. (2009) MicroRNA let-7 regulates 3T3-L1 adipogenesis. *Molecular endocrinology* **23**, 925-931
 19. Huang, Z. P., and Wang, D. Z. (2014) miR-22 in cardiac remodeling and disease. *Trends in cardiovascular medicine* **24**, 267-272
 20. Diniz, G. P., Huang, Z. P., Liu, J., Chen, J., Ding, J., Fonseca, R. I., Barreto-Chaves, M. L., Donato, J., Jr., Hu, X., and Wang, D. Z. (2017) Loss of microRNA-22 prevents high-fat diet induced dyslipidemia and increases energy expenditure without affecting cardiac hypertrophy. *Clinical science* **131**, 2885-2900
 21. Pisani, D. F., Beranger, G. E., Corinus, A., Giroud, M., Ghandour, R. A., Altirriba, J., Chambard, J. C., Mazure, N. M., Bendahhou, S., Durantou, C., Michiels, J. F., Frontini, A., Rohner-Jeanraud, F., Cinti, S., Christian, M., Barhanin, J., and Amri, E. Z. (2016) The K⁺ channel TASK1 modulates beta-adrenergic response in brown adipose tissue through the mineralocorticoid receptor pathway. *FASEB J* **30**, 909-922
 22. Karbiener, M., Neuhold, C., Opriessnig, P., Prokesch, A., Bogner-Strauss, J. G., and Scheideler, M. (2011) MicroRNA-30c promotes human adipocyte differentiation and co-represses PAI-1 and ALK2. *RNA Biol* **8**, 850-860
 23. Lundh, M., Plucinska, K., Isidor, M. S., Petersen, P. S. S., and Emanuelli, B. (2017) Bidirectional manipulation of gene expression in adipocytes using CRISPRa and siRNA. *Molecular metabolism* **6**, 1313-1320
 24. Giroud, M., Karbiener, M., Pisani, D. F., Ghandour, R. A., Beranger, G. E., Niemi, T., Taittonen, M., Nuutila, P., Virtanen, K. A., Langin, D., Scheideler, M., and Amri, E. Z. (2016) Let-7i-5p represses brite adipocyte function in mice and humans. *Scientific reports* **6**, 28613
 25. Ohno, H., Shinoda, K., Spiegelman, B. M., and Kajimura, S. (2012) PPARgamma agonists induce a white-to-brown fat conversion through stabilization of PRDM16 protein. *Cell metabolism* **15**, 395-404

26. Brandao, B. B., Guerra, B. A., and Mori, M. A. (2017) Shortcuts to a functional adipose tissue: The role of small non-coding RNAs. *Redox biology* **12**, 82-102
27. Sun, L., Xie, H., Mori, M. A., Alexander, R., Yuan, B., Hattangadi, S. M., Liu, Q., Kahn, C. R., and Lodish, H. F. (2011) Mir193b-365 is essential for brown fat differentiation. *Nature cell biology* **13**, 958-965
28. Gurha, P., Abreu-Goodger, C., Wang, T., Ramirez, M. O., Drumond, A. L., van Dongen, S., Chen, Y., Bartonicek, N., Enright, A. J., Lee, B., Kelm, R. J., Jr., Reddy, A. K., Taffet, G. E., Bradley, A., Wehrens, X. H., Entman, M. L., and Rodriguez, A. (2012) Targeted deletion of microRNA-22 promotes stress-induced cardiac dilation and contractile dysfunction. *Circulation* **125**, 2751-2761
29. Huang, Z. P., Chen, J., Seok, H. Y., Zhang, Z., Kataoka, M., Hu, X., and Wang, D. Z. (2013) MicroRNA-22 regulates cardiac hypertrophy and remodeling in response to stress. *Circulation research* **112**, 1234-1243
30. Kaur, K., Vig, S., Srivastava, R., Mishra, A., Singh, V. P., Srivastava, A. K., and Datta, M. (2015) Elevated Hepatic miR-22-3p Expression Impairs Gluconeogenesis by Silencing the Wnt-Responsive Transcription Factor Tcf7. *Diabetes* **64**, 3659-3669
31. Long, J., Badal, S. S., Wang, Y., Chang, B. H., Rodriguez, A., and Danesh, F. R. (2013) MicroRNA-22 is a master regulator of bone morphogenetic protein-7/6 homeostasis in the kidney. *The Journal of biological chemistry* **288**, 36202-36214
32. Zhang, Y., Zhao, S., Wu, D., Liu, X., Shi, M., Wang, Y., Zhang, F., Ding, J., Xiao, Y., and Guo, B. (2018) MicroRNA-22 Promotes Renal Tubulointerstitial Fibrosis by Targeting PTEN and Suppressing Autophagy in Diabetic Nephropathy. *Journal of diabetes research* **2018**, 4728645

Figure legends

Figure 1: Synergistic effect of let-7c and miR-22 on brown adipocyte thermogenic function. **A:** Relative abundance of mRNA expression of let-7c and miR-22 in iBAT-derived SVF during brown adipocyte differentiation (n=4). Data are normalized to 36B4 mRNA and expressed in arbitrary units. **B:** Transfection scheme of Anti-miR pool for let-7c and miR-22 at day 7 in iBAT-derived SVF mature brown adipocytes for 72h **C:** Relative mRNA expression levels of UCP-1 in iBAT-derived SVF mature brown adipocytes (n=3) **D:** Immunoblots of UCP1 and CHC and its quantification in protein lysates from transfected iBAT-derived SVF mature brown adipocytes (n=1). **E-G:** Representative histograms obtained for oxygen consumption measurements (n = 1). Histograms show **(E)** mitochondrial respiration values under basal condition, **(F)** isoproterenol response and **(G)** isoproterenol-stimulated uncoupled mitochondrial respiration. Data are presented as mean +/- SEM. *p-value < 0.05.

Figure 2: Lack of effect of let-7c on brown adipocyte thermogenic function. **A:** Transfection scheme of anti-miR for let-7c at day 7 in iBAT-derived SVF mature brown adipocytes for 72h **B:** Relative abundance of mRNA expression of adipocyte markers in transfected iBAT-derived mature brown adipocyte (n=3). Data are normalized to 36B4 mRNA and expressed in arbitrary units. **C-E:** Representative histograms obtained for oxygen consumption measurements (n = 1). Histograms show **(C)** mitochondrial respiration values under basal condition, **(D)** isoproterenol response and **(E)** isoproterenol-stimulated uncoupled mitochondrial respiration. Data are presented as mean +/- SEM. *p-value < 0.05.

Figure 3: miR-22 effects on brown adipocyte thermogenic function. **A:** Transfection scheme of anti-miR for miR-22 at day 7 in iBAT-derived SVF mature brown adipocytes for 72h **B:** Relative abundance of mRNA expression of adipocyte markers in transfected iBAT-derived mature brown adipocyte (n=3). Data are normalized to 36B4 mRNA and expressed in arbitrary units. **C-E:** Representative histograms obtained for oxygen consumption measurements (n = 3). Histograms show **(C)** mitochondrial respiration values under basal condition, **(D)** isoproterenol response and **(E)** isoproterenol-stimulated uncoupled mitochondrial respiration. Data are presented as mean +/- SEM. *p-value < 0.05.

Figure 4: Inhibition of miR-22 partially mimics the effect of rosiglitazone and T3 on brown adipocyte thermogenic function. **A:** Transfection scheme of Anti-miR for miR-22 at day 7 in iBAT-derived SVF mature brown adipocytes in the presence or in the absence of Rosiglitazone and T3 for 72h. **B:** Relative abundance of mRNA expression of adipocyte markers in transfected iBAT-derived mature brown adipocytes in the absence of rosiglitazone and T3 (n=3). Data are normalized to 36B4 mRNA and expressed in arbitrary units. **C:** Immunoblots of P-HSL, UCP1 and CHC and their quantification in protein lysates from

transfected iBAT-derived SVF mature brown adipocytes in the absence or presence of rosiglitazone and T3 (n=3). **D-F**: Representative histograms obtained for oxygen consumption measurements in the absence of rosiglitazone and T3 (n = 1). Histograms show **(D)** mitochondrial respiration values under basal condition, **(E)** isoproterenol response and **(F)** isoproterenol-stimulated uncoupled mitochondrial respiration. Data are presented as mean +/- SEM. *p-value < 0.05.

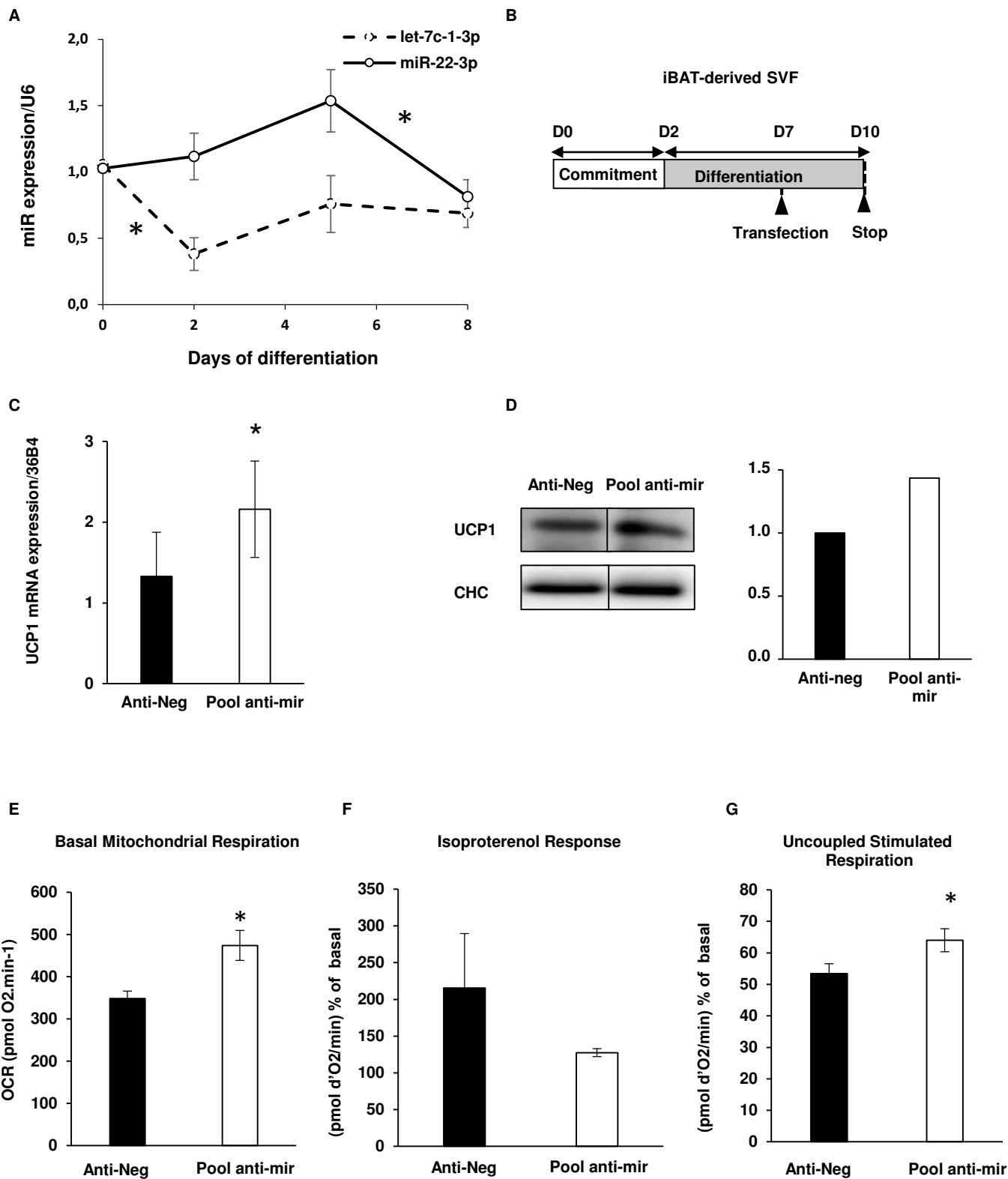


Figure 1

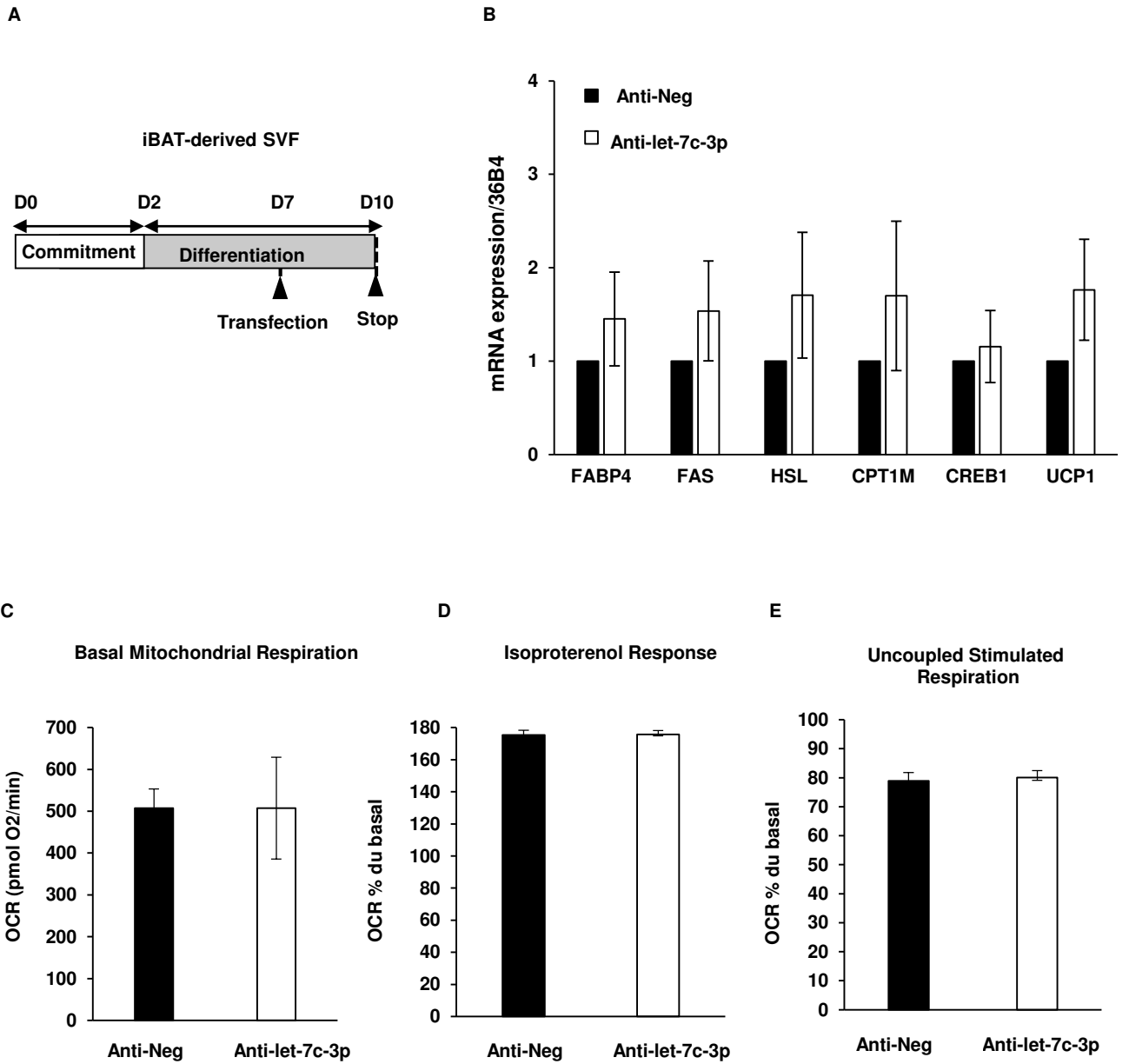


Figure 2

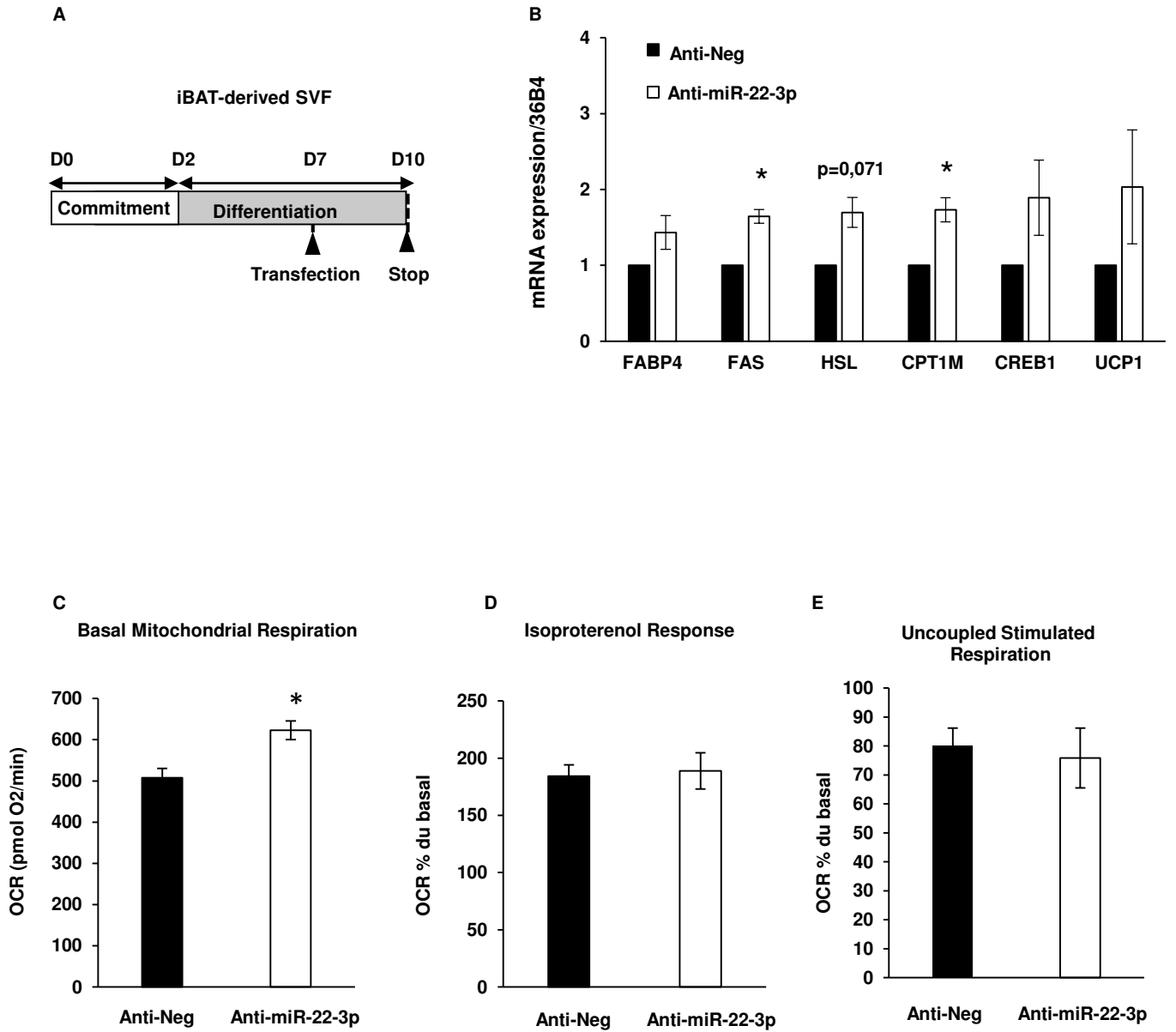


Figure 3

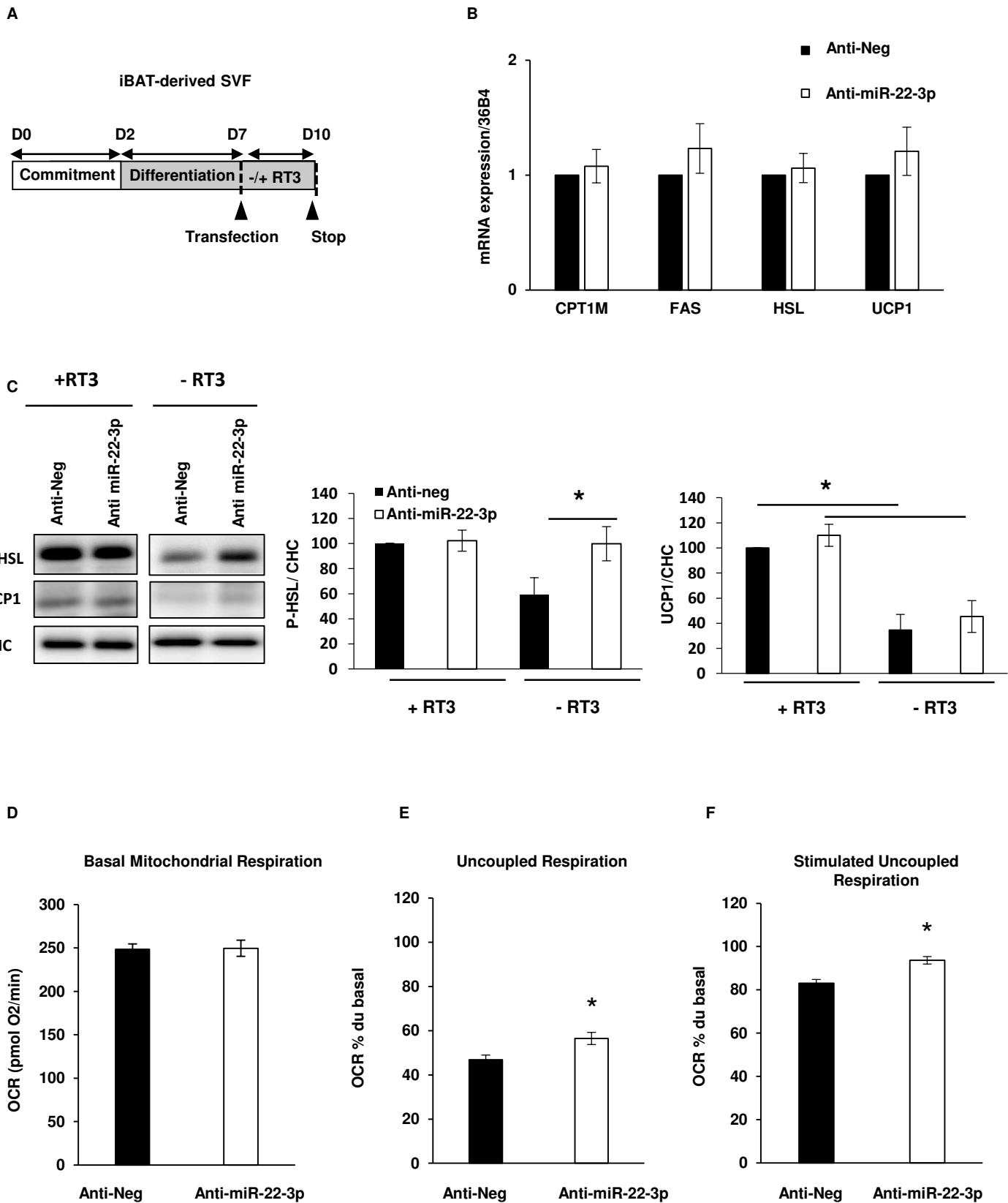


Figure 4

III. Discussion générale des résultats

Au cours de mes travaux de thèse, je me suis particulièrement intéressée aux conséquences d'un environnement maternel délétère, durant la période prénatale et post-natale précoce, sur le métabolisme de la progéniture. Nos résultats mettent en avant le rôle du TABr comme acteur majeur de l'adaptation métabolique mise en place chez la progéniture issue d'un environnement maternel carencé en protéine. Après avoir démontré l'implication du TABr dans le maintien de l'homéostasie glucidique chez cette progéniture, j'ai voulu comprendre les mécanismes sous-jacents impliquant le TABr. Nous nous sommes particulièrement focalisés sur les miARNs et leur machinerie. Nos résultats mettent en évidence que la machinerie des miARNs, plus particulièrement AGO2, et les miARNs semblent requis pour l'activation du TABr. Dans cette dernière partie je reprends certains points essentiels soulevés par l'ensemble de mes travaux.

1. Adaptation métabolique suite à une carence protéique maternelle : rôle du tissu adipeux brun

1.1 Carence protéique maternelle et adaptation des tissus périphériques dans la progéniture

Afin d'étudier les effets métaboliques d'un environnement maternel délétère sur la progéniture plusieurs modèles animaux ont été développés, avec des stratégies de restriction et des fenêtres d'application différentes, comme détaillés dans l'introduction (Warner and Ozanne, 2010). Au laboratoire, nous nous sommes focalisés sur le modèle de carence protéique maternelle durant la gestation et la lactation. Il s'agit d'un modèle très largement étudié notamment chez le rat, dans le domaine de l'origine développementale des maladies métaboliques. En effet, suite à une carence protéique maternelle, la progéniture développe des troubles métaboliques parmi lesquels une diminution significative de la sécrétion d'insuline. Malgré ce défaut de sécrétion d'insuline, la jeune progéniture adulte présente une glycémie normale et avec l'âge le défaut de sécrétion d'insuline est associé à l'apparition d'une insulino-résistance et d'une hyperglycémie. Le fait que cette jeune progéniture soit capable de maintenir sa glycémie normale avec si peu d'insuline a attiré notre attention. Il semble qu'une adaptation métabolique se mette en place et que celle-ci s'amointrisse avec l'âge entraînant une dérégulation de l'homéostasie glucidique chez la progéniture âgée. Au début de mes travaux de thèse, différentes études avaient corrélé ce paradoxe métabolique apparent de normoglycémie malgré l'insulinopénie à un processus adaptatif des tissus périphériques.

En effet, à la fin des années 1990, Ozanne et al. mettent en évidence des jeunes rats dont les mères ont été carencées en protéine une amélioration de la sensibilité à l'insuline associée à une augmentation du nombre de récepteurs à l'insuline dans les tissus insulino-sensibles (adipeux blanc, muscle et foie) (Ozanne et al., 1996a; Ozanne et al., 1996b ; Shepherd et al., 1997). Nous avons examiné le foie des jeunes animaux CP mais nous n'avons pas observé de meilleure sensibilité à l'insuline. Au contraire nous avons mesuré un défaut de stockage de glycogène (résultats non publiés). En 2014, lorsque notre étude avait déjà démarré, Jousse et al. montrent cette fois dans une progéniture de souris issues d'une carence protéique maternelle, une augmentation de la dépense énergétique associée à une augmentation du métabolisme mitochondrial musculaire (Jousse et al., 2014). Lors de l'analyse du métabolisme musculaire chez les jeunes rats CP, nous n'avons pas retrouvé de différences au niveau des marqueurs métaboliques, ni de différences de type de fibres musculaires entre jeunes animaux contrôles et CP dans deux types musculaires différents (EDL et Soleus). De plus, il n'y avait pas de différence d'activité physique entre ces deux groupes, suggérant que le muscle n'était pas directement impliqué dans la compensation métabolique que nous observons chez les jeunes rats CP. L'étude de Jousse et al. attribuant l'augmentation de la dépense énergétique à une augmentation du métabolisme musculaire a été réalisée sur des souris hébergées individuellement à une température de 22°C (Jousse et al., 2014). Il est important de noter qu'à cette température le TABr des souris est déjà hyperactif étant donné que leur thermoneutralité se trouve autour de 28-30°C. Par conséquent, son effet bénéfique potentiel est masqué. Dans cette étude, l'expression génique d'UCP1 dans le TABr a été mesurée sans différence entre les deux groupes, mais sans expérience complémentaire permettant d'évaluer son état d'activation. En conclusion, la température étant un facteur important de l'activation du TABr, sa participation à l'augmentation de la dépense énergétique dans cette étude ne peut être exclue.

Dans notre étude publiée dans *Diabetes* en 2017, nous avons démontré un rôle clé du TABr chez les jeunes rats CP hébergés à 22-24°C, température proche de la thermoneutralité des rats estimés autour de 24-26°C. Nous avons montré que l'activation du TABr ainsi que l'augmentation de la masse de ce tissu chez la jeune progéniture CP contribue au maintien de la normoglycémie chez ces animaux (Dumortier et al., 2017). L'augmentation de la thermogénèse non frissonnante chez ces jeunes rats CP a été associée à une augmentation de la dépense énergétique avec un quotient respiratoire proche de 1 indiquant une utilisation préférentielle de substrats glucidiques par rapport aux substrats lipidiques (Dumortier et al., 2017). Pour clairement démontrer une utilisation du glucose par le TABr actif de nos jeunes animaux CP, nous aurions souhaité réaliser des mesures de PET Scan (Cypess et al., 2009; van Marken Lichtenbelt et al., 2009; Virtanen et al., 2009), mais faute d'équipement disponible

cela n'a pas été possible. Par ailleurs, il aurait été intéressant de stimuler des explants de TABr avec de l'isoprotérénol (agoniste des récepteurs β -adrénergiques) ou de l'insuline pour évaluer le transport de glucose des TABr CP par rapport aux contrôles. Ceci étant nous avons néanmoins validé l'importance du TABr dans ce maintien de l'homéostasie en réalisant une ablation chirurgicale du tissu conduisant à une perte de compensation entraînant une hyperglycémie chez ces rats CP dépourvus de TABr.

Différents tissus ont donc été suggérés avant le TABr pour expliquer cette adaptation métabolique en absence d'insuline dans les jeunes progénitures CP. Outre les différences de modèle liées à l'espèce, à laquelle s'associe la notion de sensibilité différente aux températures d'hébergement, des différences dans la composition des régimes en termes de teneur en protéine ou encore dans l'âge auquel le sevrage intervient (3 versus 4 semaines) existent entre les études. Une autre notion importante est le fait de sélectionner des portées donnant entre 4 et 8 souriceaux dans l'étude de Jousse et al, de réduire les portées à 8 ratons dans les études d'Ozanne et al. alors que nous avons fait le choix de ne pas réduire les portées. En effet, le régime utilisé n'engendrant aucun effet délétère sur le nombre de petits par portée nous avons toujours obtenu un nombre de petits entre 12 et 14 autant pour les groupes CP que contrôles. De plus, nous n'avons pas voulu entraîner de stress potentiel en effectuant une réduction de portées. Enfin, il faut garder à l'esprit que des études récentes ont mis en évidence un rôle important du microbiote dans la réponse métabolique. Ce microbiote est donc sensible et propre à chaque environnement d'hébergement, mais également différent en fonction des régimes alimentaires. Il a été récemment décrit que la restriction calorique induit un changement de la composition du microbiote qui permet le développement d'adipocytes bruns/beiges au sein du TAB, aboutissant à une amélioration du contrôle glycémique et de la sensibilité à l'insuline (Fabbiano et al., 2018). Ceci suggère d'une part que les changements de composition du microbiote intestinal des jeunes animaux CP pourraient expliquer les différences observées entre les études de restriction protéique maternelle. D'autre part, la restriction protéique maternelle pourrait moduler le microbiote des jeunes animaux CP et influencer l'activation du TABr.

Bien que les études mettent en lumière différents tissus périphériques expliquant l'adaptation métabolique mise en place chez la jeune progéniture CP, elles s'accordent toutes sur l'apparition de l'insulino-résistance et d'une hyperglycémie chez les animaux âgés. Dans notre cas, l'activation du TABr permet le maintien de l'homéostasie énergétique chez la jeune progéniture CP et sa désactivation chez les vieux animaux corrèle avec l'apparition des troubles métaboliques. A ce titre une question se pose : les cellules progénitrices au sein du

TABr sont-elles programmées par l'environnement prénatal délétère ou le TABr est-il activé par des signaux extrinsèques tels que l'absence d'insuline ?

1.2 L'adaptation du tissu adipeux brun : programmation intrinsèque ou conséquence d'une altération métabolique ?

Le TABr est connu pour être présent et activé à la naissance pour maintenir la température corporelle du fœtus hors de l'environnement intra-utérin (Frontini and Cinti, 2010). Ainsi, l'étude du TABr à l'âge fœtal chez nos groupes d'animaux nous permet difficilement d'établir un lien entre régulation de l'homéostasie énergétique à cet âge et activation du TABr. En effet, à l'âge fœtal, les TABr des progénitures contrôles et CP sont activés et morphologiquement comparables avec une forte expression de leur marqueur spécifique UCP1. Cependant, nous ignorons si dans le cas de la progéniture CP, les adipocytes bruns résidents sont destinés à maintenir leur activité jusqu'à l'âge adulte par un mécanisme d'adaptation programmée.

Aujourd'hui, nous ne possédons pas d'éléments suffisants pour conclure quant à la programmation intrinsèque du TABr. Comme vu dans l'introduction, le TABr est composé d'adipocytes matures mais aussi de cellules de la fraction stroma-vasculaire (SVF ou stroma vascular fraction), des cellules endothéliales mais aussi immunitaires (Lee et al., 2014). Afin d'identifier une programmation potentielle du TABr, nous avons réalisé des expériences à partir des cellules progénitrices présentes dans la fraction stroma-vasculaire provenant de TABr issus de rats contrôles (inactifs) et rats CP (actifs). Nous avons suivi leur différenciation en adipocytes matures et réalisé des expériences pour mesurer la fonction mitochondriale in vitro. Ces expériences n'ont pas permis de mettre en évidence des différences de la respiration mitochondriale basale, stimulée à l'isoprotérénol ou découplée entre les deux populations cellulaires. Nous n'avons pas réitéré ces expériences car le fait d'ajouter un cocktail hormonal pour induire la différenciation adipocytaire avec notamment de l'insuline induit un biais par rapport à l'environnement dépourvu en insuline présent chez les rats CP.

Afin d'étudier si l'activation du TABr chez la jeune progéniture CP était programmée et transmise de génération en génération, nous avons initié des expériences transgénérationnelles. En effet, comme mentionné dans l'introduction le phénotype CP (altération de l'homéostasie glucidique) a déjà été mis en évidence pour être transmis jusqu'à la génération F3 en croisant des femelles CP F1 puis F2 avec des mâles contrôles (Benyshek et al., 2006). Dans ce contexte, et pour s'affranchir d'effet diabète gestationnel nous avons croisé des rats mâles F1 issus de mère CP avec des femelles contrôles. Nous avons évalué l'activité du TABr de la génération mâle F2. Le TABr de la descendance mâle F2 CP semblait

plus actif que celui des contrôles mais faute de temps, nous n'avons pas pu augmenter notre nombre d'animaux et continuer les investigations sur cette progéniture F2. Il aurait également été intéressant de mener les croisements avec les mâles CP jusqu'à la F3 pour savoir si l'activation du TABr chez les jeunes animaux CP est un trait transmis de manière transgénérationnelle avec la notion de mécanismes épigénétiques impliqués.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction différents mécanismes épigénétiques ont été mis en évidence pour être induit par un environnement délétère (Block and El-Osta, 2017; Vickers, 2014). Ces modifications épigénétiques peuvent cibler des promoteurs de gènes clés impliqués dans le métabolisme glucidique ou lipidique. En effet, Lecoutre et al. ont récemment montré dans un modèle d'obésité maternelle, une reprogrammation épigénétique du gène de la leptine par méthylation différentielle de son promoteur et de deux de ces enhanceurs chez la progéniture mâle aboutissant à une hyperleptinémie et une hypertrophie des adipocytes dans le TAB périrénal et sous-cutané (Lecoutre et al., 2017). Dans notre étude, nous nous sommes focalisés sur des mécanismes impliquant les miARNs qui seront abordés dans la deuxième partie de cette discussion.

Jusqu'à présent, nous nous sommes demandés si la programmation des adipocytes bruns pouvait être responsable de l'activité intrinsèque du TABr chez nos jeunes animaux CP. Cependant, l'activation du TABr pourrait également être établie en réponse à des facteurs extrinsèques. Lors des expériences que nous avons réalisées sur explants de TABr pour mesurer la lipolyse, nous avons montré que même en dehors de son environnement interscapulaire *in vivo*, le TABr des jeunes rats CP possède une lipolyse basale significativement supérieure à celle observée pour les explants des animaux contrôles (Dumortier et al., 2017). Ceci suggère plutôt un rôle intrinsèque au TABr, mais il est important de noter que les expériences de lipolyse ont été réalisées quelques heures après l'excision du tissu. Ceci n'exclut donc pas l'action de facteurs circulants toujours présents au niveau du TABr ou dont l'action pour promouvoir son activité serait encore effective. L'activation du TABr pourrait également être la conséquence d'une faible sécrétion d'insuline et par conséquent d'un signal insulinique altéré chez la jeune progéniture CP. Cette carence en insuline pourrait par la suite promouvoir la production de facteurs endogènes circulants pour activer le TABr (Villarroya and Vidal-Puig, 2013).

Afin de tester cette hypothèse, nous avons dans un premier temps mesuré dans différents fluides biologiques la quantité de certains facteurs circulants connus pour être impliqués dans la régulation de l'activité du TABr. Ainsi dans l'urine des jeunes animaux CP, nous avons vu une augmentation significative de la noradrénaline ainsi qu'une tendance à l'augmentation pour l'adrénaline, mais pas de différence pour la dopamine, suggérant un rôle à minima

participatif du système nerveux sympathique dans l'activation du TABr des jeunes animaux CP (Morrison and Madden, 2014). Nous avons choisi de mesurer spécifiquement les catécholamines dans les urines de 24h de nos animaux pour éviter un biais de sécrétion engendré par le stress que représente la collection de sérum au niveau de la veine caudale.

Dans le sérum, nous n'avons pas détecté de différence entre nos animaux contrôles et CP pour le FGF21 ou les hormones thyroïdiennes T4 et T3. Cependant, au sein du TABr, nous observons une augmentation de l'expression des gènes FGF21, et de la DIO2, responsable de la transformation de la T4 inactive en T3 active. L'expression du récepteur β -3 adrénergique est également augmentée. Ces données suggèrent que les voies de signalisation associées aux catécholamines et à l'hormone thyroïdienne sont fortement activées chez les jeunes animaux CP. L'absence d'une augmentation de FGF21 au niveau du sérum chez les animaux CP peut s'expliquer par le fait que des stimuli adrénergiques peuvent augmenter l'expression thermogénique des adipocytes bruns qui produisent à leur tour du FGF21 et celui-ci agirait directement de manière autocrine dans le but de maintenir le TABr actif (Villarroya et al., 2017). De plus, les catécholamines ont été décrites pour induire l'activité de la DIO2 dans le TABr via l'AMPc, permettant une augmentation de la transformation de la T4 en T3 (de Jesus et al., 2001). La T3 agit également de manière positive sur les niveaux d'AMPc renforçant l'activité de la DIO2, créant une boucle de régulation positive et permettant d'augmenter l'activité des adipocytes bruns. Enfin, une dernière observation faite au cours de notre étude nous permet d'avancer l'hypothèse que certains facteurs endogènes participent à l'adaptation métabolique. Lorsque nous avons procédé à l'ablation du TABr, nous avons pu observer qu'une apparition du brunissement/« britening » au niveau du TABsc chez la jeune progéniture CP, auparavant non détectée, potentiellement dû à l'action de facteurs circulants capables d'induire une différenciation des cellules progénitrices Myf 5- en adipocytes brite/beige (Seale et al., 2008).

Une autre expérience qui aurait pu nous permettre de répondre à la question de l'activation du TABr de manière intrinsèque ou extrinsèque est la transplantation de TABr in vivo. Nous avons imaginé réaliser des transplantations de TABr actif provenant de rats CP chez des rats hyperglycémiques pour évaluer son effet sur le métabolisme glucidique de ces rats. De même, nous aurions pu transplanter du TABr actif de rats CP chez des rats C pour étudier si le TABr issus des rats C devient hyperactif sous l'influence d'un milieu CP.

1.3 Quid du rôle du système nerveux central dans l'activation du tissu adipeux brun ?

Au cours de notre étude, nous avons pris le parti de pratiquer une ablation chirurgicale du TABr pour évaluer sa participation au maintien de l'homéostasie glucidique chez la jeune progéniture CP. De cette manière, nous nous sommes affranchis en même temps des effets

métaboliques du TABr in vivo et des fibres nerveuses qui y sont reliées pour participer à son activation. En effet, il est maintenant bien décrit que les fibres nerveuses du système nerveux sympathique libèrent de la noradrénaline à l'origine de l'activation des adipocytes bruns (Kooijman et al., 2015). Nous avons constaté que l'ablation du TABr chez nos jeunes animaux CP normalise la température corporelle et provoque une hyperglycémie post-prandiale, suggérant ainsi que le TABr est requis pour le maintien de la glycémie (Dumortier et al., 2017). Pour estimer la participation du système nerveux sympathique dans l'activation du TABr des rats CP, il aurait fallu réaliser des expériences de dénervation bilatérale (dénervation de chacun des lobes). Si l'effet systémique du TABr avait perduré malgré une dénervation de celui-ci, nous aurions pu omettre un effet direct du système nerveux sympathique sur l'activation du TABr.

Au sein de l'hypothalamus, les noyaux du VMH sont des senseurs de glucose et de leptine (Roh et al., 2016). De plus, le TABr est connu pour être activé par des neurones hypothalamiques du VMH et par le système mélanocortine car l' α -MSH stimule également l'activité du TABr (Brito et al., 2007). Nous n'avons pas évalué les potentiels différences de peptides neuroendocrines au niveau du cerveau des animaux CP qui pourraient également expliquer une activation plus centrale du TABr. Cependant, chez les animaux CP, il y a une très faible sécrétion d'insuline mais la leptinémie reste inchangée (Dumortier et al., 2017). Il a déjà été montré qu'une administration de fortes doses d'insuline au niveau central augmente l'activité sympathique dans le TABr, ce qui n'est pas en adéquation avec notre phénotype puisque chez nos jeunes animaux CP, une très faible sécrétion d'insuline est corrélée à une forte activation du TABr (Rahmouni et al., 2004).

Par ailleurs, la maturation hypothalamique chez le rongeur est initiée avant la naissance mais ne se termine pas avant la deuxième semaine de la vie postnatale suggérant la lactation comme une période critique pour le bon développement des différents noyaux hypothalamiques (Reynolds et al., 2015). Les changements dans la composition du lait peuvent donc avoir un effet marqué sur l'étendue de la maturation hypothalamique. En effet, un régime maternel obésogène chez le rat est associé à une augmentation de la teneur en lipides et en protéines du lait, suggérant une surnutrition précoce du fœtus associé à une augmentation de la concentration d'insuline et de leptine (Purcell et al., 2011). La période de lactation semble être critique pour la programmation de l'activation du TABr. Comme vu dans l'introduction, si le régime carencé en protéines est maintenu uniquement durant la gestation, les animaux subissent alors le phénomène de Catch-Up Growth et développent une obésité avec l'âge (Bieswal et al., 2006; Bol et al., 2009; Coupe et al., 2012), négativement corrélé dans la littérature avec la masse et l'activité du TABr (Ouellet et al., 2011). Ceci suggère que

la période de gestation n'est à elle seule pas suffisante pour permettre la reprogrammation et l'adaptation métabolique du TABr. De plus, nous pourrions imaginer que la carence protéique maternelle reprogramme les effets métaboliques induits par l'hypothalamus sur le TABr. Cependant, à ce jour, nous n'avons pas d'information concernant la composition du lait maternel de la jeune progéniture CP.

Au vu du retard de croissance présenté par les animaux CP, l'hypothèse selon laquelle le TABr est activé par la voie adrénérgique, elle-même activée en réponse au froid parce que les animaux CP sont plus petits, a été avancée. Cependant, il faut noter que les rats CP sont plus petits en poids mais également en taille par conséquent le ratio est proportionnel d'autant que ces rats maintiennent ce phénotype tout au long de leur vie. D'autre part, comme évoqué précédemment, les rats sont hébergés proche de leur thermoneutralité. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que la thermoneutralité des animaux CP soit différente de celle des animaux contrôles. En ce qui concerne le challenge des animaux au froid, lorsque nous avons réalisés ces expériences nous avons pu observer que les jeunes animaux CP sont protégés contre le froid et arrivent encore à augmenter leur température corporelle par rapport aux animaux contrôles, montrant qu'ils sont plus résistants au froid que leurs homologues contrôles. De plus, chez ces jeunes animaux CP, à l'état basal, nous n'observons pas de brunissement au sein du TAB sous-cutané, alors que ce phénomène est souvent décrit pour être activé par le froid. Enfin, nous avons mesuré l'épaisseur de la couche d'adipocytes présente sous la peau au niveau interscapulaire et dans la zone ventrale et nous n'avons pas observé de différence particulière entre les groupes.

Pour résumer, plus d'investigations concernant l'implication du système nerveux central et sympathique sont nécessaires pour conclure à une participation ou à un rôle initiateur du système nerveux pour l'activation du TABr chez les animaux CP.

1.4 Objectif : Réussir à maintenir le TABr actif

Au cours de notre étude, nous avons démontré le rôle du TABr dans l'homéostasie énergétique chez la jeune progéniture CP. Bien qu'il soit difficile à l'heure actuelle de déterminer l'origine de cette activation, nous observons que le TABr est requis pour le maintien de la normoglycémie chez les jeunes rats CP. Ceci renforce l'idée selon laquelle maintenir l'activation de ce tissu pourrait palier aux troubles métaboliques (insulino-résistance, hyperglycémie) corrélées au déclin de l'activation du TABr. Dans la littérature, plusieurs autres études ont prouvé le potentiel bénéfique du TABr dans le maintien de l'homéostasie énergétique. En effet, il a déjà été montré que la transplantation de TABr au niveau

interscapulaire inhibe la prise de poids induite par l'administration d'un régime riche en graisses et améliore de manière significative l'homéostasie énergétique (Liu et al., 2013c). Plus récemment, la transplantation de tissu adipeux brun interscapulaire dans la cavité viscérale de souris inhibe l'athérosclérose induite par une déficience en apolipoprotéine E et est associé à une augmentation des concentrations de FGF21 et de noradrénalines circulantes (Kikai et al., 2018). Comme mentionné précédemment, nous aurions pu effectuer des expériences de transplants de TABr actif notamment chez nos vieux animaux CP et évaluer le potentiel effet bénéfique sur la glycémie. Cependant, cette méthode invasive paraît difficilement applicable chez les patients en clinique, c'est pourquoi d'autres alternatives sont développées pour activer le TABr comme l'exposition au froid ou encore l'utilisation d'agents pharmacologiques, par exemple en ciblant la voie β -adrénergique avec le CL316,243 (agoniste des récepteurs β_3 -adrénergiques). Nous avons ainsi envisagé de réactiver le TABr des vieux animaux CP hyperglycémiques avec du CL 316,243 pour observer si l'hyperglycémie installée était reversée. Dans le contexte de troubles métaboliques que sont l'obésité et le diabète de type 2, l'activation du TABr est apparue comme une nouvelle approche thérapeutique de par sa capacité à brûler les calories excédentaires sous forme de chaleur. C'est pourquoi l'identification de facteurs activateurs du TABr permet à la communauté scientifique de réfléchir au développement de nouvelles thérapies. Chez des individus obèses, le TABr est faiblement représenté et les techniques cliniques mises en place jusqu'à présent pour activer le tissu consistent à exposer les individus au froid pour activer la voie β -adrénergique (Leitner et al., 2018). Cependant, malgré une activation efficace du TABr, la plupart des études ne recensent pas de perte de poids, diminuant le potentiel attractif du TABr comme cible thérapeutique dans le contexte de l'obésité. Dans le contexte d'un diabète de type 2 non associé à une obésité, comme suite à un environnement maternel délétère, l'activation du TABr permettrait de maintenir une normoglycémie dans la progéniture présentant un défaut de sécrétion de l'insuline, et ce sans cibler la perte de poids, pour éviter l'apparition du diabète avec l'âge. Le TABr se place donc comme une cible thérapeutique prometteuse pour le traitement des troubles métaboliques liés au retard de croissance induit par une restriction nutritive maternelle.

Par ailleurs, il est important de noter qu'une suractivation ou une activation permanente du TABr lorsque le métabolisme ne le nécessite pas pourrait engendrer un effet inverse et aboutir à d'autres états pathologiques.

2. Les miARNs comme outil thérapeutique pour activer le tissu adipeux brun

2.1 La machinerie des miARNs : acteurs clés dans le contrôle de la différenciation et de la fonction du TABr

La machinerie des miARNs a fait l'objet d'intenses recherches notamment dans le domaine de la différenciation et de l'activation du TABr. Le processus de répression transcriptionnelle associé aux miARNs met en jeu plusieurs enzymes et protéines (DROSHA, DGRC8, EXP5, DICER) qui vont maturer les miARNs au cours de différentes étapes, de leur traduction dans le noyau à leur action principalement cytoplasmique. La dernière étape nécessite la prise en charge du miARN mature par le complexe RISC dont la protéine Argonaute-2 (AGO2) est un des composants clés (Kreth et al., 2018). Parmi les différents acteurs de la machinerie des miARNs, DGCR8 (partenaire de DROSHA) et DICER ont déjà été impliqués dans la différenciation et par conséquent la fonction adipocytaire. Deux études publiées à trois ans d'intervalle utilisant des souris déficientes en DICER dans les adipocytes ont révélé son rôle dans l'adipogenèse. Dans la première étude de 2011, les auteurs montrent que la délétion de DICER (promoteur aP2) dans les adipocytes inhibe la lipogenèse et aboutit par conséquent à une déplétion sévère de la quantité de TAB chez la souris (Mudhasani et al., 2011). Cette déplétion est également associée à une diminution de l'activité thermogénique des adipocytes bruns. Ces observations sont corroborées dans la deuxième étude de 2014 où la délétion de DICER dans les adipocytes (promoteur adiponectine) engendre une perte significative de la graisse sous-cutanée et intra-abdominale associée à une insulino-résistance sévère et à un « whitening » du TABr interscapulaire (Mori et al., 2014). La même année, la délétion spécifique de DGCR8 dans les adipocytes (promoteur adiponectine) a permis de mettre en évidence son rôle dans le maintien des caractéristiques brunes des adipocytes (Kim et al., 2014a). Concernant AGO2, une seule étude montre que sa délétion dans des pré-adipocytes stables 3T3-L1 affecte la lipogenèse mais aucun effet n'est observé sur la différenciation (Gerin et al., 2010). C'est pourquoi nous nous sommes focalisés sur le rôle d'AGO2 dans l'activation du TABr d'autant qu'il s'agit du médiateur clé de l'action des miARNs.

Dans notre étude soumise à *Molecular Metabolism*, nous montrons un nouveau rôle d'AGO2 dans l'activation du TABr grâce à deux modèles non génétiques (Dumortier et al., 2017; Gerin et al., 2010; Pradhan et al., 2017). L'expression d'AGO2 est augmentée dans un TABr activé associée à une dérégulation positive globale de l'expression des miARNs. De plus, dans notre modèle de programmation fœtale du DT2, l'expression d'AGO2 et la dérégulation positive des miARNs sont corrélées à l'état d'activation du TABr. En effet, chez les jeunes animaux CP insulino-péniques mais normoglycémiques, le TABr actif est associé à une augmentation de l'expression des différents acteurs de la machinerie des miARNs, en particulier du médiateur

en chef de la répression transcriptionnelle AGO2 et à une dérégulation positive des miARNs. Lorsque les animaux CP vieillissent et que le déclin du TABr corrèle avec l'apparition de l'hyperglycémie chez cette progéniture, l'expression de la machinerie est normalisée et l'expression des miARNs dérégulée positivement chez la jeune progéniture CP est également normalisée. De plus, ces résultats corrélerent avec une étude publiée en 2016 où l'inactivation de DICER dans le TABr donne lieu à une altération de la différenciation et par conséquent de la fonction du TABr et à une détérioration de l'homéostasie glucidique (Oliverio et al., 2016).

Il faut également noter que les miARNs connus pour être impliqués dans l'adipogenèse brune sont bien exprimés chez les jeunes animaux mais ces miARNs ne sont pas différentiellement exprimés entre les animaux contrôles et les animaux CP. Ceci renforce l'hypothèse que l'augmentation de l'expression de la machinerie, en particulier d'AGO2 et des miARNs participe à l'activation du TABr indépendamment de la différenciation (Chen et al., 2017).

Certes, nos résultats montrent que l'état actif du TABr de la jeune progéniture CP est associée à une augmentation significative de tous les acteurs de la machinerie des miARNs, surtout pour l'expression d'AGO2. Néanmoins, seulement 7,3% des miARNs détectés ont leur expression significativement augmentée. La question qui découle est comment une augmentation globale de l'expression de la machinerie des miARNs peut expliquer un si faible pourcentage de miARNs significativement augmentés ? D'une part, l'analyse en composante principale (ACP) chez nos jeunes rats nous permet d'être discriminant en formant deux groupes d'animaux contrôles et CP distincts en fonction de l'activité de leur TABr sur base de l'expression des miARNs (significativement ou non significativement dérégulés). De cette manière, nous observons une bonne corrélation entre l'analyse ACP des miARNs significativement dérégulés et celle des miARNs totaux, suggérant ainsi que l'augmentation de l'expression de la machinerie dans un TABr actif a une influence globale sur l'expression des miARNs. D'autre part, l'étude qui montre une inactivation de DICER dans le TABr provoque une diminution de l'expression de 75% des miARNs les plus abondants dans le TABr, correspondant à 33 miARNs /48 dérégulés (sur les 674 miARNs analysés). De ce fait, la proportion de miARNs dérégulée est de 7% pour cette analyse et c'est à dire du même ordre de grandeur que celle trouvée dans notre étude (Oliverio et al., 2016). Ainsi, nos résultats montrent que doubler la quantité de protéine AGO2 est corrélée à l'activation du TABr avec l'augmentation de moins de 10% des miARNs. Inversement, diminuer de moitié les niveaux protéiques d'AGO2 suffit à réduire l'expression d'UCP1 ainsi que que l'activité thermogénique des adipocytes bruns.

Chez les vieux animaux CP hyperglycémiques, nous observons de manière intéressante une diminution de l'expression de DICER (bien que non significative) lorsque le TABr est inactif

par rapport aux contrôles. Ce résultat concorde avec une autre étude montrant une diminution de l'expression de DICER avec l'âge dans le TAB associé à une diminution de 50% de l'expression des miARNs (Mori et al., 2012b). Par ailleurs, une invalidation partielle de DICER dans le TABr a révélé une diminution de l'activité de ce dernier et une plus grande sensibilité des souris au froid et à une obésité induite par un régime riche en graisses (Oliverio et al., 2016). Dans cette étude, alors que l'invalidation spécifique de DICER dans le TABr aboutit à une diminution de l'activité de celui-ci, les auteurs observent une augmentation de l'expression de DICER dans le TABsc. Cette augmentation est corrélée à une induction du processus de brunissement dans le TABsc. Au cours de notre étude sur l'implication du TABr dans le maintien de l'homéostasie glucidique, l'ablation chirurgicale de celui-ci chez les jeunes animaux CP a engendré le développement du britening dans le TABsc, reflété par l'augmentation de l'expression d'UCP1. De manière intéressante, nous avons également pu corréler l'augmentation de l'expression d'AGO2 à l'induction du britening dans TABsc de nos jeunes animaux CP, suggérant qu'une augmentation de l'expression de la machinerie dans le TABsc est associée à une augmentation de l'expression d'UCP1 (Dumortier et al., 2017).

L'analyse comparative du profil d'expression des miARNs réalisée par Oliverio et al., a montré que dans un modèle de vieillissement les souris âgées présentaient une diminution de l'expression de miARNs associés à une diminution de DICER et un TABr inactif. Inversement, dans un modèle de longévité les souris avaient une augmentation de l'expression des miARNs associée à un TABr actif (Oliverio et al., 2016). Ces résultats concordent avec nos travaux. En effet, nous démontrons dans le TABr actif de rats - injectés au CL316,243 ou issus d'un environnement maternel CP - qu'une augmentation de l'expression de plus de 70% des miARNs est corrélée à l'augmentation de la machinerie des miARNs, préférentiellement d'AGO2. Réciproquement, dans le TABr inactif des vieux rats CP l'expression des miARNs augmentés à 3 mois reviennent au niveau contrôle tout comme le niveau de la machinerie.

Les expériences réalisées in vitro sur adipocytes bruns nous ont permis d'observer que l'expression de la protéine AGO2 était non seulement augmentée durant la différenciation mais aussi lors de l'activation des adipocytes bruns matures par l'isoprotérénol, agoniste des récepteurs β -3 adrénergiques, suggérant qu'AGO2 est impliquée également dans l'activation du TABr. Pour déterminer le rôle d'AGO2 dans l'activation du TABr, nous avons invalidé cette protéine dans des adipocytes bruns matures. Nous avons observé que la délétion partielle d'AGO2 induit une diminution de l'expression d'UCP1 de 50% associée à une diminution de l'activité thermogénique des adipocytes bruns reflétée par une diminution de la respiration mitochondriale découplée stimulée ou non par l'isoprotérénol. L'effet drastique de la délétion partielle d'AGO2 sur UCP1 n'est pas surprenant. En effet, une étude révèle qu'une délétion

de 25% de DICER dans le TABr de souris induit une diminution de 40% de l'expression d'UCP1, suggérant que les miARNs et leur machinerie sont essentiels pour le maintien de l'activité du TABr (Oliverio et al., 2016). Par ailleurs, la délétion partielle d'AGO2 dans les adipocytes matures induit également une augmentation de gènes plutôt apparentés au métabolisme de l'adipocyte blanc. De précédents rapports ont également mis en évidence la notion de whitening des adipocytes bruns associé à une augmentation des marqueurs des adipocytes blancs (Mori et al., 2014).

L'ensemble des études citées ci-dessus complétée par notre étude permettent de comprendre l'importance de la machinerie des miARNs dans la différenciation ainsi que dans l'activation du TABr. En effet, si la délétion des enzymes de la machinerie des miARNs semble causer une altération du phénotype des adipocytes bruns, notre étude révèle également qu'une activation pharmacologique ou physiopathologique du TABr provoque une augmentation de la machinerie des miARNs et de l'expression des miARNs.

2.2 Les miARNs : autres acteurs clés pour le tissu adipeux brun

Ces dernières années, les études montrant l'implication de miARNs spécifiques dans la différenciation des adipocytes blancs et bruns se sont multipliées et font l'objet de revues bien documentées (Brandao et al., 2017; Chen et al., 2017; Price and Fernandez-Hernando, 2016). Cependant, peu se sont penchées sur le potentiel des miARNs pour l'activation du TABr. Dans ce contexte, nous avons voulu tirer avantage du modèle CP dans lequel nous avons montré une différence d'activation du tissu en fonction de l'âge associée à une dérégulation de l'expression des miARNs. Alors que l'activité du TABr est comparable chez les progénitures CP et contrôles à l'âge foetal (F21), elle décline à partir de 6 semaines (résultats de notre équipe) chez les animaux contrôles contrairement aux animaux CP où le TABr est maintenu actif. Nous avons mesuré l'expression de certains des miARNs positivement dérégulés chez la jeune progéniture CP (3 mois) dans le TABr des animaux contrôles et CP à F21. Étant donné l'état actif du TABr à F21 dans les deux groupes, nous n'attendions pas nécessairement de différence d'expression des miARNs. Néanmoins, nous aurions pu observer une diminution de leur expression chez les animaux contrôles à 3 mois versus F21 et une expression maintenue chez les animaux CP. Ceci nous aurait permis d'identifier des miARNs potentiellement impliqués dans le maintien de l'activité du TABr. Cependant, les résultats obtenus ne nous ont pas permis de conclure. Pour pallier à ce problème, il aurait fallu analyser le miRnome total du TABr à l'âge foetal chez les animaux contrôles et CP. D'autre part, il aurait

été intéressant d'analyser l'expression des miARNs durant la fenêtre de temps où le TABr se désactive chez les animaux contrôles (entre 6 et 9 semaines).

Dans le but d'obtenir des éléments de réponses concernant les potentiels miARNs impliqués dans l'activation ou la désactivation du TABr, nous avons comparé leur expression chez des animaux CP jeunes versus âgés. Parmi les miARNs dérégulés chez les jeunes animaux CP seulement 2 miARNs restent communément dérégulés chez les vieux animaux CP, malgré le changement métabolique, normoglycémique versus hyperglycémique, associé à TABr actif versus inactif. Il s'agit du miR-485-3p et du miR-3580-3p tous deux positivement dérégulés dans les deux profils. Ces deux miARNs apparaissent significativement dérégulés chez les jeunes animaux CP (TABr actif) avec un facteur d'induction important (respectivement 7,1 et 9,9). Avec l'âge, lorsque l'activité du TABr décline, ce niveau d'induction est toujours significatif mais fortement diminué (respectivement 1,4 et 2,7). Il se pourrait que ces miARNs soient impliqués dans le maintien de l'activité du TABr et que le déclin de leur expression, bien que toujours significatif, participe au déclin de l'activité du TABr. Nous n'avons pas eu le temps d'approfondir cette hypothèse.

Par ailleurs, nous avons comparé le profil d'expression des miARNs des animaux CP avec celui des animaux injectés chroniquement avec un agoniste des récepteurs β -3 adrénergiques (CL316,243). Nous avons observé un profil d'expression globalement augmenté (même pourcentage d'augmentation d'environ 80%) dans ces deux modèles d'activation du TABr. De manière intéressante, seulement deux miARNs étaient communément augmentés entre les 2 groupes : le miR-344a-3p et le miR-490-3p. Ces derniers résultats sont compatibles avec l'idée que l'activation du TABr dans ces deux modèles est différente, du moins sur la base du profil des miARNs, suggérant que l'activation du TABr chez les jeunes animaux CP implique la voie β adrénergique mais pas uniquement. Cependant, il est important de noter que les niveaux adrénergiques entre les deux modèles ne sont pas comparables même si dans les deux cas il s'agit d'une activation chronique du tissu. D'autre part, soulignons le fait que les miARNs sont de petits ARNs non-codants qui peuvent avoir plusieurs ARNm cibles et que plusieurs ARNm peuvent être la cible de deux miARNs différents (Gebert and MacRae, 2018).

Concernant les miARNs augmentés dans le TABr actifs des jeunes animaux CP, il était difficile de tester ces 59 miARNs individuellement ou de récapituler le phénotype des LP en surexprimant tous ces miRs dans des adipocytes bruns pour valider leur rôle dans l'activation du TABr. C'est pourquoi nous avons opté pour une approche plus globale en ciblant d'AGO2. En revanche, bien que le profil des miARNs des jeunes animaux CP soit augmenté, 15% des miARNs sont diminués correspondant à un pool de 9 miARNs très fortement exprimés dans le TABr contrôle dont l'expression était dérégulée négativement. J'ai donc réalisé des analyses

bio-informatiques basées sur le métabolisme glucidique, lipidique et la fonction mitochondriale grâce à différentes bases de données (Diana Tools, TargetScan, Mediate). Ces dernières m'ont permis de mettre en évidence deux miARNs d'intérêt, le miR-22-3p et le let-7c-1-.3p. In vitro, la transfection commune des antagonomiRs de ces deux miARNs booste l'activité des adipocytes bruns, reflété par une augmentation de l'expression d'UCP1 et de la fonction mitochondriale. Les deux miRs, let-7c-p et miR-22-3p, sont impliqués dans l'activation du TABr et semblent participer, au moins en partie, au renforcement compensatoire du TABr dans la descendance de rats soumis à un régime alimentaire restreint. Par ailleurs, il semble que le miR-22-3p, déjà impliqué dans le métabolisme énergétique dans d'autres études, soit un régulateur négatif de l'activation des adipocytes bruns matures in vitro (Diniz et al., 2017; Gurha et al., 2012; Huang et al., 2013; Huang and Wang, 2014; Kaur et al., 2015).

2.3 Les miARNs et leur machinerie : cible thérapeutique?

Dans le cadre de nos modèles d'études, nous avons donc mis en évidence un rôle important de la machinerie des miARNs et de certains miARNs in vitro dans des adipocytes bruns matures. Il serait donc intéressant de transposer nos résultats in vivo afin de valider ces cibles potentielles. Premièrement, nous aurions pu envisager d'invalider AGO2 spécifiquement dans le TABr d'animaux contrôles et induire son activation avec du CL316,243. Si l'activation du TABr est moins prononcée que chez les rats où AGO2 n'a pas été invalidé, cela impliquerait qu'AGO2 est également un partenaire de la machinerie des miARNs requis pour l'activation du TABr. Dans le cadre de l'homéostasie énergétique, l'invalidation d'AGO2 dans le TABr actif de la jeune progéniture CP nous permettrait d'évaluer non seulement l'influence d'AGO2 sur l'activation du TABr mais aussi sur le métabolisme glucidique. La limite majeure de cette stratégie expérimentale est la manipulation des gènes dans un modèle de rat qui n'est pas aisée par rapport à un modèle de souris classiquement utilisé pour les expériences de surexpression ou d'invalidation de gènes.

Aujourd'hui, la technique bien décrite de CRISPR-CAS9 permet de modifier le génome de cellules mais aussi d'organismes entiers et ce, en fonction du tissu cible sous le contrôle d'un promoteur spécifique. Cependant, le défi majeur pour l'application de cette technique in vivo est la délivrance adéquate au tissu cible (Lau and Suh, 2017). Il existe plusieurs solutions pour relever cette difficulté notamment l'utilisation des particules virales comme les Adeno-Associated Virus (AAV) ou non-virales (nanoparticules lipidiques) (Lau and Suh, 2017). Depuis 2014, de nombreuses études ont prouvé l'efficacité de la technique CRISPR-CAS9 grâce à l'utilisation de différents variants de l'AAV dans le cerveau, le système nerveux central, le

muscle, le foie, le cœur mais aussi les poumons chez la souris (Lau and Suh, 2017). Inversement, il serait également intéressant de sur-exprimer AGO2 dans un TABr inactif et évaluer l'effet sur sa potentielle activation. De la même manière, il faut souligner que les études précédentes ont été réalisées dans le modèle de souris, suggérant que la mise au point chez dans un modèle de rat est toujours nécessaire ou qu'il serait nécessaire de transposer notre modèle chez la souris. Cependant, l'étude des mécanismes impliqués dans l'activité du TABr chez la souris nécessite de tenir compte de la thermoneutralité de ces animaux plus élevée que celle des rats.

Une autre option plus spécifique et cette fois réalisable chez le rat, consiste en l'injection des miARNs dans un tissu spécifique. La technique est plus aisée du fait de la petite taille du miARN et a déjà été utilisée avec succès par l'équipe du Dr Amri (iBV Nice) avec laquelle nous collaborons (Giroud et al., 2016b). Cette technique nécessite l'utilisation d'un agent nommé le jetPEI, polymère formant des complexes stables avec les particules d'ADN ou d'ARN et qui permet la délivrance de cette particule directement dans l'organe par injection, et ce sans provoquer de réponse inflammatoire délétère. Chez la jeune progéniture contrôlée, nous avons envisagé d'injecter l'antagomiR-22-3p pour évaluer la potentielle activation du TABr. De la même manière, dans le TABr des vieux animaux CP hyperglycémiques, nous aurions pu injecter l'antagomiR-22-3p et voir si cette surexpression est capable de ré-activer le TABr et de réverser l'hyperglycémie.

Valider des résultats obtenus in vitro dans un modèle in vivo est une chose, les transposer à l'homme constitue un tout autre défi. En effet, invalider ou surexprimer un des membres de la machinerie des miARNs en tenant compte de la spécificité du tissu cible semble compliqué au vu de la quantité de miARNs qui dépendent de cette machinerie et ce, en tenant compte du fait que chaque miARN peut avoir plusieurs cibles et que plusieurs miARNs peuvent avoir une même cible. C'est pourquoi, identifier un miARN et sa ou ses cibles potentielles nous permettrait de réguler finement l'expression des gènes en question et d'induire des changements adéquats pour une pathologie donnée. Par exemple, le miR-122, aujourd'hui en phase clinique de type IIa chez l'homme, cible des gènes de la biogenèse du cholestérol, important pour le développement du virus de l'hépatite C, et son inhibition engendre une diminution des ARNs de virus HCV (Hepatitis C Virus) chez les patients sans affecter d'autres miARNs au niveau plasmatique (van der Ree et al., 2016). En effet, les miARNs sont circulants et possèdent un potentiel clinique double puisqu'ils sont non seulement utilisés en clinique pour cibler des pathologies spécifiques mais ils sont aussi de nos jours utilisés comme biomarqueurs dans les différents fluides biologiques pour le diagnostic des pathologies ou pour évaluer leur avancement, comme par exemple dans le cadre du diabète (Raffort et al.,

2015). Cependant, au vu du pouvoir circulant de certains miARNs, l'inhibition ou l'augmentation de leur expression dans un tissu spécifique pourrait potentiellement impacter des signaux destinés à d'autres tissus de l'organisme, c'est pourquoi, à l'image du miR-122 pour le traitement de l'hépatite C, des études fondamentales, pré-cliniques et cliniques sont nécessaires pour évaluer la balance bénéfice/risque des miARNs comme cible thérapeutique.

IV. Conclusion générale

Ces trois années de doctorat ont permis de mettre en évidence le rôle du tissu adipeux brun (TABr) dans le maintien de l'homéostasie glucidique chez des animaux insulino-péniques dont les mères ont été carencées en protéines (CP) durant la gestation et la lactation. Notre étude multiapproches (in vivo, ex vivo et in vitro) a permis de comprendre comment il était possible pour ces descendants de maintenir une glycémie normale avec une si faible sécrétion d'insuline. Concernant les mécanismes d'activation à l'origine du reconditionnement du métabolisme et de la physiologie du TABr chez les animaux CP, il semblerait que l'épigénétique et notamment les microARNs (miARNs) ainsi que leur machinerie jouent un rôle important. Plus particulièrement, Argonaute-2 (AGO2), le médiateur de l'action des miARNs, est fortement augmenté en parallèle de leur expression. Ces résultats ont été confirmés dans un modèle d'activation du TABr par un agoniste des récepteurs β -adrénergiques. De plus, la délétion partielle d'AGO2 in vitro entraîne la diminution d'UCP1 et de la fonction thermogénique des adipocytes bruns matures. Bien que le lien entre AGO2 et UCP1 ne soit pas encore clairement défini, les miARNs semblent de bons candidats. En effet, mes résultats suggèrent une action synergique des miARNs sur l'activité thermogénique des adipocytes bruns, notamment pour miR-22-3p et let-7c-3p. Ainsi, l'ensemble de mes travaux, associé à de nombreuses études réalisées dans un domaine en plein essor sur l'implication des miARNs et de leur machinerie dans la différenciation et la fonction des adipocytes bruns, permet d'envisager la possibilité de les utiliser comme cibles thérapeutiques.

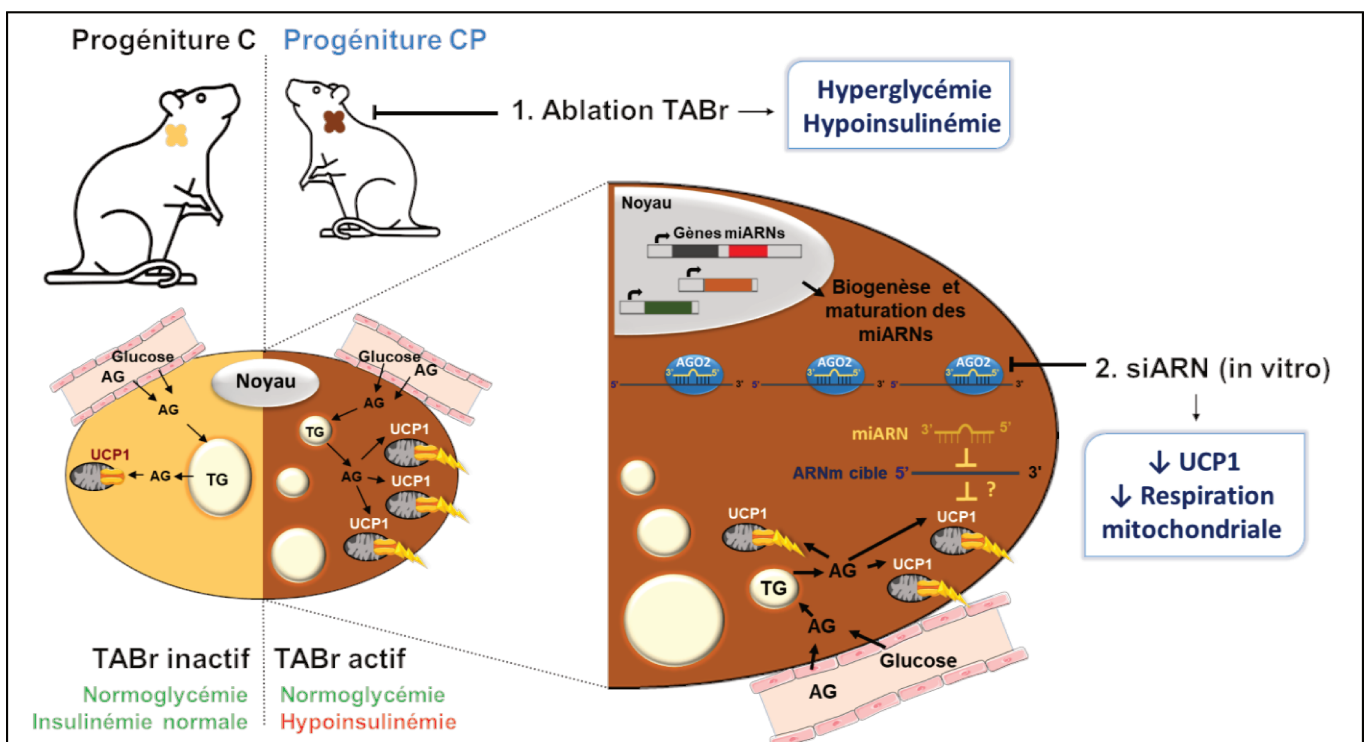


Figure 31: Schéma conclusif des résultats obtenus au cours du doctorat

V. Références

A-

Ahmadian, M., Abbott, M.J., Tang, T., Hudak, C.S., Kim, Y., Bruss, M., Hellerstein, M.K., Lee, H.Y., Samuel, V.T., Shulman, G.I., et al. (2011). Desnutrin/ATGL is regulated by AMPK and is required for a brown adipose phenotype. *Cell metabolism* 13, 739-748.

Aiken, C.E., Tarry-Adkins, J.L., and Ozanne, S.E. (2015). Transgenerational Developmental Programming of Ovarian Reserve. *Scientific reports* 5, 16175.

Alejandro, E.U., Gregg, B., Blandino-Rosano, M., Cras-Meneur, C., and Bernal-Mizrachi, E. (2015). Natural history of beta-cell adaptation and failure in type 2 diabetes. *Molecular aspects of medicine* 42, 19-41.

Alsuhaymi, N., Habeeballah, H., Stebbing, M.J., and Badoer, E. (2017). High Fat Diet Decreases Neuronal Activation in the Brain Induced by Resistin and Leptin. *Frontiers in physiology* 8, 867.

Arora, T., and Backhed, F. (2016). The gut microbiota and metabolic disease: current understanding and future perspectives. *Journal of internal medicine* 280, 339-349.

Attane, C., Foussal, C., Le Gonidec, S., Benani, A., Daviaud, D., Wanecq, E., Guzman-Ruiz, R., Dray, C., Bezaire, V., Rancoule, C., et al. (2012). Apelin treatment increases complete Fatty Acid oxidation, mitochondrial oxidative capacity, and biogenesis in muscle of insulin-resistant mice. *Diabetes* 61, 310-320.

B-

Bachman, E.S., Dhillon, H., Zhang, C.Y., Cinti, S., Bianco, A.C., Kobilka, B.K., and Lowell, B.B. (2002). betaAR signaling required for diet-induced thermogenesis and obesity resistance. *Science* 297, 843-845.

Backhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L.V., Koh, G.Y., Nagy, A., Semenkovich, C.F., and Gordon, J.I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 15718-15723.

Baik, I., Ascherio, A., Rimm, E.B., Giovannucci, E., Spiegelman, D., Stampfer, M.J., and Willett, W.C. (2000). Adiposity and mortality in men. *American journal of epidemiology* 152, 264-271.

Balkau, B., Mhamdi, L., Oppert, J.M., Nolan, J., Golay, A., Porcellati, F., Laakso, M., Ferrannini, E., and Group, E.-R.S. (2008). Physical activity and insulin sensitivity: the RISC study. *Diabetes* 57, 2613-2618.

Barker, D.J. (1995). Fetal origins of coronary heart disease. *Bmj* 311, 171-174.

Barker, D.J. (1997). Maternal nutrition, fetal nutrition, and disease in later life. *Nutrition* 13, 807-813.

Barker, D.J., and Osmond, C. (1986). Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet* 1, 1077-1081.

Barker, D.J., Winter, P.D., Osmond, C., Margetts, B., and Simmonds, S.J. (1989). Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet* 2, 577-580.

Barneda, D., Planas-Iglesias, J., Gaspar, M.L., Mohammadyani, D., Prasannan, S., Dormann, D., Han, G.S., Jesch, S.A., Carman, G.M., Kagan, V., et al. (2015). The brown adipocyte protein CIDEA promotes lipid droplet fusion via a phosphatidic acid-binding amphipathic helix. *eLife* 4, e07485.

Baroukh, N., Ravier, M.A., Loder, M.K., Hill, E.V., Bounacer, A., Scharfmann, R., Rutter, G.A., and Van Obberghen, E. (2007). MicroRNA-124a regulates Foxa2 expression and intracellular signaling in pancreatic beta-cell lines. *The Journal of biological chemistry* 282, 19575-19588.

Barquissau, V., Beuzelin, D., Pisani, D.F., Beranger, G.E., Mairal, A., Montagner, A., Roussel, B., Tavernier, G., Marques, M.A., Moro, C., et al. (2016). White-to-brite conversion in human adipocytes promotes metabolic reprogramming towards fatty acid anabolic and catabolic pathways. *Molecular metabolism* 5, 352-365.

Barres, R., and Zierath, J.R. (2016). The role of diet and exercise in the transgenerational epigenetic landscape of T2DM. *Nature reviews. Endocrinology* 12, 441-451.

Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., and Zhao, K. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129, 823-837.

Bartelt, A., Bruns, O.T., Reimer, R., Hohenberg, H., Ittrich, H., Peldschus, K., Kaul, M.G., Tromsdorf, U.I., Weller, H., Waurisch, C., et al. (2011). Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nature medicine* 17, 200-205.

- Bartelt, A., and Heeren, J. (2014). Adipose tissue browning and metabolic health. *Nature reviews. Endocrinology* 10, 24-36.
- Bartelt, A., Merkel, M., and Heeren, J. (2012). A new, powerful player in lipoprotein metabolism: brown adipose tissue. *Journal of molecular medicine* 90, 887-893.
- Bartness, T.J., Vaughan, C.H., and Song, C.K. (2010). Sympathetic and sensory innervation of brown adipose tissue. *International journal of obesity* 34 Suppl 1, S36-42.
- Barzilai, N., She, L., Liu, B.Q., Vuguin, P., Cohen, P., Wang, J., and Rossetti, L. (1999). Surgical removal of visceral fat reverses hepatic insulin resistance. *Diabetes* 48, 94-98.
- Baskaran, P., Krishnan, V., Ren, J., and Thyagarajan, B. (2016). Capsaicin induces browning of white adipose tissue and counters obesity by activating TRPV1 channel-dependent mechanisms. *British journal of pharmacology* 173, 2369-2389.
- Baskerville, S., and Bartel, D.P. (2005). Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *Rna* 11, 241-247.
- Bateson, P., Barker, D., Clutton-Brock, T., Deb, D., D'Udine, B., Foley, R.A., Gluckman, P., Godfrey, K., Kirkwood, T., Lahr, M.M., et al. (2004). Developmental plasticity and human health. *Nature* 430, 419-421.
- Bateson, P., Gluckman, P., and Hanson, M. (2014). The biology of developmental plasticity and the Predictive Adaptive Response hypothesis. *The Journal of physiology* 592, 2357-2368.
- Bengtsson, T., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2000). Differential adrenergic regulation of the gene expression of the beta-adrenoceptor subtypes beta1, beta2 and beta3 in brown adipocytes. *The Biochemical journal* 347 Pt 3, 643-651.
- Bennis-Taleb, N., Remacle, C., Hoet, J.J., and Reusens, B. (1999). A low-protein isocaloric diet during gestation affects brain development and alters permanently cerebral cortex blood vessels in rat offspring. *The Journal of nutrition* 129, 1613-1619.
- Benyshek, D.C., Johnston, C.S., and Martin, J.F. (2006). Glucose metabolism is altered in the adequately-nourished grand-offspring (F3 generation) of rats malnourished during gestation and perinatal life. *Diabetologia* 49, 1117-1119.
- Beranger, G.E., Karbiener, M., Barquissau, V., Pisani, D.F., Scheideler, M., Langin, D., and Amri, E.Z. (2013). In vitro brown and "brite"/"beige" adipogenesis: human cellular models and molecular aspects. *Biochimica et biophysica acta* 1831, 905-914.
- Berends, L.M., Dearden, L., Tung, Y.C.L., Voshol, P., Fernandez-Twinn, D.S., and Ozanne, S.E. (2018). Programming of central and peripheral insulin resistance by low birthweight and postnatal catch-up growth in male mice. *Diabetologia* 61, 2225-2234.
- Berends, L.M., Fernandez-Twinn, D.S., Martin-Gronert, M.S., Cripps, R.L., and Ozanne, S.E. (2013). Catch-up growth following intra-uterine growth-restriction programmes an insulin-resistant phenotype in adipose tissue. *International journal of obesity* 37, 1051-1057.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. (2012). *Biochemistry* 7th Edition
- Bergman, R.N. (2007). Orchestration of glucose homeostasis: from a small acorn to the California oak. *Diabetes* 56, 1489-1501.
- Betz, M.J., and Enerback, S. (2015). Human Brown Adipose Tissue: What We Have Learned So Far. *Diabetes* 64, 2352-2360.
- Bewick, G.A., Gardiner, J.V., Dhillon, W.S., Kent, A.S., White, N.E., Webster, Z., Ghatei, M.A., and Bloom, S.R. (2005). Post-embryonic ablation of AgRP neurons in mice leads to a lean, hypophagic phenotype. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19, 1680-1682.
- Bianchi, A., Evans, J.L., Iverson, A.J., Nordlund, A.C., Watts, T.D., and Witters, L.A. (1990). Identification of an isozymic form of acetyl-CoA carboxylase. *The Journal of biological chemistry* 265, 1502-1509.
- Bieswal, F., Ahn, M.T., Reusens, B., Holvoet, P., Raes, M., Rees, W.D., and Remacle, C. (2006). The importance of catch-up growth after early malnutrition for the programming of obesity in male rat. *Obesity* 14, 1330-1343.
- Billon, N., Iannarelli, P., Monteiro, M.C., Glavieux-Pardanaud, C., Richardson, W.D., Kessar, N., Dani, C., and Dupin, E. (2007). The generation of adipocytes by the neural crest. *Development* 134, 2283-2292.
- Block, T., and El-Osta, A. (2017). Epigenetic programming, early life nutrition and the risk of metabolic disease. *Atherosclerosis* 266, 31-40.

- Blondin, D.P., Labbe, S.M., Noll, C., Kunach, M., Phoenix, S., Guerin, B., Turcotte, E.E., Haman, F., Richard, D., and Carpentier, A.C. (2015). Selective Impairment of Glucose but Not Fatty Acid or Oxidative Metabolism in Brown Adipose Tissue of Subjects With Type 2 Diabetes. *Diabetes* 64, 2388-2397.
- Bluher, M., and Mantzoros, C.S. (2015). From leptin to other adipokines in health and disease: facts and expectations at the beginning of the 21st century. *Metabolism: clinical and experimental* 64, 131-145.
- Bodis, K., and Roden, M. (2018). Energy metabolism of white adipose tissue and insulin resistance in humans. *European journal of clinical investigation*, e13017.
- Bol, V.V., Delattre, A.I., Reusens, B., Raes, M., and Remacle, C. (2009). Forced catch-up growth after fetal protein restriction alters the adipose tissue gene expression program leading to obesity in adult mice. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 297, R291-299.
- Bonnefond, A., and Froguel, P. (2015). Rare and common genetic events in type 2 diabetes: what should biologists know? *Cell metabolism* 21, 357-368.
- Bork-Jensen, J., Scheele, C., Christophersen, D.V., Nilsson, E., Friedrichsen, M., Fernandez-Twinn, D.S., Grunnet, L.G., Litman, T., Holmstrom, K., Vind, B., et al. (2015). Glucose tolerance is associated with differential expression of microRNAs in skeletal muscle: results from studies of twins with and without type 2 diabetes. *Diabetologia* 58, 363-373.
- Boujendar, S., Reusens, B., Merezak, S., Ahn, M.T., Arany, E., Hill, D., and Remacle, C. (2002). Taurine supplementation to a low protein diet during foetal and early postnatal life restores a normal proliferation and apoptosis of rat pancreatic islets. *Diabetologia* 45, 856-866.
- Bouloumie, A., Planat, V., Devedjian, J.C., Valet, P., Saulnier-Blache, J.S., Record, M., and Lafontan, M. (1994). Alpha 2-adrenergic stimulation promotes preadipocyte proliferation. Involvement of mitogen-activated protein kinases. *The Journal of biological chemistry* 269, 30254-30259.
- Brakenhielm, E., Cao, R., Gao, B., Angelin, B., Cannon, B., Parini, P., and Cao, Y. (2004). Angiogenesis inhibitor, TNP-470, prevents diet-induced and genetic obesity in mice. *Circulation research* 94, 1579-1588.
- Brandao, B.B., Guerra, B.A., and Mori, M.A. (2017). Shortcuts to a functional adipose tissue: The role of small non-coding RNAs. *Redox biology* 12, 82-102.
- Brasaemle, D.L. (2007). Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *Journal of lipid research* 48, 2547-2559.
- Brasaemle, D.L., Subramanian, V., Garcia, A., Marcinkiewicz, A., and Rothenberg, A. (2009). Perilipin A and the control of triacylglycerol metabolism. *Molecular and cellular biochemistry* 326, 15-21.
- Bray, M.S., Loos, R.J., McCaffery, J.M., Ling, C., Franks, P.W., Weinstock, G.M., Snyder, M.P., Vassy, J.L., Agurs-Collins, T., and Conference Working, G. (2016). NIH working group report-using genomic information to guide weight management: From universal to precision treatment. *Obesity* 24, 14-22.
- Brewer, P.D., Habtemichael, E.N., Romenskaia, I., Mastick, C.C., and Coster, A.C. (2014). Insulin-regulated Glut4 translocation: membrane protein trafficking with six distinctive steps. *The Journal of biological chemistry* 289, 17280-17298.
- Brito, M.N., Brito, N.A., Baro, D.J., Song, C.K., and Bartness, T.J. (2007). Differential activation of the sympathetic innervation of adipose tissues by melanocortin receptor stimulation. *Endocrinology* 148, 5339-5347.
- Broeders, E.P., Nascimento, E.B., Havekes, B., Brans, B., Roumans, K.H., Tailleux, A., Schaart, G., Kouach, M., Charton, J., Deprez, B., et al. (2015). The Bile Acid Chenodeoxycholic Acid Increases Human Brown Adipose Tissue Activity. *Cell metabolism* 22, 418-426.
- Brown, L.D., Green, A.S., Limesand, S.W., and Rozance, P.J. (2011). Maternal amino acid supplementation for intrauterine growth restriction. *Frontiers in bioscience* 3, 428-444.
- Brown, N.F., Hill, J.K., Esser, V., Kirkland, J.L., Corkey, B.E., Foster, D.W., and McGarry, J.D. (1997). Mouse white adipocytes and 3T3-L1 cells display an anomalous pattern of carnitine palmitoyltransferase (CPT) I isoform expression during differentiation. Inter-tissue and inter-species expression of CPT I and CPT II enzymes. *The Biochemical journal* 327 (Pt 1), 225-231.
- Bruce, C.R., Hoy, A.J., Turner, N., Watt, M.J., Allen, T.L., Carpenter, K., Cooney, G.J., Febbraio, M.A., and Kraegen, E.W. (2009). Overexpression of carnitine palmitoyltransferase-1 in skeletal muscle is sufficient to enhance fatty acid oxidation and improve high-fat diet-induced insulin resistance. *Diabetes* 58, 550-558.

Brunkwall, L., and Orho-Melander, M. (2017). The gut microbiome as a target for prevention and treatment of hyperglycaemia in type 2 diabetes: from current human evidence to future possibilities. *Diabetologia* 60, 943-951.

Budak, H., Bulut, R., Kantar, M., and Alptekin, B. (2016). MicroRNA nomenclature and the need for a revised naming prescription. *Briefings in functional genomics* 15, 65-71.

Bunner, A.E., Chandrasekera, P.C., and Barnard, N.D. (2014). Knockout mouse models of insulin signaling: Relevance past and future. *World journal of diabetes* 5, 146-159.

C-

Calderon-Dominguez, M., Mir, J.F., Fucho, R., Weber, M., Serra, D., and Herrero, L. (2016). Fatty acid metabolism and the basis of brown adipose tissue function. *Adipocyte* 5, 98-118.

Campbell, N. (1995). *Biologie*.

Cannon, B., and Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiological reviews* 84, 277-359.

Cano, N. (2002). Bench-to-bedside review: glucose production from the kidney. *Critical care* 6, 317-321.

Cantley, J. (2014). The control of insulin secretion by adipokines: current evidence for adipocyte-beta cell endocrine signalling in metabolic homeostasis. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* 25, 442-454.

Cao, W., Daniel, K.W., Robidoux, J., Puigserver, P., Medvedev, A.V., Bai, X., Floering, L.M., Spiegelman, B.M., and Collins, S. (2004). p38 mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene. *Molecular and cellular biology* 24, 3057-3067.

Carmen, G.Y., and Victor, S.M. (2006). Signalling mechanisms regulating lipolysis. *Cellular signalling* 18, 401-408.

Caron, A., Labbe, S.M., Carter, S., Roy, M.C., Lecomte, R., Ricquier, D., Picard, F., and Richard, D. (2017). Loss of UCP2 impairs cold-induced non-shivering thermogenesis by promoting a shift toward glucose utilization in brown adipose tissue. *Biochimie* 134, 118-126.

Carone, B.R., Fauquier, L., Habib, N., Shea, J.M., Hart, C.E., Li, R., Bock, C., Li, C., Gu, H., Zamore, P.D., et al. (2010). Paternally induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals. *Cell* 143, 1084-1096.

Catalanotto, C., Cogoni, C., and Zardo, G. (2016). MicroRNA in Control of Gene Expression: An Overview of Nuclear Functions. *International journal of molecular sciences* 17.

Cedikova, M., Kripnerova, M., Dvorakova, J., Pitule, P., Grundmanova, M., Babuska, V., Mullerova, D., and Kuncova, J. (2016). Mitochondria in White, Brown, and Beige Adipocytes. *Stem cells international* 2016, 6067349.

Chen, P.C., Kryukova, Y.N., and Shyng, S.L. (2013a). Leptin regulates KATP channel trafficking in pancreatic beta-cells by a signaling mechanism involving AMP-activated protein kinase (AMPK) and cAMP-dependent protein kinase (PKA). *The Journal of biological chemistry* 288, 34098-34109.

Chen, Y., Pan, R., and Pfeifer, A. (2017). Regulation of brown and beige fat by microRNAs. *Pharmacology & therapeutics* 170, 1-7.

Chen, Y., Siegel, F., Kipschull, S., Haas, B., Frohlich, H., Meister, G., and Pfeifer, A. (2013b). miR-155 regulates differentiation of brown and beige adipocytes via a bistable circuit. *Nature communications* 4, 1769.

Chevalier, N., and Fenichel, P. (2015). Endocrine disruptors: new players in the pathophysiology of type 2 diabetes? *Diabetes & metabolism* 41, 107-115.

Choe, S.S., Huh, J.Y., Hwang, I.J., Kim, J.I., and Kim, J.B. (2016). Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Frontiers in endocrinology* 7, 30.

Chong, M.M., Zhang, G., Cheloufi, S., Neubert, T.A., Hannon, G.J., and Littman, D.R. (2010). Canonical and alternate functions of the microRNA biogenesis machinery. *Genes & development* 24, 1951-1960.

Chouchani, E.T., Kazak, L., Jedrychowski, M.P., Lu, G.Z., Erickson, B.K., Szpyt, J., Pierce, K.A., Laznik-Bogoslavski, D., Vetrivelan, R., Clish, C.B., et al. (2016). Corrigendum: Mitochondrial ROS regulate thermogenic energy expenditure and sulfenylation of UCP1. *Nature* 536, 360.

Cinti, S. (2005). The adipose organ. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 73, 9-15.

Clemmensen, C., Muller, T.D., Woods, S.C., Berthoud, H.R., Seeley, R.J., and Tschop, M.H. (2017). Gut-Brain Cross-Talk in Metabolic Control. *Cell* 168, 758-774.

Clore, J.N., Stillman, J., and Sugerma, H. (2000). Glucose-6-phosphatase flux in vitro is increased in type 2 diabetes. *Diabetes* 49, 969-974.

Collins, S., Daniel, K.W., Rohlf, E.M., Ramkumar, V., Taylor, I.L., and Gettys, T.W. (1994). Impaired expression and functional activity of the beta 3- and beta 1-adrenergic receptors in adipose tissue of congenitally obese (C57BL/6J ob/ob) mice. *Molecular endocrinology* 8, 518-527.

Conwell, D.L., Lee, L.S., Yadav, D., Longnecker, D.S., Miller, F.H., Morteale, K.J., Levy, M.J., Kwon, R., Lieb, J.G., Stevens, T., et al. (2014). American Pancreatic Association Practice Guidelines in Chronic Pancreatitis: evidence-based report on diagnostic guidelines. *Pancreas* 43, 1143-1162.

Coppari, R., Ichinose, M., Lee, C.E., Pullen, A.E., Kenny, C.D., McGovern, R.A., Tang, V., Liu, S.M., Ludwig, T., Chua, S.C., Jr., et al. (2005). The hypothalamic arcuate nucleus: a key site for mediating leptin's effects on glucose homeostasis and locomotor activity. *Cell metabolism* 1, 63-72.

Coupe, B., Grit, I., Hulin, P., Randuineau, G., and Parnet, P. (2012). Postnatal growth after intrauterine growth restriction alters central leptin signal and energy homeostasis. *PLoS one* 7, e30616.

Cousin, B., Cinti, S., Morroni, M., Raimbault, S., Ricquier, D., Penicaud, L., and Casteilla, L. (1992). Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: molecular and morphological characterization. *Journal of cell science* 103 (Pt 4), 931-942.

Cypess, A.M., Haft, C.R., Laughlin, M.R., and Hu, H.H. (2014). Brown fat in humans: consensus points and experimental guidelines. *Cell metabolism* 20, 408-415.

Cypess, A.M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A.B., Kuo, F.C., Palmer, E.L., Tseng, Y.H., Doria, A., et al. (2009). Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *The New England journal of medicine* 360, 1509-1517.

Cypess, A.M., Weiner, L.S., Roberts-Toler, C., Elia, E.F., Kessler, S.H., Kahn, P.A., English, J., Chatman, K., Trauger, S.A., Doria, A., et al. (2015). Activation of human brown adipose tissue by a beta3-adrenergic receptor agonist. *Cell metabolism* 21, 33-38.

Czech, M.P. (2017). Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature medicine* 23, 804-814.

D-

Dabelea, D. (2007). The predisposition to obesity and diabetes in offspring of diabetic mothers. *Diabetes care* 30 Suppl 2, S169-174.

Dahri, S., Snoeck, A., Reusens-Billen, B., Remacle, C., and Hoet, J.J. (1991). Islet function in offspring of mothers on low-protein diet during gestation. *Diabetes* 40 Suppl 2, 115-120.

Davegardh, C., Garcia-Calzon, S., Bacos, K., and Ling, C. (2018). DNA methylation in the pathogenesis of type 2 diabetes in humans. *Molecular metabolism*.

de Castro Barbosa, T., Ingerslev, L.R., Alm, P.S., Versteyhe, S., Massart, J., Rasmussen, M., Donkin, I., Sjogren, R., Mudry, J.M., Vetterli, L., et al. (2016). High-fat diet reprograms the epigenome of rat spermatozoa and transgenerationally affects metabolism of the offspring. *Molecular metabolism* 5, 184-197.

de Jesus, L.A., Carvalho, S.D., Ribeiro, M.O., Schneider, M., Kim, S.W., Harney, J.W., Larsen, P.R., and Bianco, A.C. (2001). The type 2 iodothyronine deiodinase is essential for adaptive thermogenesis in brown adipose tissue. *The Journal of clinical investigation* 108, 1379-1385.

de Jong, J.M., Larsson, O., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2015). A stringent validation of mouse adipose tissue identity markers. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 308, E1085-1105.

De, N., Young, L., Lau, P.W., Meisner, N.C., Morrissey, D.V., and MacRae, I.J. (2013). Highly complementary target RNAs promote release of guide RNAs from human Argonaute2. *Molecular cell* 50, 344-355.

De Tata, V. (2014). Age-related impairment of pancreatic Beta-cell function: pathophysiological and cellular mechanisms. *Frontiers in endocrinology* 5, 138.

De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., Zitoun, C., Duchamp, A., Backhed, F., and Mithieux, G. (2016). Microbiota-Produced Succinate Improves Glucose Homeostasis via Intestinal Gluconeogenesis. *Cell metabolism* 24, 151-157.

De Vos, A., Heimberg, H., Quartier, E., Huypens, P., Bouwens, L., Pipeleers, D., and Schuit, F. (1995). Human and rat beta cells differ in glucose transporter but not in glucokinase gene expression. *The Journal of clinical investigation* 96, 2489-2495.

Devaskar, S.U., and Chu, A. (2016). Intrauterine Growth Restriction: Hungry for an Answer. *Physiology* 31, 131-146.

Diniz, G.P., Huang, Z.P., Liu, J., Chen, J., Ding, J., Fonseca, R.I., Barreto-Chaves, M.L., Donato, J., Jr., Hu, X., and Wang, D.Z. (2017). Loss of microRNA-22 prevents high-fat diet induced dyslipidemia and increases energy expenditure without affecting cardiac hypertrophy. *Clinical science* 131, 2885-2900.

Doh, K.O., Kim, Y.W., Park, S.Y., Lee, S.K., Park, J.S., and Kim, J.Y. (2005). Interrelation between long-chain fatty acid oxidation rate and carnitine palmitoyltransferase 1 activity with different isoforms in rat tissues. *Life sciences* 77, 435-443.

Donkin, I., and Barres, R. (2018). Sperm epigenetics and influence of environmental factors. *Molecular metabolism*.

Donkin, I., Versteyhe, S., Ingerslev, L.R., Qian, K., Mechta, M., Nordkap, L., Mortensen, B., Appel, E.V., Jorgensen, N., Kristiansen, V.B., et al. (2016). Obesity and Bariatric Surgery Drive Epigenetic Variation of Spermatozoa in Humans. *Cell metabolism* 23, 369-378.

Druet, C., Stettler, N., Sharp, S., Simmons, R.K., Cooper, C., Smith, G.D., Ekelund, U., Levy-Marchal, C., Jarvelin, M.R., Kuh, D., et al. (2012). Prediction of childhood obesity by infancy weight gain: an individual-level meta-analysis. *Paediatric and perinatal epidemiology* 26, 19-26.

Duivenvoorden, I., Teusink, B., Rensen, P.C., Romijn, J.A., Havekes, L.M., and Voshol, P.J. (2005). Apolipoprotein C3 deficiency results in diet-induced obesity and aggravated insulin resistance in mice. *Diabetes* 54, 664-671.

Dumortier, O., Blondeau, B., Duvillie, B., Reusens, B., Breant, B., and Remacle, C. (2007). Different mechanisms operating during different critical time-windows reduce rat fetal beta cell mass due to a maternal low-protein or low-energy diet. *Diabetologia* 50, 2495-2503.

Dumortier, O., Hinault, C., Gautier, N., Patouraux, S., Casamento, V., and Van Obberghen, E. (2014). Maternal protein restriction leads to pancreatic failure in offspring: role of misexpressed microRNA-375. *Diabetes* 63, 3416-3427.

Dumortier, O., Hinault, C., and Van Obberghen, E. (2013). MicroRNAs and metabolism crosstalk in energy homeostasis. *Cell metabolism* 18, 312-324.

Dumortier, O., Roger, E., Pisani, D.F., Casamento, V., Gautier, N., Lebrun, P., Johnston, H., Lopez, P., Amri, E.Z., Jousse, C., et al. (2017). Age-Dependent Control of Energy Homeostasis by Brown Adipose Tissue in Progeny Subjected to Maternal Diet-Induced Fetal Programming. *Diabetes* 66, 627-639.

Dunn, G.A., and Bale, T.L. (2011). Maternal high-fat diet effects on third-generation female body size via the paternal lineage. *Endocrinology* 152, 2228-2236.

Duque-Guimaraes, D.E., and Ozanne, S.E. (2013). Nutritional programming of insulin resistance: causes and consequences. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 24, 525-535.

E-

Eichhorn, S.W., Guo, H., McGeary, S.E., Rodriguez-Mias, R.A., Shin, C., Baek, D., Hsu, S.H., Ghoshal, K., Villen, J., and Bartel, D.P. (2014). mRNA destabilization is the dominant effect of mammalian microRNAs by the time substantial repression ensues. *Molecular cell* 56, 104-115.

El Ouaamari, A., Baroukh, N., Martens, G.A., Lebrun, P., Pipeleers, D., and van Obberghen, E. (2008). miR-375 targets 3'-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 and regulates glucose-induced biological responses in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 57, 2708-2717.

El Ouaamari, A., Dirice, E., Gedeon, N., Hu, J., Zhou, J.Y., Shirakawa, J., Hou, L., Goodman, J., Karampelias, C., Qiang, G., et al. (2016). SerpinB1 Promotes Pancreatic beta Cell Proliferation. *Cell metabolism* 23, 194-205.

Ellis, J.M., Frahm, J.L., Li, L.O., and Coleman, R.A. (2010). Acyl-coenzyme A synthetases in metabolic control. *Current opinion in lipidology* 21, 212-217.

Elmen, J., Lindow, M., Schutz, S., Lawrence, M., Petri, A., Obad, S., Lindholm, M., Hedtjarn, M., Hansen, H.F., Berger, U., et al. (2008). LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature* 452, 896-899.

Enerback, S., Jacobsson, A., Simpson, E.M., Guerra, C., Yamashita, H., Harper, M.E., and Kozak, L.P. (1997). Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature* 387, 90-94.

F-

Fabbiano, S., Suarez-Zamorano, N., Chevalier, C., Lazarevic, V., Kieser, S., Rigo, D., Leo, S., Veyrat-Durebex, C., Gaia, N., Maresca, M., et al. (2018). Functional Gut Microbiota Remodeling Contributes to the Caloric Restriction-Induced Metabolic Improvements. *Cell metabolism*.

Fajans, S.S., Bell, G.I., and Polonsky, K.S. (2001). Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *The New England journal of medicine* 345, 971-980.

Fedorenko, A., Lishko, P.V., and Kirichok, Y. (2012). Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria. *Cell* 151, 400-413.

Feldmann, H.M., Golozoubova, V., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2009). UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. *Cell metabolism* 9, 203-209.

Feng, J., Xing, W., and Xie, L. (2016). Regulatory Roles of MicroRNAs in Diabetes. *International journal of molecular sciences* 17.

Ferland-McCollough, D., Fernandez-Twinn, D.S., Cannell, I.G., David, H., Warner, M., Vaag, A.A., Bork-Jensen, J., Brons, C., Gant, T.W., Willis, A.E., et al. (2012). Programming of adipose tissue miR-483-3p and GDF-3 expression by maternal diet in type 2 diabetes. *Cell death and differentiation* 19, 1003-1012.

Fernandez-Twinn, D.S., Constancia, M., and Ozanne, S.E. (2015). Intergenerational epigenetic inheritance in models of developmental programming of adult disease. *Seminars in cell & developmental biology* 43, 85-95.

Fernandez-Twinn, D.S., Wayman, A., Ekizoglou, S., Martin, M.S., Hales, C.N., and Ozanne, S.E. (2005). Maternal protein restriction leads to hyperinsulinemia and reduced insulin-signaling protein expression in 21-mo-old female rat offspring. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 288, R368-373.

Figuroa-Colon, R., Arani, R.B., Goran, M.I., and Weinsier, R.L. (2000). Paternal body fat is a longitudinal predictor of changes in body fat in premenarcheal girls. *The American journal of clinical nutrition* 71, 829-834.

Filios, S.R., and Shalev, A. (2015). beta-Cell MicroRNAs: Small but Powerful. *Diabetes* 64, 3631-3644.

Fischer, A.W., Shabalina, I.G., Mattsson, C.L., Abreu-Vieira, G., Cannon, B., Nedergaard, J., and Petrovic, N. (2017a). UCP1 inhibition in Cidea-overexpressing mice is physiologically counteracted by brown adipose tissue hyperrecruitment. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 312, E72-E87.

Fischer, K., Ruiz, H.H., Jhun, K., Finan, B., Oberlin, D.J., van der Heide, V., Kalinovich, A.V., Petrovic, N., Wolf, Y., Clemmensen, C., et al. (2017b). Alternatively activated macrophages do not synthesize catecholamines or contribute to adipose tissue adaptive thermogenesis. *Nature medicine* 23, 623-630.

Fisher, F.M., Kleiner, S., Douris, N., Fox, E.C., Mepani, R.J., Verdeguer, F., Wu, J., Kharitonov, A., Flier, J.S., Maratos-Flier, E., et al. (2012). FGF21 regulates PGC-1alpha and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes & development* 26, 271-281.

Forman, J.J., Legesse-Miller, A., and Collier, H.A. (2008). A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets Dicer within its coding sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 14879-14884.

Foster, M.T., and Bartness, T.J. (2006). Sympathetic but not sensory denervation stimulates white adipocyte proliferation. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 291, R1630-1637.

Foster, M.T., Song, C.K., and Bartness, T.J. (2010). Hypothalamic paraventricular nucleus lesion involvement in the sympathetic control of lipid mobilization. *Obesity* 18, 682-689.

Frayling, T.M., Timpson, N.J., Weedon, M.N., Zeggini, E., Freathy, R.M., Lindgren, C.M., Perry, J.R., Elliott, K.S., Lango, H., Rayner, N.W., et al. (2007). A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* 316, 889-894.

Fredrikson, G., and Belfrage, P. (1983). Positional specificity of hormone-sensitive lipase from rat adipose tissue. *The Journal of biological chemistry* 258, 14253-14256.

Frontini, A., and Cinti, S. (2010). Distribution and development of brown adipocytes in the murine and human adipose organ. *Cell metabolism* 11, 253-256.

Froy, O., and Garaulet, M. (2018). The Circadian Clock in White and Brown Adipose Tissue: Mechanistic, Endocrine, and Clinical Aspects. *Endocrine reviews* 39, 261-273.

Fu, Z., Gilbert, E.R., and Liu, D. (2013). Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. *Current diabetes reviews* 9, 25-53.

G-

- Gagnon, K.T., Li, L., Chu, Y., Janowski, B.A., and Corey, D.R. (2014). RNAi factors are present and active in human cell nuclei. *Cell reports* 6, 211-221.
- Gaidhu, M.P., Frontini, A., Hung, S., Pistor, K., Cinti, S., and Ceddia, R.B. (2011). Chronic AMP-kinase activation with AICAR reduces adiposity by remodeling adipocyte metabolism and increasing leptin sensitivity. *Journal of lipid research* 52, 1702-1711.
- Galvan-Pena, S., and O'Neill, L.A. (2014). Metabolic reprogramming in macrophage polarization. *Frontiers in immunology* 5, 420.
- Garofano, A., Czernichow, P., and Breant, B. (1998). Postnatal somatic growth and insulin contents in moderate or severe intrauterine growth retardation in the rat. *Biol Neonate* 73, 89-98.
- Garofano, A., Czernichow, P., and Breant, B. (1999). Effect of ageing on beta-cell mass and function in rats malnourished during the perinatal period. *Diabetologia* 42, 711-718.
- Gebert, L.F.R., and MacRae, I.J. (2018). Regulation of microRNA function in animals. *Nature reviews. Molecular cell biology*.
- Gerin, I., Bommer, G.T., McCoin, C.S., Sousa, K.M., Krishnan, V., and MacDougald, O.A. (2010). Roles for miRNA-378/378* in adipocyte gene expression and lipogenesis. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 299, E198-206.
- Gerngross, C., Schretter, J., Klingenspor, M., Schwaiger, M., and Fromme, T. (2017). Active Brown Fat During (18)F-FDG PET/CT Imaging Defines a Patient Group with Characteristic Traits and an Increased Probability of Brown Fat Redetection. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 58, 1104-1110.
- Gesta, S., Tseng, Y.H., and Kahn, C.R. (2007). Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* 131, 242-256.
- Gilsanz, V., Hu, H.H., and Kajimura, S. (2013). Relevance of brown adipose tissue in infancy and adolescence. *Pediatric research* 73, 3-9.
- Giroud, M., Karbiener, M., Pisani, D.F., Ghandour, R.A., Beranger, G.E., Niemi, T., Taittonen, M., Nuutila, P., Virtanen, K.A., Langin, D., et al. (2016a). Let-7i-5p represses brite adipocyte function in mice and humans. *Scientific reports* 6, 28613.
- Giroud, M., Pisani, D.F., Karbiener, M., Barquissau, V., Ghandour, R.A., Tews, D., Fischer-Posovszky, P., Chambard, J.C., Knippschild, U., Niemi, T., et al. (2016b). miR-125b affects mitochondrial biogenesis and impairs brite adipocyte formation and function. *Molecular metabolism* 5, 615-625.
- Gourdy, P., Cazals, L., Thalamas, C., Sommet, A., Calvas, F., Galitzky, M., Vinel, C., Dray, C., Hanaire, H., Castan-Laurell, I., et al. (2018). Apelin administration improves insulin sensitivity in overweight men during hyperinsulinaemic-euglycaemic clamp. *Diabetes, obesity & metabolism* 20, 157-164.
- Gray, S.M., Meijer, R.I., and Barrett, E.J. (2014). Insulin regulates brain function, but how does it get there? *Diabetes* 63, 3992-3997.
- Greenwood, M.R., and Hirsch, J. (1974). Postnatal development of adipocyte cellularity in the normal rat. *Journal of lipid research* 15, 474-483.
- Griffiths-Jones, S., Grocock, R.J., van Dongen, S., Bateman, A., and Enright, A.J. (2006). miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic acids research* 34, D140-144.
- Guo, H., Ingolia, N.T., Weissman, J.S., and Bartel, D.P. (2010). Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466, 835-840.
- Gurha, P., Abreu-Goodger, C., Wang, T., Ramirez, M.O., Drumond, A.L., van Dongen, S., Chen, Y., Bartonicek, N., Enright, A.J., Lee, B., et al. (2012). Targeted deletion of microRNA-22 promotes stress-induced cardiac dilation and contractile dysfunction. *Circulation* 125, 2751-2761.
- Gutierrez-Rodelo, C., Roura-Guiberna, A., and Olivares-Reyes, J.A. (2017). [Molecular Mechanisms of Insulin Resistance: An Update]. *Gaceta medica de Mexico* 153, 214-228.
- Guzik, T.J., Skiba, D.S., Touyz, R.M., and Harrison, D.G. (2017). The role of infiltrating immune cells in dysfunctional adipose tissue. *Cardiovascular research* 113, 1009-1023.

H-

- Ha, M., and Kim, V.N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology* 15, 509-524.
- Haemmerle, G., Zimmermann, R., Hayn, M., Theussl, C., Waeg, G., Wagner, E., Sattler, W., Magin, T.M., Wagner, E.F., and Zechner, R. (2002). Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis. *The Journal of biological chemistry* 277, 4806-4815.
- Hales, C.N., and Barker, D.J. (2001). The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull* 60, 5-20.
- Hales, C.N., and Barker, D.J. (2013). Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. 1992. *International journal of epidemiology* 42, 1215-1222.
- Hales, C.N., Barker, D.J., Clark, P.M., Cox, L.J., Fall, C., Osmond, C., and Winter, P.D. (1991). Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *Bmj* 303, 1019-1022.
- Hamilton, M.T., Hamilton, D.G., and Zderic, T.W. (2014). Sedentary behavior as a mediator of type 2 diabetes. *Medicine and sport science* 60, 11-26.
- Han, J., Lee, J.E., Jin, J., Lim, J.S., Oh, N., Kim, K., Chang, S.I., Shibuya, M., Kim, H., and Koh, G.Y. (2011). The spatiotemporal development of adipose tissue. *Development* 138, 5027-5037.
- Handschin, C., and Spiegelman, B.M. (2008). The role of exercise and PGC1alpha in inflammation and chronic disease. *Nature* 454, 463-469.
- Hankir, M.K., and Klingenspor, M. (2018). Brown adipocyte glucose metabolism: a heated subject. *EMBO reports* 19.
- Hansen, T.B., Veno, M.T., Jensen, T.I., Schaefer, A., Damgaard, C.K., and Kjems, J. (2016). Argonaute-associated short introns are a novel class of gene regulators. *Nature communications* 7, 11538.
- Hanson, M.A., and Gluckman, P.D. (2014a). Developmental origins of health and disease - Global public health implications. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*.
- Hanson, M.A., and Gluckman, P.D. (2014b). Early Developmental Conditioning of Later Health and Disease: Physiology or Pathophysiology? *Physiological reviews* 94, 1027-1076.
- Hanssen, M.J., Broeders, E., Samms, R.J., Vosselman, M.J., van der Lans, A.A., Cheng, C.C., Adams, A.C., van Marken Lichtenbelt, W.D., and Schrauwen, P. (2015a). Serum FGF21 levels are associated with brown adipose tissue activity in humans. *Scientific reports* 5, 10275.
- Hanssen, M.J., Hoeks, J., Brans, B., van der Lans, A.A., Schaart, G., van den Driessche, J.J., Jorgensen, J.A., Boekschoten, M.V., Hesselink, M.K., Havekes, B., et al. (2015b). Short-term cold acclimation improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes mellitus. *Nature medicine* 21, 863-865.
- Hanssen, M.J., van der Lans, A.A., Brans, B., Hoeks, J., Jardon, K.M., Schaart, G., Mottaghy, F.M., Schrauwen, P., and van Marken Lichtenbelt, W.D. (2016). Short-term Cold Acclimation Recruits Brown Adipose Tissue in Obese Humans. *Diabetes* 65, 1179-1189.
- Harms, M., and Seale, P. (2013). Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nature medicine* 19, 1252-1263.
- Heard, E., and Martienssen, R.A. (2014). Transgenerational epigenetic inheritance: myths and mechanisms. *Cell* 157, 95-109.
- Held, N.M., Kuipers, E.N., van Weeghel, M., van Klinken, J.B., Denis, S.W., Lombes, M., Wanders, R.J., Vaz, F.M., Rensen, P.C.N., Verhoeven, A.J., et al. (2018). Pyruvate dehydrogenase complex plays a central role in brown adipocyte energy expenditure and fuel utilization during short-term beta-adrenergic activation. *Scientific reports* 8, 9562.
- Hellerstrom, C., and Swenne, I. (1991). Functional maturation and proliferation of fetal pancreatic beta-cells. *Diabetes* 40 Suppl 2, 89-93.
- Herrera, B.M., Lockstone, H.E., Taylor, J.M., Wills, Q.F., Kaisaki, P.J., Barrett, A., Camps, C., Fernandez, C., Ragoussis, J., Gauguier, D., et al. (2009). MicroRNA-125a is over-expressed in insulin target tissues in a spontaneous rat model of Type 2 Diabetes. *BMC Med Genomics* 2, 54.
- Heymsfield, S.B., and Wadden, T.A. (2017). Mechanisms, Pathophysiology, and Management of Obesity. *The New England journal of medicine* 376, 254-266.
- Hilton, C., Neville, M.J., and Karpe, F. (2013). MicroRNAs in adipose tissue: their role in adipogenesis and obesity. *International journal of obesity* 37, 325-332.

Hinault, C., Dumortier, O., and Van Obberghen, E. (2013). [microRNA and diabetes: tiny things causing huge effects]. *Medecine sciences : M/S* 29, 785-790.

Holst, J.J., Gribble, F., Horowitz, M., and Rayner, C.K. (2016). Roles of the Gut in Glucose Homeostasis. *Diabetes care* 39, 884-892.

Hondares, E., Iglesias, R., Giralt, A., Gonzalez, F.J., Giralt, M., Mampel, T., and Villarroya, F. (2011). Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *The Journal of biological chemistry* 286, 12983-12990.

Hondares, E., Rosell, M., Gonzalez, F.J., Giralt, M., Iglesias, R., and Villarroya, F. (2010). Hepatic FGF21 expression is induced at birth via PPARalpha in response to milk intake and contributes to thermogenic activation of neonatal brown fat. *Cell metabolism* 11, 206-212.

Horvitz, H.R., and Sulston, J.E. (1980). Isolation and genetic characterization of cell-lineage mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 96, 435-454.

Huang, J., Imamura, T., and Olefsky, J.M. (2001). Insulin can regulate GLUT4 internalization by signaling to Rab5 and the motor protein dynein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 13084-13089.

Huang, Z.P., Chen, J., Seok, H.Y., Zhang, Z., Kataoka, M., Hu, X., and Wang, D.Z. (2013). MicroRNA-22 regulates cardiac hypertrophy and remodeling in response to stress. *Circulation research* 112, 1234-1243.

Huang, Z.P., and Wang, D.Z. (2014). miR-22 in cardiac remodeling and disease. *Trends in cardiovascular medicine* 24, 267-272.

Humphrey, C.S., Dykes, J.R., and Johnston, D. (1975). Effects of truncal, selective, and highly selective vagotomy on glucose tolerance and insulin secretion in patients with duodenal ulcer. Part I-Effect of vagotomy on response to oral glucose. *British medical journal* 2, 112-114.

Hurst, C.H., and Waxman, D.J. (2003). Activation of PPARalpha and PPARgamma by environmental phthalate monoesters. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 74, 297-308.

Hutley, L.J., Herington, A.C., Shurety, W., Cheung, C., Vesey, D.A., Cameron, D.P., and Prins, J.B. (2001). Human adipose tissue endothelial cells promote preadipocyte proliferation. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 281, E1037-1044.

Huypens, P., Sass, S., Wu, M., Dyckhoff, D., Tschop, M., Theis, F., Marschall, S., Hrabe de Angelis, M., and Beckers, J. (2016). Epigenetic germline inheritance of diet-induced obesity and insulin resistance. *Nature genetics* 48, 497-499.

I-

Ichimura, A., Hirasawa, A., Poulain-Godefroy, O., Bonnefond, A., Hara, T., Yengo, L., Kimura, I., Leloire, A., Liu, N., Iida, K., et al. (2012). Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human. *Nature* 483, 350-354.

IDF (2017). *Across the globe*. In *Across the globe* (International Diabetes Federation).

Ikeda, S.I., Tamura, Y., Takeuchi, S., Sanada, H., Kawamori, R., and Watada, H. (2016). Exercise-induced increase in IL-6 level enhances GLUT4 expression and insulin sensitivity in mouse skeletal muscle. *Biochemical and biophysical research communications* 473, 947-952.

J-

Janot, M., Cortes-Dubly, M.L., Rodriguez, S., and Huynh-Do, U. (2014). Bilateral uterine vessel ligation as a model of intrauterine growth restriction in mice. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* 12, 62.

Ji, S., You, Y., Kerner, J., Hoppel, C.L., Schoeb, T.R., Chick, W.S., Hamm, D.A., Sharer, J.D., and Wood, P.A. (2008). Homozygous carnitine palmitoyltransferase 1b (muscle isoform) deficiency is lethal in the mouse. *Molecular genetics and metabolism* 93, 314-322.

Jones, B.J., Tan, T., and Bloom, S.R. (2012). Minireview: Glucagon in stress and energy homeostasis. *Endocrinology* 153, 1049-1054.

Jones, C.N., Pei, D., Staris, P., Polonsky, K.S., Chen, Y.D., and Reaven, G.M. (1997). Alterations in the glucose-stimulated insulin secretory dose-response curve and in insulin clearance in nondiabetic insulin-resistant individuals. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 82, 1834-1838.

Jousse, C., Muranishi, Y., Parry, L., Montaurier, C., Even, P., Launay, J.M., Carraro, V., Maurin, A.C., Averous, J., Chaveroux, C., et al. (2014). Perinatal protein malnutrition affects mitochondrial function in adult and results in a resistance to high fat diet-induced obesity. *PLoS one* 9, e104896.

K-

Kahn, B.B. (1998). Type 2 diabetes: when insulin secretion fails to compensate for insulin resistance. *Cell* 92, 593-596.

Kahn, B.B., and Flier, J.S. (2000). Obesity and insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* 106, 473-481.

Kajimura, S., Seale, P., Kubota, K., Lunsford, E., Frangioni, J.V., Gygi, S.P., and Spiegelman, B.M. (2009). Initiation of myoblast to brown fat switch by a PRDM16-C/EBP-beta transcriptional complex. *Nature* 460, 1154-1158.

Kajimura, S., Seale, P., Tomaru, T., Erdjument-Bromage, H., Cooper, M.P., Ruas, J.L., Chin, S., Tempst, P., Lazar, M.A., and Spiegelman, B.M. (2008). Regulation of the brown and white fat gene programs through a PRDM16/CtBP transcriptional complex. *Genes & development* 22, 1397-1409.

Kampmann, U., Madsen, L.R., Skajaa, G.O., Iversen, D.S., Moeller, N., and Ovesen, P. (2015). Gestational diabetes: A clinical update. *World journal of diabetes* 6, 1065-1072.

Kamvissi-Lorenz, V., Raffaelli, M., Bornstein, S., and Mingrone, G. (2017). Role of the Gut on Glucose Homeostasis: Lesson Learned from Metabolic Surgery. *Current atherosclerosis reports* 19, 9.

Karbiener, M., Fischer, C., Nowitsch, S., Opriessnig, P., Papak, C., Ailhaud, G., Dani, C., Amri, E.Z., and Scheideler, M. (2009). microRNA miR-27b impairs human adipocyte differentiation and targets PPARgamma. *Biochemical and biophysical research communications* 390, 247-251.

Katsarou, A., Gudbjornsdottir, S., Rawshani, A., Dabelea, D., Bonifacio, E., Anderson, B.J., Jacobsen, L.M., Schatz, D.A., and Lernmark, A. (2017). Type 1 diabetes mellitus. *Nature reviews. Disease primers* 3, 17016.

Kaupila, T.E.S., Kaupila, J.H.K., and Larsson, N.G. (2017). Mammalian Mitochondria and Aging: An Update. *Cell metabolism* 25, 57-71.

Kaur, K., Vig, S., Srivastava, R., Mishra, A., Singh, V.P., Srivastava, A.K., and Datta, M. (2015). Elevated Hepatic miR-22-3p Expression Impairs Gluconeogenesis by Silencing the Wnt-Responsive Transcription Factor Tcf7. *Diabetes* 64, 3659-3669.

Kazantzis, M., Takahashi, V., Hinkle, J., Kota, S., Zilberfarb, V., Issad, T., Abdelkarim, M., Chouchane, L., and Strosberg, A.D. (2012). PAZ6 cells constitute a representative model for human brown pre-adipocytes. *Frontiers in endocrinology* 3, 13.

Kersten, S. (2014). Physiological regulation of lipoprotein lipase. *Biochimica et biophysica acta* 1841, 919-933.

Khanh, V.C., Zulkifli, A.F., Tokunaga, C., Yamashita, T., Hiramatsu, Y., and Ohneda, O. (2018). Aging impairs beige adipocyte differentiation of mesenchymal stem cells via the reduced expression of Sirtuin 1. *Biochemical and biophysical research communications* 500, 682-690.

Kharroubi, A.T., and Darwish, H.M. (2015). Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World journal of diabetes* 6, 850-867.

Kihara, A. (2012). Very long-chain fatty acids: elongation, physiology and related disorders. *Journal of biochemistry* 152, 387-395.

Kikai, M., Yamada, H., Wakana, N., Terada, K., Yamamoto, K., Wada, N., Motoyama, S., Saburi, M., Sugimoto, T., Irie, D., et al. (2018). Transplantation of brown adipose tissue inhibits atherosclerosis in apoE^{-/-} mice: contribution of the activated FGF-21-adiponectin axis. *Cardiovascular research* 114, i1-i13.

Kim, H.J., Cho, H., Alexander, R., Patterson, H.C., Gu, M., Lo, K.A., Xu, D., Goh, V.J., Nguyen, L.N., Chai, X., et al. (2014a). MicroRNAs are required for the feature maintenance and differentiation of brown adipocytes. *Diabetes* 63, 4045-4056.

Kim, V.N., and Nam, J.W. (2006). Genomics of microRNA. *Trends in genetics* : TIG 22, 165-173.

Kim, W., Fiori, J.L., Shin, Y.K., Okun, E., Kim, J.S., Rapp, P.R., and Egan, J.M. (2014b). Pancreatic polypeptide inhibits somatostatin secretion. *FEBS letters* 588, 3233-3239.

Kim, Y.K., and Kim, V.N. (2007). Processing of intronic microRNAs. *The EMBO journal* 26, 775-783.

Klein, J., Fasshauer, M., Klein, H.H., Benito, M., and Kahn, C.R. (2002). Novel adipocyte lines from brown fat: a model system for the study of differentiation, energy metabolism, and insulin action. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 24, 382-388.

- Klingenspor, M., Ivemeyer, M., Wiesinger, H., Haas, K., Heldmaier, G., and Wiesner, R.J. (1996). Biogenesis of thermogenic mitochondria in brown adipose tissue of Djungarian hamsters during cold adaptation. *The Biochemical journal* 316 (Pt 2), 607-613.
- Kong, L., Zhu, J., Han, W., Jiang, X., Xu, M., Zhao, Y., Dong, Q., Pang, Z., Guan, Q., Gao, L., et al. (2011). Significance of serum microRNAs in pre-diabetes and newly diagnosed type 2 diabetes: a clinical study. *Acta diabetologica* 48, 61-69.
- Kontani, Y., Wang, Y., Kimura, K., Inokuma, K.I., Saito, M., Suzuki-Miura, T., Wang, Z., Sato, Y., Mori, N., and Yamashita, H. (2005). UCP1 deficiency increases susceptibility to diet-induced obesity with age. *Aging cell* 4, 147-155.
- Kooijman, S., van den Heuvel, J.K., and Rensen, P.C.N. (2015). Neuronal Control of Brown Fat Activity. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 26, 657-668.
- Kovatcheva-Datchary, P., Nilsson, A., Akrami, R., Lee, Y.S., De Vadder, F., Arora, T., Hallen, A., Martens, E., Bjorck, I., and Backhed, F. (2015). Dietary Fiber-Induced Improvement in Glucose Metabolism Is Associated with Increased Abundance of *Prevotella*. *Cell metabolism* 22, 971-982.
- Kowalski, G.M., and Bruce, C.R. (2014). The regulation of glucose metabolism: implications and considerations for the assessment of glucose homeostasis in rodents. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 307, E859-871.
- Krek, A., Grun, D., Poy, M.N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E.J., MacMenamin, P., da Piedade, I., Gunsalus, K.C., Stoffel, M., et al. (2005). Combinatorial microRNA target predictions. *Nature genetics* 37, 495-500.
- Kreth, S., Hubner, M., and Hinske, L.C. (2018). MicroRNAs as Clinical Biomarkers and Therapeutic Tools in Perioperative Medicine. *Anesthesia and analgesia* 126, 670-681.
- Kubota, N., Terauchi, Y., Tobe, K., Yano, W., Suzuki, R., Ueki, K., Takamoto, I., Satoh, H., Maki, T., Kubota, T., et al. (2004). Insulin receptor substrate 2 plays a crucial role in beta cells and the hypothalamus. *The Journal of clinical investigation* 114, 917-927.
- Kulkarni, R.N., Bruning, J.C., Winnay, J.N., Postic, C., Magnuson, M.A., and Kahn, C.R. (1999). Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell* 96, 329-339.
- Kulkarni, R.N., Wang, Z.L., Wang, R.M., Hurley, J.D., Smith, D.M., Ghatei, M.A., Withers, D.J., Gardiner, J.V., Bailey, C.J., and Bloom, S.R. (1997). Leptin rapidly suppresses insulin release from insulinoma cells, rat and human islets and, in vivo, in mice. *The Journal of clinical investigation* 100, 2729-2736.
- Kwon, H., and Pessin, J.E. (2013). Adipokines mediate inflammation and insulin resistance. *Frontiers in endocrinology* 4, 71.

L-

- L.R., E. (2015). *Textbook of Veterinary Physiological Chemistry*
- Lafeber, H.N., Rolph, T.P., and Jones, C.T. (1984). Studies on the growth of the fetal guinea pig. The effects of ligation of the uterine artery on organ growth and development. *Journal of developmental physiology* 6, 441-459.
- Laplante, M., Festuccia, W.T., Soucy, G., Gelinas, Y., Lalonde, J., and Deshaies, Y. (2007). Involvement of adipose tissues in the early hypolipidemic action of PPARgamma agonism in the rat. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 292, R1408-1417.
- Lass, A., Zimmermann, R., Haemmerle, G., Riederer, M., Schoiswohl, G., Schweiger, M., Kienesberger, P., Strauss, J.G., Gorkiewicz, G., and Zechner, R. (2006). Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell metabolism* 3, 309-319.
- Lau, C.H., and Suh, Y. (2017). In vivo genome editing in animals using AAV-CRISPR system: applications to translational research of human disease. *F1000Research* 6, 2153.
- Law, J., Morris, D.E., Izzzi-Engbeaya, C., Salem, V., Coello, C., Robinson, L., Jayasinghe, M., Scott, R., Gunn, R., Rabiner, E., et al. (2018). Thermal Imaging Is a Noninvasive Alternative to PET/CT for Measurement of Brown Adipose Tissue Activity in Humans. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 59, 516-522.

- Lecoutre, S., Oger, F., Pourpe, C., Butruille, L., Marousez, L., Dickes-Coopman, A., Laborie, C., Guinez, C., Lesage, J., Vieau, D., et al. (2017). Maternal obesity programs increased leptin gene expression in rat male offspring via epigenetic modifications in a depot-specific manner. *Molecular metabolism* 6, 922-930.
- Lee, A.C., Katz, J., Blencowe, H., Cousens, S., Kozuki, N., Vogel, J.P., Adair, L., Baqui, A.H., Bhutta, Z.A., Caulfield, L.E., et al. (2013a). National and regional estimates of term and preterm babies born small for gestational age in 138 low-income and middle-income countries in 2010. *The Lancet. Global health* 1, e26-36.
- Lee, K.Y., Yamamoto, Y., Boucher, J., Winnay, J.N., Gesta, S., Cobb, J., Bluher, M., and Kahn, C.R. (2013b). Shox2 is a molecular determinant of depot-specific adipocyte function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 11409-11414.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854.
- Lee, Y.H., Mottillo, E.P., and Granneman, J.G. (2014). Adipose tissue plasticity from WAT to BAT and in between. *Biochimica et biophysica acta* 1842, 358-369.
- Lee, Y.H., Petkova, A.P., Mottillo, E.P., and Granneman, J.G. (2012). In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by beta3-adrenoceptor activation and high-fat feeding. *Cell metabolism* 15, 480-491.
- Lee, Y.S., Wollam, J., and Olefsky, J.M. (2018). An Integrated View of Immunometabolism. *Cell* 172, 22-40.
- Legler, J., Fletcher, T., Govarts, E., Porta, M., Blumberg, B., Heindel, J.J., and Trasande, L. (2015). Obesity, diabetes, and associated costs of exposure to endocrine-disrupting chemicals in the European Union. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 100, 1278-1288.
- Leibowitz, S.F., Hammer, N.J., and Chang, K. (1981). Hypothalamic paraventricular nucleus lesions produce overeating and obesity in the rat. *Physiology & behavior* 27, 1031-1040.
- Leitner, B.P., Huang, S., Brychta, R.J., Duckworth, C.J., Baskin, A.S., McGehee, S., Tal, I., Dieckmann, W., Gupta, G., Kolodny, G.M., et al. (2017). Mapping of human brown adipose tissue in lean and obese young men. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114, 8649-8654.
- Leitner, B.P., Weiner, L.S., Desir, M., Kahn, P.A., Selen, D.J., Tsang, C., Kolodny, G.M., and Cypess, A.M. (2018). Kinetics of human brown adipose tissue activation and deactivation. *International journal of obesity*.
- Liao, W.H., Henneberg, M., and Langhans, W. (2016). Immunity-Based Evolutionary Interpretation of Diet-Induced Thermogenesis. *Cell metabolism* 23, 971-979.
- Liu, J., Li, J., Li, W.J., and Wang, C.M. (2013a). The role of uncoupling proteins in diabetes mellitus. *Journal of diabetes research* 2013, 585897.
- Liu, J., Shi, K., Chen, M., Xu, L., Hong, J., Hu, B., Yang, X., and Sun, R. (2015). Elevated miR-155 expression induces immunosuppression via CD39(+) regulatory T-cells in sepsis patient. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases* 40, 135-141.
- Liu, M., Roth, A., Yu, M., Morris, R., Bersani, F., Rivera, M.N., Lu, J., Shioda, T., Vasudevan, S., Ramaswamy, S., et al. (2013b). The IGF2 intronic miR-483 selectively enhances transcription from IGF2 fetal promoters and enhances tumorigenesis. *Genes & development* 27, 2543-2548.
- Liu, X., Zheng, Z., Zhu, X., Meng, M., Li, L., Shen, Y., Chi, Q., Wang, D., Zhang, Z., Li, C., et al. (2013c). Brown adipose tissue transplantation improves whole-body energy metabolism. *Cell Res* 23, 851-854.
- Lowe, C.E., O'Rahilly, S., and Rochford, J.J. (2011). Adipogenesis at a glance. *Journal of cell science* 124, 2681-2686.
- Lueder, F.L., and Ogata, E.S. (1990). Uterine artery ligation in the maternal rat alters fetal tissue glucose utilization. *Pediatric research* 28, 464-468.
- Lumeng, C.N., Bodzin, J.L., and Saltiel, A.R. (2007). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *The Journal of clinical investigation* 117, 175-184.
- Lumey, L.H., Stein, A.D., Kahn, H.S., van der Pal-de Bruin, K.M., Blauw, G.J., Zyburt, P.A., and Susser, E.S. (2007). Cohort profile: the Dutch Hunger Winter families study. *International journal of epidemiology* 36, 1196-1204.
- Luo, L., and Liu, M. (2016). Adipose tissue in control of metabolism. *The Journal of endocrinology* 231, R77-R99.
- Lynes, M.D., and Tseng, Y.H. (2015). The Thermogenic Circuit: Regulators of Thermogenic Competency and Differentiation. *Genes & diseases* 2, 164-172.

M-

- M, U.D., Saari, T., Raiko, J., Kudomi, N., Maurer, S.F., Lahesmaa, M., Fromme, T., Amri, E.Z., Klingenspor, M., Solin, O., et al. (2018). Postprandial Oxidative Metabolism of Human Brown Fat Indicates Thermogenesis. *Cell metabolism* 28, 207-216 e203.
- Magnusson, I., Rothman, D.L., Katz, L.D., Shulman, R.G., and Shulman, G.I. (1992). Increased rate of gluconeogenesis in type II diabetes mellitus. A ¹³C nuclear magnetic resonance study. *The Journal of clinical investigation* 90, 1323-1327.
- Majid, S., Dar, A.A., Saini, S., Yamamura, S., Hirata, H., Tanaka, Y., Deng, G., and Dahiya, R. (2010). MicroRNA-205-directed transcriptional activation of tumor suppressor genes in prostate cancer. *Cancer* 116, 5637-5649.
- Marlatt, K.L., and Ravussin, E. (2017). Brown Adipose Tissue: an Update on Recent Findings. *Current obesity reports* 6, 389-396.
- Martin-Gronert, M.S., and Ozanne, S.E. (2007). Experimental IUGR and later diabetes. *Journal of internal medicine* 261, 437-452.
- Martin-Gronert, M.S., and Ozanne, S.E. (2012). Metabolic programming of insulin action and secretion. *Diabetes, obesity & metabolism* 14 Suppl 3, 29-39.
- Martinez de Mena, R., Scanlan, T.S., and Obregon, M.J. (2010). The T3 receptor beta1 isoform regulates UCP1 and D2 deiodinase in rat brown adipocytes. *Endocrinology* 151, 5074-5083.
- Marz, W., Nauck, M., Hoffmann, M.M., Nagel, D., Boehm, B.O., Koenig, W., Rothenbacher, D., and Winkelmann, B.R. (2004). G(-30)A polymorphism in the pancreatic promoter of the glucokinase gene associated with angiographic coronary artery disease and type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 109, 2844-2849.
- Mattsson, C.L., Csikasz, R.I., Chernogubova, E., Yamamoto, D.L., Hogberg, H.T., Amri, E.Z., Hutchinson, D.S., and Bengtsson, T. (2011). beta(1)-Adrenergic receptors increase UCP1 in human MADS brown adipocytes and rescue cold-acclimated beta(3)-adrenergic receptor-knockout mice via nonshivering thermogenesis. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 301, E1108-1118.
- Mayeur, S., Lancel, S., Theys, N., Lukaszewski, M.A., Duban-Deweere, S., Bastide, B., Hachani, J., Cecchelli, R., Breton, C., Gabory, A., et al. (2013). Maternal calorie restriction modulates placental mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency: putative involvement in fetoplacental growth defects in rats. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 304, E14-22.
- McCulloch, L.J., van de Bunt, M., Braun, M., Frayn, K.N., Clark, A., and Gloyn, A.L. (2011). GLUT2 (SLC2A2) is not the principal glucose transporter in human pancreatic beta cells: implications for understanding genetic association signals at this locus. *Molecular genetics and metabolism* 104, 648-653.
- McGarry, J.D., Woeltje, K.F., Kuwajima, M., and Foster, D.W. (1989). Regulation of ketogenesis and the renaissance of carnitine palmitoyltransferase. *Diabetes/metabolism reviews* 5, 271-284.
- Meijer, H.A., Kong, Y.W., Lu, W.T., Wilczynska, A., Spriggs, R.V., Robinson, S.W., Godfrey, J.D., Willis, A.E., and Bushell, M. (2013). Translational repression and eIF4A2 activity are critical for microRNA-mediated gene regulation. *Science* 340, 82-85.
- Modica, S., and Wolfrum, C. (2013). Bone morphogenic proteins signaling in adipogenesis and energy homeostasis. *Biochimica et biophysica acta* 1831, 915-923.
- Monteys, A.M., Spengler, R.M., Wan, J., Tecedor, L., Lennox, K.A., Xing, Y., and Davidson, B.L. (2010). Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. *Rna* 16, 495-505.
- Mori, M., Nakagami, H., Rodriguez-Araujo, G., Nimura, K., and Kaneda, Y. (2012a). Essential role for miR-196a in brown adipogenesis of white fat progenitor cells. *PLoS Biol* 10, e1001314.
- Mori, M.A., Raghavan, P., Thomou, T., Boucher, J., Robida-Stubbs, S., Macotela, Y., Russell, S.J., Kirkland, J.L., Blackwell, T.K., and Kahn, C.R. (2012b). Role of microRNA processing in adipose tissue in stress defense and longevity. *Cell metabolism* 16, 336-347.
- Mori, M.A., Thomou, T., Boucher, J., Lee, K.Y., Lallukka, S., Kim, J.K., Torriani, M., Yki-Jarvinen, H., Grinspoon, S.K., Cypess, A.M., et al. (2014). Altered miRNA processing disrupts brown/white adipocyte determination and associates with lipodystrophy. *The Journal of clinical investigation* 124, 3339-3351.
- Morrison, S.F., and Madden, C.J. (2014). Central nervous system regulation of brown adipose tissue. *Comprehensive Physiology* 4, 1677-1713.

Mottillo, E.P., Balasubramanian, P., Lee, Y.H., Weng, C., Kershaw, E.E., and Granneman, J.G. (2014). Coupling of lipolysis and de novo lipogenesis in brown, beige, and white adipose tissues during chronic beta3-adrenergic receptor activation. *Journal of lipid research* 55, 2276-2286.

Mottillo, E.P., Bloch, A.E., Leff, T., and Granneman, J.G. (2012). Lipolytic products activate peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and delta in brown adipocytes to match fatty acid oxidation with supply. *The Journal of biological chemistry* 287, 25038-25048.

Mudhasani, R., Imbalzano, A.N., and Jones, S.N. (2010). An essential role for Dicer in adipocyte differentiation. *Journal of cellular biochemistry* 110, 812-816.

Mudhasani, R., Puri, V., Hoover, K., Czech, M.P., Imbalzano, A.N., and Jones, S.N. (2011). Dicer is required for the formation of white but not brown adipose tissue. *Journal of cellular physiology* 226, 1399-1406.

Murphy, M.P. (2012). Mitochondrial thiols in antioxidant protection and redox signaling: distinct roles for glutathionylation and other thiol modifications. *Antioxidants & redox signaling* 16, 476-495.

Mutel, E., Gautier-Stein, A., Abdul-Wahed, A., Amigo-Correig, M., Zitoun, C., Stefanutti, A., Houberton, I., Tourette, J.A., Mithieux, G., and Rajas, F. (2011). Control of blood glucose in the absence of hepatic glucose production during prolonged fasting in mice: induction of renal and intestinal gluconeogenesis by glucagon. *Diabetes* 60, 3121-3131.

N-

Nam, D., Guo, B., Chatterjee, S., Chen, M.H., Nelson, D., Yeboor, V.K., and Ma, K. (2015). The adipocyte clock controls brown adipogenesis through the TGF-beta and BMP signaling pathways. *Journal of cell science* 128, 1835-1847.

Nedergaard, J., Alexson, S., and Cannon, B. (1980). Cold adaptation in the rat: increased brown fat peroxisomal beta-oxidation relative to maximal mitochondrial oxidative capacity. *The American journal of physiology* 239, C208-216.

Nedergaard, J., Bengtsson, T., and Cannon, B. (2007). Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 293, E444-452.

Nguyen, K.D., Qiu, Y., Cui, X., Goh, Y.P., Mwangi, J., David, T., Mukundan, L., Brombacher, F., Locksley, R.M., and Chawla, A. (2011). Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. *Nature* 480, 104-108.

Nicholls, D.G., Bernson, V.S., and Heaton, G.M. (1978). The identification of the component in the inner membrane of brown adipose tissue mitochondria responsible for regulating energy dissipation. *Experientia. Supplementum* 32, 89-93.

Nishi, K., Nishi, A., Nagasawa, T., and Ui-Tei, K. (2013). Human TNRC6A is an Argonaute-navigator protein for microRNA-mediated gene silencing in the nucleus. *Rna* 19, 17-35.

Nordlie, R.C., Foster, J.D., and Lange, A.J. (1999). Regulation of glucose production by the liver. *Annual review of nutrition* 19, 379-406.

O-

Ohno, H., Shinoda, K., Spiegelman, B.M., and Kajimura, S. (2012). PPARgamma agonists induce a white-to-brown fat conversion through stabilization of PRDM16 protein. *Cell metabolism* 15, 395-404.

Oliverio, M., Schmidt, E., Mauer, J., Baitzel, C., Hansmeier, N., Khani, S., Konieczka, S., Pradas-Juni, M., Brodesser, S., Van, T.M., et al. (2016). Dicer1-miR-328-Bace1 signalling controls brown adipose tissue differentiation and function. *Nature cell biology* 18, 328-336.

Orellana, E.A., and Kasinski, A.L. (2015). MicroRNAs in Cancer: A Historical Perspective on the Path from Discovery to Therapy. *Cancers* 7, 1388-1405.

Osuga, J., Ishibashi, S., Oka, T., Yagyu, H., Tozawa, R., Fujimoto, A., Shionoiri, F., Yahagi, N., Kraemer, F.B., Tsutsumi, O., et al. (2000). Targeted disruption of hormone-sensitive lipase results in male sterility and adipocyte hypertrophy, but not in obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 787-792.

Ouellet, V., Routhier-Labadie, A., Bellemare, W., Lakhil-Chaieb, L., Turcotte, E., Carpentier, A.C., and Richard, D. (2011). Outdoor temperature, age, sex, body mass index, and diabetic status determine the prevalence, mass, and glucose-uptake activity of 18F-FDG-detected BAT in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 96, 192-199.

Ozanne, S.E., and Hales, C.N. (1999). The long-term consequences of intra-uterine protein malnutrition for glucose metabolism. *The Proceedings of the Nutrition Society* 58, 615-619.

Ozanne, S.E., Smith, G.D., Tikerpa, J., and Hales, C.N. (1996a). Altered regulation of hepatic glucose output in the male offspring of protein-malnourished rat dams. *The American journal of physiology* 270, E559-564.

Ozanne, S.E., Wang, C.L., Coleman, N., and Smith, G.D. (1996b). Altered muscle insulin sensitivity in the male offspring of protein-malnourished rats. *The American journal of physiology* 271, E1128-1134.

Ozsolak, F., Poling, L.L., Wang, Z., Liu, H., Liu, X.S., Roeder, R.G., Zhang, X., Song, J.S., and Fisher, D.E. (2008). Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes & development* 22, 3172-3183.

P-

Palou, M., Konieczna, J., Torrens, J.M., Sanchez, J., Priego, T., Fernandes, M.L., Palou, A., and Pico, C. (2012). Impaired insulin and leptin sensitivity in the offspring of moderate caloric-restricted dams during gestation is early programmed. *The Journal of nutritional biochemistry* 23, 1627-1639.

Pandol, S.J. (2010). *The Exocrine Pancreas*. (Morgan & Claypool Life Sciences).

Park, J.H., Hur, W., and Lee, S.B. (2015). Intricate Transcriptional Networks of Classical Brown and Beige Fat Cells. *Frontiers in endocrinology* 6, 124.

Park, J.H., Stoffers, D.A., Nicholls, R.D., and Simmons, R.A. (2008). Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1. *The Journal of clinical investigation* 118, 2316-2324.

Park, M.S., Phan, H.D., Busch, F., Hinckley, S.H., Brackbill, J.A., Wysocki, V.H., and Nakanishi, K. (2017). Human Argonaute3 has slicer activity. *Nucleic acids research* 45, 11867-11877.

Patti, M.E. (2013). Intergenerational programming of metabolic disease: evidence from human populations and experimental animal models. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 70, 1597-1608.

Penhoat, A., Fayard, L., Stefanutti, A., Mithieux, G., and Rajas, F. (2014). Intestinal gluconeogenesis is crucial to maintain a physiological fasting glycemia in the absence of hepatic glucose production in mice. *Metabolism: clinical and experimental* 63, 104-111.

Peraldi, P., and Spiegelman, B. (1998). TNF-alpha and insulin resistance: summary and future prospects. *Molecular and cellular biochemistry* 182, 169-175.

Petrik, J., Reusens, B., Arany, E., Remacle, C., Coelho, C., Hoet, J.J., and Hill, D.J. (1999). A low protein diet alters the balance of islet cell replication and apoptosis in the fetal and neonatal rat and is associated with a reduced pancreatic expression of insulin-like growth factor-II. *Endocrinology* 140, 4861-4873.

Petrovic, N., Walden, T.B., Shabalina, I.G., Timmons, J.A., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2010). Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *The Journal of biological chemistry* 285, 7153-7164.

Petry, C.J., Dorling, M.W., Pawlak, D.B., Ozanne, S.E., and Hales, C.N. (2001). Diabetes in old male offspring of rat dams fed a reduced protein diet. *Int J Exp Diabetes Res* 2, 139-143.

Phillips, L.S., Ratner, R.E., Buse, J.B., and Kahn, S.E. (2014). We can change the natural history of type 2 diabetes. *Diabetes care* 37, 2668-2676.

Pinney, S.E., Jaeckle Santos, L.J., Han, Y., Stoffers, D.A., and Simmons, R.A. (2011). Exendin-4 increases histone acetylase activity and reverses epigenetic modifications that silence Pdx1 in the intrauterine growth retarded rat. *Diabetologia* 54, 2606-2614.

Place, R.F., Li, L.C., Pookot, D., Noonan, E.J., and Dahiya, R. (2008). MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 1608-1613.

Poissonnet, C.M., Burdi, A.R., and Garn, S.M. (1984). The chronology of adipose tissue appearance and distribution in the human fetus. *Early human development* 10, 1-11.

Pollak, M. (2017). The effects of metformin on gut microbiota and the immune system as research frontiers. *Diabetologia* 60, 1662-1667.

Poulos, S.P., Hausman, D.B., and Hausman, G.J. (2010). The development and endocrine functions of adipose tissue. *Molecular and cellular endocrinology* 323, 20-34.

Pradhan, R.N., Zachara, M., and Deplancke, B. (2017). A systems perspective on brown adipogenesis and metabolic activation. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* 18 Suppl 1, 65-81.

Prasad, R.B., and Groop, L. (2015). Genetics of type 2 diabetes-pitfalls and possibilities. *Genes* 6, 87-123.

Price, N.L., and Fernandez-Hernando, C. (2016). miRNA regulation of white and brown adipose tissue differentiation and function. *Biochimica et biophysica acta* 1861, 2104-2110.

Purcell, R.H., Sun, B., Pass, L.L., Power, M.L., Moran, T.H., and Tamashiro, K.L. (2011). Maternal stress and high-fat diet effect on maternal behavior, milk composition, and pup ingestive behavior. *Physiology & behavior* 104, 474-479.

Q-

Qiang, L., Wang, L., Kon, N., Zhao, W., Lee, S., Zhang, Y., Rosenbaum, M., Zhao, Y., Gu, W., Farmer, S.R., et al. (2012). Brown remodeling of white adipose tissue by SirT1-dependent deacetylation of Pparggamma. *Cell* 150, 620-632.

R-

Raffort, J., Hinault, C., Dumortier, O., and Van Obberghen, E. (2015). Circulating microRNAs and diabetes: potential applications in medical practice. *Diabetologia* 58, 1978-1992.

Rahmouni, K., Morgan, D.A., Morgan, G.M., Liu, X., Sigmund, C.D., Mark, A.L., and Haynes, W.G. (2004). Hypothalamic PI3K and MAPK differentially mediate regional sympathetic activation to insulin. *The Journal of clinical investigation* 114, 652-658.

Rando, O.J., and Simmons, R.A. (2015). I'm Eating for Two: Parental Dietary Effects on Offspring Metabolism. *Cell* 161, 93-105.

Rassoulzadegan, M., Grandjean, V., Gounon, P., Vincent, S., Gillot, I., and Cuzin, F. (2006). RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse. *Nature* 441, 469-474.

Ratnadiwakara, M., Mohenska, M., and Anko, M.L. (2018). Splicing factors as regulators of miRNA biogenesis - links to human disease. *Seminars in cell & developmental biology* 79, 113-122.

Ravelli, A.C., van der Meulen, J.H., Michels, R.P., Osmond, C., Barker, D.J., Hales, C.N., and Bleker, O.P. (1998). Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *Lancet* 351, 173-177.

Ray, I., Mahata, S.K., and De, R.K. (2016). Obesity: An Immunometabolic Perspective. *Frontiers in endocrinology* 7, 157.

Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R., and Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403, 901-906.

Remacle, C., Dumortier, O., Bol, V., Goosse, K., Romanus, P., Theys, N., Bouckenooghe, T., and Reusens, B. (2007). Intrauterine programming of the endocrine pancreas. *Diabetes, obesity & metabolism* 9 Suppl 2, 196-209.

Reynolds, C.M., Gray, C., Li, M., Segovia, S.A., and Vickers, M.H. (2015). Early Life Nutrition and Energy Balance Disorders in Offspring in Later Life. *Nutrients* 7, 8090-8111.

Rizza, R.A., Cryer, P.E., and Gerich, J.E. (1979). Role of glucagon, catecholamines, and growth hormone in human glucose counterregulation. Effects of somatostatin and combined alpha- and beta-adrenergic blockade on plasma glucose recovery and glucose flux rates after insulin-induced hypoglycemia. *The Journal of clinical investigation* 64, 62-71.

Rodeheffer, M.S., Birsoy, K., and Friedman, J.M. (2008). Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo. *Cell* 135, 240-249.

Rodgers, J.T., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S.P., Spiegelman, B.M., and Puigserver, P. (2005). Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* 434, 113-118.

Rodriguez-Diaz, R., Dando, R., Jacques-Silva, M.C., Fachado, A., Molina, J., Abdulreda, M.H., Ricordi, C., Roper, S.D., Berggren, P.O., and Caicedo, A. (2011). Alpha cells secrete acetylcholine as a non-neuronal paracrine signal priming beta cell function in humans. *Nature medicine* 17, 888-892.

Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J.L., and Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome research* 14, 1902-1910.

- Roh, E., Song, D.K., and Kim, M.S. (2016). Emerging role of the brain in the homeostatic regulation of energy and glucose metabolism. *Experimental & molecular medicine* 48, e216.
- Romo, A., Carceller, R., and Tobajas, J. (2009). Intrauterine growth retardation (IUGR): epidemiology and etiology. *Pediatric endocrinology reviews : PER* 6 Suppl 3, 332-336.
- Rosell, M., Kaforou, M., Frontini, A., Okolo, A., Chan, Y.W., Nikolopoulou, E., Millership, S., Fenech, M.E., MacIntyre, D., Turner, J.O., et al. (2014). Brown and white adipose tissues: intrinsic differences in gene expression and response to cold exposure in mice. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 306, E945-964.
- 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 & development* 16, 22-26.
- Rosen, E.D., and MacDougald, O.A. (2006). Adipocyte differentiation from the inside out. *Nature reviews. Molecular cell biology* 7, 885-896.
- Rosenwald, M., Perdikari, A., Rulicke, T., and Wolfrum, C. (2013). Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nature cell biology* 15, 659-667.
- Rothwell, N.J., and Stock, M.J. (1981). A role for insulin in the diet-induced thermogenesis of cafeteria-fed rats. *Metabolism: clinical and experimental* 30, 673-678.
- Ruegger, S., and Grosshans, H. (2012). MicroRNA turnover: when, how, and why. *Trends Biochem Sci* 37, 436-446.
- Rupaimoole, R., and Slack, F.J. (2017). MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nature reviews. Drug discovery* 16, 203-222.
- Ruzzin, J., Petersen, R., Meugnier, E., Madsen, L., Lock, E.J., Lillefosse, H., Ma, T., Pesenti, S., Sonne, S.B., Marstrand, T.T., et al. (2010). Persistent organic pollutant exposure leads to insulin resistance syndrome. *Environmental health perspectives* 118, 465-471.
- Ryder, J.W., Gilbert, M., and Zierath, J.R. (2001). Skeletal muscle and insulin sensitivity: pathophysiological alterations. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 6, D154-163.

S-

- Sales, V.M., Ferguson-Smith, A.C., and Patti, M.E. (2017). Epigenetic Mechanisms of Transmission of Metabolic Disease across Generations. *Cell metabolism* 25, 559-571.
- Samuel, V.T., and Shulman, G.I. (2012). Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell* 148, 852-871.
- Sandovici, I., Smith, N.H., Nitert, M.D., Ackers-Johnson, M., Uribe-Lewis, S., Ito, Y., Jones, R.H., Marquez, V.E., Cairns, W., Tadayyon, M., et al. (2011). Maternal diet and aging alter the epigenetic control of a promoter-enhancer interaction at the Hnf4a gene in rat pancreatic islets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 5449-5454.
- Scarpulla, R.C. (2011). Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochimica et biophysica acta* 1813, 1269-1278.
- 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. *The Journal of biological chemistry* 270, 26746-26749.
- Schilperoort, M., van Dam, A.D., Hoeke, G., Shabalina, I.G., Okolo, A., Hanyaloglu, A.C., Dib, L.H., Mol, I.M., Caengprasath, N., Chan, Y.W., et al. (2018). The GPR120 agonist TUG-891 promotes metabolic health by stimulating mitochondrial respiration in brown fat. *EMBO molecular medicine* 10.
- Schmidt, T.S.B., Raes, J., and Bork, P. (2018). The Human Gut Microbiome: From Association to Modulation. *Cell* 172, 1198-1215.
- Schreiber, R., Diwoky, C., Schoiswohl, G., Feiler, U., Wongsiriroj, N., Abdellatif, M., Kolb, D., Hoeks, J., Kershaw, E.E., Sedej, S., et al. (2017). Cold-Induced Thermogenesis Depends on ATGL-Mediated Lipolysis in Cardiac Muscle, but Not Brown Adipose Tissue. *Cell metabolism* 26, 753-763 e757.
- Schwartz, M.W., Woods, S.C., Porte, D., Jr., Seeley, R.J., and Baskin, D.G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature* 404, 661-671.

Scotney, H., Symonds, M.E., Law, J., Budge, H., Sharkey, D., and Manolopoulos, K.N. (2017). Glucocorticoids modulate human brown adipose tissue thermogenesis in vivo. *Metabolism: clinical and experimental* 70, 125-132.

Seale, P., Bjork, B., Yang, W., Kajimura, S., Chin, S., Kuang, S., Scime, A., Devarakonda, S., Conroe, H.M., Erdjument-Bromage, H., et al. (2008). PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* 454, 961-967.

Seale, P., Kajimura, S., Yang, W., Chin, S., Rohas, L.M., Uldry, M., Tavernier, G., Langin, D., and Spiegelman, B.M. (2007). Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell metabolism* 6, 38-54.

Sebastiani, G., Po, A., Miele, E., Ventriglia, G., Ceccarelli, E., Bugliani, M., Marselli, L., Marchetti, P., Gulino, A., Ferretti, E., et al. (2015). MicroRNA-124a is hyperexpressed in type 2 diabetic human pancreatic islets and negatively regulates insulin secretion. *Acta diabetologica* 52, 523-530.

Sharma, D., Shastri, S., and Sharma, P. (2016). Intrauterine Growth Restriction: Antenatal and Postnatal Aspects. *Clinical medicine insights. Pediatrics* 10, 67-83.

Sharp, L.Z., Shinoda, K., Ohno, H., Scheel, D.W., Tomoda, E., Ruiz, L., Hu, H., Wang, L., Pavlova, Z., Gilsanz, V., et al. (2012). Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells. *PLoS one* 7, e49452.

Shepherd, P.R., Crowther, N.J., Desai, M., Hales, C.N., and Ozanne, S.E. (1997). Altered adipocyte properties in the offspring of protein malnourished rats. *The British journal of nutrition* 78, 121-129.

Shimizu, T., and Yokotani, K. (2009). Acute cold exposure-induced down-regulation of CIDEA, cell death-inducing DNA fragmentation factor-alpha-like effector A, in rat interscapular brown adipose tissue by sympathetically activated beta3-adrenoreceptors. *Biochemical and biophysical research communications* 387, 294-299.

Shin, H., Ma, Y., Chanturiya, T., Cao, Q., Wang, Y., Kadegowda, A.K.G., Jackson, R., Rumore, D., Xue, B., Shi, H., et al. (2017). Lipolysis in Brown Adipocytes Is Not Essential for Cold-Induced Thermogenesis in Mice. *Cell metabolism* 26, 764-777 e765.

Shiohama, A., Sasaki, T., Noda, S., Minoshima, S., and Shimizu, N. (2003). Molecular cloning and expression analysis of a novel gene DGCR8 located in the DiGeorge syndrome chromosomal region. *Biochemical and biophysical research communications* 304, 184-190.

Shirakawa, J., De Jesus, D.F., and Kulkarni, R.N. (2017). Exploring inter-organ crosstalk to uncover mechanisms that regulate beta-cell function and mass. *European journal of clinical nutrition* 71, 896-903.

Silverman, B.L., Rizzo, T.A., Cho, N.H., and Metzger, B.E. (1998). Long-term effects of the intrauterine environment. The Northwestern University Diabetes in Pregnancy Center. *Diabetes care* 21 Suppl 2, B142-149.

Simmons, R.A., Templeton, L.J., and Gertz, S.J. (2001). Intrauterine growth retardation leads to the development of type 2 diabetes in the rat. *Diabetes* 50, 2279-2286.

Sladek, R., Rocheleau, G., Rung, J., Dina, C., Shen, L., Serre, D., Boutin, P., Vincent, D., Belisle, A., Hadjadj, S., et al. (2007). A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* 445, 881-885.

Slater-Jefferies, J.L., Lillycrop, K.A., Townsend, P.A., Torrens, C., Hoile, S.P., Hanson, M.A., and Burdge, G.C. (2011). Feeding a protein-restricted diet during pregnancy induces altered epigenetic regulation of peroxisomal proliferator-activated receptor-alpha in the heart of the offspring. *Journal of developmental origins of health and disease* 2, 250-255.

Snoeck, A., Remacle, C., Reusens, B., and Hoet, J.J. (1990). Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas. *Biol Neonate* 57, 107-118.

Song, W.J., Mondal, P., Wolfe, A., Alonso, L.C., Stamateris, R., Ong, B.W., Lim, O.C., Yang, K.S., Radovick, S., Novaira, H.J., et al. (2014). Glucagon regulates hepatic kisspeptin to impair insulin secretion. *Cell metabolism* 19, 667-681.

Soty, M., Gautier-Stein, A., Rajas, F., and Mithieux, G. (2017). Gut-Brain Glucose Signaling in Energy Homeostasis. *Cell metabolism* 25, 1231-1242.

Spalding, K.L., Arner, E., Westermark, P.O., Bernard, S., Buchholz, B.A., Bergmann, O., Blomqvist, L., Hoffstedt, J., Naslund, E., Britton, T., et al. (2008). Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 453, 783-787.

Sprague, J.E., and Arbelaez, A.M. (2011). Glucose counterregulatory responses to hypoglycemia. *Pediatric endocrinology reviews : PER* 9, 463-473; quiz 474-465.

Stanford, K.I., Middelbeek, R.J., Townsend, K.L., An, D., Nygaard, E.B., Hitchcox, K.M., Markan, K.R., Nakano, K., Hirshman, M.F., Tseng, Y.H., et al. (2013). Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *The Journal of clinical investigation* 123, 215-223.

- Stegemann, R., and Buchner, D.A. (2015). Transgenerational inheritance of metabolic disease. *Seminars in cell & developmental biology* 43, 131-140.
- Su, Y., Wu, H., Pavlosky, A., Zou, L.L., Deng, X., Zhang, Z.X., and Jevnikar, A.M. (2016). Regulatory non-coding RNA: new instruments in the orchestration of cell death. *Cell death & disease* 7, e2333.
- Sun, K., Kusminski, C.M., Luby-Phelps, K., Spurgin, S.B., An, Y.A., Wang, Q.A., Holland, W.L., and Scherer, P.E. (2014). Brown adipose tissue derived VEGF-A modulates cold tolerance and energy expenditure. *Molecular metabolism* 3, 474-483.
- Sun, K., Wernstedt Asterholm, I., Kusminski, C.M., Bueno, A.C., Wang, Z.V., Pollard, J.W., Brekken, R.A., and Scherer, P.E. (2012). Dichotomous effects of VEGF-A on adipose tissue dysfunction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 5874-5879.
- Sun, L., and Trajkovski, M. (2014). MiR-27 orchestrates the transcriptional regulation of brown adipogenesis. *Metabolism: clinical and experimental* 63, 272-282.
- Sun, L., Xie, H., Mori, M.A., Alexander, R., Yuan, B., Hattangadi, S.M., Liu, Q., Kahn, C.R., and Lodish, H.F. (2011). Mir193b-365 is essential for brown fat differentiation. *Nature cell biology* 13, 958-965.
- Sustarsic, E.G., Ma, T., Lynes, M.D., Larsen, M., Karavaeva, I., Havelund, J.F., Nielsen, C.H., Jedrychowski, M.P., Moreno-Torres, M., Lundh, M., et al. (2018). Cardiolipin Synthesis in Brown and Beige Fat Mitochondria Is Essential for Systemic Energy Homeostasis. *Cell metabolism* 28, 159-174 e111.
- Susulic, V.S., Frederich, R.C., Lawitts, J., Tozzo, E., Kahn, B.B., Harper, M.E., Himms-Hagen, J., Flier, J.S., and Lowell, B.B. (1995). Targeted disruption of the beta 3-adrenergic receptor gene. *The Journal of biological chemistry* 270, 29483-29492.
- Swanson, A.M., and David, A.L. (2015). Animal models of fetal growth restriction: Considerations for translational medicine. *Placenta* 36, 623-630.
- Symonds, M.E., Aldiss, P., Pope, M., and Budge, H. (2018). Recent advances in our understanding of brown and beige adipose tissue: the good fat that keeps you healthy. *F1000Research* 7.
- Symonds, M.E., Sebert, S.P., Hyatt, M.A., and Budge, H. (2009). Nutritional programming of the metabolic syndrome. *Nature reviews. Endocrinology* 5, 604-610.
- T-**
- Takahashi, A., Shimazu, T., and Maruyama, Y. (1992). Importance of sympathetic nerves for the stimulatory effect of cold exposure on glucose utilization in brown adipose tissue. *The Japanese journal of physiology* 42, 653-664.
- Tang, X., Wen, S., Zheng, D., Tucker, L., Cao, L., Pantazatos, D., Moss, S.F., and Ramratnam, B. (2013). Acetylation of drosha on the N-terminus inhibits its degradation by ubiquitination. *PloS one* 8, e72503.
- Taniguchi, C.M., Emanuelli, B., and Kahn, C.R. (2006). Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nature reviews. Molecular cell biology* 7, 85-96.
- Tank, A.W., and Lee Wong, D. (2015). Peripheral and central effects of circulating catecholamines. *Comprehensive Physiology* 5, 1-15.
- Tchkonja, T., Thomou, T., Zhu, Y., Karagiannides, I., Pothoulakis, C., Jensen, M.D., and Kirkland, J.L. (2013). Mechanisms and metabolic implications of regional differences among fat depots. *Cell metabolism* 17, 644-656.
- Theys, N., Bouckenooghe, T., Ahn, M.T., Remacle, C., and Reusens, B. (2009). Maternal low-protein diet alters pancreatic islet mitochondrial function in a sex-specific manner in the adult rat. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 297, R1516-1525.
- Thorens, B., and Larsen, P.J. (2004). Gut-derived signaling molecules and vagal afferents in the control of glucose and energy homeostasis. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 7, 471-478.
- Thorne, A., Lonqvist, F., Aelman, J., Hellers, G., and Arner, P. (2002). A pilot study of long-term effects of a novel obesity treatment: omentectomy in connection with adjustable gastric banding. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* 26, 193-199.
- Tokumar, S., Suzuki, M., Yamada, H., Nagino, M., and Takahashi, T. (2008). let-7 regulates Dicer expression and constitutes a negative feedback loop. *Carcinogenesis* 29, 2073-2077.
- Tontonoz, P., and Spiegelman, B.M. (2008). Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annual review of biochemistry* 77, 289-312.

Townsend, K.L., and Tseng, Y.H. (2014). Brown fat fuel utilization and thermogenesis. *Trends in endocrinology and metabolism*: TEM 25, 168-177.

Trajkovski, M., Ahmed, K., Esau, C.C., and Stoffel, M. (2012). MyomiR-133 regulates brown fat differentiation through Prdm16. *Nature cell biology* 14, 1330-1335.

Tran, K.V., Gealekman, O., Frontini, A., Zingaretti, M.C., Morroni, M., Giordano, A., Smorlesi, A., Perugini, J., De Matteis, R., Sbarbati, A., et al. (2012). The vascular endothelium of the adipose tissue gives rise to both white and brown fat cells. *Cell metabolism* 15, 222-229.

Tran, T.T., and Kahn, C.R. (2010). Transplantation of adipose tissue and stem cells: role in metabolism and disease. *Nature reviews. Endocrinology* 6, 195-213.

Tseng, Y.H., Kokkotou, E., Schulz, T.J., Huang, T.L., Winnay, J.N., Taniguchi, C.M., Tran, T.T., Suzuki, R., Espinoza, D.O., Yamamoto, Y., et al. (2008). New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature* 454, 1000-1004.

Tups, A., Benzler, J., Sergi, D., Ladyman, S.R., and Williams, L.M. (2017). Central Regulation of Glucose Homeostasis. *Comprehensive Physiology* 7, 741-764.

Tutar, L., Tutar, E., Ozgur, A., and Tutar, Y. (2015). Therapeutic Targeting of microRNAs in Cancer: Future Perspectives. *Drug development research* 76, 382-388.

U-

Unger, R.H. (2002). Lipotoxic diseases. *Annual review of medicine* 53, 319-336.

V-

Vaiserman, A.M. (2018). Birth weight predicts aging trajectory: A hypothesis. *Mechanisms of ageing and development* 173, 61-70.

Valinezhad Orang, A., Safaralizadeh, R., and Kazemzadeh-Bavili, M. (2014). Mechanisms of miRNA-Mediated Gene Regulation from Common Downregulation to mRNA-Specific Upregulation. *International journal of genomics* 2014, 970607.

Vambergue, A., Valat, A.S., Dufour, P., Cazaubiel, M., Fontaine, P., and Puech, F. (2002). [Pathophysiology of gestational diabetes]. *Journal de gynecologie, obstetrique et biologie de la reproduction* 31, 4S3-4S10.

van der Ree, M.H., van der Meer, A.J., van Nuenen, A.C., de Bruijne, J., Ottosen, S., Janssen, H.L., Kootstra, N.A., and Reesink, H.W. (2016). Miravirsin dosing in chronic hepatitis C patients results in decreased microRNA-122 levels without affecting other microRNAs in plasma. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 43, 102-113.

van Marken Lichtenbelt, W.D., Vanhommerig, J.W., Smulders, N.M., Drossaerts, J.M., Kemerink, G.J., Bouvy, N.D., Schrauwen, P., and Teule, G.J. (2009). Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *The New England journal of medicine* 360, 1500-1508.

Van Obberghen, E., Baron, V., Delahaye, L., Emanuelli, B., Filippa, N., Giorgetti-Peraldi, S., Lebrun, P., Mothe-Satney, I., Peraldi, P., Rocchi, S., et al. (2001). Surfing the insulin signaling web. *European journal of clinical investigation* 31, 966-977.

Van Obberghen, E., Spooner, P.M., Kahn, C.R., Chernick, S.S., Garrison, M.M., Karlsson, F.A., and Grunfeld, C. (1979). Insulin-receptor antibodies mimic a late insulin effect. *Nature* 280, 500-502.

Vaughan, C.H., Zarebidaki, E., Ehlen, J.C., and Bartness, T.J. (2014). Analysis and measurement of the sympathetic and sensory innervation of white and brown adipose tissue. *Methods in enzymology* 537, 199-225.

Vaughan, O.R., Rosario, F.J., Powell, T.L., and Jansson, T. (2017). Regulation of Placental Amino Acid Transport and Fetal Growth. *Progress in molecular biology and translational science* 145, 217-251.

Vickers, M.H. (2014). Early life nutrition, epigenetics and programming of later life disease. *Nutrients* 6, 2165-2178.

Vienberg, S., Geiger, J., Madsen, S., and Dalgaard, L.T. (2017). MicroRNAs in metabolism. *Acta physiologica* 219, 346-361.

Vila-Bedmar, R., Lorenzo, M., and Fernandez-Veledo, S. (2010). Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase-mammalian target of rapamycin cross talk regulates brown adipocyte differentiation. *Endocrinology* 151, 980-992.

Villarroya, F., Cereijo, R., Villarroya, J., and Giralt, M. (2017). Brown adipose tissue as a secretory organ. *Nature reviews. Endocrinology* 13, 26-35.

Villarroya, F., and Vidal-Puig, A. (2013). Beyond the sympathetic tone: the new brown fat activators. *Cell metabolism* 17, 638-643.

Virtanen, K.A., Lidell, M.E., Orava, J., Heglind, M., Westergren, R., Niemi, T., Taittonen, M., Laine, J., Savisto, N.J., Enerback, S., et al. (2009). Functional brown adipose tissue in healthy adults. *The New England journal of medicine* 360, 1518-1525.

Vo, T., and Hardy, D.B. (2012). Molecular mechanisms underlying the fetal programming of adult disease. *Journal of cell communication and signaling* 6, 139-153.

Vosselman, M.J., Brans, B., van der Lans, A.A., Wierdsma, R., van Baak, M.A., Mottaghy, F.M., Schrauwen, P., and van Marken Lichtenbelt, W.D. (2013). Brown adipose tissue activity after a high-calorie meal in humans. *The American journal of clinical nutrition* 98, 57-64.

Vrieze, A., Van Nood, E., Holleman, F., Salojarvi, J., Kootte, R.S., Bartelsman, J.F., Dallinga-Thie, G.M., Ackermans, M.T., Serlie, M.J., Oozeer, R., et al. (2012). Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology* 143, 913-916 e917.

W-

Wagner, K.D., Wagner, N., Ghanbarian, H., Grandjean, V., Gounon, P., Cuzin, F., and Rassoulzadegan, M. (2008). RNA induction and inheritance of epigenetic cardiac hypertrophy in the mouse. *Dev Cell* 14, 962-969.

Walden, T.B., Hansen, I.R., Timmons, J.A., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2012). Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, "brite," and white adipose tissues. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 302, E19-31.

Wang, G.X., Zhao, X.Y., Meng, Z.X., Kern, M., Dietrich, A., Chen, Z., Cozocov, Z., Zhou, D., Okunade, A.L., Su, X., et al. (2014a). The brown fat-enriched secreted factor Nrg4 preserves metabolic homeostasis through attenuation of hepatic lipogenesis. *Nature medicine* 20, 1436-1443.

Wang, H., Bei, Y., Shen, S., Huang, P., Shi, J., Zhang, J., Sun, Q., Chen, Y., Yang, Y., Xu, T., et al. (2016). miR-21-3p controls sepsis-associated cardiac dysfunction via regulating SORBS2. *Journal of molecular and cellular cardiology* 94, 43-53.

Wang, W., Kissig, M., Rajakumari, S., Huang, L., Lim, H.W., Won, K.J., and Seale, P. (2014b). Ebf2 is a selective marker of brown and beige adipogenic precursor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 14466-14471.

Wang, Y., Medvid, R., Melton, C., Jaenisch, R., and Blalock, R. (2007). DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nature genetics* 39, 380-385.

Wang, Y., Rimm, E.B., Stampfer, M.J., Willett, W.C., and Hu, F.B. (2005). Comparison of abdominal adiposity and overall obesity in predicting risk of type 2 diabetes among men. *The American journal of clinical nutrition* 81, 555-563.

Warner, M.J., and Ozanne, S.E. (2010). Mechanisms involved in the developmental programming of adulthood disease. *The Biochemical journal* 427, 333-347.

Wassermann, F. (2011). The development of adipose tissue.

Watkins, A.J., and Sinclair, K.D. (2014). Paternal low protein diet affects adult offspring cardiovascular and metabolic function in mice. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 306, H1444-1452.

Westholm, J.O., and Lai, E.C. (2011). Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing. *Biochimie* 93, 1897-1904.

Whittle, A.J., Carobbio, S., Martins, L., Slawik, M., Hondares, E., Vazquez, M.J., Morgan, D., Csikasz, R.I., Gallego, R., Rodriguez-Cuenca, S., et al. (2012). BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions. *Cell* 149, 871-885.

WHO (2016). Obesity and Diabetes : a time bomb. (World Health Organization).

WHO (2017). Obesity and Overweight. W.H. Organization, ed.

Wigglesworth, J.S. (1964). Experimental Growth Retardation in the Foetal Rat. *The Journal of pathology and bacteriology* 88, 1-13.

Wigglesworth, J.S. (1974). Fetal growth retardation. Animal model: uterine vessel ligation in the pregnant rat. *The American journal of pathology* 77, 347-350.

Wightman, B., Ha, I., and Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75, 855-862.

Wilk, S., Jenke, A., Stehr, J., Yang, C.A., Bauer, S., Goldner, K., Kotsch, K., Volk, H.D., Poller, W., Schultheiss, H.P., et al. (2013). Adiponectin modulates NK-cell function. *European journal of immunology* 43, 1024-1033.

Wilmot, E.G., Edwardson, C.L., Achana, F.A., Davies, M.J., Gorely, T., Gray, L.J., Khunti, K., Yates, T., and Biddle, S.J. (2012). Sedentary time in adults and the association with diabetes, cardiovascular disease and death: systematic review and meta-analysis. *Diabetologia* 55, 2895-2905.

Winther, S., Isidor, M.S., Basse, A.L., Skjoldborg, N., Cheung, A., Quistorff, B., and Hansen, J.B. (2018). Restricting glycolysis impairs brown adipocyte glucose and oxygen consumption. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 314, E214-E223.

Wirsén, C. (2011). Distribution of adrenergic nerve fibers in brown and white adipose tissue.

Wong, E., Backholer, K., Gearon, E., Harding, J., Freak-Poli, R., Stevenson, C., and Peeters, A. (2013). Diabetes and risk of physical disability in adults: a systematic review and meta-analysis. *The lancet. Diabetes & endocrinology* 1, 106-114.

Woods, S.C., Lotter, E.C., McKay, L.D., and Porte, D., Jr. (1979). Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature* 282, 503-505.

Wu, J., Bostrom, P., Sparks, L.M., Ye, L., Choi, J.H., Giang, A.H., Khandekar, M., Virtanen, K.A., Nuutila, P., Schaart, G., et al. (2012). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* 150, 366-376.

Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, R.C., et al. (1999a). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98, 115-124.

Wu, Z., Rosen, E.D., Brun, R., Hauser, S., Adelmant, G., Troy, A.E., McKeon, C., Darlington, G.J., and Spiegelman, B.M. (1999b). Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Molecular cell* 3, 151-158.

Y-

Yang, B.T., Dayeh, T.A., Volkov, P.A., Kirkpatrick, C.L., Malmgren, S., Jing, X., Renstrom, E., Wollheim, C.B., Nitert, M.D., and Ling, C. (2012). Increased DNA methylation and decreased expression of PDX-1 in pancreatic islets from patients with type 2 diabetes. *Molecular endocrinology* 26, 1203-1212.

Yang, W.M., Jeong, H.J., Park, S.W., and Lee, W. (2015). Obesity-induced miR-15b is linked causally to the development of insulin resistance through the repression of the insulin receptor in hepatocytes. *Molecular nutrition & food research* 59, 2303-2314.

Ye, L., Wu, J., Cohen, P., Kazak, L., Khandekar, M.J., Jedrychowski, M.P., Zeng, X., Gygi, S.P., and Spiegelman, B.M. (2013). Fat cells directly sense temperature to activate thermogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 12480-12485.

Z-

Zamora, M., and Villena, J.A. (2014). Targeting mitochondrial biogenesis to treat insulin resistance. *Current pharmaceutical design* 20, 5527-5557.

Zaragosi, L.E., Wdziekonski, B., Brigand, K.L., Villageois, P., Mari, B., Waldmann, R., Dani, C., and Barbry, P. (2011). Small RNA sequencing reveals miR-642a-3p as a novel adipocyte-specific microRNA and miR-30 as a key regulator of human adipogenesis. *Genome Biol* 12, R64.

Zhang, H., Guan, M., Townsend, K.L., Huang, T.L., An, D., Yan, X., Xue, R., Schulz, T.J., Winnay, J., Mori, M., et al. (2015). MicroRNA-455 regulates brown adipogenesis via a novel HIF1an-AMPK-PGC1alpha signaling network. *EMBO reports* 16, 1378-1393.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425-432.

Zimmermann, R., Strauss, J.G., Haemmerle, G., Schoiswohl, G., Birner-Gruenberger, R., Riederer, M., Lass, A., Neuberger, G., Eisenhaber, F., Hermetter, A., et al. (2004). Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* 306, 1383-1386.