



**HAL**  
open science

# Mécanismes moléculaires et cellulaires des processus de différenciation et de plasticité cellulaire pour la formation des adipocytes

Hélène Leménager

► **To cite this version:**

Hélène Leménager. Mécanismes moléculaires et cellulaires des processus de différenciation et de plasticité cellulaire pour la formation des adipocytes. Physiologie [q-bio.TO]. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2019. Français. NNT : 2019TOU30227 . tel-02936364

**HAL Id: tel-02936364**

**<https://theses.hal.science/tel-02936364>**

Submitted on 11 Sep 2020

**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

## En vue de l'obtention du DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

---

Présentée et soutenue par  
**Hélène LEMENAGER**

Le 11 décembre 2019

**Mécanismes moléculaires et cellulaires des processus de  
différenciation et de plasticité cellulaire pour la formation des  
adipocytes**

---

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **PHYSIOPATHOLOGIE**

Unité de recherche :

**STROMALAB - Cellules stromales, homéostasie, plasticité et réparation  
tissulaire**

Thèse dirigée par

**Frederic DESCHASEAUX et Jean-Christophe PAGES**

Jury

**Mme Danièle NOËL**, Rapporteur

**M. Bruno FEVE**, Rapporteur

**M. John DE VOS**, Rapporteur

**M. Christian DANI**, Examineur

**Mme Isabelle CASTAN**, Examinatrice

**M. Jean-Christophe PAGES**, Co-directeur de thèse







*À mon père,*



## REMERCIEMENTS

**Fred D.** : mentor, partenaire, chef. « fredo », « frizouille ». Je tenais à te remercier pour tout ce que tu avais fait. D'avoir cru en moi, déjà, le jour où j'ai pointé le bout de mon nez dans ce laboratoire. « Monsieur bible de la CSM ». De m'avoir donné ma chance, malgré mon innocence et mes notes moyennes. De m'avoir confié ce travail, aussi difficile fût-il de le porter. D'avoir formé ce duo. Duo de chocs. Pour le meilleur et pour le pire. À la paix comme à la guerre. Deux partenaires, deux adversaires, deux caractères. Un père parfois. Quelqu'un d'humain avant tout. Alors pour cette folle aventure à deux, pour tout ce que tu as partagé, pour ce bout de chemin vécu ensemble, pour ce que l'on s'est donné l'un l'autre, et pour tout le reste... Merci... Que le meilleur soit devant.

**Jean-Gérard D.** : le normand, le sagittaire, le troisième papa. All inclusive. Brut de décoffrage. Un mental d'acier. Un guerrier. Et quel guerrier ! Un mental exceptionnel. Admirable. Courage à toi. Merci de ton soutien dans les moments difficiles, merci de ton énergie au sens propre du terme, merci de ta philosophie de vie. La bise à la deuch.

**Nicolas E.** : Merci pour tout. Tu es quelqu'un d'exceptionnel. Le collègue parfait. Merci de ton soutien, de ton efficacité, de tes conseils (dans ma tête, longtemps ils perdureront. Les appliquer, je m'évertuerai à essayer), de ton écoute, de ta bonne humeur permanente. Merci de ta franchise, de ton honnêteté, de ta droiture. Bravo pour ton mental. Une belle rencontre. Faites-moi signe quand vous allez courir. Bonne continuation. La joie parfaite n'est autre que la joie de vivre. La vie est belle et pleine de couleurs / saveurs.

**Damien L.** : Le petit rocky devenu grand, le pote, le confident. On ne sera jamais d'accord sur tout, mais ces grandes discussions me manqueront, c'est sûr !! Merci de cet enrichissement permanent que nous apportent les gens. Merci des moments partagés qui construisent le puzzle de qui nous sommes. Merci d'avoir encaissé les coups de gueule, les coups de larmes, les coups de sang, les coups de doutes. Je te souhaite de réussir comme tu le souhaite. J'espère avoir pu t'apporter le petit bout de puzzle de mon monde étrange. Invite-moi à ta





soutenance, ceci est un ordre petit chenapan. T'y as intérêt à faire un pot de malade pour combler notre faim de loup !

**Lise R.** : D'abord rivales puis collègues, j'admire ta réussite. J'espère que la route est longue devant toi, je te souhaite de réussir encore. Toujours plus haut, toujours plus loin, toujours plus fort. Garde la passion, cette fibre qui te tiens, garde-là jusqu'au bout. Courage pour la dernière ligne droite, je sais que tu en as à revendre. On y survit, on en revient plus fort. Courage. J'espère que nos parcours professionnels se recroiseront. Merci de ton petit grain de folie qui rend les choses plus légères. A la prochaine Tipi.

**Clément dV.** : Quelle magnifique personne j'ai rencontré à STROMALab ! Ta petite blague à la Clément lors de notre première rencontre m'a permis de vite cerner le personnage. Et pourtant non. L'habit ne fait pas le moine ! Clément, merci pour tout. D'être qui tu es, tout simplement, et c'est déjà un grand tout ! Quelqu'un de profond. De ces adages de grand sage, de ces yeux bleus qui font exister les gens qui t'entourent, de ton caractère anarchique assumé, de ta connaissance et ta culture impressionnantes, de ta tolérance sans bornes mais bornée à la fois (faut pas pousser mémé dans les orties teh !), de ton sourire et de ta gentillesse pour tout un chacun, de ton rire, de tes blagues à la Fredouille (Fred – Clément – Loïc : le combo terrible, qu'est-ce que vous nous avez fait rigoler !), merci de donner sans bouclier. Rare sont ceux qui acceptent les autres tels qu'ils sont, mais c'est une beauté qui les rend uniques. Pour tout, Clément, merci.

**Loïc F.** : ma plus longue relation professionnelle. Et c'est pas un cadeau. Ca va je rigole, c'est ma thèse. Quelques années passées ensemble en tout cas. Un frère de thèse. Un bon partenaire de galères. Merci d'avoir été aussi chouette. Continue sans relâche jusqu'à obtenir ce que tu veux. Mais profite quand même.

**Paul M. et Philippe K.** : Merci de votre bonne humeur permanente, merci de votre sourire pour tout le monde, en tout temps et à toute épreuve, merci de votre énergie et de votre positive-attitude sans failles. Bon mental. Au plaisir de vous revoir. Vive le sport. Paul, stp, promets-moi de ne pas me soigner à la Paul si je me blesse un jour.



**Adèle A. :** Adèle, chère Adèle, le rayon de soleil qui illumine nos vies, ton incandescence nous irradie de bonheur dans la pénombre placide de notre quotidien, blablabla... Attends les remerciements de Dams pour ça. La petite bomba Latina à la joie de vivre débordante. Toujours le sourire, toujours le rire. Merci de ta bonne humeur permanente. Courage pour ces 3 ans.

**M<sup>elle</sup> Léa Marie Alice Nathalie Da Costa Fernandes 1<sup>ère</sup> du nom siouplaît :** Ma partenaire de rangée. Merci de ta compagnie dans les moments difficiles. Merci de nos regards consensuels face au grain de folie des gens. Merci de ta douceur. Ta thèse est primordiale. Courage à toi. Un immense merci pour ton mac et ton aide !!

**Sophie B. :** Une belle amie. Merci de ta gentillesse, de ta simplicité, de ton humanité, de ton soutien, de ton écoute, de ta compréhension, de ton partage, et tant d'autres ! Une belle rencontre, certes tardive, mais les instants les plus fugaces peuvent être les plus importants. Merci d'être qui tu es. Crois en toi, tu es une très belle personne. Au plaisir de te retrouver en dehors et de partager de beaux moments. Tout est possible à celui qui rêve, ose, travaille et n'abandonne jamais.

**Isabelle A. :** Merci de m'avoir donné la chance d'être à STROMALab. Merci de ton soutien tout du long de cette thèse.

**Valérie P. :** Merci pour tous ces runnings partagés, dans le vent, dans le froid, sous la chaleur. On n'a jamais abandonné ! Bravo. Un esprit sain dans un corps sain. Merci de ta disponibilité, de ta gentillesse, de ton écoute, de ton investissement, de ton côté punchy, tu gères... grave !

**Audrey C. :** Merci de ta gentillesse, de ton soutien, de ta connaissance, de ta science.

**Cécile D. et Anne L. :** Merci de votre aide et de votre expérience. Merci de m'avoir permis de donner des cours à l'université. Expérience très enrichissante ! Merci.

**Mélanie G. :** Merci de ta gentillesse, de ton sourire. Ma partenaire de DADEM et d'EGM2. Merci de ton soutien. Toujours disponible pour donner des réponses aux questions des étudiants.



**Virginie G.** : Grande sœur de thèse. Merci de tes conseils et de tes retours d'expérience. Merci des moments de partage et de rigolade. Tu n'as pas eu besoin de réjouir avec nous, c'était un réel plaisir de partager ce bureau avec toi. Bravo pour ce que tu as entrepris. Je te souhaite un bel horizon.

**Marielle O.** : Merci de ta compagnie pendant les « vacances » de Noël et au sein du bureau des jeunes. Ton sourire communicatif et ta passion nous donnent confiance en l'avenir de la recherche. Tu es un moteur. Bravo pour ton parcours. Merci de tes conseils.

**Jenny P.** : Merci de ta gentillesse et de ton aide.

**Bettina C.** : Merci de m'avoir mis le pied à l'étrier dans le monde de la recherche. Sans toi, je ne serais pas là où je suis aujourd'hui. Merci de m'avoir ouvert la porte sans hésitation. Merci de cet élan, de cette opportunité, de ce projet. Merci de ta gentillesse.

**Elodie G.** : Pour ton sourire permanent et ta bonne humeur, merci. Bonne route avec la petite.

**Laurence V.** : Merci de tes conseils et de ta compréhension.

**Mireille A.** : Ma partenaire de bureau intergénérationnelle. Merci de ces discussions enrichissantes. Ne me parle plus de grossesse stp.

**Mathieu L.** : Merci de ton conseil, c'est en partie grâce à toi que j'ai eu mon concours de l'école doctorale et la possibilité de faire cette thèse. Bonne continuation.

**Christophe G.** : Merci pour le poulet !!!! Bravo pour la Laponie. Merci de ta bonne humeur et de ton professionnalisme. Vive les Husky.

**Audrey V.** : Merci de ton professionnalisme parfait. Merci de ton investissement.

**Marie-Laure R.** : Merci de ton implication, de ton investissement, de ton intégrité et de l'envie de faire bouger le monde. Team sagittaires.



**Coralie S.** : Ton franc-parler, ton savoir incommensurable, ton audace, ton honnêteté, ta science, et tout le reste font de toi une collègue unique et précieuse. Merci d'être qui tu es. Ta pierre permet d'enjoliver le monde de la recherche. Merci.

**Élisabeth J.** : Ma copine de la team vulgarisation. Merci de ces moments partagés, de ton investissement, de ta gentillesse, sans oublier ce super sourire !

**Béatrice C.** : Merci de ta rigueur et de ton soutien.

**Nicolas G.** : Courage, accroche-toi, tu vas y arriver. Merci de ton humanité.

**David B.** : Courage à toi aussi, dernière ligne droite forever.

**Yannick J.** : Merci de ton savoir et de ta disponibilité. Ta gentillesse est précieuse.

MERCI à mes ami(e)s pour TOUT. Merci de m'avoir portée et supportée ces derniers mois. Merci pour TOUT ce que l'on partage ensemble. Merci pour TOUT ce que l'on vit ensemble. Ma famille de cœur.

**Elodie P.** : Ma sœur de cœur. Tant d'années d'amitié. Opposées mais tellement de choses à partager ! N'oublie pas, le bonheur réside en l'équilibre parfait entre la raison, la passion et le plaisir. Merci d'avoir toujours été là. Merci pour TOUT. Ma sœur de cœur. Je serais toujours là pour toi. Merci pour TOUT, vraiment TOUT, merci.

**Anthony D.** : Bientôt 10 ans de relation. Le temps passe et les instants se ressemblent mais ne se rident pas. Souvenirs impénétrables. Moments uniques. D'un clair de lune, du bruit de l'eau, des lumières de la ville, des grands rêves, du silence, de la chaleur, du respect, de l'humanité, du cœur. Parce qu'on ne le dit pas assez... merci. Bisous à la 4L.

**Béatrice P., Clara R., Anne-Eléonore O.** : Les 3 mousquetaires. On sera mamies ensemble les filles. Merci de cette amitié qui tient malgré le temps, la distance, les aléas, les différences. Les relations deviennent ce que nous en faisons. Merci de ces différences complémentaires. Merci de cette ouverture. Girls power.

**Aline P.** : J'apprécie tous les moments que l'on passe ensemble. Ma rêveuse. Je te souhaite de trouver ton prince basané sur son beau cheval blanc.





À toutes les belles personnes que j'ai rencontrées ces deux dernières années, et parce qu'il a fallu me supporter, MERCI. Pour tous ces moments partagés. Pour ces petits bouts de vie. Pour ces émotions. Pour la vie.

**Teddy C.** : Merci pour tout. Comme une croisée des chemins entre passé et futur. Tu sais la place que tu as dans mon cœur. Mon ami, les relations ne sont pas qu'éphémères. Merci pour qui tu es et pour ces moments partagés. Je ne t'apprends rien.

**Farouk B.** : Cette relation, ces moments, cette histoire. Toi. Deux mondes. Ce tout. Merci du fond du cœur, sans muraille. Linou.

**Régis C.** : Merci pour cette belle aventure Redge ! On recommence quand tu veux. À fond la forme.

**Guim K.** : Pour ces moments partagés, pour cette humanité, pour cette amitié, merci. Vive le GUBU ! La bise à Dupont !

**Jérémy B.** : Humilité et bonté de cœur, merci.

**Lucas G.** : Pour ces moments partagés, pour ces grandes discussions, pour ton honnêteté, pour ta sensibilité, merci. Porte-toi bien. Je te souhaite un bel horizon.

**Hugo P. et Damien R.** : On recommence quand vous voulez.

Merci à **Jean-Christophe Pagès** pour son encadrement. Merci à **Louis Casteilla** pour son génie. Merci aux membres de mon comité de thèse **Victorine Douin** et **Philippe Bourin** d'avoir contribué à ce travail. Merci à **Abderrahim Naji** pour son aide et son précieux soutien, au plaisir de retravailler ensemble. Merci à **Christian Dani** pour les hMADs et d'avoir accepté de juger ce travail. Merci à mes rapporteurs **Danièle Noël**, **Bruno fève** et **John De Vos** d'avoir évalué ce travail. Merci également à **Isabelle Castan** de juger cette thèse. Merci à **STROMALab**.

Merci aux copines du cheval. Merci aux potes de l'escalade. Merci aux potes de la nuit. Merci à mes anciens professeurs qui m'ont formée jusqu'ici. À tous, et à tous les autres... MERCI.

**Marc** : On est les derniers vikings mon frère, alors dans cet infini...

MERCI.



## **RÉSUMÉ VULGARISÉ (VERSION FRANÇAISE)**

Une partie de l'énergie issue de notre alimentation est stockée sous forme d'acides gras par les adipocytes blancs du tissu adipeux (TA) blanc. Ces acides gras peuvent être redistribués comme source d'énergie aux autres organes en dehors des repas ou lors d'un exercice physique. D'autre part, les adipocytes bruns du TA brun ont une grande capacité à consommer les acides gras. Cependant, il a été observé que la quantité de ce tissu diminue avec l'âge ou en cas d'obésité. Récemment, il a été décrit des adipocytes de type brun localisés dans le TA blanc, on les appelle adipocytes beiges. Ces derniers sont issus de deux origines : de la différenciation des cellules souches du TA (ASC) et/ou de la conversion directe des adipocytes blancs en beiges. Le but de la thèse a été de caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans l'obtention d'adipocytes beiges et bruns par des techniques innovantes de culture d'ASC humaines et en utilisant un modèle de souris.

---

## **POPULARIZED ABSTRACT (ENGLISH VERSION)**

Part of diet's energy is stored as fatty acids within white adipocytes constituting white adipose tissue (AT). These fatty acids could be redistributed as energy source to other organs between meals or during physical exercise. Brown adipocytes forming brown AT have the ability to highly consume these fatty acids. Of note, the amount of brown AT decreases drastically with aging or in obese patients. Recently, brown-like adipocytes located in white AT have been described and named beige adipocytes. This latter type of cell arises from two origins: by differentiation of AT stem cells (ASC) and/or from direct conversion of white-to-beige adipocytes. The aim of the thesis was to characterize the molecular mechanisms needed for obtaining beige and brown adipocytes by innovative techniques of culture of human ASC and by studying a mice model.



## RÉSUMÉ (VERSION FRANÇAISE)

Les adipocytes sont les unités fonctionnelles du tissu adipeux (TA). Les adipocytes blancs du TA blanc assurent le stockage et la libération de l'énergie au sein de l'organisme, principalement sous forme d'acides gras. A l'opposé, les adipocytes bruns du TA brun ont une grande capacité à consommer les acides gras par l'activité de la protéine Uncoupling Protein 1 (UCP1). Enfin, il a été observé des adipocytes UCP1<sup>+</sup> dans le TA blanc, notamment en réponse à une exposition au froid. Ces adipocytes sont appelés adipocytes beiges et sont issus de deux processus : d'une part via l'adipogenèse à partir des cellules souches/stromales mésenchymateuses du TA (ASC), et d'autre part par la conversion des adipocytes blancs en beiges. Ce processus de conversion est réversible, ce qui montre le caractère très plastique de ces cellules. Le but de la thèse a été de caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans les processus d'adipogenèse et de plasticité cellulaire. Pour ce faire, nous avons utilisé des modèles innovants de culture d'ASC humaines et réalisé des expériences *in vivo* chez la souris.

Compte tenu de la localisation péri-vasculaire et péricytaire des ASC *in vivo*, nous nous sommes intéressés à l'utilisation du milieu *Endothelial Growth Medium 2* (EGM2) pour leur expansion *in vitro*, comme une alternative aux méthodes de culture Standard (milieu de type Eagle's medium supplémenté en sérum de veau foetal). Nos travaux ont montré que le TGFβ1 contenu dans le sérum de culture altérait le caractère immature des ASC par leur engagement dans des voies de différenciation de type ostéoblastique, chondroblastique et vasculaire musculaire lisse. Aussi, grâce à sa faible quantité en sérum, et donc en TGFβ1, le milieu EGM2 permet de conserver l'immaturité des ASC en culture ainsi que leurs fortes capacités à se différencier en adipocytes, notamment vers le phénotype beige.

D'autre part, nous montrons que les ASC qui présentaient un fort potentiel à générer des adipocytes beiges sur-exprimaient la protéine SOX2. Nos résultats montrent que l'expression de SOX2 est positivement corrélée d'une part à la formation des adipocytes beiges et d'autre part à l'activation des adipocytes bruns *in vivo* chez la souris exposée au froid. De plus, une étude réalisée *in vitro* chez l'humain par l'utilisation de deux modèles d'ASC, a révélé que la protéine SOX2 était surexprimée lors du processus d'adipogenèse, et ce d'autant plus lorsque les cellules étaient orientées vers une différenciation adipocytaire beige. Ainsi, SOX2 semble être un facteur clé impliqué dans le potentiel de brunissement du TA et la plasticité des adipocytes *in vivo* et *in vitro*.

Cette thèse a donc permis d'une part d'améliorer la compréhension de l'impact des conditions de culture sur la biologie des ASC et d'autre part de mettre en lumière des molécules impliquées dans la plasticité des adipocytes.



## ABSTRACT (ENGLISH VERSION)

Adipocytes are the functional units of adipose tissue (AT). Within white AT, white adipocytes contribute to both storage and release of energy within the organism, mainly in the form of fatty acids. On the other hand, brown adipocytes, from brown AT, have a high capacity to consume fatty acids. This results from the activity of the UnCoupling Protein 1 (UCP1). Finally, UCP1<sup>+</sup> adipocytes have been described in white AT, notably in response to cold exposure. These adipocytes are named beige adipocytes and are generated through two pathways: on one hand via adipogenesis from adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells (ASC), and on the other hand by conversion of white-to-beige adipocytes. Being a reversible process, beige conversion highlights the plasticity of these cells. The aim of the thesis was to characterize the molecular mechanisms involved in both processes, by using culture models of human ASC and *in vivo* mice models.

Given the perivascular and pericyte localization of ASC *in vivo*, we investigated the use of *Endothelial Growth Medium 2* (EGM2) for their *in vitro* expansion as an alternative to Standard culture conditions (Eagle's medium supplemented with fetal calf serum). Our results showed that the TGFβ1 contained in serum of culture medium altered the relative immature state of ASC. Indeed, TGFβ1 induces their commitment toward osteoblastic, chondroblastic or vascular smooth muscle lineage. Also, the small amount of serum in EGM2 medium, and thus low TGFβ1 concentration, preserves ASC immaturity in culture, as well as their strong capacities to differentiate into adipocytes, including beige phenotype.

We showed that ASC with high potential to generate beige adipocytes over-expressed SOX2 protein. Our results also showed that expression of SOX2 was positively correlated to both formation of beige adipocytes and to brown adipocytes activation *in vivo* in cold-exposed mice. In addition, using two types of human ASC models *in vitro*, we observed that SOX2 was overexpressed during adipogenesis, and even more when cells were differentiated into beige adipocytes. Thus, SOX2 appears to be a key factor involved in AT browning potential and adipocyte plasticity *in vivo* and *in vitro*.

This thesis has allowed the access to a better understanding of the impact of culture conditions on the biology of ASC and highlighted molecules involved in the plasticity of adipocytes.





## PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

### Publications :

**Hélène Leménager**, Loïc M.A. Fiévet, Fabien Guilloton, Abderrahim Naji, Benoît Chaput, Narufumi Suganuma, Jean-Christophe Pagès, Luc Sensebé, Audrey Carrière, Louis Casteilla, Frédéric Deschaseaux. Cell immaturity and white/beige adipocyte-potential of primary human adipose-derived stromal cells are restrained by culture-medium TGF $\beta$ 1. *Article en cours de soumission à Stem cells.*

Muller, S., Ader, I., Creff, J., **Leménager, H.**, Achard, P., Casteilla, L., Sensebé, L., Carrière, A., and Deschaseaux, F. (2019). Human adipose stromal-vascular fraction self-organizes to form vascularized adipose tissue in 3D cultures. *Sci. Rep.* 9, 7250.

### Communications posters :

- FHU IMPACT 2018 : Prix du jury
- ESOF 2018
- AFEROs 2017 et 2018
- Journées de l'école Doctorale BSB 2017



# SOMMAIRE

<b>CONTEXTE SCIENTIFIQUE</b> .....	<b>1</b>
<b>INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>3</b>
<b>CHAPITRE 1 : LE TISSU ADIPEUX :</b> .....	<b>4</b>
1. FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES DU TA :	4
a. Fonctions métaboliques .....	5
<i>i. Synthèse et stockage des graisses</i> .....	5
<i>ii. Libération des graisses : lipolyse</i> .....	6
b. Protection mécanique .....	8
c. Isolation thermique.....	9
d. Fonction endocrine .....	9
e. Production de chaleur .....	10
<i>i. Les TA thermogéniques</i> .....	11
<i>ii. La production de chaleur par thermogénèse sans frissons</i> .....	13
2. PATHOLOGIES LIÉES AU TA.....	16
a. Obésité et maladies associées à l'obésité .....	16
<i>i. Causes</i> .....	16
<i>ii. Conséquences : maladies associées à l'obésité</i> .....	17
<i>iii. Mécanismes</i> .....	17
b. Lipodystrophies.....	18
3. LES TA CHEZ LA SOURIS .....	18
4. LES AUTRES CONSTITUANTS CELLULAIRES DU TA :	19
<b>CHAPITRE 2 : L'ADIPOGENÈSE :</b> .....	<b>23</b>
1. LES CELLULES SOUCHES : GÉNÉRALITÉS .....	23
2. LES CSM DU TA - LES ASC :.....	26
3. DE L'ASC À L'ADIPOCYTE MATURE : .....	28
4. AUTRES MODÈLES DE CELLULES SOUCHES ADIPOGÉNIQUES :.....	31
<b>CHAPITRE 3 : LA PLASTICITÉ</b> .....	<b>33</b>
1. LA PLASTICITÉ DU TA CHEZ L'ADULTE .....	33
a. La plasticité du TA .....	33
<i>i. Variations de la balance énergétique</i> .....	33
<i>ii. Thermogénèse</i> .....	34
b. La plasticité des adipocytes .....	35
<i>i. Froid / Chaud</i> .....	35
<i>ii. Stress métabolique : le lactate</i> .....	35
<i>iii. La lactation</i> .....	36
c. Autres processus de plasticité cellulaire du TA :.....	37
2. TRANSFORMING GROWTH FACTOR B :.....	39
a. Superfamille des TGFβ.....	39
b. Signalisation des voies TGFβ .....	40



i. Récepteurs .....	40
ii. Voie canonique via les SMADs.....	41
iii. Voies non canoniques.....	41
c. TGFβ1.....	42
d. Fonctions .....	43
3. SRY-RELATED HMG-BOX .....	43
a. Classe des protéines SOX.....	44
b. Facteurs pionniers et destin cellulaire.....	44
c. Facteurs pionniers et reprogrammation cellulaire .....	45
d. SOX2 .....	46
<b>OBJECTIFS SCIENTIFIQUES DE LA THÈSE.....</b>	<b>48</b>
<b>RÉSULTATS .....</b>	<b>50</b>
<b>CHAPITRE 1 : TGFβ1, RÉGULATEUR DU DEVENIR DES ASC. ....</b>	<b>51</b>
<b>CHAPITRE 2 : SOX2 ET ADIPOGENÈSE.....</b>	<b>52</b>
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>60</b>
1. IDENTIFICATION DES CSM : .....	61
2. RÉGULATIONS EXTRACELLULAIRES DU DEVENIR DES CSM : .....	65
3. LA TRANSDUCTION DES SIGNAUX EXTRACELLULAIRES : .....	68
4. RÔLE DE SOX2 DANS LES ADIPOCYTES :.....	70
5. MAÎTRISER LE DEVENIR DES CSM : .....	77
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>79</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>103</b>



## LISTE DES SIGLES ET ACRONYMES

Mots		Molécules	
<sup>18</sup> F-FDG	<sup>18</sup> F-FluoroDesoxyGlucose	αSMA	Smooth Muscle Actin α
PET-Scan	Tomographie à Émission de Positrons-Scan	ALK	Anaplastic Lymphoma Kinase
ASC	Adipose-derived Stromal Cells	ATGL	Adipose TriGlycéride Lipase
BM-MSC	Bone Marrow-derived Mesenchymal Stromal Cells	ATP	Adenosine Tri Phosphate
ChIP	Chromatin Immunoprecipitation assay	BMP	Bone Morphogenetic Protein
CSH	Cellules Souches Hématopoïétiques	CD	Cluster of Differentiation
CSM	Cellules Souches/stromales Mésenchymateuses	C/EBP	CCAAT/Enhancer-Binding Protein
EGM2	Endothelial cell Growth Medium 2	CTGF	Connective Tissue Growth Factor
ES	cellules Souches Embryonnaires	DKK	Dickkopf
hMADs	human Multipotent Adipose-derived Stem Cells	DPP4	Dipeptidyl peptidase-4
IMC	Indice de Masse Corporelle	EBF2	Early B Factor 2
iPS	induced-Pluripotent Stem Cells	FABP	Fatty Acids Binding Protein
ISCT	International Society for Cell Therapy	HMG	High-Mobility Group
MEC	Matrice ExtraCellulaire	HSL	Hormono-Sensible Lipase
MEM	Minimum Essential Medium	IBMX	IsoButylMethylXanthine
NSLA	Non Segmentable Lobule Area	ICAM-1	Inter Cellular Adhesion Molecule 1
SLA	Segmentable Lobule Area	KLF4	Kruppel-like factor 4
TA	Tissu Adipeux	LAP	Latency-Associated Peptide
VML	Vasculaire Musculaire Lisse	LTBP	Latent-Binding Protein
		MMP	Matrix MetalloProteases
		MSCA1	Mesenchymal Stromal Cell Antigen-1
		MYH11	Myosin Heavy Chain 11
		NPC2	Nieman-Pick Type C2
		OCT	Octamer-binding transcription factor
		PGC1α	Peroxisome proliferator activated receptor Gamma Coactivator 1 alpha
		PKA	Protein Kinase A
		PPARγ	Peroxisome Proliferator-Activated receptor-γ
		PRDM16	PR Domain Containing 16
		SLC	Solute Carrier
		SMAD	Small Mothers Against Decapentaplegic homolog
		SOX	SRY-related HMG-Box
		SOX2OT	SOX2 Overlapping Transcript
		TAG	TriAcylGlycérols
		TGFβ1	Transforming Growth Factor β1
		UCP	UnCoupling Protein
		Wnt	Wingless
		YAP	Yes-Associated Protein





# LISTE DES ILLUSTRATIONS

- Figure 1 : Constituants du TA
- Figure 2 : Métabolisme des lipides au sein des adipocytes
- Figure 4 : Explant de lobule de dermolipectomie abdominale humaine
- Figure 3 : Analyse morphologique des adipocytes blancs
- Figure 5 : Localisations du TA chez l'humain
- Table 1 : Liste non exhaustive des facteurs sécrétés par le TA
- Figure 6 : Localisations du TA brun chez l'humain
- Figure 7 : Analyse morphologique des adipocytes bruns
- Figure 8 : Différents types d'adipocytes
- Figure 9 : Activation de la thermogenèse dans les adipocytes beiges et bruns par les catécholamines et les peptides natriurétiques
- Figure 10 : Mécanismes moléculaires de la thermogenèse de non frissons
- Figure 11 : Différents cas de lipodystrophies acquises ou congénitales
- Figure 12 : Localisation des TA chez la souris
- Figure 13 : Programmes de différenciations adipocytaire blanche, beige et brune
- Figure 14 : Facteurs régulateurs de l'adipogenèse
- Figure 15 : Régulation transcriptionnelle de la différenciation et de l'activité des adipocytes bruns
- Figure 16 : Évolution histologique de la glande mammaire murine lors de la lactation
- Évolution histologique de la glande mammaire murine lors de la lactation
- Figure 17 : Lignage VML
- Figure 18 : Photo d'un lipo-fibroblaste ou fibro-adipocyte
- Figure 19 : Signalisation canonique de la superfamille du TGF $\beta$
- Figure 20 : Voies non canoniques de signalisation du TGF $\beta$ 1
- Figure 21 : Production, maturation et sécrétion du TGF $\beta$ 1
- Figure 22 : Famille des facteurs pionniers SOX
- Figure 23 : Régulations moléculaires du devenir des CSM



# **CONTEXTE SCIENTIFIQUE**

---



Les cellules souches/stromales mésenchymateuses (CSM) ont la capacité de se différencier selon des phénotypes variés, ces différents types cellulaires contribuant à l'homéostasie et à la régénération tissulaires. Aussi, cette capacité de différenciation ouvre-t-elle de grands espoirs en médecine régénératrice et en ingénierie biologique de reconstruction tissulaire<sup>1</sup>. Par ailleurs, les propriétés immunomodulatrices des CSM augmentent l'intérêt porté à ces cellules pour les thérapies visant les maladies inflammatoires.

Les CSM sont utilisées aujourd'hui dans pratiquement 50% des essais thérapeutiques de thérapie cellulaire<sup>2</sup>. Du fait de leur description originelle au sein de la moelle osseuse, les CSM issues de la moelle osseuse sont les plus utilisées en clinique (40% des essais cliniques<sup>1</sup>), suivies par les CSM dérivées de cordon ombilical (30%) et des CSM issues d'autres origines (20%). Les CSM dérivées de tissu adipeux (TA) ne représentent actuellement que 10% des cellules utilisées dans les essais thérapeutiques de CSM. Or, du fait de d'une obtention moins invasive qu'un prélèvement médullaire par exemple, de la possibilité d'une utilisation par transfert autologue ou allogénique, et des rendements de collecte importants, les CSM dérivées de TA suscitent un intérêt croissant pour leur utilisation clinique.

Les exigences pharmaceutiques nécessitent de caractériser précisément les cellules thérapeutiques, tant sur le plan du phénotype que d'en maîtriser l'état de différenciation. Par ailleurs, les CSM dérivées de TA ont de bonnes capacités de différenciation dans les différentes formes d'adipocytes<sup>3</sup>, qui sont des cellules dont la fonctionnalité au sein du TA dépasse le simple stockage lipidique. Ceci confère un intérêt supplémentaire à ce type de CSM, afin de développer des approches thérapeutiques contre les maladies du TA telles que l'obésité et les lipodystrophies. La maîtrise du devenir des CSM nécessite de caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans les processus de différenciation et de plasticité cellulaire.

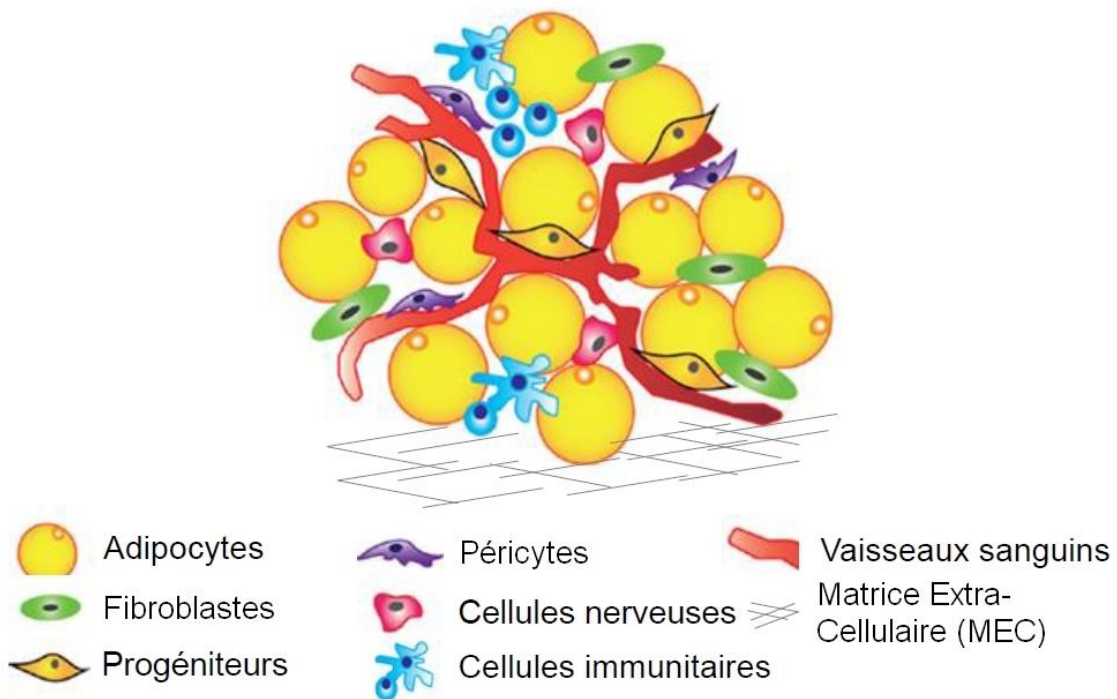


# **INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE**

---



**Figure 1 : Constituants du TA**



Le TA représenté ici est le TA blanc car les adipocytes blancs qui le composent ont une unique grande vacuole lipidique qui occupe la majeure partie de la cellule. Les adipocytes blancs sont le type d'adipocytes le plus abondant à l'échelle de l'organisme. Tous les TA sont innervés et irrigués, mais le TA brun l'est davantage, ce qui lui confère d'une part une capacité de réponse aux stimuli du système nerveux et d'autre part de propager la chaleur qu'il produit à l'ensemble de l'organisme.

*Adapté de : Shukla L, Morrison WA, Shayan R. Adipose-Derived Stem Cells in Radiotherapy Injury: A New Frontier. Front Surg 2, 1-12 (2015).*

## **Chapitre 1 : Le tissu adipeux :**

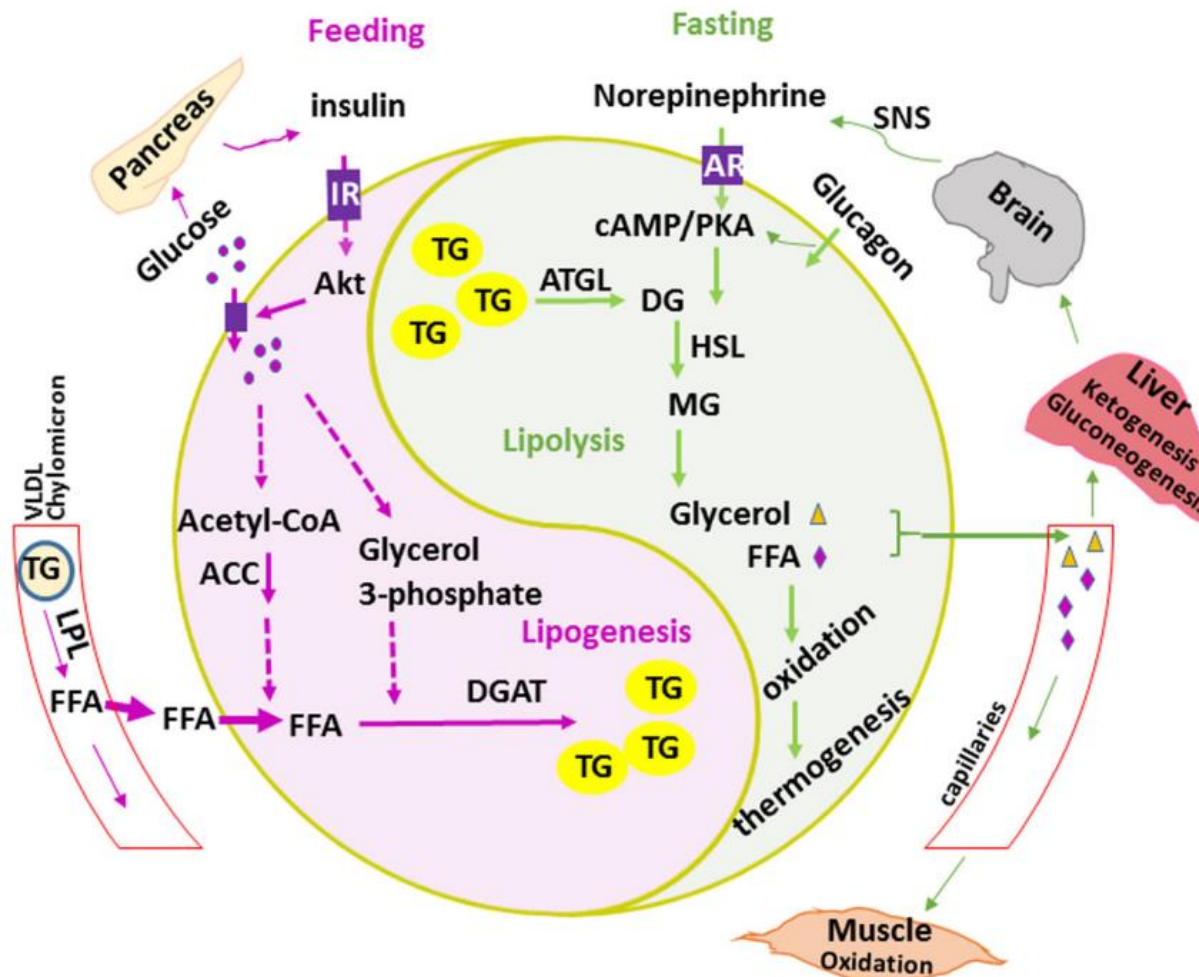
Le tissu adipeux (TA) se développe chez le fœtus à partir de la 14<sup>ème</sup> semaine de grossesse<sup>4</sup>. C'est un tissu conjonctif lâche riche en cellules de stockage des graisses qui représente 20 à 30% de la masse totale du corps humain adulte. Ce chiffre varie en fonction du genre, de l'âge, de l'hygiène de vie et des pathologies qui peuvent toucher les individus<sup>5</sup>. Il est constitué majoritairement d'adipocytes qui assurent la fonction du tissu (voir figure 1). D'autres types cellulaires composant le TA contribuent au support de cette fonction, les cellules : endothéliales, nerveuses, péricytaire, immunitaires, souches et progénitrices, ainsi que les fibroblastes qui sécrètent la matrice extracellulaire (MEC). Le TA est étudié par les pathologistes depuis plus de deux siècles. Au XVII<sup>ème</sup> siècle Malpighi décrit la structure du TA, et en 1837 le docteur David Craigie parle déjà d'inflammation du TA chez l'humain<sup>6</sup>. Les découvertes scientifiques liées au TA se découpent en 3 grandes étapes : il est dans un premier temps étudié chez l'humain, puis à partir de la découverte de la leptine chez la souris en 1950 de nombreuses études sur ce modèle animal ont permis de faire des preuves de concept, qui ont été confrontées parallèlement aux observations faites chez l'humain à partir des années 2000.

Il est en fait décrit plusieurs types de TA. On les distingue selon leur localisation, leur fonction et leur morphologie. Leur couleur est littéralement différente car leur contenu en mitochondries leur donne une teinte plus ou moins colorée. Les deux principaux TA décrits chez les mammifères sont le TA blanc et le TA brun, mais il existe d'autres TA aux couleurs intermédiaires.

### **1. Fonctions physiologiques du TA :**

Grâce aux adipocytes qui le composent, le TA assure différentes fonctions majeures au sein de l'organisme. Toutefois, la fonction principale des adipocytes est la gestion des substrats énergétiques, principalement les acides gras et les sucres<sup>7</sup>. Les adipocytes ont une forte capacité à stocker les substrats énergétiques, à libérer des métabolites dérivés des acides gras dans la circulation sanguine, ou à oxyder les acides gras.

Figure 2 : Métabolisme des lipides au sein des adipocytes



Lors des repas (feeding ; rose), les cellules  $\beta$  du pancréas sécrètent de l'insuline dans la circulation sanguine. L'insuline est une hormone hypoglycémisante qui favorise l'entrée du glucose et des acides gras non estérifiés (FFA) au sein des adipocytes. Par le processus de glycolyse, le glucose est catabolisé en glycérol-3-phosphate. Ce dernier est estérifié par des enzymes, dont la diacylglycérol acyl transférase (DGAT), pour former des triacylglycérols (TG). Les TG sont stockés au sein de vacuoles lipidiques et servent de réserves énergétiques. En dehors des repas, la lipolyse permet la libération du glycérol et des FFA dans la circulation sanguine pour leur utilisation comme substrats énergétiques par d'autres organes. AR : Adrenergic Receptor ; ATGL : Adipose Triglyceride Lipase ; cAMP : cyclic adenosine monophosphate ; DG : DiacylGlycerol ; HSL : Hormono-Sensible Lipase ; IR : Insulin Receptor ; LPL : LipoProtein Lipase ; MG : MonoacylGlycerol ; PKA : Protein Kinase A ; SNS : Sympathetic Nervous System ; VLDL : Very Low Density Lipoprotein.

Source : Luo L and Liu M. Adipose tissue in control of metabolism. *Journal of Endocrinology* **231**, 77-99 (2016).

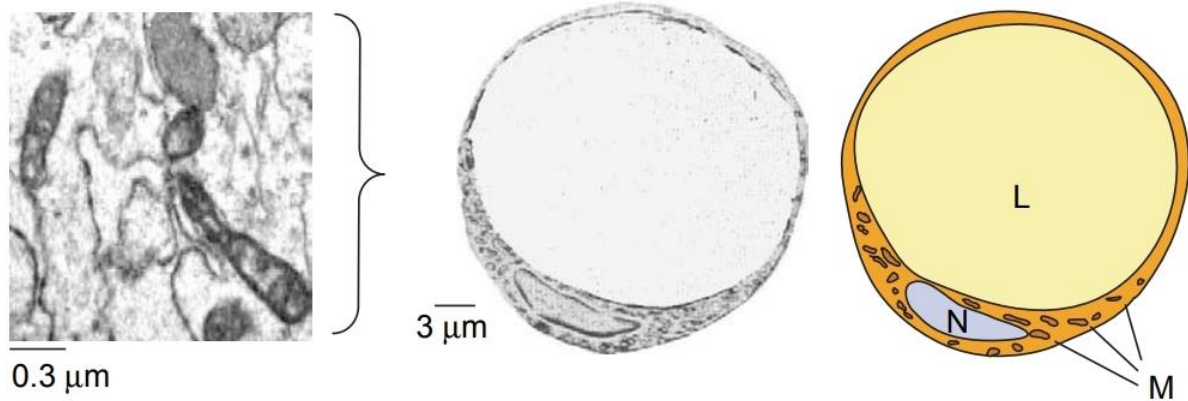
## a. Fonctions métaboliques

Les fonctions métaboliques sont assurées majoritairement par le TA blanc et ne sont pas restreintes au stockage des acides gras comme on le pensait jusque dans les années 1940<sup>8</sup>. La libération des acides gras dans la circulation sanguine en réponse à des signaux de l'organisme assure l'approvisionnement des autres organes en substrats énergétiques (voir figure 2). Le TA blanc est majoritairement constitué d'adipocytes blancs qui assurent ces fonctions. Ils contiennent une unique vacuole lipidique qui occupe la majeure partie de la cellule, et ils ne contiennent que peu de mitochondries, contrairement aux adipocytes bruns et beiges. Il n'y a pas de marqueur spécifique des adipocytes blancs car la majorité de leurs fonctions sont communes à tous les types d'adipocytes. Même si certains marqueurs ont été proposés, notamment chez la souris, ils restent débattus. On retrouve notamment Tcf21, HoxC8, HoxC9, Agt et Slc16a12<sup>9,10</sup>.

### i. Synthèse et stockage des graisses

Les lipides issus du bol alimentaire sont transportés dans le sang sous forme de triacylglycérols (TAG) (3 acides gras et 1 glycérol) et de cholestérol estérifié ou non au sein de lipoprotéines appelées chylomicrons. Les TAG sont hydrolysés par la lipoprotéine lipase localisée à la surface de l'endothélium des capillaires du TA et des muscles. Les acides gras non estérifiés libérés pénètrent dans les adipocytes soit de manière passive du fait de leurs propriétés lipophiles, soit de manière active via des récepteurs tels que le *Cluster of Differentiation* (CD) 36 ou les *Fatty Acid Transport Protein*<sup>11</sup>. L'insuline favorise ce transport en induisant la transcription des gènes codant ces transporteurs et en favorisant leur translocation membranaire. L'insuline est une hormone hypoglycémiante sécrétée par les cellules  $\beta$  du pancréas en réponse à une augmentation de la glycémie<sup>12</sup>. L'insuline favorise également l'entrée de glucose dans les adipocytes via des transporteurs spécialisés dénommés GLUT pour *GLU*cose *T*ransporters. Le glucose est catabolisé par le processus de glycolyse, et donne aussi du glycérol. La biosynthèse des TAG résulte de l'estérification successive des groupes alcool du glycérol-3-phosphate grâce à un ensemble d'enzymes liées à la membrane du réticulum endoplasmique. La lipogenèse peut se faire également *de novo* à partir de substrats non lipidiques tels que les carbohydrates, bien que ce processus ait

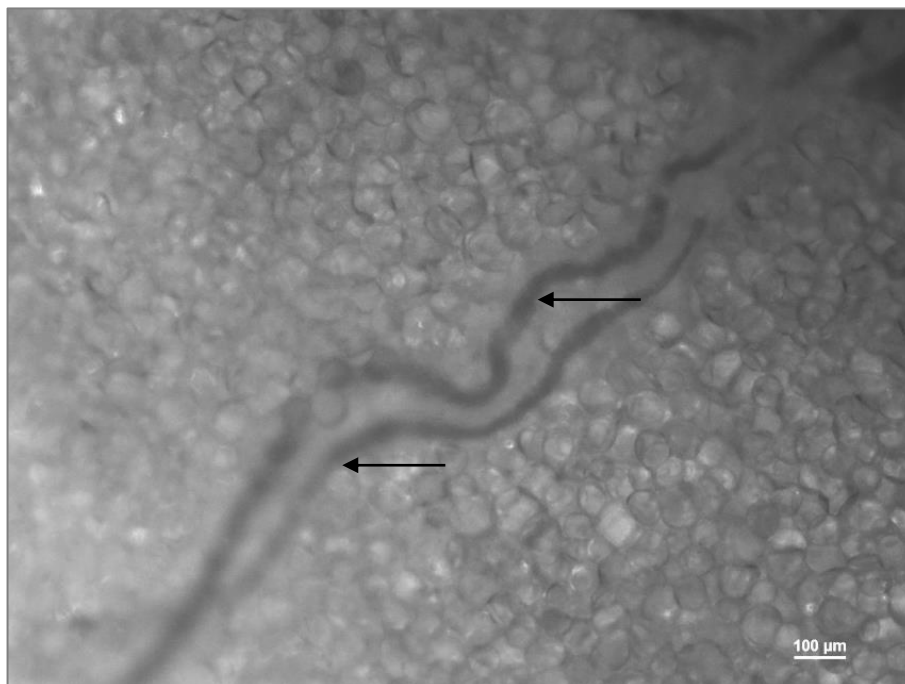
**Figure 3 : Analyse morphologique des adipocytes blancs**



Les adipocytes blancs ont une unique grande vacuole lipidique qui occupe la majorité de l'espace cellulaire. Les mitochondries des adipocytes blancs sont peu abondantes et les crêtes mitochondriales sont peu développées. Photographie par microscopie électronique à transmission et représentation schématique d'un adipocyte blanc chez la souris. N : noyau ; M : mitochondries ; L : vacuole lipidique.

*Adapté de : Villaroya F, Domingo P and Giralt M. Lipodystrophy associated with highly active anti-retroviral therapy for HIV infection: the adipocyte as a target of anti-retroviral-induced mitochondrial toxicity. TRENDS in Pharmacological Sciences (26), 88-93 (2005).*

**Figure 4 : Explant de lobule de dermolipectomie abdominale humaine**



Le TA, traversé par des capillaires sanguins (flèches), contient de nombreux adipocytes blancs reconnaissables par leur grande vacuole lipidique uniloculaire. Dissection : 5 mm<sup>3</sup> ; Barre d'échelle : 100 μm ; microscopie optique.

*Source : Hélène Leménager, STROMALab.*

lieu principalement au niveau du foie. Les TAG ainsi formés sont stockés et maintenus au sein d'une vésicule unique appelée vacuole lipidique qui occupe la plus grande partie du cytoplasme de la cellule, repoussant les organites à la périphérie cellulaire (voir figures 3 et 4).

Un adipocyte blanc peut ainsi mesurer de 25 à 200  $\mu\text{m}$  de diamètre selon l'équilibre de la balance énergétique et le flux d'acides gras<sup>13,14</sup>. La vacuole lipidique est entourée d'une fine monocouche de phospholipides et de nombreuses protéines comme la périlipine et cell-death-inducing DFFA-like effector (CIDE) C qui permettent son maintien structural et fonctionnel<sup>15</sup>. Découverte en 1991, la périlipine est localisée en périphérie de la vacuole lipidique et inhibe la lipolyse des TAG<sup>16,17</sup>. La protéine Fsp27 (ou CIDEC) permet le maintien de la structure de la gouttelette lipidique sous forme uniloculaire. En effet, une mutation de ce gène est associée à un phénotype d'adipocytes multiloculaires chez la souris<sup>18</sup> et à une lipodystrophie chez l'humain. Cette lipodystrophie est associée à une incapacité fonctionnelle du TA à stocker les graisses<sup>19</sup>. À noter que le phénotype uniloculaire des adipocytes *in vivo* n'est pas retrouvé *in vitro* dans des conditions de culture classique en deux dimensions. Toutefois, de nouveaux modèles très récents d'organoïdes ou d'explants cultivés en trois dimensions permettent de maintenir *ex vivo* des adipocytes uniloculaires comme c'est le cas *in vivo*<sup>20,21</sup>.

## ii. Libération des graisses : lipolyse

Les adipocytes ont d'autres fonctions que le stockage des graisses. En 1956, Gordon démontre chez l'homme que les acides gras peuvent être libérés du TA dans la circulation sanguine<sup>22</sup>. Effectivement, en réponse à une stimulation par des signaux de besoin énergétique de l'organisme, par exemple en période de jeûne ou lors d'un exercice physique, les réserves de TAG sont hydrolysées et libérées dans la circulation sanguine sous formes d'acides gras non estérifiés par un processus appelé lipolyse<sup>23</sup>. En réponse aux catécholamines, la périlipine est phosphorylée par la *Protein Kinase A* (PKA)<sup>17</sup>, inhibant ainsi son effet inhibiteur, et les protéines liées aux acides gras comme les *Fatty Acids Binding Protein* (FABP) favorisent l'accès des lipases aux TAG. Les TAG sont hydrolysés séquentiellement avec une libération d'acide gras libre à chaque étape : ils sont transformés en diacylglycérol par l'*Adipose Triglycéride Lipase* (ATGL)<sup>24</sup>, puis en monoacylglycérol



par la Lipase Hormono-Sensible (HSL) découverte au début des années 1960, et enfin en acide gras libre et glycérol par la *MonoGlycérine Lipase*. Ces acides gras seront ensuite utilisés par d'autres organes comme substrats énergétiques grâce à la  $\beta$ -oxydation mitochondriale<sup>25</sup>. Au contraire des acides gras à chaîne courte qui peuvent directement traverser les membranes, les acides gras à longue chaîne sont transportés dans la matrice mitochondriale par les navettes carnitine<sup>25</sup>. Les acides gras libres sont ensuite activés par l'Acyl-CoA Synthetase et sont  $\beta$ -oxydés. La  $\beta$ -oxydation des acides gras libère de l'énergie chimique d'une part sous forme de co-enzymes réduits riches en électrons à haut potentiel énergétique tels que le NADH, H<sup>+</sup> et le FADH<sub>2</sub>, qui peuvent alimenter la chaîne respiratoire mitochondriale, et d'autre part sous forme d'acétyl-CoA dont le groupe acétyle est oxydé par le cycle de Krebs (cycle de l'acide citrique) pour donner des co-enzymes réduits. L'énergie libérée par le transfert d'électrons permet la génération d'un gradient électrochimique de protons de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale. Le transfert des protons dans la matrice mitochondriale est couplé à la synthèse d'Adénosine Tri Phosphate (ATP) via l'ATP synthase. La  $\beta$ -oxydation des acides gras produit davantage d'énergie que l'oxydation du glucose du fait de la quantité supérieure d'acétyl-CoA qu'ils délivrent, et *in fine* de composés réduits qu'ils apportent à la chaîne respiratoire mitochondriale. Le rendement de l'oxydation du palmitate (à 16 carbones) par exemple, un acide gras simple, est de 129 molécules d'ATP. Comparativement, une molécule de glucose (à 6 carbones) produit 30 à 32 molécules d'ATP. Le TA est donc au centre de l'homéostasie énergétique et une altération de son fonctionnement peut avoir des conséquences dramatiques pour l'individu.



**Figure 5 : Localisations du TA chez l'humain**



Cryocoupes transversales du cadavre d'un homme (Joseph Paul Jernigan, 39 ans - à gauche) et d'une femme (Susan Potter, 87 ans - à droite). Le TA sous-cutané est de couleur blanc laiteux à la surface du corps entre le fascia musculaire et la peau et entoure certains organes internes.

*Source : "Visible Human Project" (National Library of Medicine)*

## **b. Protection mécanique**

Le TA blanc assure également un rôle de protection mécanique dans certaines régions de l'organisme exposées aux frottements et compressions (voir figure 5). On référence par exemple du TA mécano-protecteur au niveau des articulations (dépôt adipeux infrapatellaire du genou<sup>26</sup>, ...), des pieds (dépôt adipeux sous-calcanéen<sup>27</sup>, ...), des mains, des fesses, de la mâchoire<sup>28</sup>, ... Au sein de ces tissus, le TA permet la fonction de glissement ou d'amorti grâce aux graisses qu'il contient.

Parmi les TA blancs viscéraux mécano-protecteurs, le TA péri-cardique est le mieux décrit<sup>29</sup>. On y répertorie le TA épi-cardique, localisé entre le péricarde et le myocarde, le TA myocardique qui correspond à des clusters d'adipocytes infiltrés dans le myocarde, et le TA péri-coronaire qui entoure les artères coronaires. Le volume de ces dépôts adipeux est positivement corrélé à l'âge et au tour de taille. De même, il est plus important chez les hommes que les femmes, et chez les personnes de type caucasien<sup>30</sup>. On estime à 100g la masse de ce tissu chez un individu sain, et jusqu'à 900g chez un individu obèse<sup>31</sup>. De manière physiologique ce TA a un rôle de protection mécanique en réponse aux battements cardiaques et de sécrétions paracrines qui contribuent à l'homéostasie glucidique et lipidique du myocarde<sup>32</sup>. Cependant, du fait de son lien étroit avec le myocarde, un dérèglement de ce TA contribue aux pathologies cardiovasculaires associées à l'obésité : insuffisance cardiaque, athérosclérose, inflammation, fibrose, ...

Le corps adipeux de la bouche, décrit depuis 1732 par Lorenz Heister, est aussi appelé depuis 1829 « boule grasseuse de Bichat ». Ce tissu mal défini est connu pour son rôle protecteur de la bouche vis-à-vis des frottements de la mâchoire. Le contenu grasseux de ce tissu est doté d'une certaine élasticité qui lui permet d'épouser les changements de volume musculaire lors des contractions de la mâchoire. Il joue également le rôle d'amortisseur biomécanique des mouvements complexes d'élongation et de relâchement du conduit parotidien. Ceci pourrait expliquer la taille plus importante du prolongement buccal chez l'enfant, chez qui cette fonction d'amortissement a une importance capitale lors des mouvements de suctions répétées<sup>33</sup>. Cependant, la nature de ce tissu est peu décrite. Une étude a montré que ce TA aurait un phénotype brun chez le nouveau-né, puis existerait

**Table 1 : Liste non exhaustive des facteurs sécrétés par le TA**

<b>Adipokine</b>	<b>Type protéique</b>	<b>Fonction</b>	<b>Références</b>
Leptine	Hormone	Satiété et dépense énergétique	humain <sup>48,54</sup> , souris <sup>55</sup>
TNF $\alpha$	Cytokine inflammatoire	Lipolyse (et insulino-résistance)	humain <sup>53</sup> , rat <sup>56</sup>
IL-6	Cytokine inflammatoire	↑ acides gras libres circulants (et insulino-résistance)	humain <sup>53,57</sup>
Adiponectine	Adipokine	Anti-inflammatoire, dépense énergétique (et insulino-sensibilité)	humaine <sup>58,59</sup>
MCP-1	Chimiokine inflammatoire	Recrutement des monocytes et macrophages dans le tissu	souris <sup>60,61</sup>
PAI-1	Protéine	Inhibe la fibrinolyse (et insulino-résistance)	humain <sup>53</sup> , rat <sup>62</sup>
Résistine	Adipokine	↑ sécrétion TNF $\alpha$ et IL-6 (et insulino-résistance)	souris <sup>63</sup>
Apeline	Peptide	Hypoglycémiant (et insulino-sensibilité)	humain <sup>64</sup> , boeuf <sup>65</sup> , souris <sup>66</sup>
Lipoprotéine Lipase (LPL)	Enzyme	Métabolisme des lipides	souris <sup>67</sup>
Apolipoprotéine M	Apolipoprotéine	insulino-sensibilité	humain <sup>68</sup>
miRNAs	Petits ARN	Régulation de l'expression des gènes	souris <sup>69</sup>
<u>Autres exemples de facteurs sécrétés</u> : Adipsine (complement factor D), Complement factor B, Cholesterol Ester Transfer Protein (CETP), Apolipoprotein E			
<b>Batokine</b>	<b>Type protéique</b>	<b>Fonction</b>	<b>Références</b>
IL-6	Cytokine inflammatoire	↑ browning	humain <sup>46</sup> , souris <sup>70</sup>
FGF21	Facteur de croissance	↑ browning	humain <sup>71</sup>
BMP8b	Cytokine	↑ browning	humain <sup>72</sup>
CXCL14	Chimiokine	↑ polarisation macrophages M2 et browning	souris <sup>73</sup>
IL-8	Cytokine inflammatoire	↑ browning	humain <sup>46</sup>
MCP-1	Chimiokine inflammatoire	↑ browning	humain <sup>46</sup>
Adenosine	Nucléoside	↑ browning	humain <sup>74</sup>
Prostaglandine E2	Prostaglandine	↑ browning (et insulino-sensibilité)	humain <sup>75</sup>
sLR11	Récepteur	insulino-résistance	humain <sup>76</sup>
Meteorin-like	Hormone	↑ browning	humain <sup>77</sup>

selon un phénotype blanc à partir de l'enfance<sup>34</sup>. Aujourd'hui, le corps adipeux de la bouche est d'intérêt clinique pour de la greffe buccale de TA, ou de l'ingénierie tissulaire osteo-chondrale à partir des ASC qu'il contient<sup>35</sup>.

### **c. Isolation thermique**

Le TA joue aussi le rôle d'isolant thermique<sup>36</sup>. Le TA majoritairement impliqué dans cette fonction est le TA dermique, principalement localisé au niveau du follicule pileux chez l'humain<sup>37</sup>. Alors qu'il est bien délimité du TA sous-cutané chez la souris<sup>38</sup>, la distinction entre les deux types de TA chez l'humain est plus confuse car la limite musculaire y est moins claire, excepté au niveau de la nuque<sup>39</sup>. Il a été montré que des souris ayant une diminution de 75% d'épaisseur de leur TA dermique étaient plus sensibles au froid (4°C) que des souris *Wild-Type*<sup>40</sup>. Certains animaux entrent en torpeur, un état de semi-coma, mesuré par la diminution de la température corporelle, de la fréquence cardiaque et de la consommation d'oxygène. La diminution de la fonction d'isolation du TA dermique s'accompagne de la sur-activation compensatrice du TA brun (voir chapitre production de chaleur), et de la consommation des réserves de glycogène au niveau du foie. En outre ses capacités de protection thermique, ce TA participe également à la croissance du follicule pileux chez la souris<sup>41</sup>, la régénération après une blessure<sup>42</sup>, et la protection de la peau contre les infections<sup>43</sup>.

### **d. Fonction endocrine**

Depuis l'identification du gène de la leptine chez la souris en 1950<sup>44</sup> et chez l'homme en 1994<sup>45</sup> et son implication dans l'obésité, le TA est très étudié pour ses sécrétions endocrines. Le TA est effectivement un organe endocrine à part entière puisqu'il sécrète de nombreuses molécules (voir table 1). Le TA blanc sécrète des adipokines tandis que le TA brun sécrète des batokines. Ces molécules peuvent agir de manière autocrine<sup>46</sup> (action sur la cellule sécrétrice), paracrine (action sur les cellules voisines) ou endocrines (action à l'échelle de l'organisme via la circulation sanguine). L'activité endocrine du TA blanc sous-cutané a été montré vis-à-vis du cerveau, du foie, du pancréas, des reins, et des autres TA<sup>47</sup>. La leptine, du grec ancien *leptos* qui signifie fin, mince ou ténu est aussi appelée hormone de la satiété<sup>48</sup>. Sécrétée par le TA et transportée par la circulation sanguine de manière libre ou en interaction avec son récepteur protecteur ObRe, elle traverse la

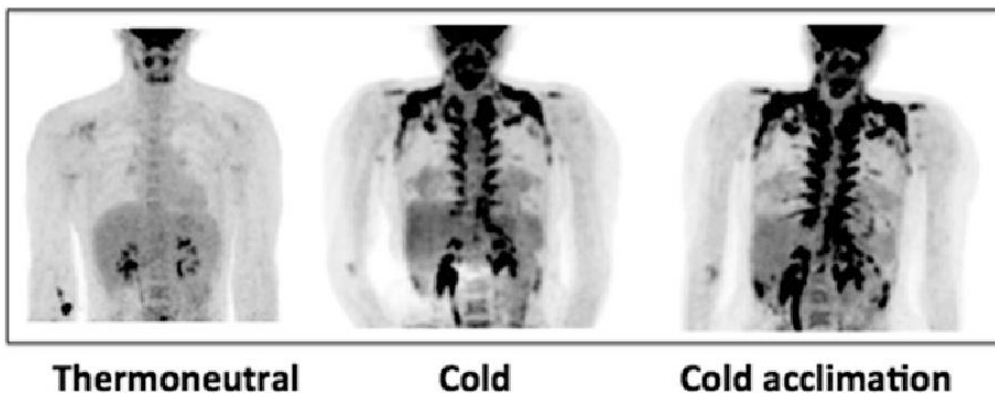


barrière hématoencéphalique et agit directement au niveau de l'hypothalamus via ses récepteurs ObRa, ObRb ou ObRc et une signalisation *Janus Kinase 2*<sup>49</sup>. La leptine active d'une part des neurones anorexigènes de type pro-opiomélanocortine pour la libération de neuropeptides de type  *$\alpha$ -Melanocyte Stimulating Hormone*, cocaïne, *Corticotropin-Releasing Hormone* et *Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript*, et inhibe d'autre part des neuropeptides orexigènes de type Neuropeptide Y, *Melanin Concentrating Hormone*, orexine et *Agouti Related Peptide*<sup>50,51</sup>. Ainsi, en agissant sur ces neurones au niveau central, la leptine agit d'une part en diminuant la prise alimentaire, et d'autre part en augmentant la sensation de satiété ainsi que la dépense énergétique globale. Cette hypothèse avait été énoncée pour la première fois par Kennedy chez le rat en 1953, sans qu'il n'identifie le facteur<sup>52</sup>. La leptine est un paramètre représentatif de la quantité de masse adipeuse, car sa sécrétion est positivement corrélée à l'hypertrophie des adipocytes (augmentation de la taille des adipocytes) chez la souris. Vers les années 90 il est décrit de nombreux autres facteurs sécrétés par le TA tels que l'adiponectine (*ADIPOQ*), l'adipsine et le *tumour necrosis factor  $\alpha$*  (TNF $\alpha$ ). Aujourd'hui on dénombre plus de 50 facteurs sécrétés. Exceptées la leptine et l'adiponectine spécifiquement sécrétées par les adipocytes, les autres facteurs sont sécrétés également par les autres cellules du TA<sup>53</sup>.

#### **e. Production de chaleur**

Les mammifères sont endothermes, c'est-à-dire qu'ils produisent leur propre chaleur, avec une régulation permettant de maintenir le milieu intérieur à environ 37-38°C, et sont en capacité de s'adapter aux variations thermiques du milieu extérieur. La thermogenèse est le processus biologique par lequel l'organisme produit de la chaleur. Elle se fait selon 2 processus : la thermogenèse de frissons par les muscles squelettiques, selon un processus biomécanique de frottements<sup>78</sup>, et la thermogenèse sans frissons par les adipocytes bruns du TA brun et les adipocytes beiges du TA blanc, selon un processus biochimique exothermique. Ces adipocytes produisent de la chaleur grâce à l'expression spécifique de la protéine découplante *UnCoupling Protein* (UCP) 1 au sein de leurs très nombreuses mitochondries. Cette dernière découple l'entrée des protons dans la matrice mitochondriale de la synthèse d'ATP, ce qui accélère de nombreuses réactions biochimiques oxydatives exothermiques. Ceci d'une part augmente la libération de

**Figure 6 : Localisations du TA brun chez l'humain**



<sup>18</sup>F-FDG-PET-SCAN chez des humains gardés à thermoneutralité (22°C ; à gauche) ou mis au froid pendant 2h (16°C ; milieu) ou pendant 10 jours à raison de 6h/jour (15-16°C ; à droite). Les zones noires correspondent à l'internalisation de glucose au sein des tissus qui en sont grand consommateurs : le cerveau, le TA brun et (le cœur, non visible ici). On détecte du TA brun au niveau cervical, supraclaviculaire, axillaire, paraspinal, médiastinal, périrénal et abdominal.

*Source : Boon MR and van Marken Lichtenbelt WD. Brown Adipose Tissue: A Human Perspective. Hand exp pharmacology 233, 301-319 (2016)*

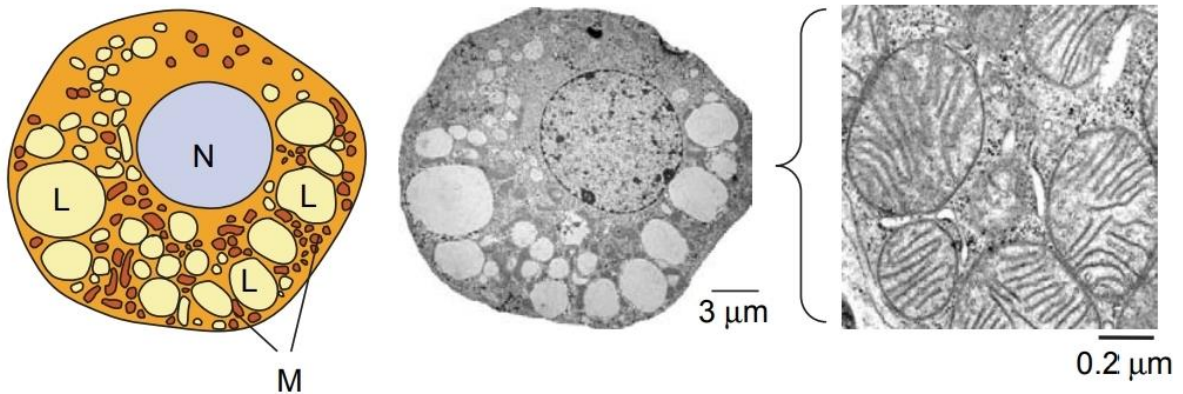
chaleur et d'autre part augmente la consommation de substrats tels que les sucres et les graisses stockés dans leurs vésicules. Le TA brun est un TA richement vascularisé, ce qui permet de propager rapidement la chaleur produite à l'échelle de l'organisme<sup>79</sup>.

### **i. Les TA thermogéniques**

Le TA brun a d'abord été décrit en tant que « glande d'hibernation » permettant de maintenir la température corporelle des animaux hibernants. Il est décrit chez l'humain dès le début du XX<sup>ème</sup> siècle comme une glande produisant de la chaleur au niveau inter-scapulaire au niveau de la nuque des nouveaux-nés et chez l'adulte<sup>80-82</sup>. De grandes quantités de ce tissu ont notamment été décrites chez des travailleurs de l'extérieur (bûcherons, peintres, charpentiers, fermiers, ...) en 1981<sup>83</sup>. Grâce à l'imagerie par <sup>18</sup>F-FluoroDesoxyGlucose Tomographie à Émission de Positrons-Scan (<sup>18</sup>F-FDG PET-Scan, glucose radiomarqué non métabolisable par la cellule), on découvre par inadvertance en 2002 que le TA brun est grand consommateur de glucose chez l'homme adulte<sup>84</sup>. Dans ce type d'imagerie, le glucose pénètre et s'accumule dans la cellule consommatrice où il émet une fluorescence qui est détectée par IRM. À cette époque, principalement utilisée pour la détection des cellules cancéreuses (grandes consommatrices de glucose), le <sup>18</sup>F-FDG-PET-SCAN révélait systématiquement un marquage symétrique au niveau supraclaviculaire : le TA brun<sup>85</sup>. Depuis, cette technique est largement utilisée pour l'étude du TA brun, bien qu'il existe une grande hétérogénéité de réglages pouvant rendre difficile la comparaison entre études différentes<sup>86</sup>. Entre 2007 et 2009 quatre études clés démontrent que le TA brun est actif et hétérogène chez l'humain et qu'il augmente en réponse à une exposition au froid mais diminue en cas d'obésité et au cours du vieillissement<sup>87-90</sup>. Ce TA est localisé chez l'homme adulte au niveau cervical, supra-claviculaire, axillaire, para-spinal, médiastinal, abdominal, et également péri-rénal chez le nouveau-né<sup>80,82,86,87,91-93</sup> (voir figure 6). Le TA brun actif représente environ 4.3% de la masse grasse totale d'un individu adulte<sup>86</sup>. Mais sa pureté de constitution cellulaire est discutée car du TA blanc entoure le TA brun. Il semblerait que ce TA blanc devienne majoritaire au cours du vieillissement et de l'obésité<sup>80,86,91,94</sup>. Il est décrit un gradient de types d'adipocytes en fonction de la profondeur dans la nuque : du TA blanc puis beige puis brun<sup>87</sup>. Il est souvent indiqué dans la littérature que la



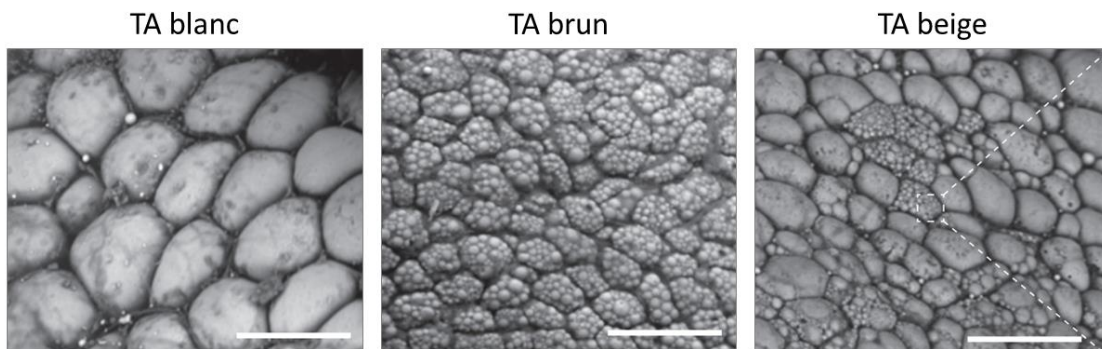
**Figure 7 : Analyse morphologique des adipocytes bruns**



Les adipocytes bruns sont multiloculaires et enrichis en mitochondries. Leurs mitochondries ont des crêtes parallèles très développées qui expriment UCP1. Photographie par microscopie électronique à transmission et représentation schématique d'un adipocyte brun chez la souris. N : noyau ; M : mitochondrie ; L : vacuole lipidique.

*Adapté de : Villaroya F, Domingo P and Giralt M. Lipodystrophy associated with highly active anti-retroviral therapy for HIV infection: the adipocyte as a target of anti-retroviral-induced mitochondrial toxicity. TRENDS in Pharmacological Sciences (26), 88-93 (2005)*

**Figure 8 : Différents types d'adipocytes**



Morphologie de différents types d'adipocytes chez la souris. Les adipocytes blancs du TA blanc inguinal (panneau de gauche) ont une unique grande vacuole lipidique. Les adipocytes bruns du TA brun inter-scapulaire (panneau du milieu) sont multiloculaires et riches en mitochondries. L'activation pharmacologique chronique des récepteurs  $\beta_3$ -adrénergiques induit le « *browning* » du TA blanc inguinal, c'est-à-dire l'apparition d'adipocytes beiges multiloculaires parmi les adipocytes blancs uniloculaires (panneau de droite). Microscopie électronique à balayage. Barre d'échelle = 50  $\mu\text{m}$ .

*Source : Bartelt A and Heeren J. Adipose tissue browning and metabolic health. Nat Rev Endocrinol 1, 24-36 (2014)*

présence du TA brun chez l'humain adulte était une grande interrogation non résolue avant les années 2000. Effectivement, il y a eu comme un oubli bibliographique au cours du XX<sup>ème</sup> siècle : décrit en 1908 puis oublié, décrit à nouveau dans les années 60-70 puis oublié, et enfin redécouvert au début du XXI<sup>ème</sup> siècle avec le <sup>18</sup>F-FDG-PET-SCAN. Sa forte consommation de lipides chez l'humain<sup>95</sup> et le rongeur<sup>96</sup>, et sa capacité à réduire l'insulinorésistance et l'obésité chez l'humain<sup>97-99</sup> et la souris<sup>70,100</sup>, en font actuellement un espoir thérapeutique majeur dans ces pathologies.

Les molécules participant à la mitochondriogenèse et au maintien de l'activité mitochondriale sont surexprimées dans les adipocytes bruns par rapport aux adipocytes blancs et sont nécessaires à leur fonction (voir chapitre adipogenèse et figure 7). On retrouve ainsi *Peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 alpha* (PGC1 $\alpha$ ), facteur maître de la mitochondriogenèse, *PR Domain Containing 16* (PRDM16), Tfam, ... Par rapport aux adipocytes beiges, les adipocytes bruns surexpriment également, chez la souris, *Lhx18*, *Eva1* et *Pdk4*. Quant à *Zic1*, il est un marqueur admis de ces cellules chez l'humain et la souris<sup>87</sup>. Le seul marqueur discriminant actuellement les adipocytes bruns des blancs est la protéine UCP1. Cependant, d'autres cellules l'expriment également : les adipocytes beiges.

On découvre en 1992, que des adipocytes de type brun apparaissent dans le TA blanc de rats exposés au froid<sup>101</sup> (voir figure 8). On parle à l'époque d'adipocytes *brown-in-white* ou *brite*, même si l'appellation beige est devenue majoritaire aujourd'hui du fait de leur couleur chez la souris. Les adipocytes beiges apparaissent dans le TA blanc en réponse à différents stimuli ou dans certaines conditions telles que l'exposition au froid<sup>102-104</sup> par stimulation adrénérergique, en réponse à l'exercice physique<sup>105,106</sup> par action de l'irisine bien que ce soit discuté<sup>107</sup>, en cas de phéochromocytome<sup>108</sup> par stimulation adrénérergique, chez les grands brûlés<sup>109</sup> par stimulation adrénérergique, lors d'une cachexie induite dans certains cancers<sup>110</sup>, ou encore dans certains cas d'ossification ectopique post-traumatique<sup>111</sup>. Les adipocytes beiges expriment des marqueurs qui leurs sont propres, ce qui en fait un type d'adipocytes à part entière<sup>71,112</sup>. Chez la souris, ils surexpriment notamment *Cd137*, *Tmem26*, *Tbx1*, *Cited1* et *Shox2*. Les adipocytes beiges sont dits inductibles car ils apparaissent/disparaissent dans les conditions

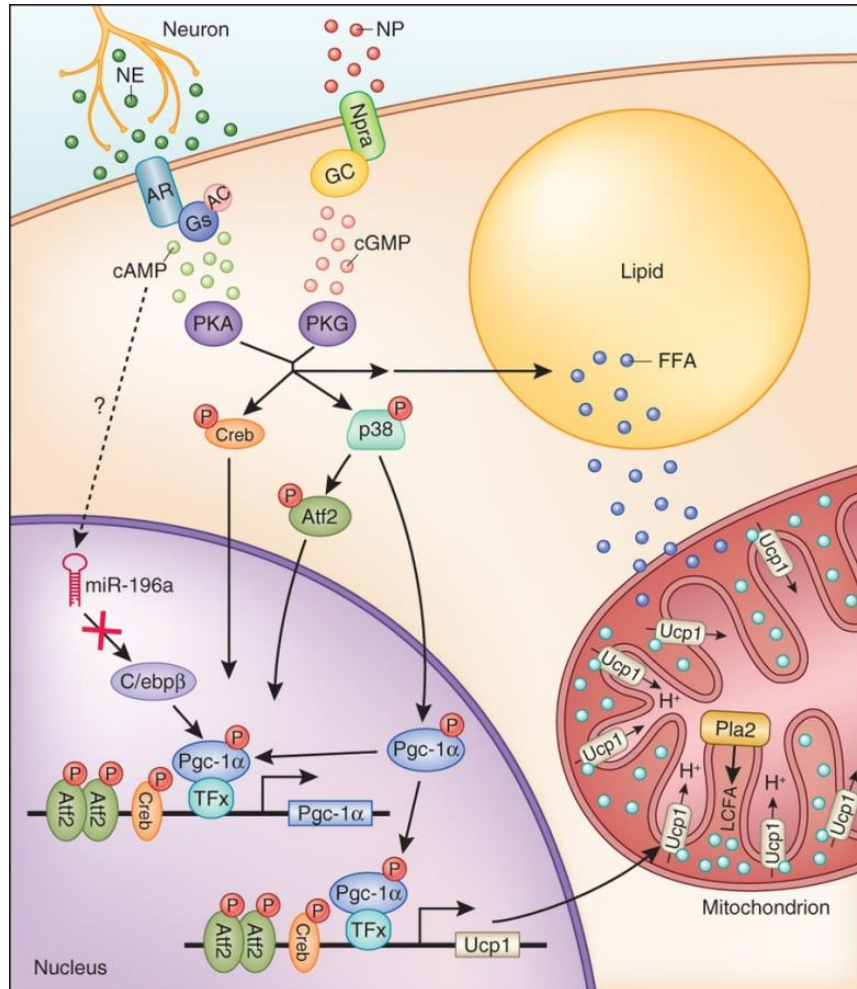


énoncées ci-dessus. Il est également décrit chez la souris des adipocytes beiges dits dormants, c'est-à-dire activables rapidement en adipocytes beiges fonctionnels et différents des adipocytes blancs<sup>104</sup>.

## ii. La production de chaleur par thermogénèse sans frissons

Le cytoplasme des adipocytes bruns et beiges est enrichi en mitochondries, ce qui leur donne leur couleur brune ou beige et leur nom. Il est théoriquement admis que les adipocytes beiges ont moins de mitochondries que les bruns. Plus petits que les adipocytes blancs (15 à 60  $\mu\text{m}$  de diamètre), ils ont de nombreuses petites gouttelettes lipidiques qui sont « brûlées », ce qui produit de la chaleur grâce à l'activité de la protéine UCP1<sup>113</sup>. Historiquement appelé thermogénine, UCP1 appartient à la famille des UCPs qui comprend 6 membres<sup>114,115</sup>. Alors qu'UCP1 est exprimée uniquement dans le TA brun et beige, et qu'UCP3 n'est exprimée que dans le muscle squelettique, le muscle cardiaque, et les TA, UCP2 a une expression ubiquitaire. UCP2 et UCP3 ont un rôle dans la limitation de la production mitochondriale d'espèces réactives de l'oxygène<sup>116</sup> et contribuent, de manière minoritaire par rapport à UCP1, au transport des protons de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale<sup>117</sup> et au métabolisme basal chez l'humain<sup>118</sup>. Quant à eux, UCP4 et UCP5 sont principalement exprimés au niveau du système nerveux central au sein duquel ils joueraient un rôle protecteur contre les neurotoxines<sup>119</sup>. Des travaux récents ont montré qu'UCP5 et UCP6 assurent principalement l'export mitochondrial d'anions inorganiques de type sulfite et thiosulfate<sup>120</sup>. Ces canaux peuvent également transporter des dicarboxylates tels que le malonate, le malate et le citramalate, ainsi que de l'aspartate. L'UCP majoritairement décrit est UCP1. UCP1 a été découverte en 1978 par Heaton et al<sup>121</sup> après des études préliminaires réalisées en 1969<sup>122,123</sup> et 1976<sup>124</sup>. Séquencé en 1990<sup>125</sup>, le gène UCP1 code une protéine de 307 acides aminés organisés en 6 domaines transmembranaires entrecoupés de boucles. UCP1 comprend 3 domaines homologues de 11 kDa ou une centaine d'acides aminés<sup>126</sup>, et appartient ainsi à la classe des transporteurs mitochondriaux *Solute Carrier* (SLC) 25A. UCP1 est décrit comme un canal ionique de 33 kDa qui permet un flux de protons  $\text{H}^+$  orienté par le gradient induit par la chaîne respiratoire, de l'espace inter-membranaire vers la matrice mitochondriale<sup>127</sup>. UCP1 représente 0.7 nmol/mg de

**Figure 9 : Activation de la thermogénèse dans les adipocytes beiges et bruns par les catécholamines et les peptides natriurétiques**



Les neurones du système nerveux sympathique libèrent des catécholamines de type norepinephrine (NE), qui se lient aux récepteurs de type  $\beta$ -adrénergique. Cette fixation conduit à l'activation de l'adenylyl cyclase (AC), à une augmentation de la concentration en AMPc intracellulaire, et à l'activation de la PKA. Par ailleurs, les peptides natriurétiques (NP) sécrétés par le cœur se lient au récepteur Npra. Cette fixation conduit à l'activation de la guanylyl cyclase (GC), une augmentation de la concentration intracellulaire de GMPc, et l'activation de la PKG. Les PKA et PKG activées phosphorylent Creb et la p38 MAPK, qui activent PGC1 $\alpha$ . Ce dernier va induire la mitochondriogenèse et la transcription du gène *UCP1*. En parallèle, les PKA et PKG induisent la lipolyse et les acides gras libérés activent les canaux mitochondriaux UCP1. Ce dernier dissipe le gradient électrochimique de protons et augmente la libération de chaleur.

Source : Harms M. and Seale P. *Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential.*

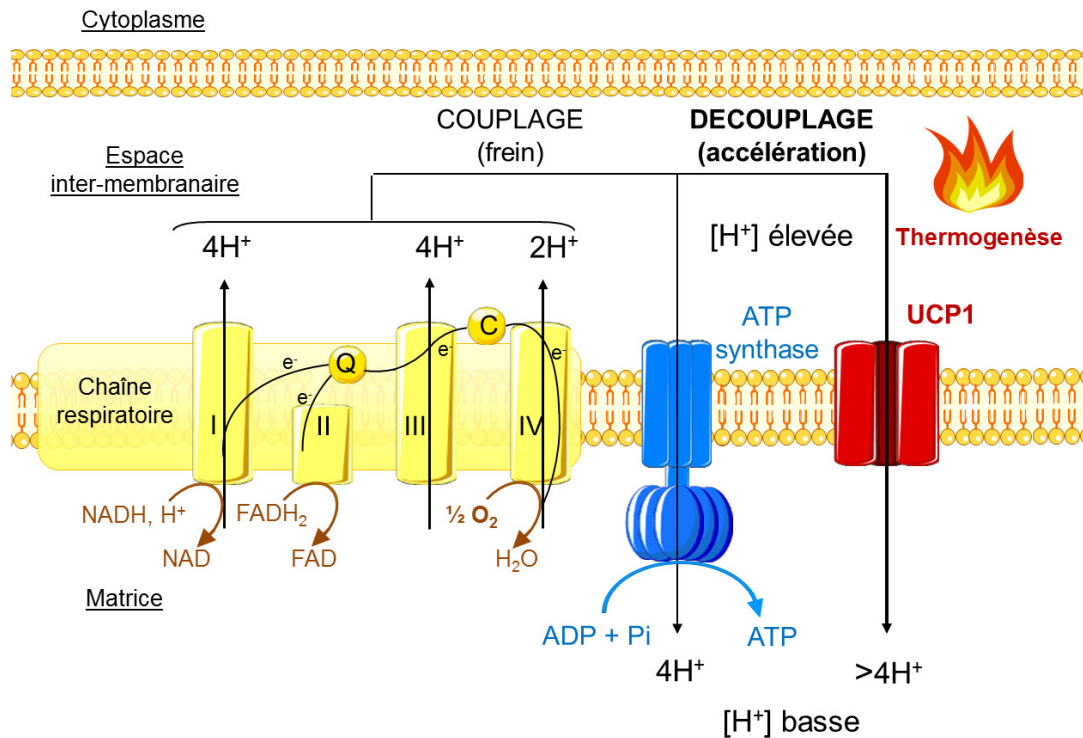
*Nature Medicine* (19), 1252-1263 (2013)

protéines totales de la membrane interne mitochondriale de TA brun de hamster, soit 6 à 10% des protéines<sup>121</sup>. Comparativement, les 50 autres membres de la famille SLC25A ne sont pas exprimés à plus de 20 pmol/mg de protéines. De nombreuses études biochimiques ont suivi pour comprendre les mécanismes et les régulations de ce canal particulier<sup>127</sup>.

Lors d'une exposition au froid, la voie  $\beta$ -adrénergique des adipocytes bruns et beiges est activée par le système nerveux sympathique (voir figure 9). En conséquence, une cascade de signalisation passant par l'AMPc et la PKA conduit d'une part à la transcription de l'ARNm d'*UCP1* et d'autre part à la lipolyse qui active les canaux inactifs d'*UCP1*. La transcription d'*UCP1* est activée par de nombreux facteurs, se fixant tant sur son promoteur distal que proximal<sup>128</sup>. CREB se fixe sur le site CRE du promoteur proximal d'*UCP1*, induisant directement sa transcription. En parallèle, il active également la transcription de *DIO2* qui est impliqué dans l'activation de la voie des hormones thyroïdiennes qui peuvent activer la transcription d'*UCP1* au niveau distal en se fixant via leur récepteur intracellulaire et l'élément de régulation TRE. La p38 MAPK quant à elle active de nombreux effecteurs menant à la transcription d'*UCP1*<sup>129</sup> : acide rétinoïque, PGC1 $\alpha$ , PRDM16, ATF2, CEBP $_{\alpha/\beta}$ , ... D'autre part, les canaux *UCP1* sont inhibés par la fixation de nucléotides de type puriques tels que l'ADP ou le GDP sur un site particulier en position centrale de la protéine. Les acides gras libérés lors de la lipolyse se fixent sur *UCP1*. Cette liaison déloge les purines par compétition directe ou par changement conformationnel ce qui lève l'inhibition exercée sur le canal. La charge négative des acides gras facilite également le transport des protons H<sup>+</sup><sup>130</sup>.

Les substrats énergétiques sont catabolisés par différents processus selon leur nature biochimique : glycolyse d'oxydation du glucose,  $\beta$ -oxydation des acides gras, cycle de Krebs (cycle d'acide tricarboxylique, cycle citrique) d'oxydation de l'acétyl-CoA, ... Ces réactions génèrent des composés réduits à haut potentiel énergétique tels que le NADH, H<sup>+</sup> et le FADH<sub>2</sub>. Les électrons sont transportés par les différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale, libérant l'énergie de génération d'un gradient électrochimique de protons,  $\Delta\Psi$ , de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale (voir figure 10). Ce gradient  $\Delta\Psi$  résulte d'une part d'un gradient chimique de pH de part et d'autre de la membrane et d'autre part du potentiel électrique de cette membrane. Le NADH induit le passage vers l'espace

**Figure 10 : Mécanismes moléculaires de la thermogénèse de non frissons**



Un gradient électrochimique de protons est obtenu grâce à l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette dernière comprends 4 complexes protéiques qui transportent les électrons à haut potentiel énergétique provenant des composés réduits  $NADH, H^+$  et  $FADH_2$ , tous deux produits lors des différentes réactions cataboliques de l'organisme (glycolyse,  $\beta$ -oxydation, cycle de Krebs, ...). Le complexe I a une action NADH coenzyme Q réductase, récupérant les électrons du NADH et permet le transport de 4 protons. Le complexe II a une action Succinate coenzyme Q réductase, récupérant les électrons du  $FADH_2$ . Le complexe III a une action Coenzyme Q cytochrome C réductase, et permet le transport de 4 protons. Le complexe IV a une action Cytochrome C oxydase, et permet le transport de 2 protons. Le coenzyme Q (ou ubiquinone) assure le transport des électrons entre le complexe I ou II et le complexe III, le cytochrome C entre le complexe III et le complexe IV. Le retour des protons dans la matrice mitochondriale est couplé à la synthèse d'ATP via l'ATP synthase pour la production d'énergie ou transportés via le canal à protons UCP1 pour la production de chaleur (thermogénèse de non frissons). L'ATP synthase est considérée comme le V<sup>ème</sup> complexe protéique constituant les phosphorylations oxydatives.

Source : Hélène Leménager, STROMALab.

inter-membranaire de 10 protons, le  $\text{FADH}_2$  de 6. Enchâssée dans la membrane interne, l'ATP synthase couple la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique au transfert de 4 protons vers la matrice mitochondriale <sup>131</sup>. Le gradient  $\Delta\Psi$  est nécessaire à la synthèse d'ATP. Cependant, ne permettant le passage que de 4 protons  $\text{H}^+$ , l'ATP synthase représente un frein mécanique au retour des protons dans la matrice. On parle de phosphorylations oxydatives et de couplage car la chaîne respiratoire est couplée à la synthèse d'ATP. Les électrons issus de la chaîne respiratoire réduisent des molécules d'oxygène  $\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$ . Expérimentalement, on peut ainsi mesurer l'activité mitochondriale par sa consommation d'oxygène dans un appareil de mesure appelé oxygraphe. L'application de différentes drogues contre les complexes de la chaîne respiratoire permet d'étudier l'activité de ces complexes. En inhibant le complexe III par un traitement à l'antimycine A, toute la chaîne respiratoire est bloquée et la consommation d'oxygène mesurée est le reflet de la respiration non mitochondriale. De manière similaire, l'utilisation d'un protonophore tel que le carbonylcyanide-3-chlorophenylhydrazone ou le carbonylcyanide-4-trifluorométhoxy-phenylhydrazone dissipera le gradient  $\Delta\Psi$  et permettra de mesurer la respiration maximale des échantillons. Cette respiration maximale est le reflet de la quantité totale de complexes protéiques fonctionnels de la chaîne respiratoire.

Par sa forte activité de transport de protons vers la matrice mitochondriale, UCP1 dissipe le gradient électrochimique de protons  $\Delta\Psi$  aux dépens de l'ATP synthase. On parle alors de découplage entre l'activité de la chaîne respiratoire et celle de l'ATP synthase <sup>113</sup>. Ainsi, en faisant passer plus de 4 protons par réaction, le frein exercé par l'ATP synthase en aval de la chaîne respiratoire est levé par l'activité d'UCP1. Par conséquent, les réactions biochimiques mitochondriales exothermiques intervenant en amont du gradient  $\Delta\Psi$  s'accélèrent, ce qui produit et libère davantage de chaleur. Le TA brun est caractérisé par une vascularisation très riche, qui contribue à propager rapidement la chaleur produite de manière systémique, ainsi que les batokines sécrétées par le tissu. La vascularisation permet aussi d'apporter les nutriments aux cellules <sup>132</sup>. L'effet thermogénique d'UCP1 a été prouvé *in vivo* en 1997 car contrairement aux souris normales, des souris invalidées pour le gène *Ucp1* meurent lorsqu'elles sont exposées brutalement au froid <sup>133</sup>. A l'oxygraphe, la respiration découplée est donnée





indirectement par la mesure de la consommation d'oxygène liée à l'activité de l'ATP synthase par un traitement inhibiteur à l'oligomycine, à laquelle on soustrait la respiration non mitochondriale (traitement antimycine A). On peut ajouter des acides gras libres tels que le palmitate, ou des nucléotides de type puriques tels que l'ADP ou le GDP, afin de mesurer la respiration liée respectivement à une augmentation ou une diminution de l'activité d'UCP1.

Récemment, des mécanismes de thermogénèse indépendante des frissons et d'UCP1 ont été décrits. On note notamment celui du cycle de la créatine entraînant une suractivation de l'ATP synthase<sup>134</sup> et celui de SERCa2b par l'utilisation du calcium  $Ca^{2+}$ <sup>135</sup>. Ces systèmes mènent à l'accélération de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale ce qui augmente la production de chaleur.

## **2. Pathologies liées au TA**

Les pathologies du TA sont décrites avec deux situations extrêmes et opposées : d'une part l'obésité se caractérise par une forte prise de masse de TA, et d'autre part les lipodystrophies correspondent à une forte perte de masse ou de fonction de TA. Dans les deux situations, les maladies associées sont causées par une perte de capacité du TA à stocker les lipides, conduisant à une insulino-résistance et un diabète de type 2.

### **a. Obésité et maladies associées à l'obésité**

#### **i. Causes**

L'obésité est une pathologie multifactorielle en expansion constante à travers le monde<sup>136</sup>, définie par l'organisation mondiale pour la santé comme « une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui représente un risque pour la santé ». Elle est principalement due à un déséquilibre de la balance énergétique en faveur du stockage : les apports dépassent les dépenses. L'environnement est la cause principale de cette expansion, même si des facteurs génétiques et épigénétiques peuvent également être impliqués (syndrome de Noonan ou Prader-Willi par exemple<sup>137</sup>). Pour l'environnement, il faut prendre en compte plusieurs facteurs : un accès à la nourriture facilité dans les sociétés modernes occidentales avec augmentation des portions lors des repas, excès de matières grasses et de sucres simples utilisés par l'industrie agroalimentaire, un



accès aux aliments pro-obésogènes qui sont les moins onéreux, une diminution de l'activité physique, ... Dans les années 1970, la mise en place de l'Indice de Masse Corporelle (IMC)<sup>138</sup> (calcul du poids (kg) divisé par la taille au carré (m<sup>2</sup>)) a permis de mesurer la prévalence et l'accroissement de l'obésité à l'échelle mondiale, poussant les scientifiques à s'intéresser de plus près au TA. Un IMC supérieur à 30 indique qu'une personne est obèse, et supérieur à 40 qu'elle souffre d'obésité morbide<sup>139,140</sup>. En 2016 un quart de la population mondiale était ainsi en surpoids (IMC > 25). L'obésité est un problème majeur de notre société actuelle à cause des conséquences sur le fonctionnement de l'organisme, sur la vie de l'individu et par voie de conséquences médicales et économiques sur la société.

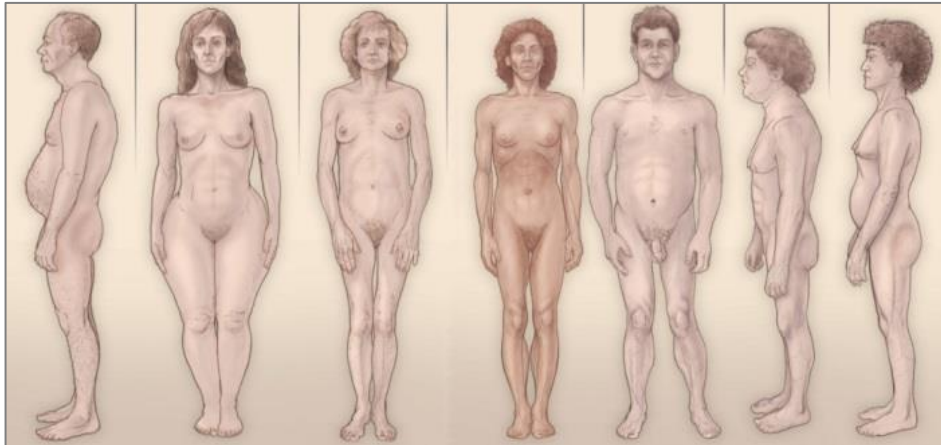
## ii. Conséquences : maladies associées à l'obésité

L'obésité est associée à plusieurs comorbidités telles que le diabète de type 2<sup>141</sup>, l'hypertension<sup>142</sup>, les dyslipidémies<sup>142</sup>, les maladies cardiovasculaires<sup>143,144</sup>, le syndrome métabolique<sup>142</sup>, les calculs biliaires<sup>145</sup>, les apnées du sommeil<sup>146</sup>, le cancer<sup>147</sup> et le vieillissement prématuré de l'individu. Le diabète de type 2 est associé à une résistance à l'insuline des tissus cibles. Cette insulino-résistance entraîne une hyper-insulinémie compensatoire de manière précoce, c'est-à-dire une surproduction d'insuline par les cellules  $\beta$  du pancréas. Cependant, à long terme, la production compensatoire d'insuline est dépassée, induisant une hyperglycémie à jeun<sup>148</sup>. Le syndrome métabolique quant à lui est caractérisé par la présence de 3 critères parmi les 5 suivants<sup>149</sup> : grand tour de taille (>102cm pour les hommes et >88cm pour les femmes), pression artérielle élevée (>130/85mmHg), hyperglycémie à jeun (>6.1mM), taux élevés de triglycérides plasmatiques (>150mg/dL), taux faibles de *high density lipoprotein* cholestérol plasmatiques (< 40mg/dL pour les hommes et <50 mg/dL pour les femmes).

## iii. Mécanismes

Les pathologies associées à l'obésité sont provoquées par une altération de la fonction de stockage du TA sous-cutané. Le TA blanc sous-cutané représente 80% de l'adiposité totale d'un individu. Il est localisé à la surface de l'organisme entre la peau et le fascia musculaire. Ce TA spécialisé ne pouvant plus stocker les surplus lipidiques, une adiposité viscérale est engendrée<sup>150-152</sup> et des dépôts lipidiques ectopiques toxiques se forment<sup>153-155</sup>. Le TA blanc viscéral représente 5

**Figure 11 : Différents cas de lipodystrophies acquises ou congénitales**



Représentations schématiques de différentes formes de lipodystrophies. De gauche à droite : homme de 42 ans avec une lipodystrophie acquise (séropositif) ; femme de 28 ans atteinte d'une lipodystrophie acquise partielle depuis 16 ans ; femme de 60 ans avec une lipodystrophie acquise généralisée ; femme de 33 ans avec une lipodystrophie congénitale généralisée de type 1 ; homme de 19 ans avec une lipodystrophie congénitale généralisée de type 2 (mutation dans le gène *seipin*) ; femme de 37 ans avec une lipodystrophie familiale partielle de type Dunnigan (mutation dans les gènes *lamin A* et *C*) ; femme de 64 ans avec une lipodystrophie familiale partielle (mutation dans le gène *PPAR $\gamma$* ).

*Adapté de : Garg, A. Acquired and inherited lipodystrophies. New England Journal of Medicine 350, 1220–1234 (2004)*

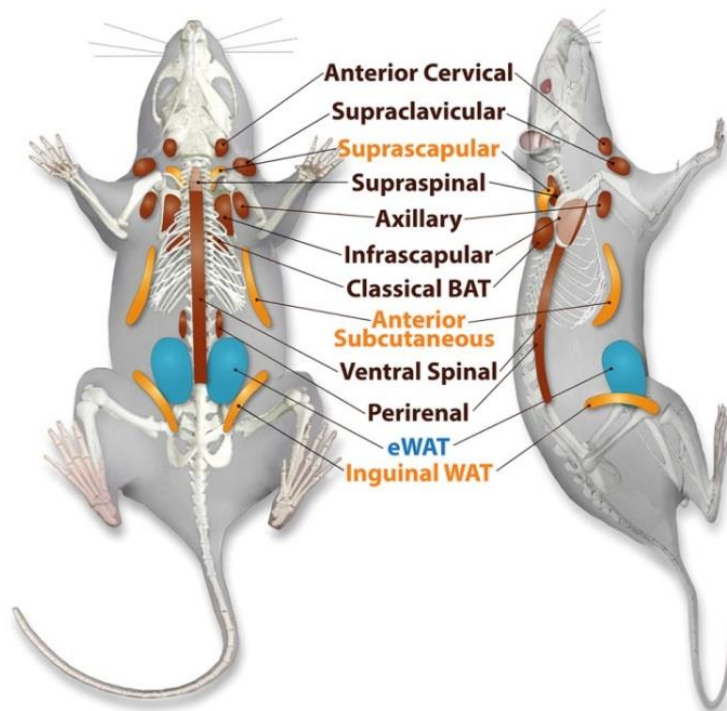
à 8% chez les femmes et 10 à 20% chez les hommes. Il entoure les organes internes<sup>156–159</sup>. Notamment, la localisation anatomique du TA viscéral près de la veine porte du foie participe à une stéatose hépatique et une insulino-résistance<sup>160</sup>. Les femmes non ménopausées sont davantage protégées des effets délétères de l'obésité car les œstrogènes favorisent un stockage des graisses préférentiellement au niveau glutéo-fémoral, sous-cutané, plutôt qu'au niveau viscéral<sup>153</sup>. On parle de forme gynoïde pour les femmes, ou poire, et androïde pour les hommes, ou pomme. Par ailleurs, il existe des individus métaboliquement sains mais atteints d'obésité sévère au regard de leur IMC. Leur TA sous-cutané est encore fonctionnel, et est donc capable de stocker les surplus lipidiques<sup>161</sup>. Il est donc important de comprendre comment fonctionne le TA sous-cutané pour éviter les comorbidités liées à l'adiposité viscérale.

### **b. Lipodystrophies**

À l'inverse, le syndrome lipodystrophique correspond à un ensemble de maladies impliquant une perte anormale et variable de masse ou de fonction du TA de manière locale ou généralisée<sup>162</sup> (voir figure 11). Causé par une maladie génétique, une maladie auto-immune ou certains traitements, il est difficile de classer les lipodystrophies à cause d'une grande hétérogénéité de causes<sup>163</sup>. La perte de TA entraîne des défauts de stockage des acides gras à l'échelle de l'organisme et favorise l'apparition de dépôts ectopiques lipotoxiques<sup>164</sup>. Ainsi, la sévérité du phénotype métabolique associé est proportionnelle à la quantité de perte de masse graisseuse. Les patients sont généralement atteints d'insulino-résistance sévère et des maladies métaboliques qui lui sont associées<sup>165</sup> : diabète, stéatose hépatique, hypertriglycéridémie, maladies cardiovasculaires, ... Les trois principales conséquences de ces maladies métaboliques sont la dyslipidémie, le diabète et une altération du profil de sécrétion adipokinique. En effet, les taux d'adiponectine et de leptine sont souvent très bas chez ces patients<sup>166</sup>. Ainsi, la métréleptine, un analogue synthétique de la leptine, est un traitement efficace contre la dyslipidémie et l'insulino-résistance des patients lipodystrophiques utilisé depuis plusieurs années<sup>167–169</sup>.

## **3. Les TA chez la souris**

**Figure 12 : Localisation des TA chez la souris**



Chez la souris, le TA blanc épидидymaire (eWAT) est considéré comme un vrai TA blanc possédant de faibles capacités de brunissement. Les TA pouvant brunir sont en jaune, et les TA bruns sont en marron.

Source : Zhang F. *An adipose tissue atlas: an image-guided identification of human-like BAT and beige depots in rodents.* *Cell Metabolism* (27) 252-262 (2018)

Chez la souris le TA sous-cutané se développe chez l'embryon entre le 14<sup>ème</sup> et le 18<sup>ème</sup> jour de développement, et le TA viscéral se développe après la naissance<sup>170</sup>. Le TA blanc sous-cutané chez la souris est le TA inguinal (voir figure 12). Cependant, du fait de sa localisation anatomique à proximité des mamelles, la question est soulevée quant à sa ressemblance avec le TA mammaire chez l'humain plutôt que le TA blanc sous-cutané humain. Chez la souris, le TA viscéral est le TA péri-gonadique, le plus étudié étant le TA épидidymaire chez le mâle. Il est considéré comme possédant de faibles capacités thermogéniques en comparaison avec le TA inguinal par exemple<sup>171</sup>. On retrouve aussi du TA blanc viscéral au niveau mésentérique et péri-rénal. Comme chez l'humain<sup>172</sup>, les TA blancs murins sont structurés sous forme de lobules richement vascularisés<sup>173</sup>. Le TA brun quant à lui est représenté en de nombreux dépôts chez la souris. Il est décrit au niveau péri-rénal, péri-cardique, interscapulaire, cervical et médiastinal<sup>10</sup>. Une étude comparative entre l'homme et la souris a montré que le TA brun humain était moins homogène en adipocytes bruns que le TA brun murin du fait d'une hétérogénéité avec des adipocytes blancs<sup>174</sup>. De plus, par microscopie électronique à transmission les auteurs ont mis en évidence que les adipocytes bruns humains sont moins riches en mitochondries et que celles-ci expriment moins la protéine découplante UCP1. Ainsi, bien qu'il fonctionne de manière similaire (UCP1 y fonctionne aussi bien), le TA brun humain a des capacités oxydatives plus faibles que le TA brun murin.

#### **4. Les autres constituants cellulaires du TA :**

Outre les adipocytes, le TA est constitué de nombreux autres types cellulaires qui aident à sa fonction. On retrouve les cellules endothéliales, immunitaires, nerveuses, fibroblastiques et progénitrices, qui reposent sur une MEC plus ou moins fibreuse.

Les cellules endothéliales constituent la paroi des vaisseaux sanguins qui traversent le TA. Chez l'humain ces cellules sont caractérisées par la double expression du CD34 et du CD31. La perméabilité de la barrière endothéliale contrôle les échanges entre le TA et la circulation sanguine, en nutriments, solutés, hormones, oxygène et cellules. De plus, l'adipogenèse (la formation de nouveaux adipocytes) et l'angiogenèse (la formation de nouveaux vaisseaux) sont étroitement





liées au cours du développement du TA chez l'humain<sup>4</sup>. Le développement des capillaires sanguins est en amont de l'apparition de vésicules lipidiques au cours de la lobulogenèse chez le fœtus. Il a été montré chez la souris qu'une transfection des pré-adipocytes entraînant la perte de fonction de facteurs nécessaires à l'adipogenèse abolit la formation de nouveaux adipocytes et diminue parallèlement l'apparition des vaisseaux sanguins<sup>175</sup>. À l'inverse, l'utilisation d'un anticorps bloquant l'activité du *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2* diminue l'angiogenèse, et la différenciation adipocytaire des pré-adipocytes. Cette relation est renforcée par le fait que certains progéniteurs adipocytaires résident dans des niches péri-vasculaires constituées de cellules endothéliales et péricyaires, c'est-à-dire en contact direct avec la barrière endothéliale<sup>176</sup>. Les cellules endothéliales stimulent la prolifération des progéniteurs adipocytaires, et ces derniers augmentent la survie des cellules endothéliales<sup>177</sup>. Quant au réseau lymphatique du TA, peu de données sont disponibles chez l'humain. Une étude de 1988 par lymphographie indirecte après injection d'un agent contrastant a montré que les vaisseaux lymphatiques étaient localisés en dehors des lobules graisseux<sup>178</sup>. Chez la souris, le TA blanc sous-cutané inguinal dispose en son centre d'un ganglion lymphatique<sup>173</sup>.

Le TA contient des cellules immunitaires, principalement des macrophages et des lymphocytes. Il existe deux types de macrophages dans le TA : les macrophages résidants dans le tissu, et les macrophages recrutés depuis la circulation sanguine et provenant de précurseurs médullaires en réponse à une inflammation locale par l'action de chimiokines sécrétées par le TA. Lors de l'obésité le nombre de macrophages augmente dans le tissu, on parle même de « *crown-like structures* » lorsque les macrophages entourent les adipocytes en état de mort cellulaire, qui serait liée à une hypertrophie<sup>179</sup>. Une altération des sécrétions endocrines du TA ou la libération des acides gras lors de la mort des adipocytes pourraient être des événements précoces de l'inflammation chronique à bas bruit retrouvée chez les sujets obèses. Des études chez la souris ont montré que cette inflammation était plus importante au niveau viscéral que sous-cutané, en corrélation avec les problèmes métaboliques liés à l'obésité<sup>180</sup>. Chez l'humain cette infiltration de macrophages au niveau viscéral est corrélée à la sécrétion de chimiokines inflammatoires de type MCP-1 et *Colony Stimulating Factor 1*<sup>181</sup>. A



l'inverse, une analyse transcriptomique à grande échelle a révélé qu'une perte de poids chez l'humain diminuait l'expression de facteurs pro-inflammatoires et augmentait l'expression de facteurs anti-inflammatoires dans le TA sous-cutané<sup>182</sup>. Outre les macrophages, le TA de sujets obèses est enrichi en lymphocytes de type T CD8<sup>+</sup>. Chez la souris, ces lymphocytes favorisent l'infiltration et l'activation des macrophages vers un phénotype pro-inflammatoire M1 puisque la déplétion des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> diminue l'infiltration des macrophages dans le TA et améliore la sensibilité systémique à l'insuline<sup>183</sup>.

Le TA est également un tissu innervé. Il a été démontré chez le rongeur que des fibres nerveuses appartenant au système nerveux parasymphatique innervent les adipocytes blancs<sup>184,185</sup>. Ces fibres ont été marquées par un traceur viral trans-synaptique rétrograde et proviendraient du système nerveux central au niveau de la moelle épinière, du tronc cérébral, du cerveau moyen et de différentes zones du cerveau antérieur chez le rongeur<sup>186,187</sup>. Il a été montré chez la souris mise au froid, que la densité des fibres sympathiques (marquées à la tyrosine hydroxylase) innervant les adipocytes blancs augmentait lors du *browning* du TA blanc inguinal<sup>188</sup>. Même si ces fibres libèrent de la noradrénaline, impliquée dans la signalisation du processus de *browning*, et du neuropeptide Y, qui induit la prolifération des pré-adipocytes<sup>189,190</sup>, des souris dépourvues des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques ont la capacité de brunir lorsqu'elles sont exposées au froid<sup>191</sup>. Ces données indiquent que l'innervation n'est pas nécessaire au processus de *browning*. De manière intéressante, des adipocytes cultivés *in vitro* sont capables de brunir de manière autonome lorsqu'ils sont maintenus à 27-33°C au lieu de 37°C<sup>191</sup>. La dénervation sympathique et sensorielle unilatérale du TA brun chez la souris et le rongeur en comparaison avec le TA brun contro-latéral innervé, révèle que l'augmentation de l'expression d'UCP1, de l'activité cytochrome oxydase, de la mitochondriogenèse et de l'import de glucose en réponse au froid dépendent de cette innervation<sup>192,193</sup>. La mélanocortine serait impliquée au niveau central dans l'activation du TA brun chez le rongeur<sup>194</sup>. Concernant les adipocytes blancs, outre le fait que la noradrénaline est un inducteur bien connu de la lipolyse, la sécrétion de la leptine est inhibée via une signalisation  $\beta$ -adrénergique chez l'humain<sup>195</sup>. Par ailleurs, des agonistes des récepteurs  $\beta$ 3-adrénergiques inhibent l'expression d'adiponectine dans les TA blancs et brun chez la souris, mais augmentent



l'expression du TNF $\alpha$ <sup>196</sup>. Le couplage de l'immunohistochimie et de la microscopie confocale a révélé la présence de fibres sensorielles au sein des TA chez le rat<sup>197</sup>. Ces fibres pourraient être impliquées dans la transmission de l'information au niveau central des stocks lipidiques périphériques, et/ou de la production de chaleur par le TA brun.

Le TA n'est pas constitué que de cellules. L'ensemble de ces populations cellulaires est entouré de MEC. La MEC n'est pas un espace inerte. Elle est en permanence synthétisée, dégradée, maturée et modifiée. Le remodelage de la MEC est constant et nécessaire, notamment pour l'expansion des adipocytes, la formation de nouveaux adipocytes et l'angiogenèse<sup>198</sup>. De nombreuses enzymes sont impliquées dans le remodelage de la MEC, les plus décrites étant les *Matrix MetalloProteases* (MMP) et leurs inhibiteurs, les *Tissue Inhibitor of MetalloProteases*. L'obésité est souvent associée à une fibrose, c'est-à-dire une augmentation de la quantité, de la densité, et de la rigidité de la MEC. Ces effets sont délétères pour l'organisme, notamment par la contrainte mécanique subie par les adipocytes qui altère leurs fonctions<sup>199,200</sup>. Les constituants majoritaires de la MEC sont les collagènes. Il existe 28 types de collagènes, dont certains ont plusieurs isoformes (collagène 1 $\alpha$ 1 et 1 $\alpha$ 2 par exemple)<sup>201</sup>. Ces protéines possèdent des domaines riches en prolines et hydroxyprolines qui contribuent à la formation de structures fibrillaires complexes. Les adipocytes reposent sur la lame basale, principalement constituée de collagène de type IV, laminine et héparan sulfates<sup>202</sup>. Quant à lui, le collagène de type VI est positivement corrélé à l'IMC de patients obèses, et est associé à la fibrose du TA et aux effets néfastes de l'obésité<sup>203,204</sup>. La MEC est majoritairement sécrétée par les fibroblastes localisés dans le tissu.



## **Chapitre 2 : L'adipogenèse :**

La durée de vie moyenne d'un adipocyte est d'environ 10 ans *in vivo* chez l'homme<sup>205,206</sup>. Ainsi, tout au long de la vie de l'individu, le TA doit renouveler son contenu en adipocytes pour assurer ses fonctions. Environ 10% des adipocytes sont ainsi renouvelés chaque année à partir des cellules souches et progéniteurs contenus dans le tissu par un processus appelé adipogenèse.

### **1. Les cellules souches : généralités**

James Till et Ernest McCulloch ont réalisé des travaux pionniers sur les cellules souches adultes en 1961 en injectant des cellules de moelle osseuse dans des souris irradiées<sup>207</sup>. Ils montrent alors que des cellules souches ou progéniteurs sont capables de proliférer et de se différencier en cellules lymphoïdes et myéloïdes, restaurant ainsi l'hématopoïèse altérée de la moelle osseuse détruite.

Les cellules souches sont définies comme des cellules non différenciées capables d'auto-renouvellement, donc capables de donner une cellule identique à elles-mêmes à chaque cycle de division cellulaire, tout en donnant une descendance cellulaire différenciée et variée qui assurera ou soutiendra la fonction du tissu<sup>208</sup>. Lors de la division cellulaire, la cellule souche peut se diviser de manière symétrique ou asymétrique<sup>209</sup>. La division asymétrique résulte soit de la localisation de facteurs intrinsèques régulant le devenir cellulaire à un pôle de la cellule souche mère, donnant ainsi deux cellules filles différentes à l'issue de la division ; soit de l'exposition d'une des deux cellules filles à des facteurs extrinsèques modifiant ainsi son devenir par rapport à l'autre cellule fille qui restera souche.

Une cellule immature est une cellule qui n'a pas atteint de destinée cellulaire particulière et a le potentiel de devenir une autre cellule par des processus de différenciation et de plasticité cellulaire. La différenciation est le processus par lequel les cellules deviennent plus spécialisées. On considère qu'une cellule immature se différencie en cellules matures. L'immaturité correspond au degré de potentialités d'une cellule, c'est-à-dire la capacité à devenir plusieurs types cellulaires matures différents. Le lignage regroupe un ensemble de cellules ayant la même origine développementale qui partagent un phénotype et/ou une fonction





similaire. L'identité d'une cellule est définie à un instant donné par la description de caractéristiques phénotypiques, l'expression de marqueurs spécifiques, et l'étude de sa fonctionnalité.

Jusqu'alors les cellules souches étaient identifiées *in vivo* par une rétention du BrdU due à un temps de doublement cellulaire plus long que les autres cellules, même si cette technique a montré ses limites notamment concernant les cellules souches hématopoïétiques (CSH)<sup>210</sup>. Nous n'avons pas identifié aujourd'hui de marqueur spécifique des cellules souches, notamment du fait que leur profil de signalisation varie en permanence en fonction des signaux perçus depuis leur microenvironnement. Il est donc nécessaire de définir des marqueurs plus spécifiques afin de les isoler techniquement. Aujourd'hui on ne peut identifier les cellules souches *in vivo* que par leur marquage avant transplantation et le suivi de leur devenir : auto-renouvellement et progéniture différenciée. Des travaux rapportent l'existence de cellules souches spécifiques dans de nombreux organes, mais ce n'est que dans certains d'entre eux que l'existence de cellules souches a été clairement démontrée *in vivo* chez les mammifères. On dénombre parmi elles les cellules souches épithéliales de l'intestin localisées dans une niche en profondeur des cryptes intestinales<sup>211</sup>, les cellules souches germinales localisées au sein des tubules séminifères<sup>212</sup>, les cellules souches épithéliales localisées dans le renforcement du follicule pileux<sup>213</sup>, les cellules souches musculaires localisées dans une niche sous la lame basale des fibres musculaires<sup>214</sup>, les cellules souches neurales localisées dans la zone subventriculaire du ventricule latéral du système nerveux central<sup>215</sup>, et les CSH<sup>216,217</sup>. Les CSH sont localisées au sein d'une niche endostéale et/ou péri-vasculaire dans la moelle osseuse ou au sein de la rate<sup>216,217</sup>. Il a récemment été décrit des progéniteurs hématopoïétiques au sein du TA chez la souris, bien que ces cellules soient préférentiellement orientées vers le lignage myéloïde et qu'une niche n'est pas été fermement décrite<sup>218</sup>.

Le devenir des cellules souches est finement régulé par leur niche environnementale<sup>219</sup> : auto-renouvellement, prolifération, différenciation, survie, quiescence, apoptose. La différenciation correspond à l'acquisition séquentielle de marqueurs phénotypiques fonctionnels spécifiques du devenir cellulaire « cible ». Elle est classiquement décrite comme le passage d'une cellule souche à un progéniteur puis un précurseur avant de donner une cellule différenciée mature.



Lors de cette cascade d'évènements, les capacités de prolifération diminuent. On parle d'engagement lorsque la cellule souche entame son processus de différenciation dans un lignage cellulaire particulier. On parle du degré d'immaturation d'une cellule en fonction des potentialités de différenciation plus ou moins étendues dans différents lignages qu'elle possède à un instant donné. Il existe plusieurs types de cellules souches, classées selon leurs potentialités de différenciation, et donc leur degré d'immaturation :

- Cellules souches pluripotentes : elles sont présentes au stade blastocyste et ont la capacité de générer toutes les cellules correspondant aux 3 feuillets embryonnaires (ectoderme, mésoderme, endoderme), mais contrairement aux cellules souches totipotentes, elles ne peuvent pas former les structures extra-embryonnaires. Les cellules souches embryonnaires (ES) sont des cellules souches pluripotentes<sup>220</sup>. L'utilisation et l'étude de ces cellules est très encadrée en France, la loi de bioéthique régit l'accès à ces cellules du fait de l'utilisation d'embryons humains comme source biologique. Seuls les laboratoires qui ont une autorisation du Conseil d'Orientation de l'Agence de la Biomédecine peuvent les étudier.

- Cellules souches multipotentes : elles ont la capacité à générer plus d'un type cellulaire, mais tous issus du même lignage (mésenchymateux par exemple). C'est le cas des cellules souches adultes comme les cellules souches intestinales, neurales, de la peau, ... Les principales cellules souches multipotentes décrites chez l'adulte sont les CSH et les cellules souches/stromales mésenchymateuses (CSM). Les CSH sont à l'origine des cellules circulantes au travers d'une différenciation soit de la lignée myéloïde (plaquettes, globules rouges, monocytes, macrophages et granulocytes) soit de la lignée lymphoïde (lymphocytes B / T / NK). Le chapitre suivant détaille les caractéristiques des CSM, plus particulièrement les CSM du TA.

- Cellules souches unipotentes : capacité de générer un seul type cellulaire différencié tout en maintenant sa capacité d'auto-renouvellement. C'est le cas par exemple des cellules souches musculaires (ou cellules satellites) ou des cellules souches endothéliales - aussi parfois appelées progéniteurs endothéliaux tardifs.

Cependant, des phénomènes biologiques ont été récemment décrits, tels que la dédifférenciation (le fait de revenir à un état cellulaire plus immature) et la



transdifférenciation (le fait de devenir une cellule mature définie par un autre lignage de différenciation sans passer par un stade pluripotent). Ces phénomènes laissent penser qu'il serait possible d'obtenir des cellules souches ou des cellules matures en conditions pathologiques sans activer le stock de cellules souches lors de la régénération du tissu. Ces processus reflètent la capacité de plasticité des cellules (voir chapitre 3).

## 2. Les CSM du TA - les ASC :

Les adipocytes sont renouvelés à partir de cellules ayant toutes les caractéristiques des CSM *in vitro*. Les CSM sont retrouvées dans le mésenchyme de nombreux tissus. Historiquement décrites dans la moelle osseuse et nommées BM-MSc pour *bone marrow-derived mesenchymal stromal cells*<sup>221</sup>, les CSM peuvent également être localisées au sein du TA – nommées ASC pour *adipose-derived stromal cells*<sup>222</sup>, ou de nombreux autres tissus tels que le rein, le pancréas, le muscle squelettique, le cerveau et le foie. Elles soutiennent la fonction du tissu. Elles ont donc une fonction stromale.

Par une combinatoire de facteurs intrinsèques et extrinsèques, les CSM s'engagent dans différents lignages de différenciation pour donner une cellule mature. Classiquement, les CSM peuvent se différencier selon 3 voies du lignage mésodermique du fait de leur origine développementale : le lignage adipocytaire pour donner un adipocyte mature du tissu adipeux, le lignage ostéoblastique pour donner un ostéoblaste qui produit la matrice osseuse, et le lignage chondroblastique pour donner un chondroblaste, constituant cellulaire du cartilage<sup>223</sup>. Elles peuvent également se différencier en cellules vasculaires musculaires lisses constituant la paroi de certains vaisseaux sanguins<sup>224</sup>. Ces potentialités en font les cellules principales constituant la niche hématopoïétique. De manière physiologique, les BM-MSCs soutiennent et régulent la fonction des CSH par la synthèse de MEC et de facteurs de croissance ou de cytokines régulant leur devenir, tels que le CXCL12 ou l'angiopoïétine 1<sup>217,225</sup>. Par ailleurs, même si cette capacité est controversée du fait des méthodes utilisées et de l'absence de résultats convaincants *in vivo*, il a également été montré que les BM-MSc pouvaient se différencier *in vitro* en certaines cellules dérivant de l'ectoderme et de l'endoderme : en cellules nerveuses<sup>226,227</sup>, musculaires<sup>228</sup>, endothéliales, en



ténocytes<sup>229</sup> et en hépatocytes<sup>230</sup> et cellules ovales du foie<sup>231</sup>. Ces capacités peuvent être expliquées par le fait que certaines CSM dérivent de la crête neurale et de l'épithélium neural chez la souris, bien que ces populations diminuent chez l'adulte<sup>232</sup>. Ainsi, les CSM assurent le renouvellement continu des cellules constituant le tissu conjonctif de manière physiologique ou à la suite de lésion, vieillesse ou maladie.

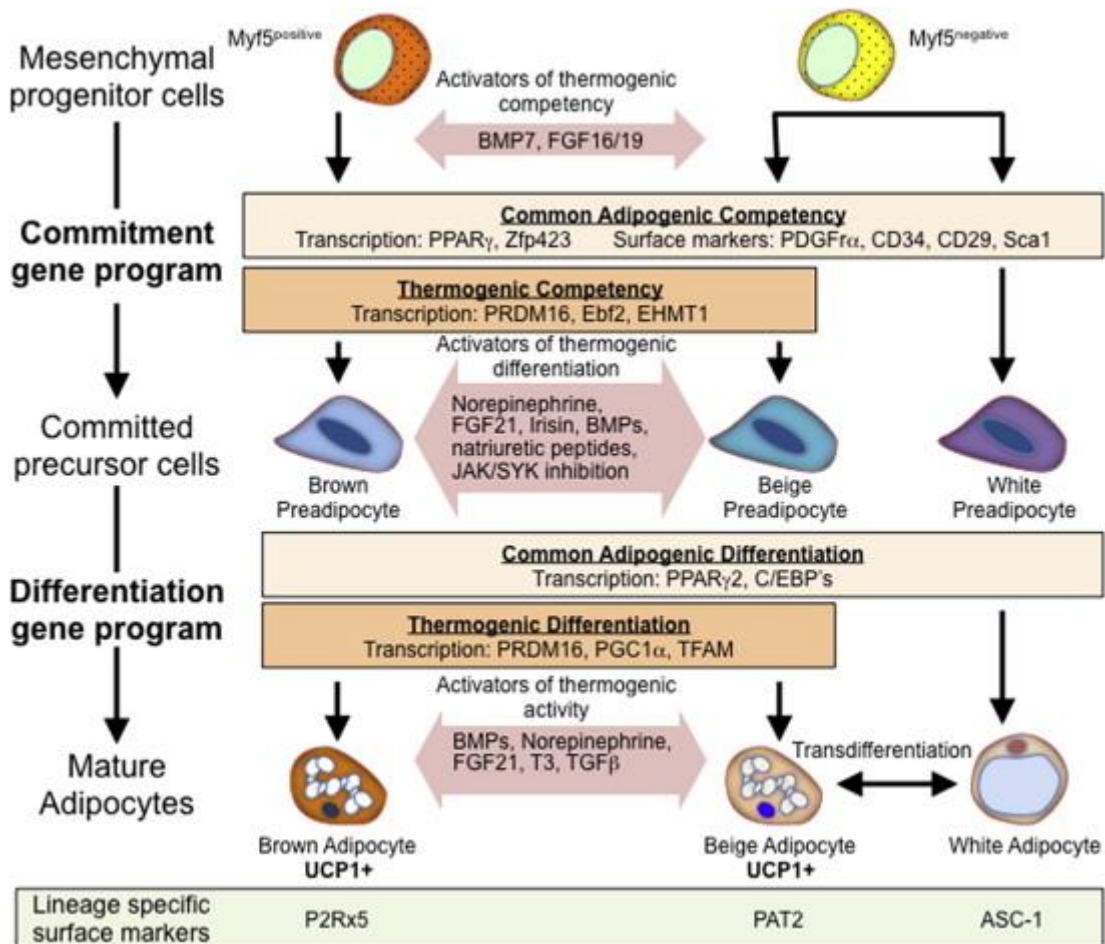
Bien qu'elles aient initialement été considérées par Caplan comme des cellules souches<sup>233</sup>, Sacchetti a révélé en 2007 que les cellules stromales de la moelle osseuse représentaient en fait une population rare et hétérogène de progéniteurs engagés à différents degrés dans des voies de différenciation du lignage mésodermique, et que seulement une petite sous-population de cellules exprimant le CD146 étaient capables d'auto-renouvellement<sup>217</sup>. Depuis, l'appellation « cellules stromales mésenchymateuses » est préférée à « cellules souches mésenchymateuses ».

Elles sont définies *in vitro* par plusieurs caractéristiques :

- Critères minimums<sup>234</sup> :
  - Leur capacité à adhérer au plastique et à proliférer *in vitro* dans des conditions de culture standard
  - L'expression des marqueurs de surface CD105 (Endogline), CD73 (5'terminal nucléotidase), CD90 (Thy-1), et l'absence des marqueurs CD45 (leucocytes), CD14 ou CD11b (monocytes/macrophages), CD79a ou CD19 (lymphocytes B).
  - Leur capacité à se différencier au minimum en adipocyte, chondroblaste et ostéoblaste<sup>223</sup>
- Critères complémentaires :
  - l'expression du CD146 (MUC18), CD10, CD29, CD44, CD26, CD49d (VLA- $\alpha$ 4), CD49e (VLA- $\alpha$ 5) et du CD271 et l'absence du CD31 (cellules endothéliales) et du CD235a (érythrocytes)<sup>235-237</sup>
  - capacité à croître de manière clonale *in vitro* en formant des *Colony Forming Unit*<sup>238</sup>
  - capacités d'immunomodulation (voir ci-dessous)



**Figure 13 : Programmes de différenciations adipocytaire blanche, beige et brune**



Les adipocytes blancs et beiges sont issus d'ASC Pax7<sup>-</sup>Myf5<sup>-</sup> chez la souris, tandis que les adipocytes bruns dérivent d'ASC Pax7<sup>+</sup>Myf5<sup>+</sup> communes avec le lignage musculaire. Lors du processus de différenciation adipocytaire, différents programmes géniques spécifiques sont activés et permettent la maturation des ASC en adipocytes fonctionnels.

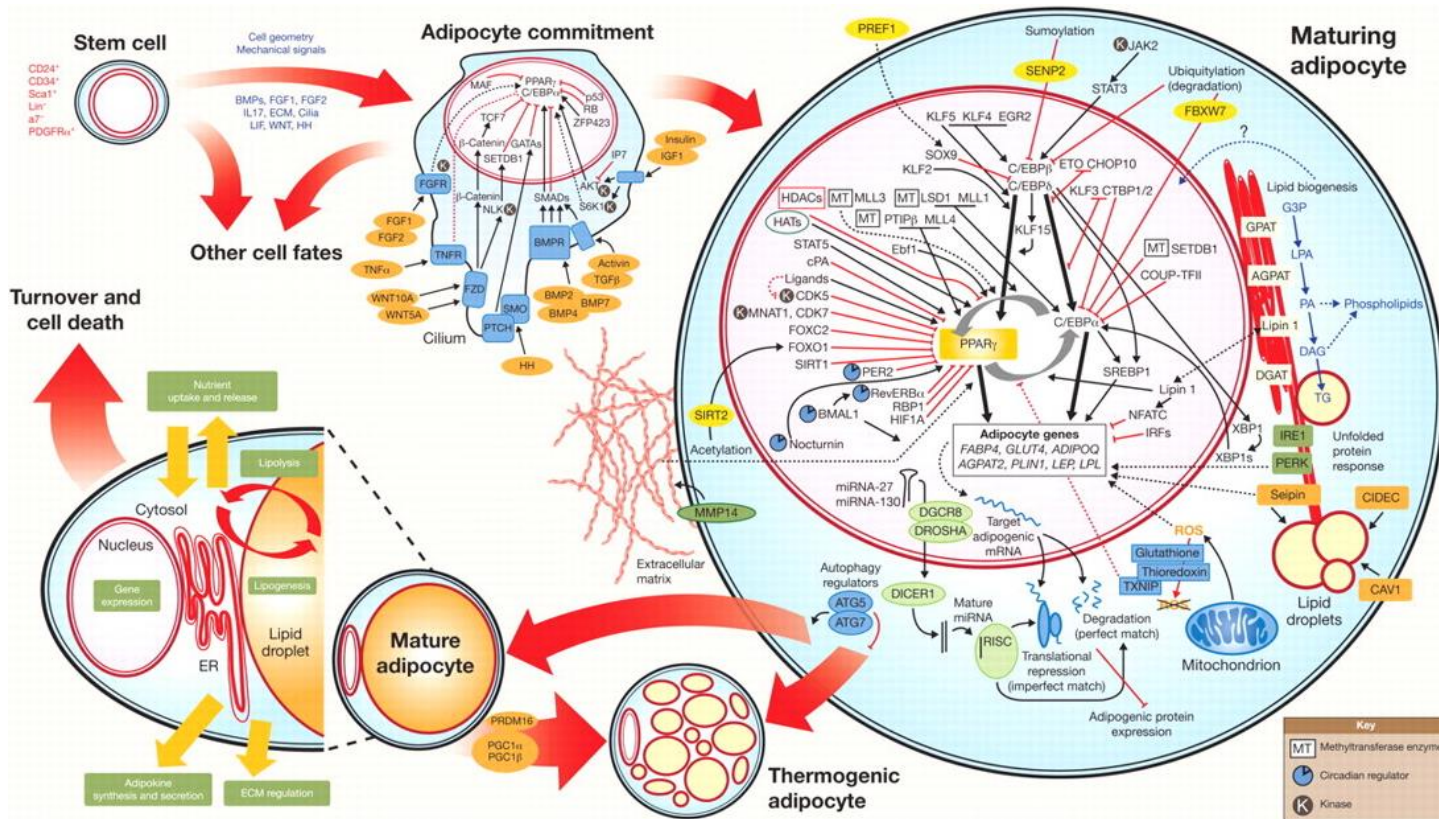
Source : Lynes MD and Tseng YH. *The thermogenic circuit: regulators of thermogenic competency and differentiation* (2) 164-172 (2015)

Les CSM ont des propriétés d'immunomodulation *in vitro*. Les CSM peuvent inhiber la prolifération et la différenciation des lymphocytes T pro-inflammatoires de type Th1 et CD8<sup>+239,240</sup>, et inhiber la fonction et la maturation des cellules présentatrices d'antigène, telles que les cellules dendritiques<sup>241-243</sup>. Il est communément admis que ces propriétés dépendent de leur « *licensing* », c'est-à-dire leur stimulation par un environnement pro-inflammatoire. Cependant des travaux récents de notre laboratoire montrent leur effet immunosuppresseur sur la prolifération des lymphocytes T de manière basale, et le fait que leur interaction avec des macrophages de type pro-inflammatoire M1 via le CD54 augmente ces propriétés immuno-modulatrices<sup>244</sup>. Les CSM interagissent également avec les cellules *natural killer* et inhibent leur cytotoxicité en diminuant l'expression du récepteur activateur *NKp30 and natural killer group 2 member D*<sup>245</sup>. Cependant, la plupart des activités immunomodulatrices des CSM ont été décrites *in vitro*, ces propriétés n'ont pas été démontrées expérimentalement *in vivo*.

### **3. De l'ASC à l'adipocyte mature :**

Les CSM donnent des adipocytes matures et fonctionnels par un processus de différenciation appelé adipogenèse. Toutes les CSM peuvent former des adipocytes, mais les ASC sont les spécialistes de l'adipogenèse<sup>3</sup>. Les adipocytes blancs dérivent de cellules Pax7<sup>-</sup>Myf5<sup>-</sup> alors que les bruns dérivent de cellules Pax7<sup>+</sup>Myf5<sup>+</sup> communes avec le lignage musculaire<sup>246</sup> (voir figure 13). Lors du processus de différenciation, les ASC suivent une phase d'engagement dans le lignage adipocytaire pour donner un précurseur adipocytaire (aussi nommé pré-adipocyte), puis une phase de différenciation terminale en adipocyte mature. Les stimuli d'engagement et de différenciation provenant de la niche initient et maintiennent l'activation du facteur maître de la différenciation adipocytaire, *Peroxisome Proliferator-Activated receptor-γ* (PPAR<sub>γ</sub>), découvert en 1994. Du fait d'un épissage alternatif, PPAR<sub>γ</sub> est décrit selon deux isoformes qui diffèrent dans la partie N-terminale de la protéine : PPAR<sub>γ</sub>1 et PPAR<sub>γ</sub>2. Seul PPAR<sub>γ</sub>2 est nécessaire est suffisant à la formation d'adipocytes<sup>247</sup>. Lors du processus de différenciation adipocytaire, les cellules changent de forme et s'enrichissent en lipides. Elles passent d'un phénotype allongé et fibroblastique à une apparence circulaire et arrondie<sup>248</sup>. Ces modifications morphologiques sont notamment

**Figure 14 : Facteurs régulateurs de l'adipogenèse**



L'adipogenèse est un processus finement régulé. Les cellules souches s'engagent dans le lignage adipocytaire et donnent un préadipocyte qui se différencie pour donner un adipocyte mature. Abréviations non contenues dans le texte du manuscrit : AGPAT : 1-acylglycerol-3-phosphate O acyltransferase ; ATG : autophagy gene protein ; BMAL1 : brain and muscle Arnt-like protein 1 ; CAV1 : caveolin 1 ; CDK : cyclin-dependant kinase ; CHOP10 : C/EBP homologous protein 10 ; COUP-TFII : chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II ; cPA : cyclic phosphatidic acid ; CTBP : C-terminal binding protein ; DGCR8 : DiGeorge syndrome critical region gene 8 ; EGR2 : early growth response 2 ; ER : endoplasmic reticulum ; ETO : eight twenty-one ; FBXW7 : F-box- and WB-repeat-containing protein 7 ; FOX : forkhead box protein ; FZD : frizzled family receptor ; HAT : histone acyltransferase ; HDAC : histone deacetylase ; HH : Hedgehog ; HIF1 $\alpha$  : hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  ; IP7 : inositol pyrophosphate ; IRE1 : inositol-requiring ; IRF : interferon regulatory factor ; LIF : leukaemia inhibitory factor ; LPA : lysophosphatidic acid ; LSD1 : lysine-specific demethylase 1 ; MLL : mixed lineage leukaemia ; MNAT1 : menage a trois homolog 1 ; NFATC : nuclear factor of activated T cells cytoplasmic ; NLK : nemo-like kinase ; PER2 : period circadian protein homolog 2 ; PERK : protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase ; PTCH : patched ; PTIP $\beta$  : Pax-transactivation-domain-interacting protein  $\beta$  ; RB : retinoblastoma protein ; RBP1 : retinol-binding protein 1 ; RISC : RNA-induced silencing complex ; ROS : reactive oxygen species ; S6k1 : ribosomal protein S6 kinase 1 ; SENP2 : sentrin-specific peptidase 2 ; SETDB1 : SET-domain bifurcated 1 ; SIRT : sirtuin ; SMO : smoothed ; SREBP1 : sterol-regulatory-element-binding protein 1 ; STAT : signal transducer and activator of transcription ; TXNIP : thioredoxin-interacting protein ; XBP1 : X-box-binding protein 1.

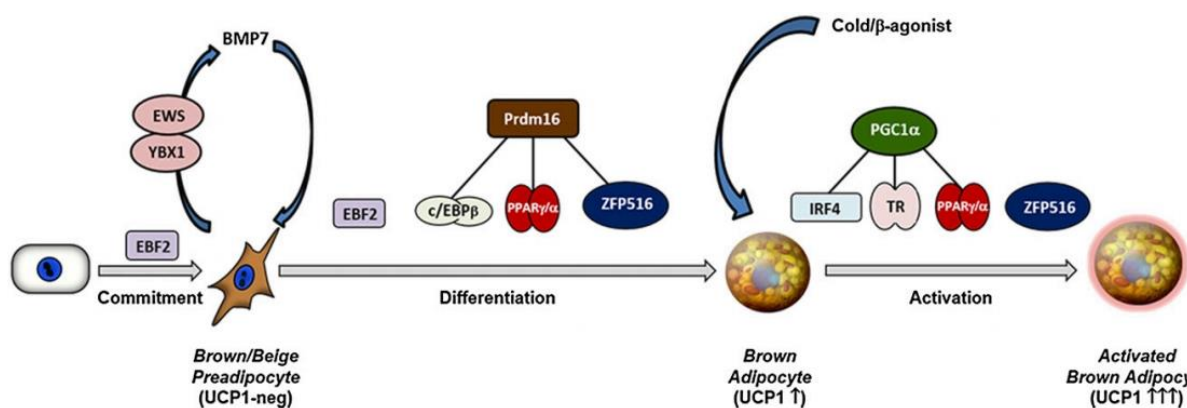
Source : Lowe CR, O'Rahilly S and Rochford JJ. Adipogenesis at a glance. *Journal of cell science* (124) 2681-2686 (2011)

régulées par la MEC via la réorganisation du cytosquelette et la régulation de cascades de signalisation menant à la lipogenèse<sup>249</sup>.

L'engagement adipocytaire est précocement favorisé par une MEC peu rigide chez l'humain<sup>250</sup>, l'inhibition de la voie Wnt (Wingless)<sup>251</sup>, un stimulus Bone Morphogenetic Protein (BMP) 4 ou BMP7<sup>252,253</sup>, et l'activation des facteurs de transcription *CCAAT/enhancer-binding protein* (C/EBP<sub>α/β/δ</sub>), notamment en réponse à l'activation d'une voie adipogénique AMPc – PKA – CREB<sup>254</sup> (voir figure 14). Les facteurs de transcription *Zinc-finger protein* (ZFP) 423 et *transcription factor* (TCF) 7L1 sont également activés de manière précoce et maintiennent l'identité adipogénique tout au long de la vie de l'adipocyte chez la souris<sup>255–257</sup>. L'addition de cofacteurs tels que STAT3 et *Kruppel-like factor 4* (KLF4) et des facteurs épigénétiques (marques d'histones telles que H3K4Me ou H3K27Me) induisent la transcription du facteur maître de l'adipogenèse *PPARγ2*<sup>251</sup>. Le pré-adipocyte ainsi obtenu est défini chez la souris comme une cellule péri-vasculaire engagée et restreinte au lignage adipocytaire mais qui n'entre pas en différenciation terminale sans un stimulus adéquat<sup>176</sup>. Ce pré-adipocyte est PPARγ<sup>+</sup>, Lin<sup>-</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, Sca1<sup>+</sup> et CD24<sup>+</sup> chez la souris, et a la capacité de donner des adipocytes matures et fonctionnels *in vivo* dans un modèle de souris<sup>258</sup>. Au fur et à mesure de la différenciation, les capacités de prolifération des cellules décroissent. Enfin, la différenciation terminale est marquée par l'acquisition de molécules de gestion des substrats : transporteurs de substrats (GLUT, navettes carnitines), constituants des vésicules (pénilipine, CIDEC), acteurs du stockage et de la libération des acides gras (FABP, ATGL, HSL), adipokines (leptine, adiponectine), ...

Concernant les adipocytes beiges/bruns, le facteur *Early B Factor 2* (EBF2) s'ajoute à la cascade de transcription précoce et va orienter la cellule vers le phénotype d'un pré-adipocyte beige/brun<sup>259</sup> (voir figure 15). Connu comme marqueur de BM-MSc natives chez la souris, il joue un rôle clé dans la détermination du lignage adipocytaire beige/brun<sup>260</sup>. Les adipocytes bruns dérivent d'un progéniteur Pax7<sup>+</sup>Myf5<sup>+</sup> dérivant du dermomyotome donnant d'une part un précurseur d'adipocyte brun et d'autre part un myoblaste pour la formation des cellules musculaires squelettiques<sup>246,261,262</sup>. En effet, c'est l'expression de MyoD ou d'EBF2 qui détermine respectivement l'engagement du progéniteur Myf5<sup>+</sup> vers le lignage myogénique ou adipocytaire brun. Ces deux facteurs s'inhibent de manière

**Figure 15 : Régulation transcriptionnelle de la différenciation et de l'activité des adipocytes bruns**



Chez la souris, EBF2 marque les pré-adipocytes bruns engagés dans le lignage de différenciation en adipocyte brun. Une boucle autocrine de BMP7 induit l'adipogenèse brune. EBF2, PRDM16 et ZFP516 induisent l'expression de gènes spécifiques du programme brun lors du processus de différenciation. PRDM16 coactive C/EBP $\beta$ , PPAR $\gamma$ , PPAR $\alpha$ , thyroid receptor (TR) et ZFP516. Lors d'une exposition au froid ou lors d'un traitement par des agonistes  $\beta$ -adrénergiques, les adipocytes bruns sont activés et il y a une augmentation de l'expression des gènes contenus dans le programme thermogénique. IRF4 joue un rôle majeur dans le recrutement de PGC1 $\alpha$ , qui co-active les PPARs et le TR pour activer la transcription des gènes thermogéniques et donner un adipocyte brun actif et fonctionnel.

Source : Seale P. *Transcriptional regulatory circuits controlling brown fat development and activation.*

*Diabetes (64) 2369-2375 (2015)*

réciroque, ce qui engage une cellule dans une voie ou l'autre. EBF2 est notamment un cofacteur de PPAR $\gamma$  qui cible les gènes du programme beige/brun. Les adipocytes beiges dérivent chez la souris de progéniteurs Pax7<sup>-</sup>Myf5<sup>-</sup> apparentés à une cellule de type vasculaire musculaire lisse comme pour les adipocytes blancs<sup>170,263–265</sup>. Or de manière remarquable les adipocytes beiges peuvent être générés directement de la conversion des adipocytes blancs, comme cela a été montré par « *lineage tracing* » chez la souris, et en l'absence de prolifération des progéniteurs<sup>104,266–268</sup>. S'ensuivent deux processus parallèles : la mitochondriogenèse via PGC1 $\alpha$ , qui sert de support<sup>269,270</sup> et le programme thermogénique<sup>128</sup>. Malgré un programme commun, des différences existent entre l'adipogenèse brune et beige, pour revue voir Inagaki et al 2017<sup>271</sup>.

La mitochondrie est un organite cellulaire cytosolique ayant un rôle crucial dans le métabolisme de la cellule. Elle assure le cycle de Krebs, la décarboxylation du pyruvate, la  $\beta$ -oxydation des acides gras et la dégradation de certains acides aminés<sup>272</sup>. C'est au sein de la mitochondrie qu'est synthétisé plus de 95% de l'ATP cellulaire. Les protéines mitochondriales sont codées par le génome mitochondrial et le génome nucléaire. Le génome mitochondrial est circulaire et contient 16569 paires de bases. Les gènes mitochondriaux codent 13 protéines, 22 ARN de transfert et 2 ARN ribosomiques<sup>273</sup>. Parmi les 13 protéines on retrouve certaines sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale : deux sous-unités de l'ATP synthase, certaines NADH déshydrogénases du complexe I, la cytochrome c oxydoréductase B du complexe III et certaines cytochrome c oxydases du complexe IV<sup>274</sup>. La majorité des protéines mitochondriales sont codées par le génome nucléaire, synthétisées dans le cytosol et importées dans la mitochondrie<sup>272</sup>. Le facteur maître de la mitochondriogenèse est PGC1 $\alpha$ . Il est transcrit grâce à un ensemble de cofacteurs tels que PRDM16 et le couple PPAR $\gamma$ -EBF2. En tant que co-activateur de PPAR $\gamma$ , la protéine PGC1 $\alpha$  permet la transcription des facteurs précoces de la mitochondriogenèse comme le « *Nuclear Respiratory Factors* » NRF1 et NRF2. Ces derniers induisent conjointement avec CREB (activée par une signalisation AMPc – PKA) la transcription de gènes nucléaires impliqués dans la respiration mitochondriale et la réplication de l'ADN mitochondrial, notamment les *Mitochondrial Transcription Factor A (TFAM)* et les *Mitochondrial Transcription Termination Factor (MTERF)*. Ainsi, la biogenèse



mitochondriale se fait de manière coordonnée avec le noyau<sup>275,276</sup>. La mitochondriogenèse est couplée à la transcription d'UCP1, ces mitochondries des adipocytes beiges/bruns disposent des protéines supportant leur fonction thermogénique.

#### **4. Autres modèles de cellules souches adipogéniques :**

Les hMADs (*human multipotent adipose-derived stem cells*) sont un modèle cellulaire décrit en 2004 par l'équipe de Christian Dani à Nice<sup>277</sup>. Ce sont des ASC non modifiées issues de biopsies de TA pédiatrique. Ce modèle cellulaire est intéressant du fait du jeune âge des donneurs (< 7 ans), permettant aux cellules d'être maintenues en culture jusqu'à 20 passages sans subir de sénescence répliquative. Elles ne sont pas immortalisées, ont un caryotype normal, et ont toutes les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des CSM<sup>278</sup>. Elles peuvent se différencier *in vitro* en adipocyte blanc<sup>279</sup>, adipocyte beige ou brun<sup>280</sup>, ostéoblaste<sup>281</sup>, chondroblaste<sup>282</sup>, et également en cellule endothéliale<sup>283</sup> et en myoblaste<sup>277</sup>. Ce modèle est surtout utilisé pour l'étude de l'adipogenèse des tissus blancs et beiges. En effet, les adipocytes blancs issus de la différenciation de ces cellules montrent des caractéristiques fonctionnelles d'adipocytes natifs : ils sécrètent des adipokines telles que la leptine et l'adiponectine, expriment les récepteurs aux hormones thyroïdiennes et répondent à l'insuline, aux agonistes des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques et aux peptides natriurétiques. De plus, *in vitro*, une activation chronique de PPAR $\gamma$  par la rosiglitazone favorise leur différenciation en adipocyte beige : la quantité et l'activité mitochondriales sont augmentées, et le programme thermogénique (*UCP1*, *CIDEA*, *ELOVL3*, *CPT1b*) est exprimé. Cependant, les cellules hMADs sont Myf5 négatives. Les adipocytes obtenus sont donc plus beiges que bruns. Ce modèle de la conversion des adipocytes blancs en beiges grâce à une exposition brève des adipocytes blancs obtenus à la rosiglitazone a été bien étudié<sup>266,284</sup>. Pour résumer, les hMADs sont un modèle d'étude de l'adipogenèse à partir de CSM humaines jeunes bien caractérisées pour l'obtention d'adipocytes blancs et beiges matures et fonctionnels *in vitro*.

Les iPS (*induced-pluripotent stem cells*) sont des cellules souches pluripotentes obtenues à partir de cellules différenciées par reprogrammation (voir chapitre reprogrammation cellulaire). Leur potentiel adipogénique a été démontré





en 2009 par Taura et collaborateurs<sup>285</sup>. Cependant, l'obtention d'adipocytes beiges ou bruns à partir d'iPS ne se fait pas selon les mêmes protocoles qu'à partir de progéniteurs adultes. Il était nécessaire de forcer l'expression de PPAR $\gamma$ 2<sup>286</sup> ou de Pax3<sup>287</sup>. Récemment, il a été possible d'obtenir des progéniteurs d'adipocytes beiges/bruns fonctionnels à partir d'iPS sans transfection<sup>288,289</sup>. L'utilisation du milieu de culture *Endothelial cell Growth Medium 2* (EGM2) et d'un inhibiteur de la voie *Transforming Growth Factor  $\beta$ 1* (TGF $\beta$ 1)/Activine permet en effet l'obtention d'adipocytes riches en lipides exprimant *FABP4*, *PLIN1*, *UCP1*, *PAX3*, *DIO2*, *CD137*, *ZIC1*, *CIDEA* et capables de répondre à l'insuline.



## **Chapitre 3 : La plasticité**

Un autre processus de formation des adipocytes est la plasticité. La plasticité est une notion acceptée par de nombreuses disciplines. Dans la littérature, la plasticité amène à des notions de malléabilité, docilité et mollesse. En physique, on dit d'un matériau qu'il est plastique s'il est capable de se déformer sans rompre et qu'il résiste à un stress lui étant appliqué (une force physique par exemple). En biologie, la plasticité est définie par la capacité d'un organisme / un tissu / une cellule à changer de phénotype / d'identité / de fonction en réponse à des variations de l'environnement. La plasticité cellulaire est la capacité d'une cellule à se convertir en un autre type cellulaire de manière spontanée ou par des signaux externes ou des expériences de perturbation de gènes. En résumé, la plasticité est la faculté d'adaptation à un changement par la modification d'un état. Nous rediscuterons de cette définition dans la partie « Discussion générale » de ce manuscrit. Lorsque nous parlons de plasticité, il faut tenir compte de l'échelle. Ici, nous nous intéressons à la plasticité tissulaire et cellulaire.

### **1. La plasticité du TA chez l'adulte**

Le TA est un organe plastique qui, selon les stimuli, présente une réponse adaptative aux variations des besoins énergétiques de l'organisme (repas - effort physique), des conditions environnementales extérieures (froid - chaud) ou intra-tissulaires (métabolites), le TA change de phénotype et de fonction. On parle de remodelage et de plasticité du tissu. Cette capacité est telle que l'on décrit une grande variabilité de morphotypes à l'échelle des individus (maigreurs versus obésité). À l'échelle cellulaire, les adipocytes qui le composent sont plastiques car il est décrit des adipocytes blancs, bruns, beiges et roses (voir section 1. b. iii. La lactation), et que des stimuli biologiques peuvent entraîner des transitions d'un type d'adipocyte à un autre.

#### **a. La plasticité du TA**

##### **i. Variations de la balance énergétique**

La fonction première du TA blanc est la gestion des substrats énergétiques en fonction des variations environnementales. Lorsque la balance énergétique



penche en faveur du stockage, c'est-à-dire que les apports surpassent les dépenses, le TA est remodelé pour s'adapter aux surplus. Il croît par augmentation de la taille (hypertrophie) puis du nombre (hyperplasie/adipogenèse) d'adipocytes<sup>205,290-292</sup>. Le remodelage du contenu adipocytaire s'accompagne d'une synthèse ou d'une dégradation et un remodelage de la MEC, et la formation de nouveaux vaisseaux sanguins par le processus d'angiogenèse<sup>293-295</sup>. Cependant, une fine régulation de ces processus est nécessaire<sup>296,297</sup>. Des adipocytes trop hypertrophiques induisent une inflammation tissulaire<sup>298,299</sup> et une MEC trop fibreuse restreint la capacité d'expansion du TA<sup>198,203,300,301</sup>. Si le TA atteint sa limite d'expansion ou n'est plus fonctionnel, une inflammation apparaît<sup>180</sup> et des dépôts ectopiques lipotoxiques se forment au sein d'autres organes tels que le foie, le pancréas, les muscles et les vaisseaux sanguins, générant des maladies métaboliques associées à l'obésité<sup>302-305</sup>. Ainsi, la plasticité fonctionnelle du TA blanc préserve des maladies associées à l'obésité.

A l'inverse, lorsque la balance penche en faveur de la dépense énergétique, le TA est remodelé pour s'adapter à la perte des substrats énergétiques. Le TA est ainsi très flexible du fait de ses variations de morphotype rapides et continues, de manière quotidienne en fonction des repas, ou chronique lors de régimes hyper ou hypo-caloriques. La chirurgie bariatrique permet d'améliorer le métabolisme des lipides, de restaurer la sensibilité à l'insuline et de diminuer l'inflammation chronique<sup>306,307</sup>. Les patients ont une forte diminution de la taille des dépôts ectopiques et des différents TA<sup>308-310</sup>. Leur espérance de vie est ainsi améliorée<sup>306</sup>. Cependant, il semblerait que le remodelage du tissu consiste en une diminution de la taille des adipocytes mais pas du nombre<sup>206,311</sup>.

## ii. Thermogenèse

Le TA brun s'active plus ou moins pour réguler la thermogenèse de manière fine en fonction des besoins de l'organisme en réponse à un stress thermique. C'est pour cela que les dépôts de TA brun prennent en volume par imagerie <sup>18</sup>F-FDG-PET-Scan lorsque les individus sont exposés à une baisse de température. De plus, les adipocytes bruns qui le composent peuvent s'adapter à l'échelle cellulaire par un enrichissement en mitochondries thermogéniques ou par l'expression d'une acétyl-CoA hydrolase. Cette enzyme leur permet de contourner



le cycle de Krebs pour l'oxydation des acides gras, et donc de produire de la chaleur plus rapidement/efficacement.

## **b. La plasticité des adipocytes**

### **i. Froid / Chaud**

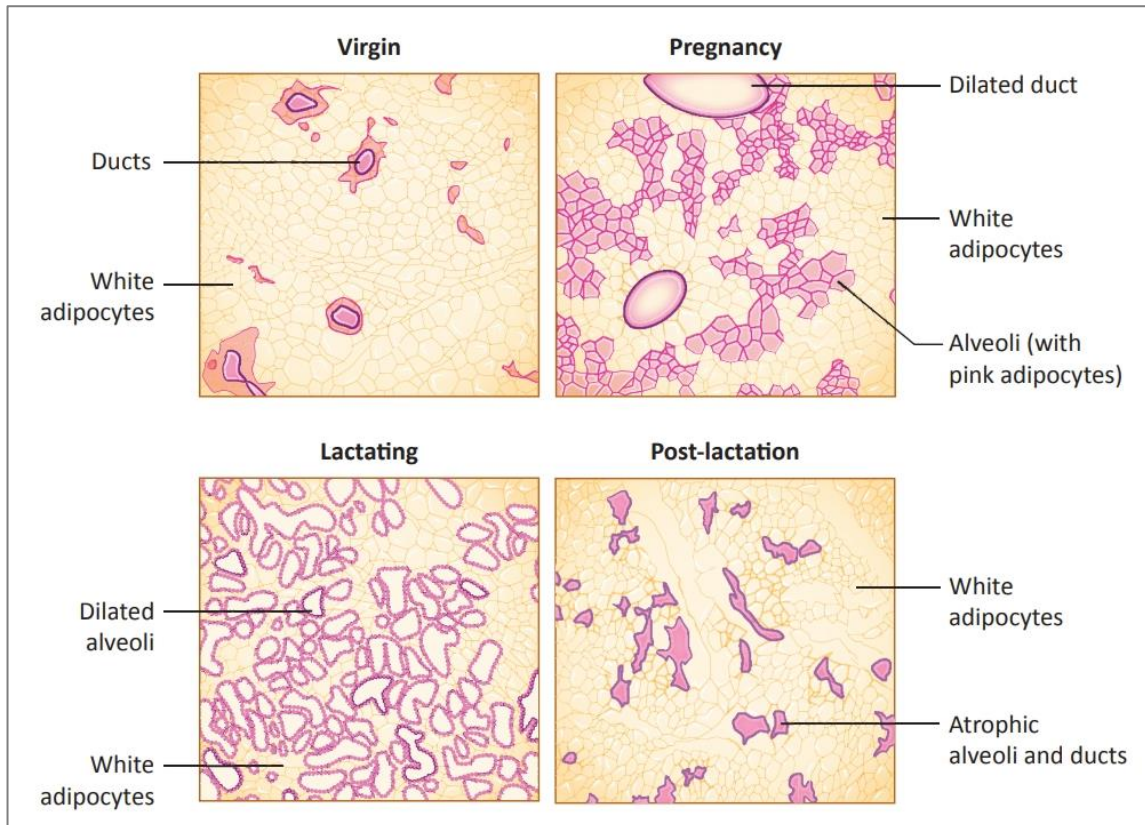
La température extérieure à laquelle un individu est exposé varie tout au long de la journée, de ses déplacements, des saisons ou de son lieu de vie. Pourtant, la température corporelle est maintenue dans un équilibre dynamique autour de 37°C, c'est l'homéostasie thermique. Une température corporelle inférieure à 35°C est une hypothermie qui peut entraîner le coma puis la mort. À température ambiante, le TA blanc par les adipocytes blancs, stocke et libère l'énergie en réponse aux besoins d'énergie ; le TA beige est dormant et inactif car le TA brun assure la fonction thermogénique basale de l'organisme. Lors d'une exposition au froid, les TA bruns et beiges sont stimulés<sup>312</sup>. Ce dernier augmente en quantité<sup>103</sup>. Chez la souris, les adipocytes beiges apparaissent par activation d'adipocytes beiges préexistants à l'état dormant puis par conversion d'adipocytes blancs<sup>104</sup>. Enfin, si le stimulus perdure, l'adipogenèse beige permettra l'apport de nouveaux adipocytes thermogéniques. Toutefois, si le stress de baisse de température environnementale s'arrête, la balance homéostatique penche en faveur de la thermolyse : les adipocytes beiges redeviennent dormants puis blancs. Cependant, une mémoire cellulaire est gardée. Il a notamment été montré par marquage et suivi de cellules (*lineage tracing*) dans le TA blanc chez la souris que parmi une population hétérogène d'adipocytes blancs et beiges, les adipocytes beiges récemment activés par une exposition au froid étaient ceux réactivés lors d'une exposition secondaire au froid<sup>104</sup>. Cette mémoire est notamment régulée au niveau épigénétique : marques d'histones, facteurs pionniers, facteurs de transcription.

### **ii. Stress métabolique : le lactate**

Le TA a également montré de grandes capacités d'adaptation à son environnement métabolique chez la souris. En plus de la signalisation  $\beta$ 3-adrénergique, plusieurs autres stimuli peuvent induire le brunissement des TA. Le laboratoire a notamment démontré qu'un environnement riche en lactate induit une



**Figure 16 : Évolution histologique de la glande mammaire murine lors de la lactation**



Chez la souris, la glande mammaire est majoritairement constituée d'adipocytes blancs. Quelques conduits sont présents chez la femelle non fécondée. Lors de la gestation, les cellules épithéliales entourant les alvéoles mammaires sont remplies de lipides, ce sont les adipocytes roses. Ces adipocytes roses apparaissent au sein du tissu par transdifférenciation des adipocytes blancs et restent jusqu'à la période de lactation. Durant la phase d'involution qui suit la lactation, les adipocytes roses disparaissent avec l'involution des alvéoles, et les adipocytes blancs deviennent majoritaires au sein du tissu mammaire.

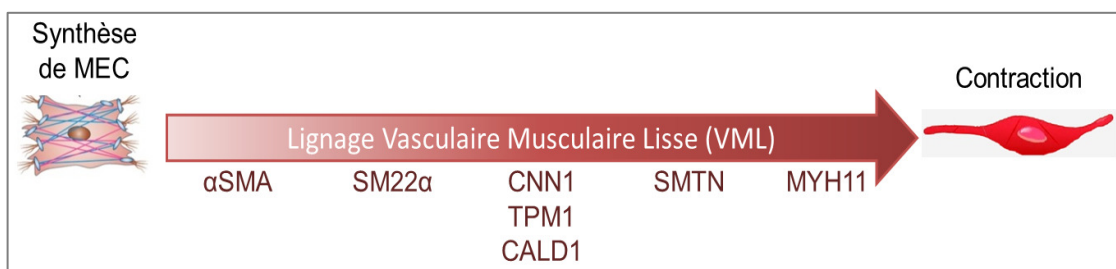
Source : Cinti S. Pink Adipocytes. *Trends Endocrinol Metab* **29**, 651-666 (2018)

conversion des adipocytes blancs murins en adipocytes beiges<sup>313</sup>. Le lactate est produit à partir du pyruvate lorsque le flux glycolytique dépasse les capacités oxydatives de la cellule et ce, quel que soit la pression en oxygène. Considéré longtemps comme un simple déchet métabolique, il peut aussi être consommé par des cellules et alimenter leur métabolisme oxydatif, servir de substrat pour les voies de biosynthèse, par exemple la voie de la néoglucogénèse ou encore le cycle de Cori, et agir comme molécule de signalisation, on parle de lacthormone<sup>314</sup>. Au sein des adipocytes, l'augmentation de l'état redox intracellulaire (rapport NADH/NAD<sup>+</sup>) induite par la conversion du lactate en pyruvate par l'activité de la lactate déshydrogénase est à l'origine de l'augmentation de l'expression d'*Ucp1*<sup>313</sup>. Étant donné qu'UCP1 accélère le fonctionnement de la chaîne respiratoire et diminue ainsi le ratio NADH/NAD<sup>+</sup>, le laboratoire a proposé l'hypothèse selon laquelle l'apparition des adipocytes beiges constituerait un mécanisme adaptatif pour lever de fortes pressions redox extracellulaires<sup>315</sup>. En plus de réguler l'expression d'UCP1, le lactate augmente l'expression et la sécrétion de la batokine FGF21 (qui induit le browning du TA blanc chez la souris<sup>316,317</sup>), et ce via une phosphorylation transitoire de la p38-MAPK<sup>318</sup>. Ainsi, suite à un stress métabolique, les adipocytes blancs deviendraient beiges pour préserver l'homéostasie du TA et/ou des autres tissus en réponse à ce stress redox. Il est à noter que les corps cétoniques de type  $\beta$ -hydroxybutyrate induisent des effets similaires au lactate sur la plasticité des adipocytes<sup>313,318</sup>. Depuis ces travaux du laboratoire, la régulation du browning par ces métabolites à fort potentiel redox a été démontré par ailleurs<sup>319</sup>. L'ensemble de ces travaux reste cependant à confirmer chez l'humain.

### iii. La lactation

Lors de la grossesse, de l'allaitement, et en période post-lactation, le TA entourant la glande mammaire subit des modifications morphologiques, phénotypiques et fonctionnelles drastiques (voir figure 16). Très étudié chez la souris, le développement et l'involution des alvéoles de la glande mammaire lors de la grossesse et de la période post-lactation se fait en 2 étapes concomitantes avec la disparition et la réapparition du TA de la glande mammaire respectivement : une première phase où les alvéoles sont constituées de cellules épithéliales vides de toute gouttelette lipidique et dérivant de la prolifération de cellules souches ; et une seconde phase où les cellules épithéliales se chargent en lipides alors que le TA

**Figure 17 : Lignage VML**



Les cellules vasculaires musculaires lisses (VML) sont plastiques, elles peuvent passer d'un phénotype indifférencié proliférateur et producteur de Matrice Extra-Cellulaire (MEC) à un phénotype contractile. Pour passer d'un phénotype à un autre, les cellules expriment plus ou moins l'ensemble des protéines contractiles, canaux ioniques et molécules de transduction du signal nécessaires à leur fonction.  $\alpha$ SMA : actine musculaire lisse de type  $\alpha$  ; SM22 $\alpha$  : transgeline ; CNN1 : calponine 1 ; TPM1 : chaîne  $\alpha$  de la tropomyosine ; CALD1 : h-caldesmon ; SMTN : smootheline ; MYH11 : chaîne lourde de la myosine de type 11.

*Adapté de : Owens GK. Regulation of Differentiation of Vascular Smooth Muscle Cells. Physiological Reviews 75, 487-517 (1995)*

diminue. Ces cellules épithéliales chargées en lipides sont issues de la transdifférenciation des adipocytes blancs du TA en adipocytes dits roses car il n'y a pas de cellules prolifératives BrDU<sup>+</sup> durant cette période<sup>320,321</sup>. Cependant, on ne sait pas si des mécanismes de transition épithéliaux-mésenchymateuse interviennent dans ce processus car cela n'a pas été décrit. Les adipocytes roses sont définis par 3 caractéristiques : ils stockent des acides gras, ils apparaissent dans le TA sous-cutané de la glande mammaire chez la femelle gestante et en lactation, enfin, ils ont une couleur rose au niveau macroscopique<sup>322</sup>. Morphologiquement, ce sont des cellules qui ont de grosses mitochondries et un réticulum endoplasmique développé, de nombreux peroxyosomes et qui émettent des projections cytoplasmiques. Ils sont multiloculaires avec seulement quelques grosses vacuoles lipidiques, et non de nombreuses petites grappes comme on peut en trouver dans les adipocytes bruns ou beiges. En plus de sécréter les constituants du lait maternel, il semblerait que ces adipocytes roses sécrètent de la leptine, ce qui diminue le risque d'obésité chez le nouveau-né<sup>323</sup>. Inversement, en fin de lactation, on observe une conversion des adipocytes roses en blancs, et l'on revient à la morphologie et la fonction du TA mammaire originel. Ainsi, le TA est capable de s'adapter par transdifférenciation transitoire d'adipocytes blancs en roses et inversement.

### **c. Autres processus de plasticité cellulaire du TA :**

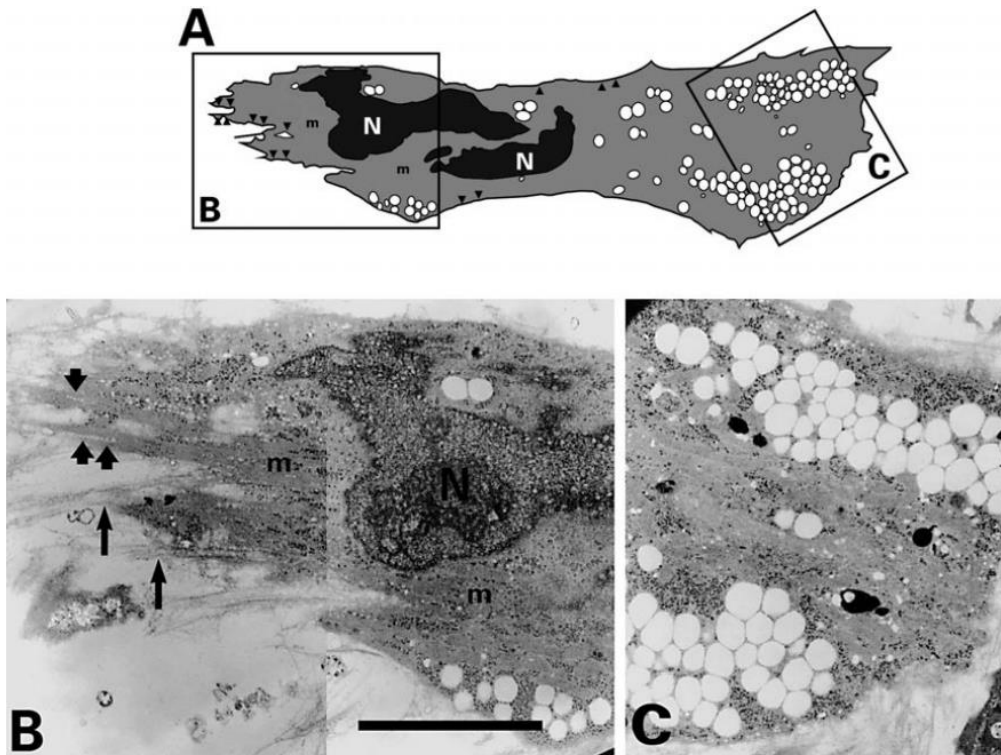
Le TA est traversé par de nombreux vaisseaux sanguins. Les cellules Vasculaires Musculaires Lisses (VML) entourent certains vaisseaux sanguins et en régule le diamètre, ainsi que la pression du sang qui s'écoule à l'intérieur et donc la distribution du flux sanguin. Ces cellules prolifèrent peu et expriment de nombreuses protéines impliquées dans leur fonction contractile (voir figure 17). Cependant, lors de la vasculogenèse ces cellules prolifèrent davantage et sécrètent beaucoup de MEC de type collagènes et élastines. Un des facteurs clé dans la fonction de ces cellules est le TGFβ1, notamment par son rôle pro-différenciant de ces cellules en myofibroblastes. Des études par « *lineage tracing* » chez la souris ont montré que les adipocytes dérivent de progéniteurs péri-vasculaires exprimant ou ayant exprimé la *Myosin Heavy Chain 11* (MYH11), un marqueur tardif de cellules VML<sup>265</sup> et l'actine α musculaire lisse (αSMA), un marqueur précoce de cellules VML<sup>324</sup>. De manière remarquable, les cellules VML sont plastiques car



selon les sollicitations physiologiques de l'organisme elles peuvent commuter entre un phénotype contractile différencié  $\alpha\text{SMA}^+$   $\text{MYH11}^+$  s'apparentant au myofibroblaste et un phénotype non différencié n'exprimant pas ou peu l' $\alpha\text{SMA}$  et  $\text{MYH11}$  et sécrétant de la MEC<sup>325</sup>. On parle de switch phénotypique entre un phénotype contractile et un phénotype synthétique. Le facteur  $\text{KLF4}$  serait impliqué dans cette plasticité, par des processus similaires à ceux retrouvés dans la reprogrammation cellulaire<sup>326-329</sup>. Cette plasticité dépend également de l'intégration complexe de nombreux signaux environnementaux<sup>330</sup> : facteurs sanguins ( $\text{TGF}\beta_1$ ,  $\text{PDGF}\beta$ , angiotensine II, endothéline 1), interactions entre cellules VML (contacts cellule-cellule, facteurs autocrines), influences de cellules endothéliales (facteurs diffusibles, oxyde nitrique, contacts cellulaires, perméabilité vasculaire), forces mécaniques (forces hémodynamiques, étirements passifs, pressions actives), MEC (molécules d'adhésion, MMPs), contrôles neuronaux (neurotransmetteurs, contrôle du tonus vasculaire), environnement métabolique (apports en  $\text{O}_2$ ) et stimuli de blessures ou d'athéromes (productions et/ou présence de lipides, traumatismes mécaniques, toxines, espèces réactives de l'oxygène, médiateurs et cellules inflammatoires). Il est également décrit des cellules VML de différents phénotypes au sein des plaques d'athérome<sup>325</sup> : chez le porc<sup>331</sup> et le primate<sup>332</sup> le  $\text{PDGF}$  augmente la migration et la prolifération des cellules VML ce qui leur donne un phénotype de cellules VML microprolifératives ; les cytokines inflammatoires telles que le  $\text{TNF}\alpha$  et l' $\text{IL-1}$  induisent un phénotype inflammatoire des cellules VML par la surexpression d' $\text{IL-6}$ , d'*Inter Cellular Adhesion Molecule-1* ( $\text{ICAM-1}$ ) et de MMPs<sup>333,334</sup> ; un phénotype osteo-chondrogenique de cellules VML a même été décrit chez la souris pour son rôle dans la calcification de la plaque d'athérome<sup>335</sup>.

Bien que l'origine développementale des cellules VML ne soit pas bien définie, les fibroblastes et myofibroblastes appartiennent au lignage VML. Or la perte de fonction de la protéine *Nieman-Pick Type C2* ( $\text{NPC2}$ ) dans des fibroblastes de peau humaine augmente l'expression de marqueurs d'adipocytes, dont  $\text{PPAR}\gamma$ <sup>336</sup>. Lorsqu'ils sont cultivés en présence d'un cocktail adipogénique, ces fibroblastes donnent des adipocytes riches en vésicules lipidiques alors que les fibroblastes exprimant  $\text{NPC2}$  ne possèdent pas de gouttelettes marquées à l'*Oil Red O*. Ainsi les fibroblastes de la peau peuvent se transdifférencier en adipocytes chez l'humain et  $\text{NPC2}$  régule cette plasticité. Par ailleurs, via des modèles de

**Figure 18 : Photo d'un lipo-fibroblaste ou fibro-adipocyte**



Etude ultrastructurale d'un myofibroblaste adipocytaire (*tel que dénommé dans la publication source*) dérivé des cellules STRO-1<sup>+</sup> de moelle osseuse humaine. La cellule est polarisée avec un pôle myofibroblastique (B) et un pôle adipocytaire à l'opposé (C). Le pôle myofibroblastique contient des microfilaments et des pontages entre fibres alors que le pôle adipocytaire contient de nombreuses petites gouttelettes lipidiques. N : noyau ; m : myofilaments ; tête de flèche : caveolae ; longues flèches : pontages de fibres. Microscopie électronique à transmission ; barre d'échelle : inconnue.

*D'après : Dennis JE, Carbillet JP, Caplan AI, Charbord P. The STRO-1+ marrow cell population is multipotential. Cells Tissues Organs 170,73-82 (2002)*

souris transgéniques *SM22-Cre;R26R* et *αSMA-CreER<sup>T2</sup>;R26R*, il a été montré récemment *in vivo* l'apparition d'adipocytes dérivant de cellules de type myofibroblastique au niveau du follicule pileux lors des processus de cicatrisation suite à une blessure<sup>42</sup>. Or la perte de PPAR $\gamma$  dans ces cellules ou la délétion du récepteur 1a des BMP empêche ce processus de transdifférenciation, suggérant l'implication de ces voies. Ce processus de conversion lipo-fibroblastique ou fibro-adipogénique a également été mis en évidence chez la souris lors de la résolution de la fibrose pulmonaire induite par la bleomycine<sup>337</sup>. Le fibroblaste passe d'un phénotype myofibroblastique avec l'expression d'un programme myogénique lors de la formation de la fibrose, à un phénotype lipofibroblastique exprimant un programme adipogénique lors des phases de résolution de la fibrose (voir figure 18). Enfin, les CSM, quel que soit leur tissu d'origine (moelle osseuse, TA ou cordon ombilical) se différencient spontanément en myofibroblastes lorsqu'elles sont cultivées *in vitro* sur un support rigide tel que le plastique des flacons de culture classiques (rigidité de 10 000 kPa selon le module de Young) et en présence de sérum<sup>250</sup>. Cependant, leur culture sur substrats mous (3kPa ; c'est-à-dire la rigidité du TA blanc murin *in vivo*<sup>338</sup>) diminue l'expression protéique de l' $\alpha$ SMA et augmente l'expression de PPAR $\gamma$  ainsi que la production de lipides sans modification de leur maturité. Il s'agirait donc d'une transdifférenciation entre un myofibroblaste et un adipocyte, et non d'une dédifférenciation suivie d'une différenciation en adipocyte.

Ainsi, l'ensemble des cellules appartenant au lignage VML présentes dans le TA démontre de grandes capacités de plasticité chez les mammifères.

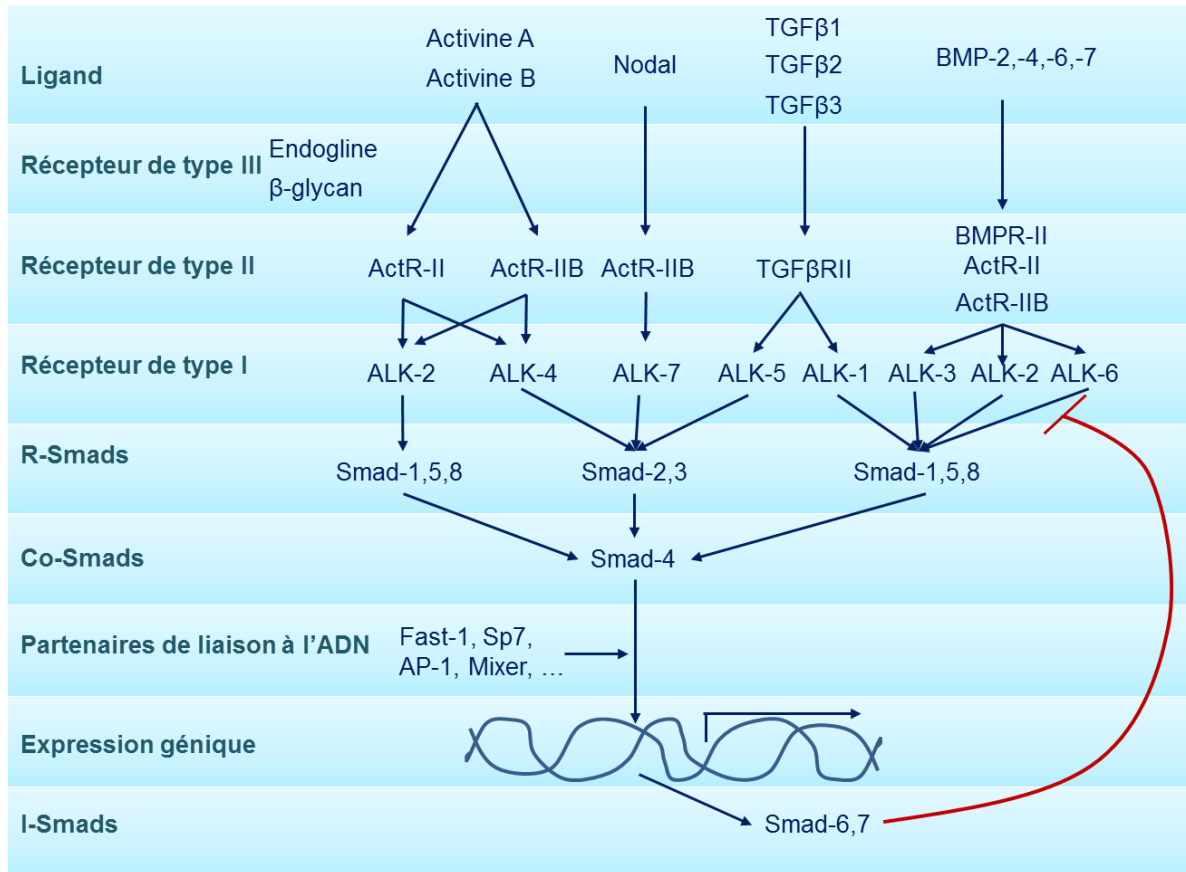
## **2. Transforming Growth Factor $\beta$ :**

Le TGF $\beta$ 1 est une cytokine essentielle à la différenciation des cellules VML vers un phénotype de myofibroblaste. De plus, de nombreux travaux ont montré le rôle clé de cette molécule lors de la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules épithéliales. Le TGF $\beta$ 1 semble donc être une molécule clé impliquée dans les processus de plasticité cellulaire.

### **a. Superfamille des TGF $\beta$**



**Figure 19 : Signalisation canonique de la superfamille du TGFβ**



La voie de signalisation canonique de la superfamille du TGFβ1 passe par différents hétérodimères de récepteurs selon le ligand désigné. L'activation du récepteur à activité sérine/thréonine kinase induit la phosphorylation des facteurs de transduction du signal R-Smads. La liaison des R-Smads avec le Co-Smad SMAD-4 induit la transduction nucléaire du signal pour réguler l'expression des gènes.

Source : Hélène Leménager, STROMALab

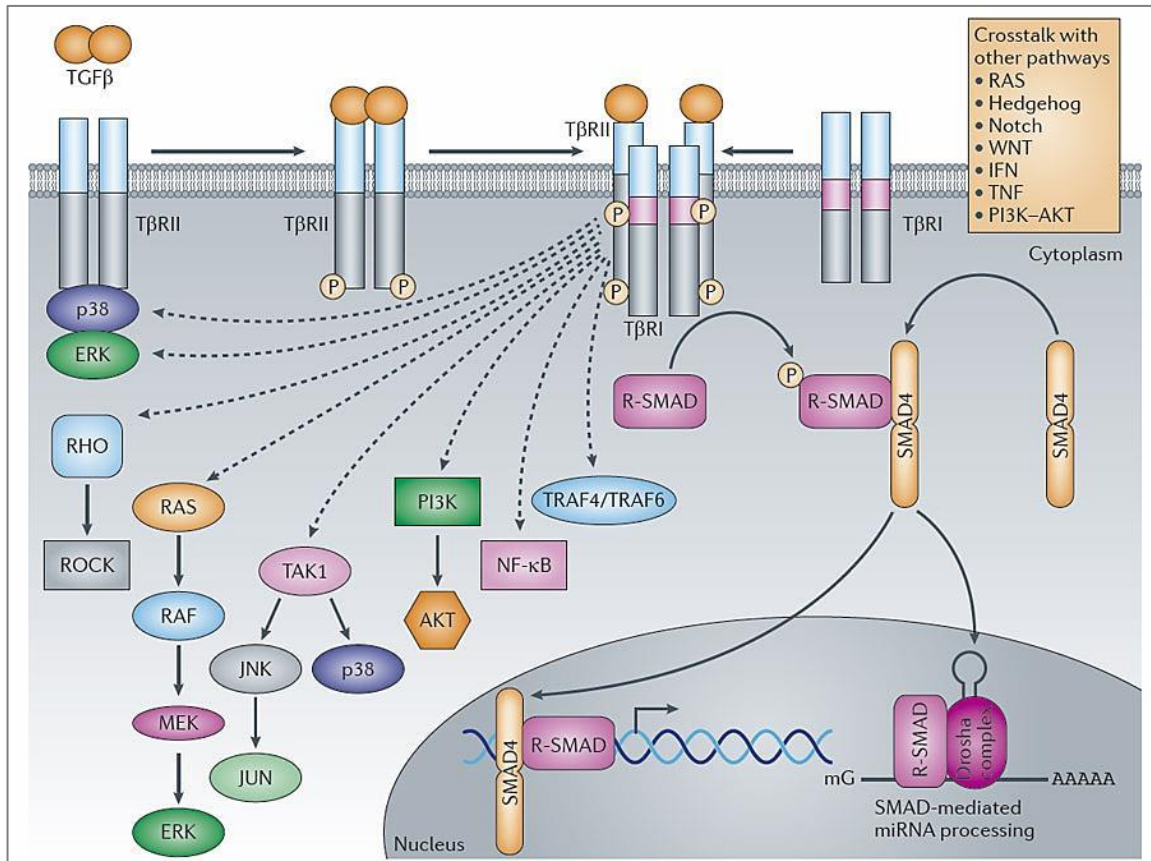
La superfamille des TGF $\beta$  regroupe un ensemble de 33 cytokines dimériques conservées entre les espèces. Elles sont identifiables par leur nœud de cystéines maintenues structurellement par des ponts disulfides<sup>339</sup>. Historiquement, les TGF ont été identifiés comme des facteurs oncogéniques capables de transformer les cellules voisines de la tumeur et de les rendre pro-tumorales, d'où leur nom *Transforming Growth Factor*<sup>340</sup>. Cette famille de cytokines est impliquée dans de nombreux processus physiopathologiques tels le développement, la différenciation, l'angiogenèse, l'apoptose, la survie, la migration cellulaire, les réponses immunitaires, la carcinogenèse, etc... Ces molécules sont réparties en différentes classes : TGF $\beta$  (TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, TGF $\beta$ 3), Activines (Activine A, Activine B, Inhibin), Nodal, BMPs (BMP 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8a, 8b, 10, 11, 15), *growth differentiation factors* (GDF 1 à 15), AMH/MIS. On compte également des effecteurs alternatifs ou accessoires tels que l'Endoglin, le  $\beta$ -Glycan, Cripto et Lefty1/2.

## **b. Signalisation des voies TGF $\beta$**

### **i. Récepteurs**

La voie de signalisation moléculaire des TGF $\beta$  débute par la fixation du dimère de cytokine à son récepteur (voir figure 19). Le récepteur des voies TGF $\beta$  est un complexe hétérodimérique de protéines transmembranaires à activité sérine/thréonine kinase. Le récepteur est constitué de deux unités réceptrices de type II (qui activent le signal) et deux unités réceptrices de type I (qui propagent le signal)<sup>341</sup>. Il existe 5 récepteurs de type II : Activin Receptors type IIA et IIB pour les ligands Activine, Nodal et BMPs ; TGF $\beta$  Receptor type II pour les TGF $\beta$ s ; BMP Receptor II pour les BMPs et AMH Receptor II pour l'AMH. L'accès du ligand à son récepteur peut être régulé par deux classes de protéines. D'une part des protéines qui séquestrent le ligand et empêchent sa liaison au récepteur. On retrouve dans cette classe le *Latency-Associated Peptide* (LAP) qui masque l'épitope de fixation des TGF $\beta$  matures au récepteur, un petit protéoglycan nommé Décorine ou l' $\alpha$ 2-Macroglobuline qui lie le TGF $\beta$  libre, la Follistatine qui lie les Activines et les BMP, et la chordine, le cerberus et Noggin qui lient les BMPs. D'autre part, des protéines solubles ou ancrées à la membrane plasmique à proximité du récepteur servent de co-récepteurs, ou récepteurs accessoires, en favorisant ou inhibant la

**Figure 20 : Voies non canoniques de signalisation du TGFβ1**



La fixation du TGFβ sur son récepteur de type II entraîne son hétérodimerisation avec le récepteur de type I et la phosphorylation de ce dernier. La transduction du signal TGFβ se fait selon une voie canonique passant par les SMADs et des voies non canoniques diverses.

Source : Akhurst RJ et al. Targeting the TGFβ signalling pathway in disease. *Nature Reviews Drug Discovery* **11**, 790-811 (2012)

liaison du ligand sur son récepteur. On retrouve notamment dans cette classe l'endogline, le  $\beta$ -glycan et Cripto. La fixation spécifique du ligand entraîne un changement de conformation du récepteur de type II induisant l'auto-phosphorylation d'un domaine kinase. Celui-ci phosphoryle alors le récepteur de type I sur une partie riche en Thréonine/Sérine/Glycine dite GS (de séquence TTSGSGSG), localisée à proximité du domaine kinase N-terminal qui est alors activé<sup>342</sup>. Il existe 7 récepteurs de type I : *Anaplastic lymphoma kinase* (ALK) 2, ALK4 et ALK7 pour les Activines et Nodal ; ALK5 pour les TGF $\beta$  ; ALK1 pour le BMP9, le BMP10 et pour de fortes concentrations en TGF $\beta$  ; ALK3 et ALK6 pour les autres BMPs et l'AMH. La transduction du signal se fait ensuite par la phosphorylation d'effecteurs selon une voie canonique passant par les *Small Mothers Against Decapentaplegic homolog* (SMAD). Il existe une voie non canonique de transduction du signal.

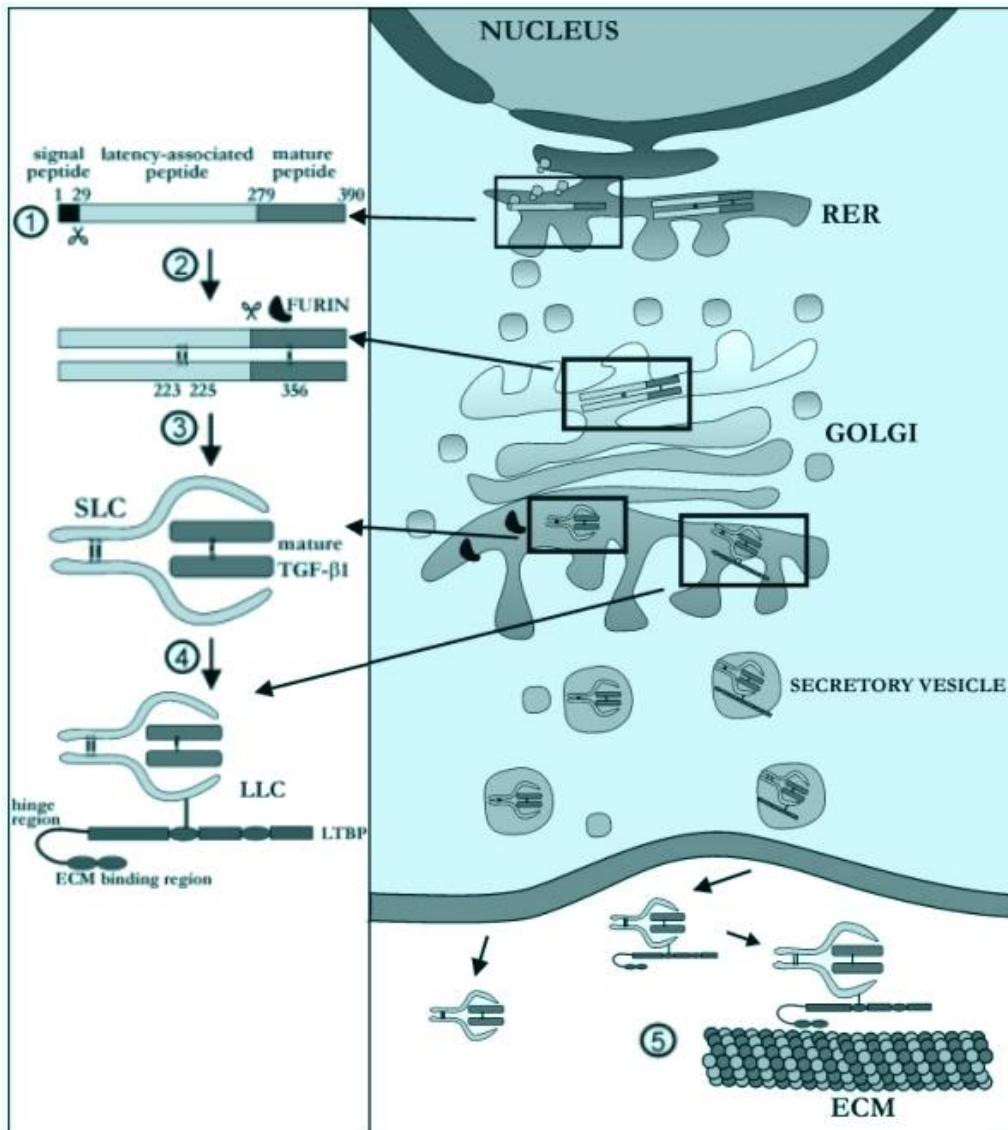
## ii. Voie canonique via les SMADs

Les protéines SMAD sont des protéines de la voie canonique de transduction du signal des TGF $\beta$  jusqu'au noyau. Elles sont constituées d'un domaine MH1 de liaison à l'ADN et un domaine MH2 d'interaction avec les récepteurs de type I activés, avec des protéines cytoplasmiques et avec des cofacteurs de liaison à l'ADN<sup>343</sup>. Il existe trois types de SMAD : les R-SMAD, c'est-à-dire celles régulées par le récepteur, les Co-SMAD, SMAD médiateurs, et les I-SMAD, SMAD inhibiteurs. Les R-SMAD-1,-5, et -8 sont phosphorylés et activés par les kinases ALK-1,-2,-3, et -6, tandis que les R-SMAD-2 et -3 sont activés par ALK-4,-5 et -7. Cette phosphorylation entraîne leur homodimérisation, grâce à leurs domaines MH2 respectifs, puis la formation d'un complexe hétérotrimérique avec Co-SMAD4. Ce complexe est importé dans le noyau et, associé à des coactivateurs ou corépresseurs, il régule la transcription de gènes cibles. Les I-SMAD-6 et -7 inhibent la voie de signalisation des TGF $\beta$  par compétition avec les R-SMAD pour leur interaction avec le récepteur ou le Co-SMAD4. Ils ne possèdent pas de domaine MH1 et ne peuvent donc pas se lier à l'ADN.

## iii. Voies non canoniques

En plus de la voie canonique passant par les SMADs, le TGF $\beta$  peut activer d'autres effecteurs tels que la p38 MAPK, la TGF $\beta$ -*Activated Kinase* 1, les *Tumour*

**Figure 21 : Production, maturation et sécrétion du TGFβ1**



① Le pré-pro-TGFβ1 ; ② dimérisation du pré-pro-TGFβ1 ; ③ clivage entre le peptide d'adressage et la LAP ; ④ sécrétion sous forme latente ; ⑤ séquestration par la matrice extra-cellulaire (ECM) et la Latent-Binding Protein (LTBP). Abréviations : LLC : large latent complex ; RER : rough endoplasmic reticulum ; SLC : small latent complex.

*Adapté de : Janssens K et al. Transforming Growth Factor-β1 to the Bone. Endocrine Reviews 26, 743-774 (2005)*

*necrosis factor Receptor-Associated Factor 4* et 6, la voie Phospho-Inositide-3-Kinase / AKT, la voie des MAPK, la voie JUN N-terminal kinase / JUN, ou encore le *nuclear factor-κB*. Ces effecteurs peuvent également moduler la voie canonique et inhiber l'action du TGFβ<sup>344</sup>. Ainsi la cellule répond aux signaux induits par les TGFβ par combinaison de la voie canonique et des voies non canoniques (voir figure 20).

### c. TGFβ1

Dans la superfamille des TGFβ on retrouve la famille des TGFβ prototypiques, qui regroupe 3 isoformes : TGFβ1, TGFβ2 et TGFβ3, chacun étant codé par un gène différent. Bien qu'ils soient similaires dans leur séquence et qu'ils soient exprimés de manière ubiquitaire, leurs fonctions ne sont pas redondantes *in vivo*. Le TGFβ1 est l'isoforme majoritaire, si bien qu'elle est parfois nommée uniquement TGFβ, pouvant apporter de la confusion dans la littérature.

Le gène codant le TGFβ1 est localisé sur le chromosome 19 du génome humain. Il est transcrit et traduit en une protéine de 390 acides aminés non fonctionnelle (voir figure 21): le pré-pro-TGFβ1. Il s'agit d'une protéine constituée de 3 domaines : un peptide d'adressage aux voies sécrétoires (29 acides aminés), un domaine associé à la latence de la protéine finale nommé LAP (249 acides aminés) et la protéine mature TGFβ1 finale fonctionnelle (112 acides aminés). Le pré-pro-peptide est dimérisé via des ponts disulfures entre des résidus cystéine en position 223, 225 et 356. Une fois adressé à l'appareil de Golgi, le peptide d'adressage est clivé du pré-pro-peptide, puis le LAP est clivé par une convertase de type furine mais maintenu par des ponts non-covalents sur le peptide mature ce qui évite une activation précoce du TGFβ1 dans la cellule<sup>345</sup>. Cette structure est sécrétée par la cellule dans le milieu extra-cellulaire de manière isolée ou liée de manière covalente à la *Latent-Binding Protein* (LTBP). La présence du LAP associé à la forme mature inhibe la liaison du TGFβ1 à son récepteur, conférant latence et régulation de la signalisation par le TGFβ1. De même, par association à la LTBP, le TGFβ1 peut être séquestré au niveau de la MEC ou à la surface de la cellule, générant des stocks de molécules de signalisation<sup>346-348</sup>. Le TGFβ1 mature peut ensuite être activé par 3 mécanismes par lesquels le site d'interaction au récepteur est libéré de son interaction avec le domaine LAP<sup>349</sup> : 1/ dégradation du domaine LAP par des protéases, 2/ changement de conformation du domaine LAP par



interaction avec des intégrines, thrombospondine TSP-1, ..., ou 3/ rupture de la liaison non covalente entre le domaine LAP et la forme mature. Le TGF $\beta$ 1 mature peut alors interagir avec son récepteur et activer les voies de signalisation canoniques et non canoniques en aval.

#### **d. Fonctions**

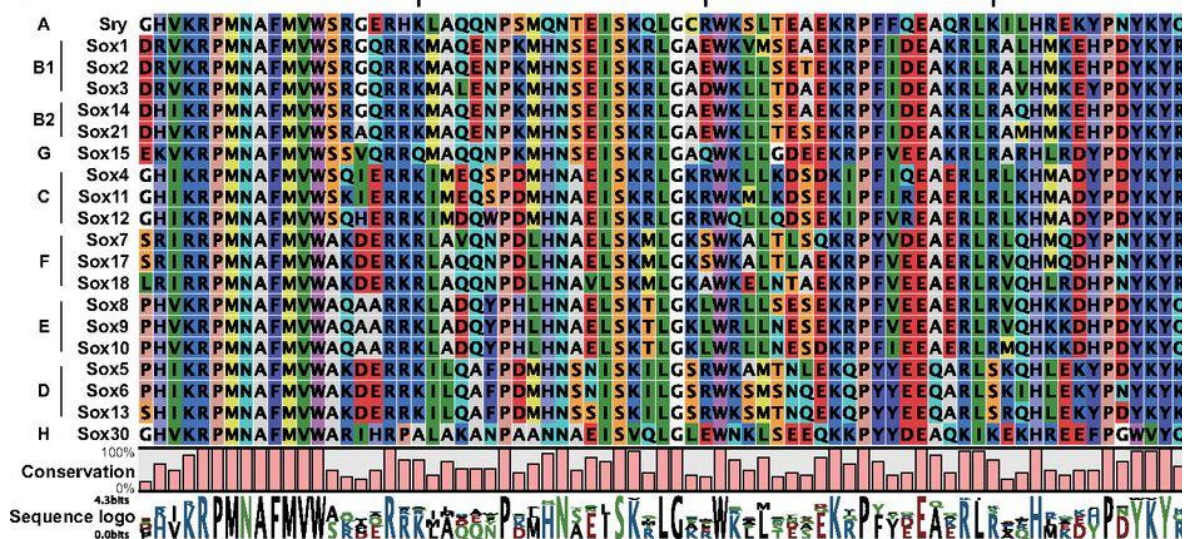
Le TGF $\beta$ 1 régule de nombreux processus cellulaires comme la prolifération, la sénescence, l'apoptose ou encore la transition épithélio-mésenchymateuse. La croissance cellulaire des cellules épithéliales est diminuée en présence de TGF $\beta$ 1, par l'inhibition de l'expression de c-myc<sup>350</sup>, un gène d'activation de la prolifération cellulaire, et la transcription de gènes codant des inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines ce qui arrête le cycle cellulaire en phase G1<sup>351</sup>. Le TGF $\beta$ 1 participe à l'apoptose de nombreux types cellulaires tels que les hépatocytes, les lymphocytes B et les cellules épithéliales<sup>352</sup>. Le facteur de transduction du signal SMAD3 induit la dégradation de Bcl2, une molécule connue pour son rôle anti-apoptotique<sup>353</sup>. De plus, une suractivation de la voie de signalisation TGF $\beta$ 1 par la délétion du I-SMAD SMAD7, augmente l'apoptose des cellules cancéreuses hépatiques<sup>354</sup>. Les cellules épithéliales assurent l'étanchéité de la barrière épithéliale par une forte cohésion inter-cellulaire et l'expression de nombreuses molécules d'adhérence cellule-cellule. Au contraire, les cellules mésenchymateuses ont de fortes capacités de migration et présentent peu de jonctions inter-cellulaires. Le TGF $\beta$ 1 est un inducteur majeur du processus de transition épithélio-mésenchymateuse, notamment dans le cadre du développement des cellules cancéreuses en métastases. Le TGF $\beta$ 1 régule en effet de nombreux programmes cellulaires nécessaires à cette transition comme la réorganisation du cytosquelette, la régulation des jonctions cellulaires ou encore l'acquisition de propriétés migratoires et invasives<sup>355</sup>. De par ses nombreuses fonctions, le TGF $\beta$ 1 est actif à tous les stades de la vie : de l'embryogénèse à l'homéostasie chez l'adulte.

### **3. SRY-related HMG-BOX**

Une autre grande famille de molécules impliquées dans les processus de plasticité est la famille des SRY-related HMG-Box (SOX).



Figure 22 : Famille des facteurs pionniers SOX



Alignement de séquences des 20 SOX murins, répartis en 9 sous-familles visibles à gauche de l'image. Le domaine de liaison à l'ADN HMG est constitué de 79 acides aminés hautement conservés entre SOX. L'homologie de séquences est représentée par le diagramme et le logo sous le tableau.

Source : Kamachi Y. and Kondoh H. Sox proteins: regulators of cell fate specification and differentiation. *Development* **140**, 4129-4144 (2013)

### a. Classe des protéines SOX

La famille SOX regroupe environ 20 membres classés en 9 sous-familles (voir figure 22). Les SOX sont des facteurs de transcription très conservés entre les espèces<sup>356</sup>. Ils sont identifiables par leur domaine *High-Mobility Group* (HMG) de liaison à l'ADN. Ce sont des facteurs de transcription très particuliers, on les appelle des facteurs pionniers car ce sont les premiers arrivés au niveau de la chromatine.

### b. Facteurs pionniers et destin cellulaire

La chromatine est une structure complexe formée de protéines et d'acides nucléiques. L'ADN y est compacté par une série d'enroulements successifs. Ces structures sont composées d'unités de base comprenant deux tours de la molécule d'ADN autour d'un cylindre constitué d'un octamère de 4 protéines histones, on appelle cette conformation le nucléosome. L'ensemble du nucléosome est maintenu par une protéine de liaison, « *Linker* » ou histone H1<sup>357</sup>.

Les modifications de structure de la chromatine régulent la fixation des facteurs de transcription et par conséquent la transcription des gènes<sup>358</sup>. La chromatine existe dans un état dit actif de type A (pour *Active*), qui représente 20 à 40% du génome et porte des marques épigénétiques d'histone hypométhylées et/ou acétylées, c'est à dire ouvert à la transcription des gènes (H3K4me, H3K9/27ac, ...<sup>359</sup>). A l'inverse, 20% de la chromatine existe dans un état dit fermé et portant des marques d'histone hyperméthylées fermées à la transcription, on parle de chromatine de type R (pour « *Repressive* » ; H3K27me, H3K9me, ...<sup>360</sup>). La chromatine de type L (pour *Low signal*) est retrouvée sur 40 à 50% du génome et correspond à une chromatine dont les histones ne sont pas ou peu marquées<sup>361</sup>. Cependant, cette chromatine n'est conformationnellement pas accessible aux facteurs de transcription classiques, et une ouverture de cette chromatine nécessite des facteurs particuliers. Les facteurs pionniers, qui sont impliqués dans ce processus, sont donc fondamentaux pour l'initiation de la transcription et au contrôle du devenir cellulaire<sup>360,362</sup>. Les protéines SOX se lient au sillon mineur (12 Å) de la double hélice d'ADN de la chromatine de type L grâce à leur domaine HMG. Ils interagissent avec un motif consensus ATTGTT<sup>363,364</sup>. Cette liaison



change la conformation des sillons mineur et majeur (22 Å), déplaçant la protéine *Linker* de l'octamère d'histones et déroulant ainsi le nucléosome. Cette ouverture de la chromatine permet l'accès à l'ADN à de nombreuses protéines telles que les facteurs de transcription classiques, les variants d'histone, les protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine, ...<sup>364,365</sup>. Les facteurs SOX sont appelés pionniers, car ils sont les premiers à se lier à la chromatine de type L et permettent la fixation d'autres protéines. En contrôlant l'accessibilité au génome, les facteurs pionniers contribuent au contrôle des fonctions et au devenir cellulaire.

### c. Facteurs pionniers et reprogrammation cellulaire

Les facteurs pionniers ont suscité un intérêt croissant lorsque leur rôle dans la reprogrammation cellulaire a été identifié. Dès 1893 (Weismann A. *The Germ-Plasm: A Theory of Heredity*. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.29345>) et jusqu'en 1962<sup>366</sup> on pensait qu'une cellule mature était irréversiblement fixée dans son identité et sa fonction. Il s'agissait d'une vision déterministe dans laquelle la cellule devenait mature de manière irréversible par une succession d'étapes verrouillées de perte de potentialités. Par une expérience de transfert nucléaire, Sir John Gurdon a toutefois montré qu'une cellule somatique mature gardait toutefois sa capacité de pluripotence<sup>366</sup>. De nombreux travaux ont suivis<sup>367-373</sup>. Notamment ceux de Robert L. Davis en 1987, dans lesquels il a montré qu'il était possible de convertir des fibroblastes murins C3H10T1/2 en myoblastes à la suite de la transfection d'un vecteur d'expression du facteur de transcription maître du lignage musculaire, MyoD. Ces travaux ont ainsi montré qu'un facteur de transcription unique pouvait changer l'identité d'une cellule différenciée. Le dogme d'un déterminisme figé commençait à s'effondrer. En 2006, Yamanaka a montré chez la souris que des fibroblastes matures pouvaient être reprogrammés vers un état de pluripotence grâce à l'introduction de 4 facteurs de transcription, dont SOX2 et *Octamer-binding transcription factor* (OCT) 3/4, tous deux facteurs pionniers et appartenant respectivement aux familles SOXB1 et POU-V<sup>374</sup>. Ainsi sont apparues les cellules souches pluripotentes induites (iPS)<sup>375</sup>. Ces travaux ont été confirmés *in vitro* chez l'humain un an plus tard<sup>376</sup> et ont valu le prix Nobel de médecine en 2012 à Yamanaka. Depuis, il a été montré que la reprogrammation cellulaire était un processus en deux phases, difficile à obtenir<sup>373,377</sup>, une stœchiométrie fine des différents facteurs étant importante<sup>378</sup>. De plus, parmi les quatre facteurs pionniers



identifiés dans l'étude princeps, OCT4 et SOX2 jouent un rôle majeur et il a été suggéré récemment que SOX2 à lui seul était suffisant pour reprogrammer des fibroblastes murins en iPS<sup>379,380</sup>. NANOG et Lin28 joueraient également un rôle tardif dans l'obtention des iPS et des cellules embryonnaires souches<sup>363,364</sup>.

#### d. SOX2

La protéine SOX2 appartient à la famille SOXB1 avec SOX1 et SOX3. Le gène SOX2 présente un court domaine N-terminal, suivi par le domaine de liaison à l'ADN HMG-Box, et un long domaine C-terminal. Il est exprimé par les compartiments de cellules souches d'origine endodermale et ectodermale. Le gène SOX2 est localisé sur le chromosome 3 et a la particularité de ne pas avoir d'intron. Il fait ainsi partie des 1500 Single Exon Genes du génome, soit 0.85% du génome codant (source : database SEG sinex.cl). Ainsi, il ne subit pas d'épissage alternatif pouvant entraîner l'apparition de variants d'épissage ou de mutations. Son ARNm ne possède pas de queue poly-A, qui est remplacée par une structure en tige-boucle.

Il a été décrit des mutations du gène SOX2 entraînant des microphthalmies et des anophthalmies chez l'humain<sup>381</sup>. La protéine SOX2 régule la transcription de son propre gène par une boucle de rétrocontrôle négatif via la phosphorylation et la relocalisation cytoplasmique de FoxO1<sup>382</sup>, un de ses facteurs de transcription activateur. Néanmoins, il peut être régulé négativement par des micro-ARNs tels que miR200<sup>383</sup> et miR145<sup>384</sup>. De plus, le gène SOX2 a la particularité d'être localisé au sein de l'intron d'un long ARN non codant nommé *SOX2 Overlapping Transcript* (SOX2OT)<sup>385</sup>. De 700kb de longueur, celui-ci n'a pas de cadre ouvert de lecture mais plusieurs *Transcription Start Sites* et 13 exons qui sont épissés en plusieurs variants similaires à des ARNm possédant une coiffe et une queue polyA. Même si l'interaction directe n'a pas été démontrée entre les transcrits de SOX2OT et SOX2, leur activation est rarement dissociable. L'expression ectopique de SOX2OT augmente celle de SOX2. Il ne semble donc pas y avoir de régulation négative de SOX2OT sur SOX2.

Une fois traduite, la protéine SOX2 est fortement régulée par des modifications post-traductionnelles telles que phosphorylation<sup>386-390</sup>, acétylation<sup>391,392</sup>, sumoylation<sup>393</sup>, glycosylation<sup>394</sup>, méthylation<sup>388,395</sup>, etc... Ces



modifications régulent notamment sa localisation intracellulaire, sa demi-vie ou son interaction avec des partenaires nucléiques ou protéiques. La protéine SOX2 se lie à l'ADN par interaction avec d'autres facteurs tels que PARP1<sup>396</sup> ou OCT4<sup>397,398</sup>. Le niveau de protéine SOX2 dans la cellule est finement régulé et contrôle, d'un côté l'engagement d'une cellule souche vers la différenciation, et de l'autre le maintien de l'état souche et de ses potentialités. En effet, la surexpression de SOX2 d'un facteur 2<sup>399</sup> ou sa diminution de moitié<sup>400</sup> favorisent tous deux la différenciation des cellules ES murines. De même, pour obtenir des iPS à partir de cellules matures de manière plus efficace, il est nécessaire de maintenir des taux d'expression d'OCT4 élevés et de SOX2 faibles dans la première étape du processus<sup>401</sup>. La délétion du gène SOX2 est létale au stade blastocyste, l'*Inner Cell Mass* (ICM) n'est pas structuré correctement et l'épiblaste ne se forme pas<sup>402</sup>. La délétion du gène SOX2 chez la souris adulte entraîne la mort prématurée des animaux. La protéine SOX2 est nécessaire au maintien de l'état souche, donc à l'homéostasie des tissus par le renouvellement de leur contenu cellulaire<sup>403</sup>. Il est associé à la pluripotence et l'immaturité des cellules souches.





# **OBJECTIFS SCIENTIFIQUES DE LA THÈSE**



Du fait de leurs nombreuses fonctions, les CSM sont de grand intérêt en médecine régénératrice et en thérapie cellulaire. Cependant, la compréhension globale de ces cellules n'est pas aboutie. Les CSM correspondent en fait à une population hétérogène de cellules ayant des potentialités différentes. À titre d'exemple, seule une sous-population de BM-MSCs humaines exprimant le CD146 est capable d'auto-renouvellement *in vivo*<sup>217</sup>. Il a récemment été montré que des ASC humaines CD271<sup>+</sup> étaient pro-fibrotiques, tandis que des ASC *Mesenchymal Stromal Cell Antigen-1* (MSCA1) positives étaient pro-adipocytaires<sup>172</sup>. Il en est de même pour les ASC ICAM1<sup>+</sup> qui démontrent de plus grandes capacités de différenciation adipocytaire que les ASC *Dipeptidyl peptidase-4* positives (DPP4)<sup>404</sup>. Cette hétérogénéité reflète un engagement plus ou moins avancé des différentes cellules vers différents lignages. Cet engagement impacte l'immaturation et les potentialités des CSM en général. Il est donc primordial de mieux caractériser l'engagement des CSM.

Bien que les BM-MSCs représentent 41% des CSM utilisées en thérapie du fait de leur découverte historique, les biopsies de la crête iliaque de l'os pelvien dont dérivent ces cellules sont obtenues sous anesthésie générale par des méthodes invasives et lourdes pour les donneurs. Aussi, ces dernières années, l'utilisation d'ASC a fortement gagné en intérêt par rapport aux BM-MSCs du fait de leur facilité et relative innocuité d'obtention chez le patient, et de leur plus grande quantité numérique dans le tissu d'origine. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés aux ASC dans cette étude.

Cette thèse a pour objectifs de :

- Étudier l'impact des conditions de culture sur l'immaturation et les potentialités de différenciation des ASC humaines
- Caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans l'adipogenèse des ASC et la plasticité des adipocytes

Ces travaux font l'objet d'un article scientifique en cours de soumission, et d'un article scientifique à venir.



# **RÉSULTATS**

---



## **Chapitre 1 : TGFβ1, régulateur du devenir des ASC.**

### **INTRODUCTION**

Du fait de leurs nombreuses fonctions, et notamment de leurs potentialités de différenciation en cellules matures, les CSM sont de grand intérêt en médecine régénérative. Cependant, les méthodes d'isolement, de congélation et de culture altèrent les potentialités des CSM. Il est donc important de mieux caractériser l'impact des conditions de culture sur la biologie des CSM et d'améliorer ces conditions afin de conserver le potentiel de ces cellules. La culture des CSM est menée classiquement en milieu de type *Eagle's medium* (α-MEM ou DMEM) supplémenté en sérum de veau fœtal ou en lysat plaquettaire humain ; milieu dit « Standard ». Or, *in vivo* une partie des CSM est localisée au sein d'une niche péri-vasculaire<sup>176,405-407</sup>. On leur attribue même une localisation péricytaire autour des petits vaisseaux sanguins, ou adventitielle autour des gros<sup>408</sup>.

L'objectif de notre étude a été de caractériser les ASC cultivées dans le milieu de culture EGM2, conçu pour l'expansion de cellules endothéliales et péri-vasculaires, comme une alternative aux méthodes de culture Standard. Outre la présence définie de molécules et facteurs de croissances, le milieu EGM2 contient 5 fois moins de sérum de veau fœtal que le milieu Standard. Cette étude a été menée de manière comparative et une analyse étendue des potentialités de différenciation des ASC primaires a été réalisée. Ces travaux mettent en évidence une nouvelle méthode de culture des ASC, plus adaptée à leur utilisation clinique.

### **RESULTATS**





# 1 Cell immaturity and white/beige adipocyte-potential of 2 primary human adipose-derived stromal cells are 3 restrained by culture-medium TGFβ1

## 4 TGFβ1 modulates adipose-derived stromal cell fate

5 Hélène Leménager<sup>1\*</sup>, Loïc M.A. Fiévet<sup>1</sup>, Fabien Guilloton<sup>1</sup>, Abderrahim Naji<sup>2</sup>,  
6 Benoît Chaput<sup>3</sup>, Narufumi Suganuma<sup>2</sup>, Jean-Christophe Pagès<sup>1</sup>, Luc Sensebé<sup>1</sup>,  
7 Audrey Carrière<sup>1</sup>, Louis Casteilla<sup>1\*</sup>, Frédéric Deschaseaux<sup>1\*</sup>

- 8 1. STROMALab, Etablissement Français du Sang-Occitanie (EFS), Inserm 1031, University of  
9 Toulouse, National Veterinary School of Toulouse (ENVT), ERL5311 CNRS, Toulouse,  
10 France
- 11 2. Department of Environmental Medicine, Cooperative Medicine Unit, Research and Education  
12 Faculty, Medicine Science Cluster, Kochi Medical School (KMS), Kochi University, Kohasu,  
13 Oko-Cho, Nankoku City, Kochi Prefecture 783-8505, Japan
- 14 3. Department of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery, Ranguel University Hospital,  
15 Toulouse, France

16  
17 **\*Corresponding authors:** Louis Casteilla, PhD, STROMALab – Bâtiment INCERE, 4 bis avenue  
18 Hubert Curien 31100 Toulouse. email: louis.casteilla@inserm.fr; phone: +33 5 34 60 95 01; fax: +33 5  
19 34 60 95 05 ; Frédéric Deschaseaux, Ph.D., STROMALab – Bâtiment INCERE, 4 bis avenue Hubert  
20 Curien 31100 Toulouse. email: frederic.deschaseaux@efs.sante.fr; phone: +33 5 34 60 95 19; fax: +33  
21 5 34 60 95 05. Hélène Leménager, MSc, STROMALab – Bâtiment INCERE, 4 bis avenue Hubert  
22 Curien 31100 Toulouse. email: helene.lemenager@inserm.fr; phone: +33 5 34 60 95 17; fax: +33 5 34  
23 60 95 05

24 **Author's contributions:** HL and FG: conception and design, collection and/or assembly of data, data  
25 analysis and interpretation, manuscript writing. FD: conception and design, data analysis and  
26 interpretation, manuscript editing. LF: data analysis. AC, JCP, LC, and LS: conception, manuscript  
27 editing. AN and NS: data analysis, manuscript editing. CB: provision of human material. All authors:  
28 final approval of the manuscript.

29  
30 **Keywords:** Mesenchymal stem/stromal cells; adipose-derived stromal cells; transforming growth  
31 factor-beta 1; osteoblast; chondroblast, vascular smooth muscle cell; white adipocyte, beige adipocyte



1 **Abbreviations**

2

ASCs	adipose-derived stem/stromal cells
BM-MSCs	bone marrow mesenchymal stem/stromal cells
CFU-f	colony-forming-unit fibroblast
EGM2	endothelial cell growth medium 2
FBS	fetal bovine serum
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
hrTGFβ1	human recombinant transforming growth factor-beta 1
MEM	minimum essential media
MSCs	mesenchymal stem/stromal cells
PCA	principal component analysis
SVF	stromal vascular fraction
TGFβ1R	transforming growth beta 1 receptor
TGFβR1	transforming growth beta receptor type 1
VSMCs	vascular smooth muscle cells

3



## 1 **Abstract**

2 Human adipose-derived stem/stromal cells (hASCs) can differentiate into specialized cell types and  
3 thereby contribute to tissue regeneration. As such, hASCs have drawn increasing attention in cell  
4 therapy and regenerative medicine, not to mention the ease to isolate them from donors. Culture  
5 conditions are critical for expanding hASCs while maintaining optimal therapeutic capabilities. Here,  
6 we identified a role for transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) in culture medium in influencing the  
7 fate of hASCs during *in vitro* cell expansion. Human ASCs obtained after expansion in standard  
8 culture medium (Standard-hASCs) and in endothelial cell growth medium 2 (EGM2-hASCs) were  
9 characterized by high-throughput transcriptional studies, Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) and  
10 functional properties. EGM2-hASCs exhibited enhanced multipotency capabilities and an immature  
11 phenotype as compared with Standard-hASCs. Moreover, the adipogenic potential of EGM2-hASCs  
12 was enhanced, including toward beige adipogenesis, as compared with Standard-hASCs. In these  
13 conditions TGF $\beta$ 1 acts as a critical factor affecting the immaturity and multipotency of Standard-  
14 hASCs, as suggested by SMAD3 nuclear localization and phosphorylation in Standard-hASCs versus  
15 EGM2-hASCs. Finally, the typical priming of Standard-hASCs into osteoblast, chondroblast and  
16 vascular smooth muscle cell (VSMC) lineages was counteracted by pharmacological inhibition of the  
17 TGF $\beta$ 1 receptor, which allowed retention of SMAD3 into the cytoplasm and a decrease in expression  
18 of osteoblast and VSMC lineage markers. Overall, the TGF $\beta$ 1 pathway appears critical in influencing  
19 the commitment of hASCs toward osteoblast, chondroblast and VSMC lineages, thus reducing their  
20 adipogenic potential. These effects can be counteracted by using EGM2 culture medium or chemical  
21 inhibition of the TGF $\beta$ 1 pathway.

22

## 23 **Significance statement**

24 Human adipose-derived stem/stromal cells (hASCs) are typically expanded in serum-containing  
25 media. Here, we show that the TGF $\beta$ 1 contained in serum induces the commitment of hASCs toward  
26 osteoblast, chondroblast and vascular smooth muscle cell lineages. This commitment impedes the



1 immaturity of hASCs and their adipogenic potential during *in vitro* cell expansion, including toward  
2 the beige adipocyte. Standard culture medium affects the cell multipotency of hASCs, a crucial feature  
3 to consider when improving methods of hASC expansion to obtain clinical-grade hASCs. Here, we  
4 detail the effect of TGF $\beta$ 1 on hASC culture and propose alternative culture methods to expand hASCs  
5 with optimal therapeutic interests.





# 1 Introduction

2 Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) are multipotent cells that can differentiate into  
3 multiple cell types and contribute to tissue regeneration [1]. Hence, MSCs hold important interest in  
4 cell therapy and regenerative medicine [2]. MSCs were first identified in bone marrow (BM-MSCs),  
5 which remains their main biological source in research and cell therapy [3]. Alternatively, adipose-  
6 derived stromal cells (ASCs) are MSCs accessible from adipose tissue, by simple procedures and at  
7 high cell yield [4].

8 Subcutaneous adipose tissue contains at least 2 types of adipocytes: mostly white adipocytes  
9 and beige adipocytes [5,6]. White adipocytes store and release lipids, whereas beige adipocytes  
10 express the uncoupling protein 1 (UCP1) promoting lipid and glucose oxidization. Recently, beige  
11 adipocytes have drawn interest in medicine because of their ability to prevent metabolic diseases, such  
12 as obesity and type 2 diabetes in animal models [7,8]. Therefore, the differentiation of hASCs and/or  
13 the conversion of white adipocytes into beige adipocytes are of clinical interest [7,9]. By affecting  
14 ASC functionality but lacking standardization, hASC culture represents a major bottleneck and  
15 deserves specific attention [3]. For expanding hASCs, we used the endothelial cell growth medium 2  
16 (EGM2), designed for culturing endothelial and perivascular cells, a physiological location common to  
17 hASCs [10–13]. Of note, the most-used condition for hASCs expansion, standard medium, differs  
18 from EGM2 notably by a higher percentage of fetal bovine serum (FBS).

19 Transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) belongs to the TGF $\beta$  superfamily, involved in  
20 regulating cell differentiation, growth, and proliferation. TGF $\beta$ 1 binds to cell surface receptors  
21 consisting of type I (TGF $\beta$ RI) and type II (TGF $\beta$ RII) receptor serine/threonine kinases that propagate  
22 signaling via phosphorylation of effector proteins, such as small mother of decapentaplegic homolog  
23 (SMADs), notably SMAD3. SMAD3 is phosphorylated by TGF $\beta$ RI and heterodimerizes with  
24 SMAD4 to form an active SMAD complex. Activated SMAD complex translocates into the nucleus,  
25 thus enabling transcription of genes involved in cell differentiation, growth, and proliferation.

26 Here, we observed that hASCs expanded *in vitro* in a standard medium (Standard-hASCs)  
27 were essentially primed into osteoblast, chondroblast and VSMC lineages. We also showed that



1 EGM2-hASCs retained features of cell immaturity and exhibited an enhanced adipogenic potential,  
2 with beige adipocyte potential. Furthermore, high-throughput transcriptomic, Gene Set Enrichment  
3 Analysis (GSEA) and functional experiments confirmed the immaturity of EGM2-hASCs and allowed  
4 us to identify TGF $\beta$ 1 as a critical factor affecting the hASC fate during *in vitro* cell expansion.  
5 Accordingly, inhibition of TGF $\beta$ 1 receptor (TGF $\beta$ 1R) in Standard-hASCs was sufficient to restore the  
6 immaturity of hASCs, with strong beige adipogenic potential.

7         Our results highlight the need to consider the effect of TGF $\beta$ 1 on hASCs during *in vitro* cell  
8 expansion in standard-medium culture conditions. These findings should prompt the alternative use of  
9 EGM2 to expand hASCs, for optimal therapeutic potential in regenerative medicine and metabolic  
10 disorders.



## 1 **Material and methods**

### 2 **Isolation of hASCs, expansion media and cell culture**

3 Abdominal dermolipectomia tissues were obtained from 46 women after reconstructive surgery (mean  
4 body mass index  $26.9 \pm 0.4 \text{ kg/m}^2$  [range 18.7–32.7]; mean age  $41.4 \pm 1.7$  years [range 18–66]).  
5 Experimental protocols were approved by an ethics committee (No: DC-2015-23-49), and informed  
6 consent was obtained from all participants. Human AT was dissected with scissors and underwent  
7 enzymatic digestion with 13.6 U/mL collagenase NB4 (Serva Electrophoresis; Heidelberg, Germany)  
8 at 37°C under agitation for 45 min in MEM containing Glutamax (Life Technologies, Carlsbad, CA,  
9 USA) supplemented with 1% penicillin/streptomycin (Life Technologies). Homogenates were 100-  
10  $\mu\text{m}$ -filtered (Sterifip; Millipore, Burlington, MA, USA) and the stromal vascular fraction (SVF) was  
11 isolated by centrifugation for 10 min at 500 g. The SVF was plated at 4000 cells/cm<sup>2</sup> in  
12 standard medium — MEM Glutamax 1% penicillin/streptomycin, 10% fetal bovine serum (FBS) (Life  
13 Technologies) and 1 ng/mL fibroblast growth factor 2 (Reliatech GmbH, Wolfenbüttel, Germany) —  
14 or EGM2 with 2% FBS and defined supplements (PromoCell; Heidelberg, Germany). After 7 days,  
15 hASCs were analyzed or treated with 10 ng/mL TGF $\beta$ 1 (Miltenyi Biotech; Bergisch Gladbach,  
16 Germany) or 1  $\mu\text{M}$  SB431542 or SB505124 ALK5 TGF $\beta$ 1R inhibitors (Tocris Bioscience; Bristol,  
17 UK). All experiments were performed with hASCs at passage 0 unless stated otherwise.

### 18 **Multipotential assays**

19 Osteogenesis was induced by 50  $\mu\text{M}$  ascorbic acid (Sigma-Aldrich; Saint-Louis, MO, USA) and 10  
20 mM  $\beta$ -glycerophosphate (Sigma) in  $\alpha$ MEM (Life Technologies), 2% FBS and 1% L-glutamine (Life  
21 Technologies). At day 11, cultures were fixed with 4% formaldehyde (Sigma) and stained with  
22 Alizarin red S (Sigma), then dissolved in 10% acetic acid. Absorbance was read at 405 nm by  
23 spectrophotometry (Varioskan, Thermo Fisher; Waltham, MA, USA).

24 Chondrogenesis was induced by 3 weeks of culture in high-glucose DMEM (Life Technologies)  
25 complemented with 1 mM sodium pyruvate, 0.1  $\mu\text{M}$  dexamethasone, 0.17 mM ascorbic-2-phosphate  
26 acid, 0.35 mM L-proline, 1% insulin transferrin selenium+1 (all Sigma) and 10 ng/mL TGF $\beta$ 3 (R&D



1 Systems; Minneapolis, MN, USA). Cells were fixed with 4% paraformaldehyde and stained with  
2 Alcian blue (Sigma).

3 Adipogenesis was induced by culture for 11 days in MEM containing Glutamax supplemented with  
4 10% FBS, 1  $\mu$ M dexamethasone, 5  $\mu$ g/mL insulin, 1  $\mu$ M rosiglitazone and 60  $\mu$ M indomethacin (all  
5 Sigma) or MEM supplemented with 2% FBS, 1  $\mu$ M dexamethasone, 1  $\mu$ g/mL insulin and 0.5 mM  
6 isobutylmethylxanthine (Sigma). In some experiments, conversion of white to beige adipocytes was  
7 induced by overnight treatment with 2  $\mu$ M forskolin (Sigma). Adipogenesis was assessed in cells fixed  
8 in glutaraldehyde 3% and stained for neutral lipids with Oil-red O (Sigma), then dissolved in 60%  
9 isopropanol. Absorbance at 510 nm was read by using Varioskan spectrophotometry (ThermoFisher).

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

11 Cells were lysed in RIPA buffer (Biotech; Markham, ON, Canada) supplemented with a complete  
12 mini-EDTA free protease inhibitors cocktail (Roche; Bâle, Suisse) and phosphatase inhibitors cocktail  
13 (Sigma). Proteins were quantified with MicroBCA (Thermo Fisher). Electrophoresis was performed in  
14 Mini Protean TGX Gel 12% SDS (Biorad; Hercules, CA, USA), bathed in tris-glycine-SDS buffer  
15 (Biorad). Proteins were transferred to polyvinylidene difluoride membrane (Biorad) in tris-glycine  
16 buffer (Biorad). Membranes were incubated in PBS 0.1% Tween-20 (Biorad), 5% nonfat dry milk and  
17 primary antibodies for OCT4 (ab19857, Abcam; Cambridge, UK), SOX2 (ab97959, Abcam), NANOG  
18 (AF1997, R&D),  $\beta$ -Actin (A5441, Sigma), PPAR $\gamma$  (2443S, Cell Signaling Technology [CST];  
19 Danvers, MA, USA), Calponin1 (MAB9569 Abnova; Taiwan), FABP4 (AF1443, R&D), GAPDH  
20 (ab8245, Abcam), p-SMAD3 (9520S, CST), or SMAD3 (9513S, CST). Proteins were revealed with  
21 horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit or anti-mouse IgG (respectively 1706515 and  
22 1706516, Biorad) or rabbit anti-goat IgG (81-1620, Thermo Fisher) and ECL detection (Biorad).  
23 ImageJ (National Institutes of Health; Bethesda, MD, USA) was used for protein semi-quantification.

#### 24 **Quantitative RT-PCR**

25 Cells were lysed in RLT (Qiagen; Hilden, Germany). RNA was extracted by using the RNeasy Plus  
26 Mini kit (Qiagen) and reverse-transcribed by using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit  
27 (Applied Biosystem; Foster City, CA, USA) following manufacturer's instructions for 10 min at 25°C,





1 120 min at 37°C and 5 min at 85°C. qPCR involved using 300 nM primers listed in **table S1** and  
2 FAST SYBR Green Reagent (Applied Biosystem) with a StepOne device (Applied Biosystem). Data  
3 were analyzed with StepOne software and normalized to the housekeeping gene expression and the  
4 standard control sample unless stated otherwise. Fold change in mRNA content was determined  
5 according to the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. Relative comparison was calculated as  $\Delta\Delta Ct(x) = \Delta Ct(x) - \Delta Ct(\text{Ctrl})$   
6 with  $\Delta Ct(x \text{ or Ctrl}) = Ct(x \text{ or Ctrl}) - Ct(\text{housekeeping genes})$  with x = the sample mRNA.

### 7 **Flow cytometry**

8 Standard-hASCs or EGM2-hASCs were trypsinized (Life Technologies) and blocked in 0.1% human  
9 serum albumin (LFB Biomedicaments; Courtaboeuf, France). Cells were stained with CD90 (555596),  
10 CD73 (550257), CD13 (555394), CD45 (555483), CD31 (555446), CD34 (555822), all conjugated  
11 with phycoerythrine (BD Biosciences; Franklin Lakes, NJ, USA), and staining was analyzed with an  
12 ADP Cyan flow cytometer (Beckman Coulter; Brea, CA, USA). Data were analyzed with Kaluza v1.2  
13 (Beckman Coulter). Dead cells were excluded by DAPI staining (Sigma).

### 14 **Colony-forming unit-fibroblasts (CFU-f) analysis**

15 SVF was serially diluted from 128 to 1 cells per well in 96-well plates. After 10 days, cells were fixed  
16 in absolute methanol for 5 min and stained in 10% Giemsa (Sigma) for 10 min. Colony-formation  
17 assay involved using Poisson distribution statistics by determining the number of wells with no  
18 clonogenic growth at day 10. Aggregates of >10 cells were scored as CFU-f-derived colonies as  
19 previously described [14].

### 20 **Affymetrix assay**

21 cDNA synthesis and amplification were performed on high-quality mRNA (RQI >9.8) by using the  
22 Ovation PicoSL WTA-System V2 protocol (NuGEN, Redwood City, CA, USA). An amount of 25 ng  
23 mRNA was reverse transcribed in primer mix containing poly-T and random sequences for whole-  
24 transcriptome coverage, followed by second-strand cDNA synthesis with Ribo-SPIA technology  
25 (NuGEN). An amount of 2.5  $\mu\text{g}$  SPIA cDNA was fragmented and biotinylated in Encore Biotin  
26 Module (NuGEN) and hybridized (48°C, 20 h) with the Affymetrix HuGene1.1STArray Strip Kit



1 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Arrays were scanned by using the Affymetrix GeneAtlas  
2 imaging station. Scanned images (DAT files) were analyzed with Affymetrix GeneChip Command  
3 Console software. Data were imported into Partek Genomics Suite software (Partek, Inc. MO, USA).  
4 The Robust Multichip Analysis algorithm was used for generating signal values. Principal component  
5 analysis (PCA) was used for global 3D unsupervised analysis. Partek Genomics Suite software was  
6 used for generating specific gene expression signatures (fold change >2), and for Gene Ontology (GO)  
7 enrichment analysis. Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity Systems, [www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)) was used  
8 for gene networks and canonical pathways analysis.

### 9 **Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)**

10 We used GSEA software from Broad Institut (<http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>)  
11 [15,16]. Gene signatures and raw data are accessible in the Gene Expression Omnibus (GEO)  
12 repository platform (GSE136778). Analyses of molecular pathways involved the Database for  
13 Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) [17,18].

### 14 **ELISA**

15 Sandwich ELISA was performed on medium or supernatant of cell cultures for bovine or human  
16 TGFβ1 according to manufacturer's instructions (Boster Biological Technology; Pleasanton, CA,  
17 USA).

### 18 **Immunofluorescence assay**

19 Cells were fixed in 3.7% paraformaldehyde (Sigma), permeabilized with 0.2% Triton X-100 (Sigma),  
20 and incubated overnight at 4°C with an anti-SMAD3 primary antibody (9513S, CST). Staining was  
21 revealed by using a donkey Alexa fluor 488-nm anti-rabbit antibody (A21206, Molecular Probes;  
22 Eugene, OR, USA) along with DAPI staining (1:10000; D9542, Sigma). Images of cells were acquired  
23 on an LSM 780 confocal microscope (Zeiss; Oberkochen, Germany) or epifluorescence biphotonic  
24 microscope (Leica Biosystems; Nanterre, France). Fluorescence was analyzed with ImageJ (National  
25 Institutes of Health).

### 26 **Statistical analysis**



1 GraphPad Prism 5 (GraphPad Software; San Diego, CA, USA) was used for statistical analysis and  
2 graph design. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Wilcoxon or Mann-Whitney tests were used for  
3 statistical analysis, with  $p < 0.05$  considered statistically significant, and statistical significance was  
4 shown with \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .



# 1 **Results**

## 2 **EGM2-hASCs exhibit cell immaturity features**

3 In culture, both Standard-hASCs and EGM2-hASCs displayed similar fibroblast-like  
4 morphology (**fig S1a**) and expressed CD90, CD73 and CD13 but not CD45 or CD31 (**fig S1b**). EGM2  
5 culture conditions led to 5-fold less CFU-f from SVF as compared with standard conditions (**fig S1c**),  
6 but we obtained twice more adherent cells with EGM2 versus standard conditions after 7 days of cell  
7 expansion (**fig S1d**). These results suggest that although both Standard-hASCs and EGM2-hASCs had  
8 a close phenotype, EGM2-hASCs showed an enhanced proliferation ability as compared with  
9 Standard-hASCs. Also, under appropriate stimulations, EGM2-hASCs could differentiate into  
10 osteoblasts and chondroblasts as efficiently as Standard-hASCs (**Fig 1a and S1e**). Remarkably,  
11 EGM2-hASCs exhibited enhanced ability to differentiate into adipocytes as compared with Standard-  
12 hASCs (**Fig 1a and S1e**).

13 To compare the cell immaturity of Standard-hASCs and EGM2-hASCs, we studied the  
14 expression of stemness markers. Notably, sex-determining region Y-box (SOX) 2, octamer-binding  
15 transcription factor (OCT) 4 and NANOG were found essential to maintain cell immaturity via  
16 cooperative interactions [19]. We found increased protein content of SOX2, OCT4, and NANOG, by  
17 at least 2-fold in EGM2-hASCs as compared with Standard-hASCs (**Fig 1b**). Furthermore, EGM2-  
18 hASCs exhibited reduced priming toward the osteoblast lineage, as shown by decreased mRNA  
19 content of *distal-less homeobox 5 (DLX5)*, *collagen type 1a1 (COL1a1)* and *alkaline phosphatase*  
20 *liver (ALPL)*, as compared with Standard-hASCs (**Fig 1c**). Moreover, levels of chondroblast lineage-  
21 associated mRNAs such as *hyaluronan and proteoglycan link protein 1 (HAPLN)* and *SOX9* were  
22 greatly reduced in EGM2-hASCs as compared with Standard-hASCs (**Fig 1c**). Similarly, levels of  
23 VSMC lineage-associated mRNAs, including *smooth muscle actin 2 (ACTA2)* and *calponin 1 (CNN1)*  
24 were decreased in EGM2-hASCs as compared with Standard-hASCs (**Fig 1c**). In contrast, EGM2-  
25 hASCs exhibited increased levels of mRNAs associated with the adipocyte lineage, including *fatty*  
26 *acid-binding protein 4 (FABP4)* and *lipoprotein lipase (LPL)*, as compared with Standard-hASCs (**Fig**  
27 **1c**). These findings suggest that EGM2-hASCs were more immature than Standard-hASCs.





## 1 **EGM2-hASCs exhibit enhanced adipogenesis potential**

2 We further analyzed the adipogenic potential of EGM2-hASCs and Standard-hASCs notably  
3 with rosiglitazone, an agonist of the master adipogenic regulator peroxisome proliferator-activated  
4 receptor  $\gamma$ 2 (PPAR $\gamma$ 2). We observed an enhanced adipogenic potential for EGM2-hASCs (**Fig 2a and**  
5 **2b**). This was assessed by increased mRNA content of *PPAR $\gamma$ 2* as well as *FABP4*, *LPL*, *adiponectin*  
6 (*ADIPOQ*) and *CCAAT enhancer-binding protein  $\alpha$*  (*CEBP $\alpha$* ) (**Fig 2a**). Accordingly, we detected  
7 higher protein expression of PPAR $\gamma$ 2 in EGM2-hASCs than Standard-hASCs and especially after  
8 adipogenic differentiation (**Fig 2b**).

9 Taking into account that EGM2-hASCs were prone to adipogenic differentiation and  
10 considering that chronic treatment with rosiglitazone promoted also the beige adipocyte phenotype  
11 [20], we evaluated the beige adipocyte potential of EGM2-hASCs and Standard-hASCs. Our results  
12 confirmed that adipocytes obtained from EGM2-hASCs overexpressed beige adipocyte mRNAs,  
13 including *UCPI*, *cell death-inducing DFFA like effector A* (*CIDEA*), and *PPAR $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$*   
14 (*PGC1 $\alpha$* ) (**Fig 2c**). Subsequently, we used an alternative method to differentiate both EGM2-hASCs  
15 and Standard-hASCs into adipocytes, with a differentiation medium not containing rosiglitazone [7],  
16 to avoid hASCs differentiation into beige adipocytes. Under those conditions, *PPAR $\gamma$ 2* mRNA content  
17 increased about 10-fold in adipocytes derived from EGM2-hASCs as compared with those derived  
18 from Standard-hASCs (**fig S2a**). This finding confirmed that EGM2-hASCs were prone to  
19 differentiate to adipocytes to a greater extent than were Standard-hASCs. Moreover, *UCPI* mRNA  
20 was virtually absent in adipocytes derived from both Standard-hASCs and EGM2-hASCs (**fig S2a**),  
21 which confirms that this alternative medium did not induce beige adipocytes. Subsequently,  
22 adipocytes were exposed overnight to the AMPc inducer forskolin in order to upregulate mRNAs  
23 associated with beige adipocytes. An increase in *UCPI* mRNA content was measurable in adipocytes  
24 derived from both Standard-hASCs and EGM2-hASCs after forskolin stimulation (**fig S2a**).  
25 Remarkably, *UCPI* mRNA content in adipocytes derived from EGM2-hASCs was about 9-fold higher  
26 than that observed in Standard-hASC-derived adipocytes. Moreover, *CIDEA* and *PGC1 $\alpha$*  mRNA



1 levels were significantly increased by at least 3-fold in adipocytes derived from EGM2-hASCs, as  
2 compared with standard counterparts (**fig S2a**).

3 To evaluate the preservation of adipocyte differentiation capabilities during *in vitro* hASC  
4 expansion, we induced adipogenesis of Standard-hASCs and EGM2-hASCs at passages 0, 1, 2, 3 and  
5 4. The mRNA levels of *PPAR $\gamma$ 2*, *FABP4*, *LPL* and *ADIPOQ* in adipocytes from Standard-hASCs were  
6 greatly decreased as early as passage 2, whereas EGM2-hASCs retained intact adipogenic potential up  
7 to passage 4 (**Fig 2d**). Consistently, *UCP1*, *CIDEA*, and *PGC1 $\alpha$*  mRNA levels were maintained in  
8 EGM2-hASC-derived adipocytes (**Fig 2e**). By contrast, Standard-hASCs retained mRNAs levels  
9 associated with the osteoblast lineage, *DLX5* and *RUNX2*, and also the chondroblast lineage, *SOX9*,  
10 and VSMC lineage, including *ACTA2*, *CNN1*, and *TGF $\beta$ 1*. This was true after the adipogenic  
11 differentiation of Standard-hASCs as compared with EGM2-hASCs (**fig S2b**). Thus, EGM2-hASCs  
12 exhibited stronger white and beige adipogenic potential than Standard-hASCs.

### 13 **Transcriptomic analysis of Standard-hASCs confirms osteoblast, chondroblast and VSMC** 14 **priming**

15 To validate our observations, we used a high-throughput transcriptomic analysis of Standard-  
16 hASCs and EGM2-hASCs. We observed that 62.4% of the genes in 4-dimension PCA diverged in  
17 expression between Standard-hASCs and EGM2-hASCs (**Fig 3a and S3a**). Hence, among all genes  
18 analyzed, 981 showed significant differential expression by at least 2-fold in Standard-hASCs as  
19 compared with EGM2-hASCs, with 535 genes upregulated in Standard-hASCs and 446  
20 downregulated.

21 We used Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) to analyze specific transcripts associated  
22 with osteoblast, chondroblast, adipocyte, and VSMC lineages. We found a clear adipocyte gene  
23 signature in EGM2-hASCs as compared with Standard-hASCs (**fig S3b**). Remarkably, *PPAR $\gamma$* ,  
24 *perilipin (PLIN2)*, *apolipoprotein D (APOD)*, *PPAR $\alpha$* , *fatty acid synthase (FASN)*, *CEBP $\beta$* , *FABP5*,  
25 *FABP4*, and *FABP3* were upregulated by  $\geq 1.5$ -fold in EGM2-hASCs versus Standard-hASCs (**fig**  
26 **S3c**). Conversely, Standard-hASCs showed an anti-adipogenic gene signature (**fig S3d**) that was



1 notably underscored by the upregulation of *Kruppel-like factor 2 (KLF2)*, *KLF3*, *cyclin-dependant*  
2 *kinase inhibitor 1B (CDKN1B)*, *nuclear receptor coactivator 2 (NCOA2)*, *vitamin D receptor (VDR)*,  
3 and *transcription factor 7 Like 2 (TCF7L2)* (**fig S3e**). Furthermore, we found upregulation of  
4 osteoblast (**fig S4a**), chondroblast (**fig S4b**) and VSMC (**fig S4c**) lineage gene signatures in Standard-  
5 hASCs as compared with EGM2-hASCs. Osteoblast-associated mRNAs, including *COL12a1*,  
6 *podocan (PODN)*, *COL1a1*, *ALPL*, *biglycan (BGN)* and *RUNX1*, were upregulated by about 3-fold in  
7 Standard hASCs versus EGM2-hASCs (**fig S4d**). Similarly, upregulated chondroblast-associated  
8 mRNAs included *microfibril-associated protein 4 (MFAP4)*, *dermatopontin (DPT)*, *fibromodulin*  
9 (*FMOD*), *angiopoietin 1 (ANGPT1)*, *cytochrome P450 family 1 subfamily B member 1 (CYP1B1)* and  
10 *ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 2 (ADAMTS2)*, with mRNA levels  
11 increased by at least 2-fold in Standard-hASCs as compared with EGM2-hASCs (**fig S4e**). Finally,  
12 VSMC-associated mRNAs upregulated in Standard-hASCs as compared with EGM2-hASCs included  
13 *CNN1*, *gap junction protein alpha 1 (GJA1)*, *phosphodiesterase 3A (PDE3A)*, *myosin 1C (MYO1C)*,  
14 *tropomyosin 1 (TPM1)* and *endoglin (ENG)* (**fig S4f**). Hence, Standard-hASCs exhibited priming  
15 toward osteoblast, chondroblast, and VSMC lineages as compared with EGM2-hASCs showing  
16 distinctive priming toward an adipocyte lineage.

### 17 **TGFβ1 pathway is involved in influencing the fate of Standard hASCs**

18 To identify the molecular pathway regulating the biological properties of Standard-hASCs and  
19 EGM2-hASCs, we performed Gene Ontology (GO) pathway analysis of mRNAs isolated from  
20 Standard-hASCs and EGM2-hASCs. We found a significant enrichment of GO terms associated with  
21 extracellular matrix (ECM)-receptor interaction, focal adhesion, malaria, PI3K-Akt signaling,  
22 proteoglycans in cancer and TGFβ-signaling pathway in Standard-hASCs as compared with EGM2-  
23 hASCs (**Fig 3b**). These upregulated pathways are known to be related to TGFβ signaling pathways.  
24 Therefore, we thought that TGFβ pathways might be altering the immaturity and multipotential of  
25 Standard-hASCs.

26 Following GSEA, we confirmed that mRNAs associated with TGFβ pathways were greatly  
27 upregulated in Standard-hASCs as compared with EGM2-hASCs (**Fig 3c**). Of note, transcriptomic



1 analysis displayed on a heatmap showed an upregulation of the 40 most-expressed genes associated  
2 with TGF $\beta$  pathways, including TGF $\beta$ 1-inducible *TGF $\beta$ 111* and *TGF $\beta$ 1*, in Standard-hASCs versus  
3 EGM2-hASCs (**Fig 3d**). We next analyzed the TGF $\beta$ 1-associated mRNA contents. Consistently, we  
4 found that *TGF $\beta$ 1*, *SMAD3*, and *TGF $\beta$ 111* mRNA levels were increased by at least 1.25-fold in  
5 Standard-hASCs versus EGM2-hASCs (**Fig 3e**). This observation was supported by the finding of a 5-  
6 fold higher content of bovine TGF $\beta$ 1 protein in standard medium than EGM2 medium. Also,  
7 Standard-hASCs secreted significantly more TGF $\beta$ 1 than did EGM2-hASCs (**Fig 3f**). Altogether,  
8 these results emphasized the increased activity of the TGF $\beta$ 1 pathway in Standard-hASCs.

9 To assess the actual implication of the TGF $\beta$ 1 pathway, we examined SMAD3 protein  
10 expression but also the cellular localization and phosphorylation of SMAD3 in Standard-hASCs and  
11 EGM2-hASCs. We found a pronounced SMAD3 nuclear staining in Standard-hASCs, with only a  
12 diffuse SMAD3 signal pattern detected in the cytoplasm of EGM2-hASCs (**Fig 4a**). The fluorescence  
13 intensity of SMAD3 in the cytoplasm, as compared with the nucleus, was higher by about 25% in  
14 EGM2-hASCs than Standard hASCs, which suggests lower TGF $\beta$ 1 activity in EGM2-hASCs (**Fig 4a**).  
15 This finding strongly suggested that the TGF $\beta$ 1 pathway activity was enhanced in Standard-hASCs as  
16 compared with EGM2-hASCs. Subsequently, we analyzed the capacity of Standard-hASCs and  
17 EGM2-hASCs to respond to human recombinant TGF $\beta$ 1 (hrTGF $\beta$ 1) *in vitro*. All nuclei of Standard-  
18 hASCs contained SMAD3 after 3 days of stimulation with hrTGF $\beta$ 1, whereas in EGM2-hASCs, we  
19 did not detect nuclear SMAD3 (**Fig 4a**). Consistently, the content of phosphorylated-SMAD3 at  
20 Ser423-425, relative to whole SMAD3 protein content, was intensively increased in Standard-hASCs  
21 as compared with EGM2-hASCs. Of note, this was observed with or without hrTGF $\beta$ 1 stimulation,  
22 which strengthens the former analysis suggesting the presence of activated SMAD3 in the nucleus of  
23 Standard-hASCs (**Fig 4b**).

24 Remarkably, the expression of SOX2 protein was not affected by hrTGF $\beta$ 1 stimulation in  
25 EGM2-hASCs, which suggests that EGM2-hASCs could retain their immaturity even upon TGF $\beta$ 1  
26 stimulation (**Fig 4c**). Likewise, the level of the VSMC-associated protein CALPONIN1 was strongly  
27 augmented in Standard-hASCs, but EGM2-hASCs did not express CALPONIN1 (**Fig 4d**). Also,





1 hrTGFβ1 stimulation in Standard-hASCs induced an increase in CALPONIN1 protein level by up to  
2 4-fold, with no effect in EGM2-hASCs (**Fig 4d**). Accordingly, *ACTA2* and *CNN1* VSMC lineage-  
3 associated mRNAs were upregulated by at least 6-fold in Standard-hASCs as compared with EGM2-  
4 hASCs (**fig S5a**). Similarly, following hrTGFβ1 stimulation, the mRNA levels of *ACTA2* and *CNN1*  
5 were increased by at least 2-fold in Standard-hASCs, but EGM2-hASCs were not significantly  
6 affected (**fig S5a**). In parallel, we found an increase in mRNA levels associated with osteoblasts,  
7 including *DLX5*, by about 6-fold; *OSTERIX* about 80-fold; and *COL1α1* about 1.5-fold, in Standard-  
8 hASCs stimulated with hrTGFβ1 than without hrTGFβ1 (**Fig S5b**). Of note, the effect of hrTGFβ1 on  
9 *DLX5* and *OSTERIX* mRNA expression was negligible in EGM2-hASCs, yet *COL1α1* mRNA level  
10 was significantly increased in EGM2-hASCs with than without hrTGFβ1 stimulation (**Fig S5b**). In  
11 contrast, FABP4 protein, a landmark of adipocytes, was expressed in EGM2-hASCs, but its  
12 expression was virtually absent in Standard-hASCs (**Fig 4e**). Similar results were found with  
13 PPARγ (**Fig 4f**). Here, stimulation of Standard-hASCs or EGM2-hASCs with hrTGFβ1 tended to alter  
14 the protein expression of both FABP4 and PPARγ (**Fig 4e and 4f**). Accordingly, adipogenic lineage-  
15 associated mRNAs including *FABP4* and *LPL* were upregulated about 10- and 2-fold, respectively, in  
16 EGM2-hASCs as compared with Standard-hASCs, which strengthens our previous findings  
17 suggesting an enhanced adipogenic potential of EGM2-hASCs (**fig S5c**). Upon hrTGFβ1 stimulation,  
18 *FABP4* and *LPL* mRNA levels were significantly decreased by at least 2-fold in both Standard-hASCs  
19 and EGM2-hASCs (**fig S5c**), so the adipogenic potential of hASCs can be affected by TGFβ1.

20 TGFβ1 mRNA level was higher in Standard-hASCs than EGM2-hASCs (**Fig S5d**). Of note,  
21 EGM2-hASCs stimulated with hrTGFβ1 exhibited a significant increase in TGFβ1 mRNA level,  
22 which suggests a TGFβ1 amplification loop (**Fig S5d**). Hence, these data confirmed that Standard-  
23 hASCs were sensitized to TGFβ1 signaling and that the addition of hrTGFβ1 increased the Standard-  
24 hASC commitment into osteoblast, chondroblast and VSMC lineages at the expense of adipocyte  
25 lineage.



## 1 **Blockade of TGF $\beta$ 1 pathway restores immaturity and adipogenesis potential of Standard-hASCs**

2 To strengthen the hypothesis that TGF $\beta$ 1 influenced the fate of Standard-hASCs, we evaluated  
3 the effect of inhibitors of the TGF $\beta$ 1 pathway on the adipogenic potential. To this end, we used two  
4 pharmacological inhibitors of TGF $\beta$ 1R, SB431542, and SB505124. The addition of SB431542 was  
5 associated with a cytoplasmic SMAD3 localization in Standard-hASCs, to an extent comparable to  
6 that observed in EGM2-hASCs (**Fig 5a**). Of note, SOX2 protein content was increased in Standard-  
7 hASCs in the presence of SB431542, which suggests a reinstatement of cell immaturity features (**Fig**  
8 **5b**). We next sought to determine whether TGF $\beta$ 1R inhibition might restore the adipogenic potential  
9 in Standard-hASCs. In Standard-hASCs, both SB431542 and SB505124 decreased the mRNA level of  
10 osteoblast lineage-associated *COL1a1* as well as the levels of VSMC lineage-associated *ACTA2*,  
11 *CNN1*, and *TGF $\beta$ 1*. Both SB431542 and SB505124 greatly enhanced levels of adipocyte lineage-  
12 associated mRNAs, including *PGC1 $\alpha$* , *CEBP $\alpha$* , *PPAR $\gamma$ 2*, *FABP4*, *LPL* and *CEBP $\beta$* , in Standard-  
13 hASCs (**Fig 5c**). Remarkably, SB431542 and SB505124 significantly reduced CALPONIN1 protein  
14 content in Standard-hASCs to a comparable level to that observed in EGM2-hASCs (**Fig 5d**).  
15 Importantly, SB431542 improved the Standard-hASC ability to differentiate into beige adipocytes  
16 upon forskolin stimulation, as assessed by the upregulation of *UCPI* as compared with controls (**Fig**  
17 **5e**).



## 1 Discussion

2 Human ASCs exhibit functional characteristics of interest in cell therapy and regenerative  
3 medicine. Here, we studied the effect of culture conditions on ASC characteristics. We compared a  
4 medium with low TGF $\beta$ 1 content, as in EGM2, to one with higher TGF $\beta$ 1 content, as in standard  
5 conditions. It appeared that low TGF $\beta$ 1 content was associated with a certain immaturity of primary  
6 hASCs during *in vitro* expansion, with a higher concentration of TGF $\beta$ 1-primed hASCs toward  
7 osteoblast, chondroblast and VSMC lineages. Importantly, this priming was associated with reduced  
8 adipogenic potential (**Graphical abstract: Fig 6**).

9 In dealing with adult multipotent cells in a cell therapy perspective, it is crucial to keep the  
10 differentiation potential of these cells, a feature linked to cell immaturity. The immature state of cells  
11 is evaluated by both the expression of specific pluripotency-associated genes and the downregulation  
12 of specific lineage markers. We observed that EGM2-hASCs exhibited increased SOX2, OCT4 and  
13 NANOG protein levels as compared with Standard-hASCs. The expression of those “stemness  
14 markers” revealed the enhanced immature state of hASCs under EGM2 conditions versus standard  
15 conditions [21–25]. This observation grounds the strong ability of EGM2-hASCs to differentiate into  
16 osteoblast, chondroblast, and adipocytes. The differentiation process corresponds to sequential  
17 acquisition of specific features and markers of the mature cell type [26,27]. This process is associated  
18 with the loss of the proliferative abilities of the cells [28]. Here, we found low mRNA levels of  
19 osteoblast, chondroblast, and VSMC-lineage markers in proliferative EGM2-hASCs as compared with  
20 Standard-hASCs. This finding suggests that EGM2-hASCs were less engaged toward those lineages,  
21 being in a more immature state. We previously found similar results with EGM2-BM-MSCs, even if  
22 we did not identify in this study TGF $\beta$ 1 as a regulator of immaturity and differentiation abilities [29].  
23 Nevertheless, despite being more immature, both EGM2-hASCs and EGM2-BM-MSCs still showed  
24 the expression, albeit at a low level, of lineage markers. This observation agrees with the Dov Zipori  
25 hypothesis and the results of Pierre Charbord’s team on human BM-MSCs [30]. In clonal and non-  
26 clonal high throughput transcriptomic studies, BM-MSCs expressed osteoblast, chondroblast, VSMC  
27 and adipocyte lineage markers at a basal state [31]. Differentiation of BM-MSCs induced an increase



1 of the intended genomic program and downregulation of lineage-unspecific genes [31]. Other wide-  
2 range bio-computing studies, gathering transcriptomic data from several published reports and using  
3 MSCs from different tissue origins also showed this lineage priming [32]. Our study highlighted that  
4 the TGFβ1 contained in the serum of standard medium induced the expression of osteoblast,  
5 chondroblast, and VSMC lineage markers in hASCs. In the literature, BM-MSCs were mostly  
6 expanded in standard conditions. Thus, the expression at a low level of lineage markers detected in  
7 BM-MSCs could result from TGFβ1 activity. In order to determine whether immaturity is associated  
8 to constitutive low-grade expression of lineage markers, or to bias from culture conditions, the  
9 expression of lineage markers could be evaluated in native BM-MSCs and hASCs.

10 Although EGM2-hASCs appeared more immature than Standard-hASCs, overexpression of  
11 mRNAs and proteins related to the adipocyte lineage suggested that EGM2-hASCs were committed  
12 toward an adipocyte lineage. Given the significantly higher proliferation capacities (**fig S1d**) and  
13 immaturity marks of EGM2-hASCs than Standard-hASCs, we could wonder whether EGM2-hASCs  
14 were less engaged toward an adipocyte lineage than Standard-hASCs were toward osteoblast,  
15 chondroblast, and VSMC lineages. Because the stiffness of plastic culture flasks can decrease the  
16 ability of BM-MSCs to differentiate into mature adipocytes, we similarly could suspect that EGM2-  
17 hASCs were restrained in their adipogenic commitment [33]. In our study, functional experiments  
18 demonstrated the deleterious effects of TGFβ1 on adipogenesis. Indeed, EGM2 contained  $137.5 \pm 12.6$   
19 pg/mL of TGFβ1 protein (**Fig 3f**), 5-fold less TGFβ1 than with standard medium. Hence, this TGFβ1  
20 could be sufficient to impede the strong priming of EGM2-hASCs toward adipogenesis at baseline.  
21 Finally, the immature state of EGM2-hASCs maintained a potential to differentiate into osteoblasts  
22 and chondroblasts, to the same extent as Standard-hASCs (**Fig 1A and S1a**). Altogether, these  
23 observations suggested that EGM2-hASCs could be more immature cells rather than committed to an  
24 adipocyte lineage.

25 Our data also confirmed that Standard-hASCs remained sensitive to TGFβ1 signaling and that  
26 further addition of hrTGFβ1 increased the commitment into osteoblast, chondroblast and VSMC  
27 lineages at the expense of adipogenesis. The role of TGFβ1 in osteoblast, chondroblast and VSMC  
28 lineages was previously evaluated in different cell models [34–39]. Our data confirmed TGFβ1 as a





1 major factor with broad influence on the fate of primary hASCs in their plasticity. Also, we showed  
2 that EGM2-hASCs were not responsive to TGF $\beta$ 1 for osteoblast, chondroblast and VSMC lineages but  
3 were sensitive for adipocyte priming. Recently, the stromal vascular fraction of mouse and human  
4 adipose tissues were analyzed by single-cell RNA-seq and functional experiments [40]. This work  
5 demonstrated that the low adipogenic capabilities of DPP4<sup>+</sup> cells, as compared with ICAM1<sup>+</sup> cells,  
6 were due to differential TGF $\beta$ 1 sensitivity. Our work confirmed that hASCs were heterogeneously  
7 sensitive to TGF $\beta$ 1 and suggested that EGM2 medium maintained their adipogenic capacities.

8 We next showed that the TGF $\beta$ 1 effects on Standard-hASCs could be overturned by using  
9 pharmacological inhibitors of TGF $\beta$ R, promoting immaturity and expression of adipogenic-lineage  
10 biomarkers. Furthermore, blocking the TGF $\beta$ 1 pathway increased beige adipocyte potential. This  
11 finding agrees with the need for SB431542 in EGM2 medium to trigger strong beige adipocyte  
12 differentiation from induced pluripotent stem cells [41]. In addition, SMAD3-null mice exhibited  
13 browning of their white adipose tissue with the appearance of beige adipocytes among white  
14 adipocytes [8,42,43]. From a therapeutic point of view, browning of adipose tissue enhanced systemic  
15 insulin sensitivity and glucose tolerance in mice, and protected the animals against high-fat diet-  
16 induced obesity and diabetes. Similar results were recently obtained for TGF $\beta$ R1-deficient mice [44].  
17 Conversely, *in vivo* intraperitoneal injection of TGF $\beta$ 1 downregulated beige adipocyte markers,  
18 including UCP1, in white adipose tissue [8]. Finally, beige adipocytes obtained from human adipose-  
19 tissue explants cultured in EGM2 conditions could improve the glucose metabolism of obese NSG  
20 mice [7].

21 Therefore, blockade of the TGF $\beta$ 1 pathway or utilization of EGM2 medium to expand primary  
22 hASCs could help retain immature features of hASCs *in vitro* and strong beige adipocyte  
23 differentiation abilities. In the clinic, this characteristic could be valorized to combat obesity and  
24 diabetes. Considering the numerous clinical trials using hMSCs or hASCs to treat a large panel of  
25 degenerative diseases or injuries, there is a need to optimize culture conditions to obtain high cell  
26 yields.



## 1 **Conclusions**

2 Here, we showed that medium containing TGFβ1 induced differentiation toward osteoblast,  
3 chondroblast and VSMC lineages of primary hASCs and reduced adipogenic potential. With reduced  
4 TGFβ1 content, EGM2 maintained the high immaturity features of hASCs, allowing to exploit their  
5 strong white and beige adipogenic potential. Hence, we encourage paying particular attention to  
6 TGFβ1 content for MSC cultures in research as well as for clinical objectives.

7

8 **Acknowledgments:** The authors acknowledge Jean-Gérard Descamps, Yannick Jeanson and Noémie  
9 Juin for their technical expertise. This work was supported by the Etablissement Français du Sang  
10 Scientific Council (APR 2014). HL received funding from the French Research and Educational  
11 Ministry at Paul Sabatier University and the Etablissement Français du Sang. AN received funding  
12 from the Japanese Society for the Promotion of Science (JSPS), Young B KAKENHI (Grant No.  
13 17K15729).

14

15 **Conflict of interest:** The authors declare that they have no conflict of interests.



## 1 **References**

- 2 1 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human  
3 mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143–147.
- 4 2 Bianco P, Cao X, Frenette PS, et al. The meaning, the sense and the significance:  
5 translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nat Med* 2013;19:35–  
6 42.
- 7 3 Naji A, Eitoku M, Favier B, et al. Biological functions of mesenchymal stem cells and  
8 clinical implications. *Cell Mol Life Sci CMLS* 2019.
- 9 4 Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem  
10 cells. *Mol Biol Cell* 2002;13:4279–4295.
- 11 5 Finlin BS, Memetimin H, Confides AL, et al. Human adipose beiging in response to cold and  
12 mirabegron. *JCI Insight* 2018;3.
- 13 6 Cousin B, Cinti S, Morroni M, et al. Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose  
14 tissue: molecular and morphological characterization. *J Cell Sci* 1992;103 ( Pt 4):931–942.
- 15 7 Min SY, Kady J, Nam M, et al. Human “brite/beige” adipocytes develop from capillary  
16 networks, and their implantation improves metabolic homeostasis in mice. *Nat Med*  
17 2016;22:312–318.
- 18 8 Yadav H, Quijano C, Kamaraju AK, et al. Protection from obesity and diabetes by blockade  
19 of TGF- $\beta$ /Smad3 signaling. *Cell Metab* 2011;14:67–79.
- 20 9 Rosenwald M, Perdikari A, Rüllicke T, et al. Bi-directional interconversion of brite and  
21 white adipocytes. *Nat Cell Biol* 2013;15:659–667.
- 22 10 Tang W, Zeve D, Suh JM, et al. White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature.  
23 *Science* 2008;322:583–586.
- 24 11 Crisan M, Yap S, Casteilla L, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in  
25 multiple human organs. *Cell Stem Cell* 2008;3:301–313.
- 26 12 Long JZ, Svensson KJ, Tsai L, et al. A smooth muscle-like origin for beige adipocytes. *Cell*  
27 *Metab* 2014;19:810–820.
- 28 13 Tran K-V, Gealekman O, Frontini A, et al. The vascular endothelium of the adipose tissue  
29 gives rise to both white and brown fat cells. *Cell Metab* 2012;15:222–229.
- 30 14 Gronthos S, Zannettino ACW, Hay SJ, et al. Molecular and cellular characterisation of  
31 highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci*  
32 2003;116:1827–1835.
- 33 15 Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-  
34 based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S*  
35 *A* 2005;102:15545–15550.
- 36 16 Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson K-F, et al. PGC-1 $\alpha$ -responsive genes involved in  
37 oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet*  
38 2003;34:267–273.
- 39 17 Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene  
40 lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 2009;4:44–57.



1 18Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the  
2 comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res* 2009;37:1–13.

3 19Rodda DJ, Chew J-L, Lim L-H, et al. Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2.  
4 *J Biol Chem* 2005;280:24731–24737.

5 20Merlin J, Sato M, Nowell C, et al. The PPAR $\gamma$  agonist rosiglitazone promotes the induction  
6 of brite adipocytes, increasing  $\beta$ -adrenoceptor-mediated mitochondrial function and  
7 glucose uptake. *Cell Signal* 2018;42:54–66.

8 21Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult  
9 human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007;131:861–872.

10 22Arnold K, Sarkar A, Yram MA, et al. Sox2(+) adult stem and progenitor cells are important  
11 for tissue regeneration and survival of mice. *Cell Stem Cell* 2011;9:317–329.

12 23Tompkins DH, Besnard V, Lange AW, et al. Sox2 is required for maintenance and  
13 differentiation of bronchiolar Clara, ciliated, and goblet cells. *PLoS One* 2009;4:e8248.

14 24Lai Y-S, Chang C-W, Pawlik KM, et al. SRY (sex determining region Y)-box2 (Sox2)/poly  
15 ADP-ribose polymerase 1 (Parp1) complexes regulate pluripotency. *Proc Natl Acad Sci U S*  
16 *A* 2012;109:3772–3777.

17 25Wuebben EL, Rizzino A. The dark side of SOX2: cancer - a comprehensive overview.  
18 *Oncotarget* 2017;8:44917–44943.

19 26Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev*  
20 *Immunol* 2008;8:726–736.

21 27Laurenti E, Göttgens B. From haematopoietic stem cells to complex differentiation  
22 landscapes. *Nature* 2018;553:418–426.

23 28Ruijtenberg S, van den Heuvel S. Coordinating cell proliferation and differentiation:  
24 Antagonism between cell cycle regulators and cell type-specific gene expression. *Cell*  
25 *Cycle Georget Tex* 2016;15:196–212.

26 29Bouacida A, Rosset P, Trichet V, et al. Pericyte-like progenitors show high immaturity and  
27 engraftment potential as compared with mesenchymal stem cells. *PLoS One*  
28 2012;7:e48648.

29 30Zipori D. The nature of stem cells: state rather than entity. *Nat Rev Genet* 2004;5:873–  
30 878.

31 31Delorme B, Ringe J, Pontikoglou C, et al. Specific lineage-priming of bone marrow  
32 mesenchymal stem cells provides the molecular framework for their plasticity. *Stem Cells*  
33 *Dayt Ohio* 2009;27:1142–1151.

34 32Roson-Burgo B, Sanchez-Guijo F, Del Cañizo C, et al. Insights into the human mesenchymal  
35 stromal/stem cell identity through integrative transcriptomic profiling. *BMC Genomics*  
36 2016;17:944.

37 33Talele NP, Fradette J, Davies JE, et al. Expression of  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin Determines  
38 the Fate of Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cell Rep* 2015;4:1016–1030.

39 34Xia W, Jin Y-Q, Kretlow JD, et al. Adenoviral transduction of hTGF-beta1 enhances the  
40 chondrogenesis of bone marrow derived stromal cells. *Biotechnol Lett* 2009;31:639–646.





1 35Mehlhorn AT, Niemeyer P, Kaschte K, et al. Differential effects of BMP-2 and TGF-beta1  
2 on chondrogenic differentiation of adipose derived stem cells. *Cell Prolif* 2007;40:809–  
3 823.

4 36Zhao L, Jiang S, Hantash BM. Transforming growth factor beta1 induces osteogenic  
5 differentiation of murine bone marrow stromal cells. *Tissue Eng Part A* 2010;16:725–733.

6 37Maeda S, Hayashi M, Komiya S, et al. Endogenous TGF-beta signaling suppresses  
7 maturation of osteoblastic mesenchymal cells. *EMBO J* 2004;23:552–563.

8 38Hautmann MB, Madsen CS, Owens GK. A transforming growth factor beta (TGFbeta)  
9 control element drives TGFbeta-induced stimulation of smooth muscle alpha-actin gene  
10 expression in concert with two CARG elements. *J Biol Chem* 1997;272:10948–10956.

11 39Yang H, Zhang L, Weakley SM, et al. Transforming growth factor-beta increases the  
12 expression of vascular smooth muscle cell markers in human multi-lineage progenitor  
13 cells. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res* 2011;17:BR55-61.

14 40Merrick D, Sakers A, Irgebay Z, et al. Identification of a mesenchymal progenitor cell  
15 hierarchy in adipose tissue. *Science* 2019;364.

16 41Hafner A-L, Contet J, Ravaud C, et al. Brown-like adipose progenitors derived from human  
17 induced pluripotent stem cells: Identification of critical pathways governing their  
18 adipogenic capacity. *Sci Rep* 2016;6:32490.

19 42Tiano JP, Springer DA, Rane SG. SMAD3 negatively regulates serum irisin and skeletal  
20 muscle FNDC5 and peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1- $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ )  
21 during exercise. *J Biol Chem* 2015;290:11431.

22 43McDonald ME, Li C, Bian H, et al. Myocardin-related transcription factor A regulates  
23 conversion of progenitors to beige adipocytes. *Cell* 2015;160:105–118.

24 44Wankhade UD, Lee J-H, Dagur PK, et al. TGF- $\beta$  receptor 1 regulates progenitors that  
25 promote browning of white fat. *Mol Metab* 2018;16:160–171.

26



## **Figures**

### **Cell immaturity and white/beige adipocyte-potential of primary human adipose-derived stromal cells are restrained by culture-medium TGF $\beta$ 1**

Hélène Leménager, Loïc M.A. Fiévet, Fabien Guilloton, Abderrahim Naji, Benoît Chaput, Narufumi Suganuma, Jean-Christophe Pagès, Luc Sensebé, Audrey Carrière, Louis Casteilla, Frédéric Deschaseaux

**Fig 1 Differentiation potential and immature state of EGM2-hASCs**

**Fig 2 White/beige adipogenic potential of Standard- and EGM2-hASCs**

**Fig 3 TGF $\beta$ 1 as a hallmark of Standard-hASCs**

**Fig 4 Effect of TGF $\beta$ 1 in Standard- and EGM2-hASCs**

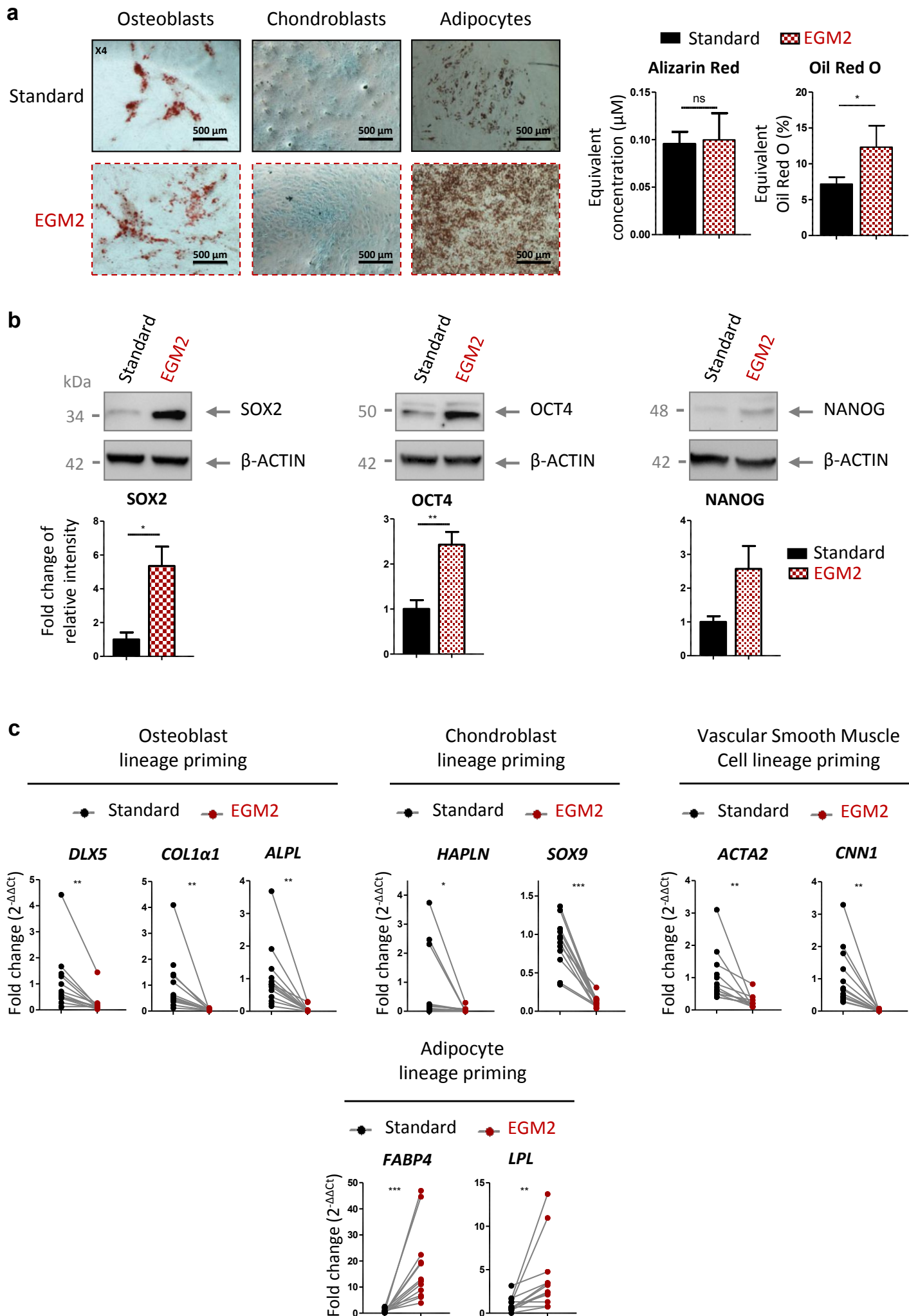
**Fig 5 Inhibition of TGF $\beta$ 1 effects on Standard-hASCs**

**Fig 6 Graphical abstract**

### **Fig 1 Differentiation potential and immature state of EGM2-hASCs**

**a-c** Differentiation potential (a) and immature state (b-c) evaluation of hASCs expanded in MEM with 10% FBS (Standard; black) or EGM2 medium (EGM2; red). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . **a** Both types of hASCs were submitted to osteogenic, chondrogenic and adipogenic differentiation and were then analyzed for calcium deposition staining with Alizarin red (left panels), sulfated proteoglycan staining with Alcian blue (middle panels) and lipid staining with Oil-red O (right panels), respectively. Photonic microscopy. The calcium deposition and lipid content was quantified by chemical processes.  $n=3$ , Wilcoxon test. Scale bar = 500  $\mu\text{m}$ , magnification = 4X. **b** Western blot analysis of SOX2, OCT4 and NANOG proteins in both types of hASCs after expansion.  $\beta$ -ACTIN was a loading control. Data were quantified according to band intensity normalized to the corresponding  $\beta$ -ACTIN band and expressed as fold change relative to Standard condition.  $n=4$ , Mann-Whitney test. **c** RT-qPCR analysis of mRNA levels of characteristic markers for osteoblast (*DLX5*, *COL1 $\alpha$ 1*, and *ALPL*), chondroblast (*HAPLN* and *SOX9*), vascular smooth muscle cell (VSMC; *ACTA2* and *CNN1*) and adipocyte (*FABP4* and *LPL*) lineages in both types of hASCs after expansion. Data are expressed as fold change relative to both the housekeeping gene and Standard condition.  $n=13$ , Wilcoxon test.

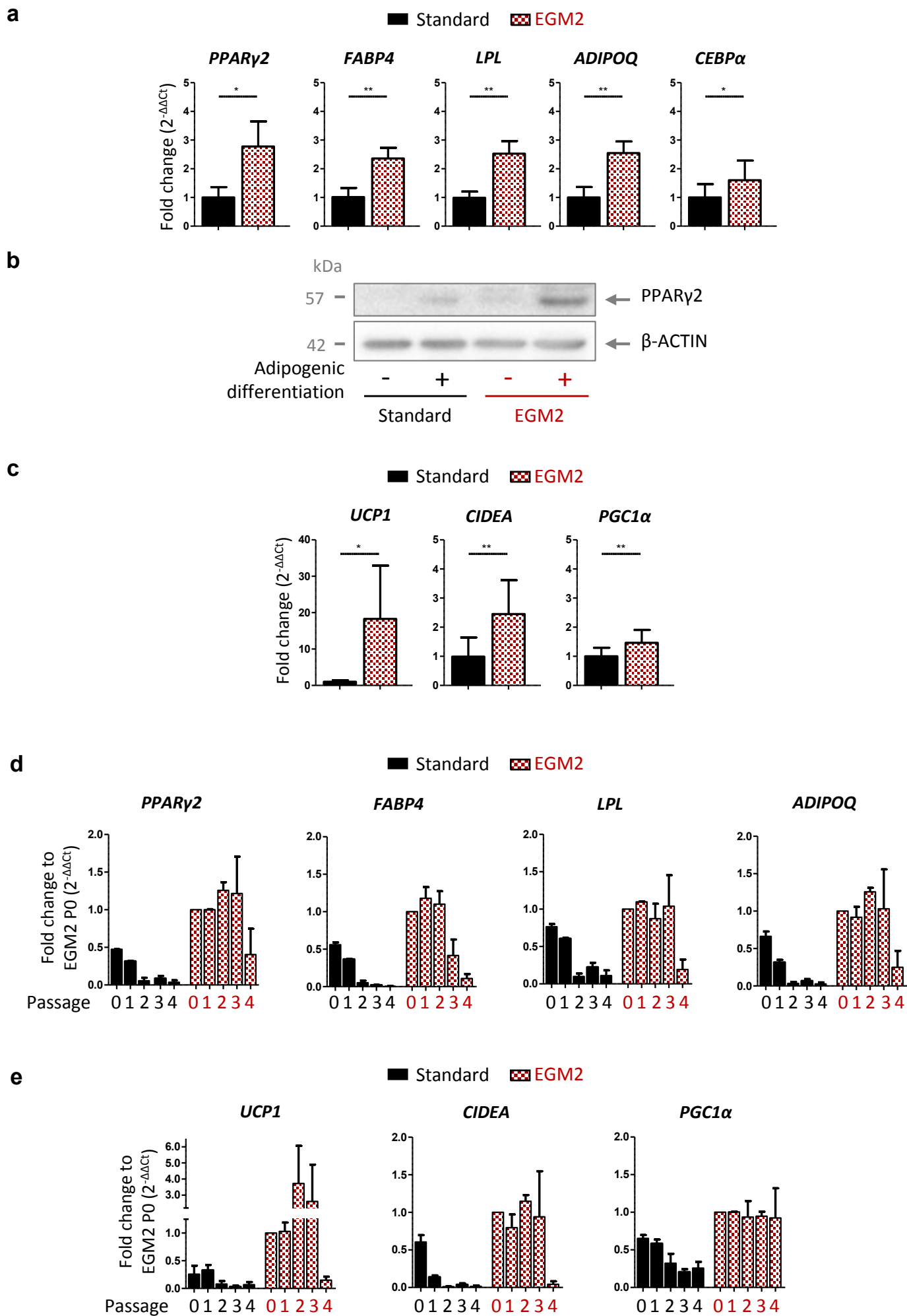
**Fig 1 Differentiation potential and immature state of EGM2-hASCs**



**Fig 2 White/beige adipogenic potential of Standard- and EGM2-hASCs**

**a-e** Standard-hASCs (black) and EGM2-hASCs (red) from passage 0 (a-c) to P4 (d-e) were subjected to adipogenic differentiation and analyzed for expression of characteristic markers of adipocytes by RT-qPCR (a, c-e) and western blot assay (b). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ . **a** mRNA expression of *PPAR $\gamma$ 2*, *FABP4*, *LPL*, *ADIPOQ*, and *CEBPA*. Data are expressed as fold change relative to both the housekeeping gene and Standard condition. n=8, Wilcoxon test. **b** PPAR $\gamma$ 2 and  $\beta$ -ACTIN loading control protein expression. n=1 **c** mRNA expression of characteristic markers of beige adipocytes (*UCP1*, *CIDEA*, and *PGC1 $\alpha$* ). n=8, Wilcoxon. Data are expressed as fold change relative to both the housekeeping gene and Standard condition. **d** mRNA expression of whole types of adipocyte markers (*PPAR $\gamma$ 2*, *FABP4*, *LPL*, and *ADIPOQ*) or **e** specific to beige adipocytes (*UCP1*, *CIDEA* and *PGC1 $\alpha$* ). n=2. Data are expressed as fold change relative to both the housekeeping gene and EGM2 P0 condition.

**Fig 2 White/beige adipogenic potential of Standard- and EGM2-hASCs**

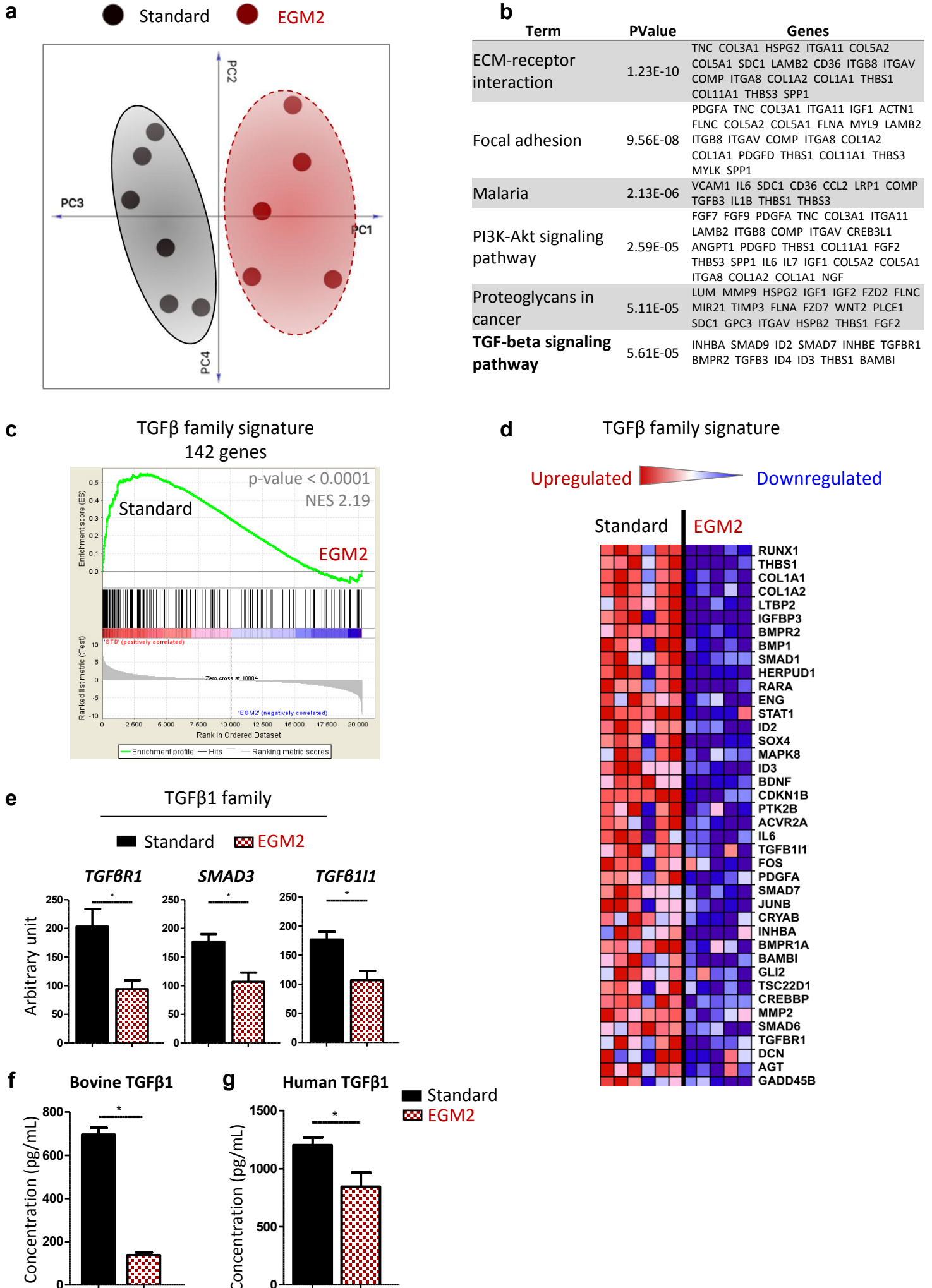




### **Fig 3 TGFβ1 as a hallmark of Standard-hASCs**

**a-g** Standard-hASCs (black, n=6) and EGM2-hASCs (red, n=5) were analyzed by high throughput transcriptomic studies (a-e), and TGFβ1 in media (f) or supernatant (g) was evaluated. **a** Analysis of 4 principal components for both types of hASCs. **b** Significant gene ontology terms of pathway analysis for Standard-hASCs according to the corresponding p-value. **c** Heat map representing the 40 top-expressed TGFβ-related genes overexpressed in Standard-hASCs as compared with EGM2-hASCs. **d** Gene Set Enrichment Analysis for TGFβ family signature in Standard-hASCs and EGM2-hASCs. Results were statistically significant according to FWER p-value depicted on the panel. **e** mRNA expression of representative markers of the TGFβ1 pathway (*TGFβ1*, *SMAD3*, and *TGFβR1*) obtained from microarray studies. Wilcoxon test, \* p<0.05. **f** Bovine TGFβ1 concentration in Standard (black) and EGM2 (red) medium analyzed by sandwich ELISA. n=4, Mann-Whitney test, \* p<0.05. **g** Human TGFβ1 concentration in the supernatant of both hASCs types analyzed by sandwich ELISA. Data are expressed as fold change of level relative to Standard condition. n=5, Mann-Whitney test, \* p<0.05.

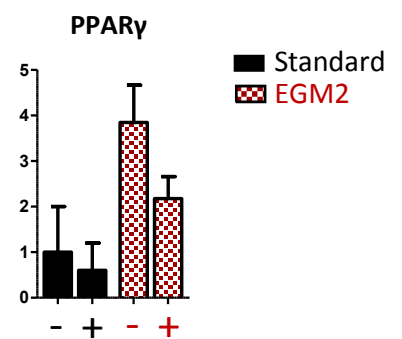
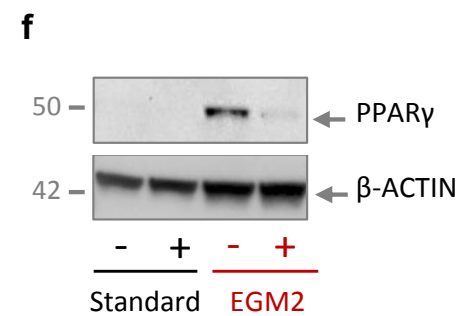
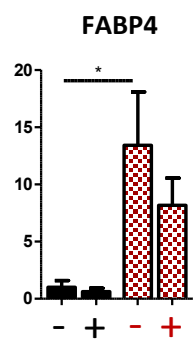
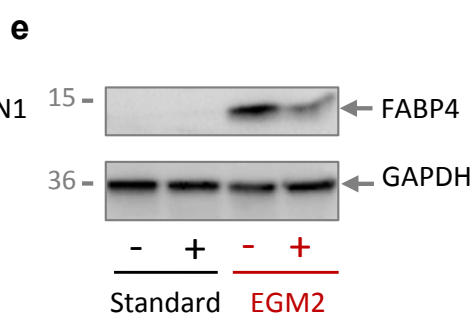
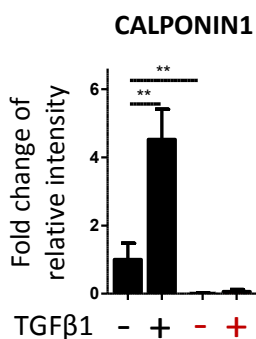
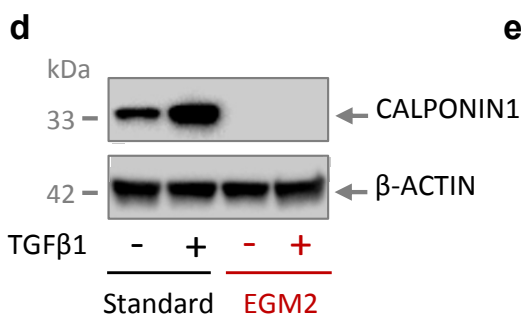
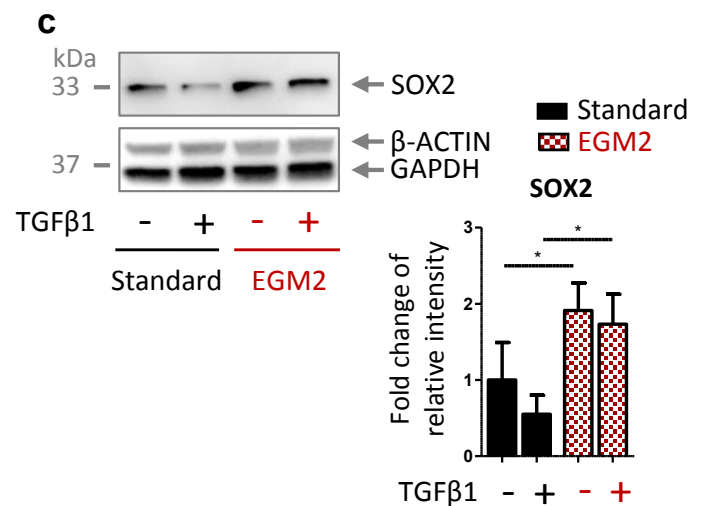
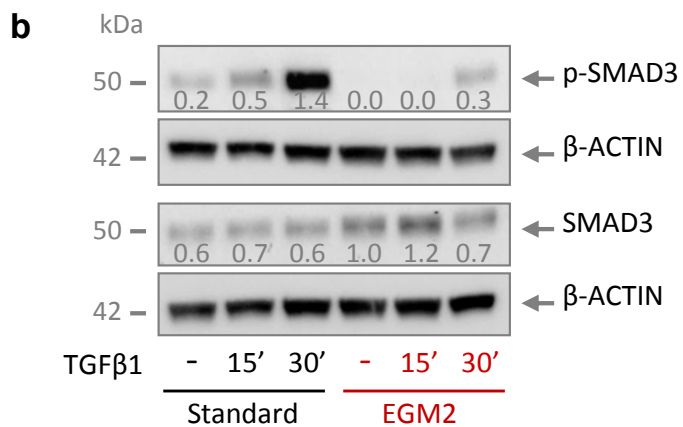
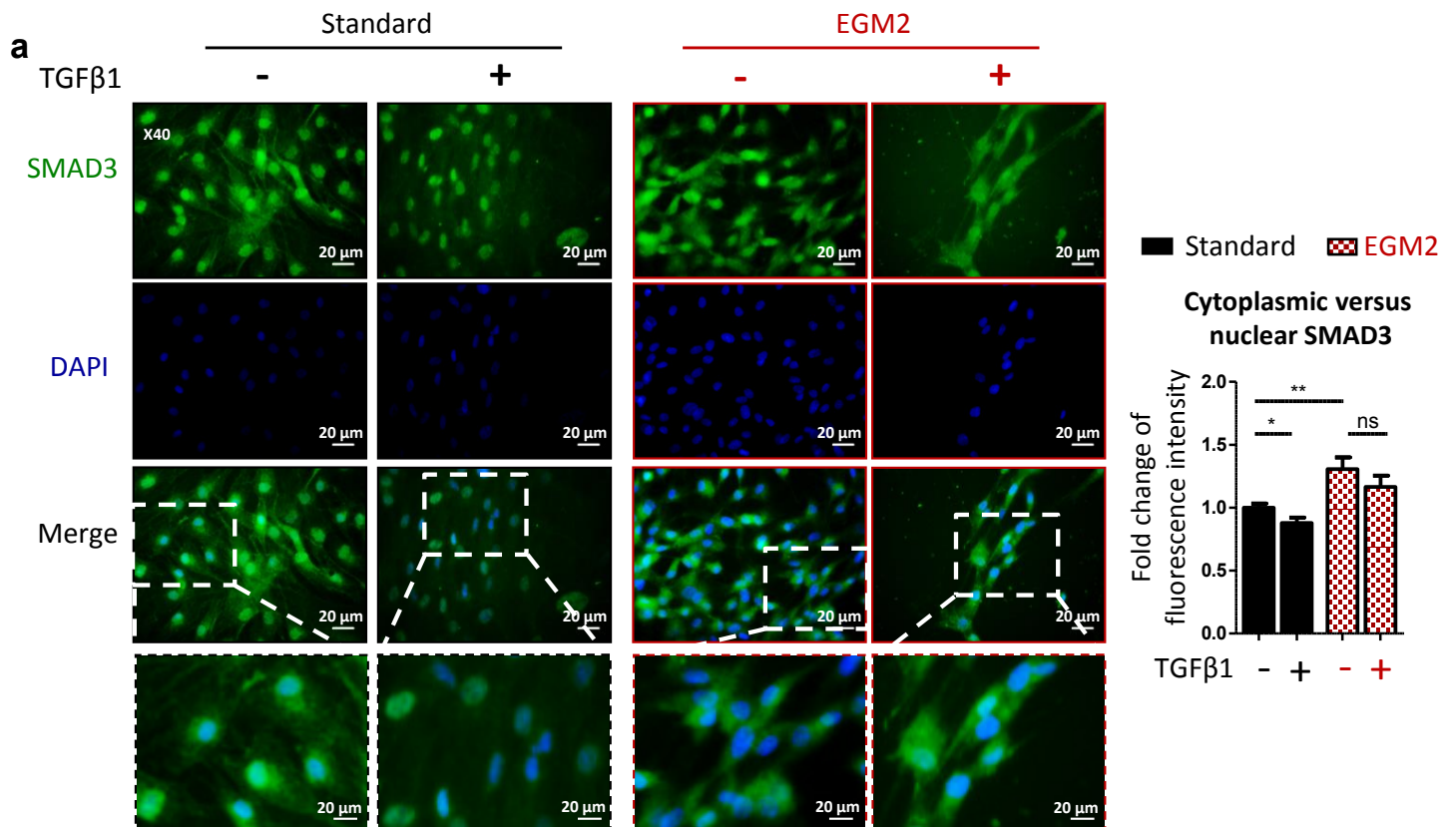
**Fig 3 TGFβ1 as a hallmark of Standard-hASCs**



#### **Fig 4 Effect of TGFβ1 in Standard- and EGM2-hASCs**

**a-f** Standard-hASCs (black) and EGM2-hASCs (red) were treated (+) or not (-) with 10 ng/mL recombinant hTGFβ1 and analyzed by immunofluorescence (a) and western blot assay (b-f). \* p<0.05, \*\* p<0.01. **a** SMAD3 protein staining (green) in hASCs treated or not for 3 days. Nuclei were stained with DAPI. Images are representative of 6 independent experiments. Photonic microscopy. Scale bar = 20 μm, magnification = 40X. Mann-Whitney test. **b** phospho-SMAD3 (Ser423/425) and total SMAD3 protein levels in hASCs treated or not for 15 or 30 min (15' – 30'). β-ACTIN was a loading control. n=4. **c-f** SOX2 (**c**), CALPONIN1 (**d**), FABP4 (**e**) and PPARγ (**f**) protein levels in hASCs treated or not for 3 days. β-ACTIN or GAPDH was a loading control. Data were quantified according to band intensity normalized to the corresponding β-ACTIN band and expressed as fold change relative to Standard untreated condition. At least n=4, Mann-Whitney test.

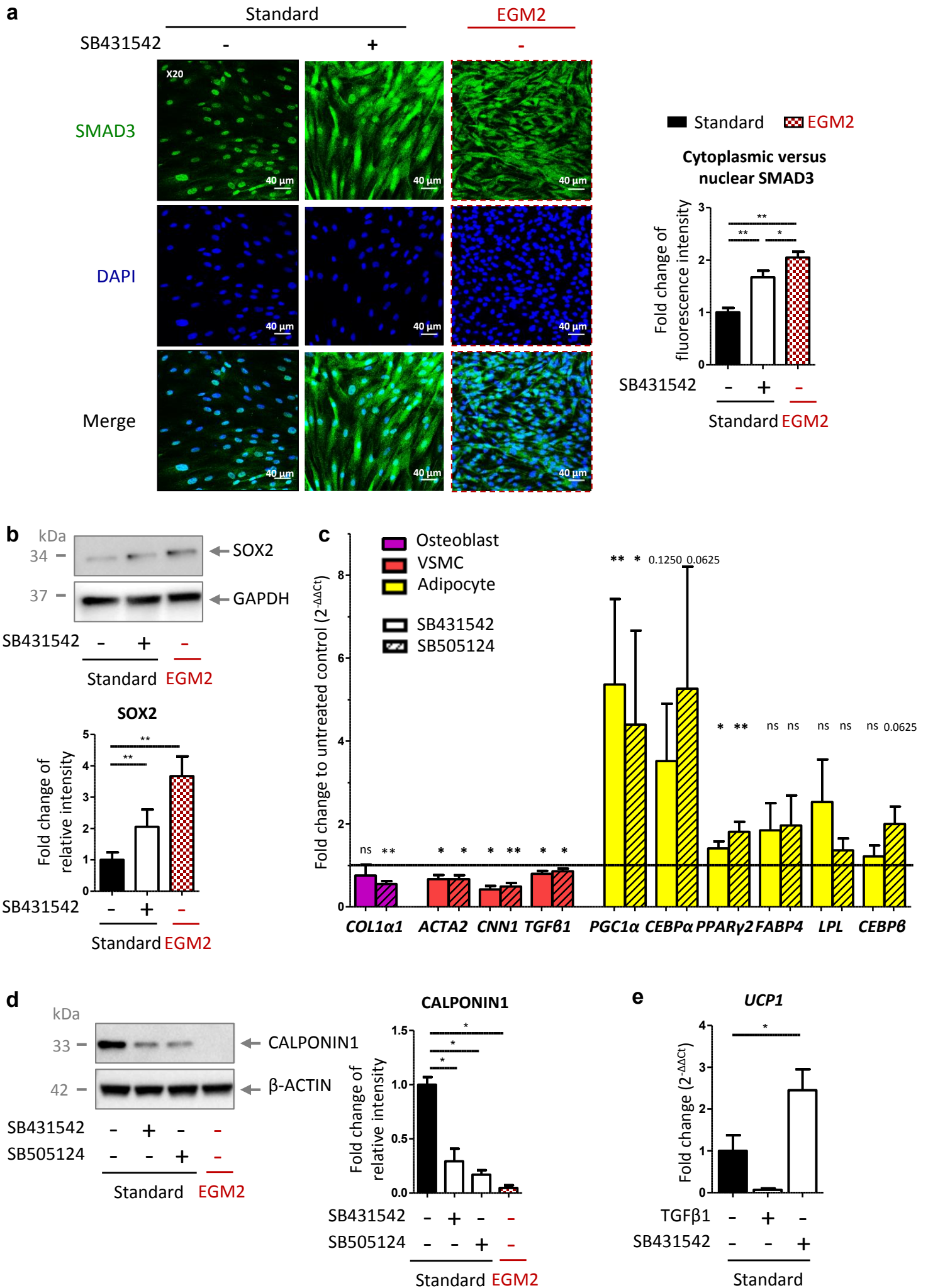
**Fig 4 Effect of TGFβ1 in Standard- and EGM2-hASCs**



### Fig 5 Inhibition of TGFβ1 effects on Standard-hASCs

**a-e** Standard-hASCs (black) and EGM2-hASCs (red) were treated (+) or not (-) with 1 μM TGFβ1 receptor inhibitor for 3 days (SB431542 or SB505124, as specified in figure), and analyzed by immunofluorescence (a), Western blot analysis (b,d) or RT-qPCR (c,e) before (a-d) or after (e) adipogenic differentiation. \* p<0.05, \*\* p<0.01. **a** SMAD3 protein staining (green) in hASCs. Nuclei were stained with DAPI. Images are representative of 6 independent experiments. Confocal microscopy. Scale bar = 40 μm, magnification = 20X. Mann-Whitney test. **b** SOX2 protein levels. GAPDH was a loading control. Data were quantified according to band intensity normalized to the corresponding GAPDH band and expressed as fold change relative to Standard untreated condition. n=8, Wilcoxon test. **c** mRNA expression of osteoblast (*COL1a1*), VSMC (*ACTA2*, *CNN1*, and *TGFβ1*), and adipocyte (*PGC1α*, *CEBPα*, *PPARγ2*, *FABP4*, *LPL*, and *CEBPβ*) characteristic markers in Standard-hASCs. Data are expressed as fold change relative to both the housekeeping gene and untreated condition. n=7, Wilcoxon test. **d** CALPONIN1 protein level. β-ACTIN was a loading control. Data were quantified according to band intensity normalized to the corresponding β-ACTIN band and expressed as fold change relative to Standard untreated condition. n=3, Mann-Whitney test. **e** mRNA expression of *UCPI* in Standard-hASCs treated (+) or not (-) with 10 ng/mL recombinant hTGFβ1 or 1 μM TGFβ1 receptor inhibitor SB431542 for 3 days before 11 days of adipogenic differentiation and overnight forskolin stimulation. Data are expressed as fold change relative to both the housekeeping gene and untreated condition. n=6, Mann-Whitney test.

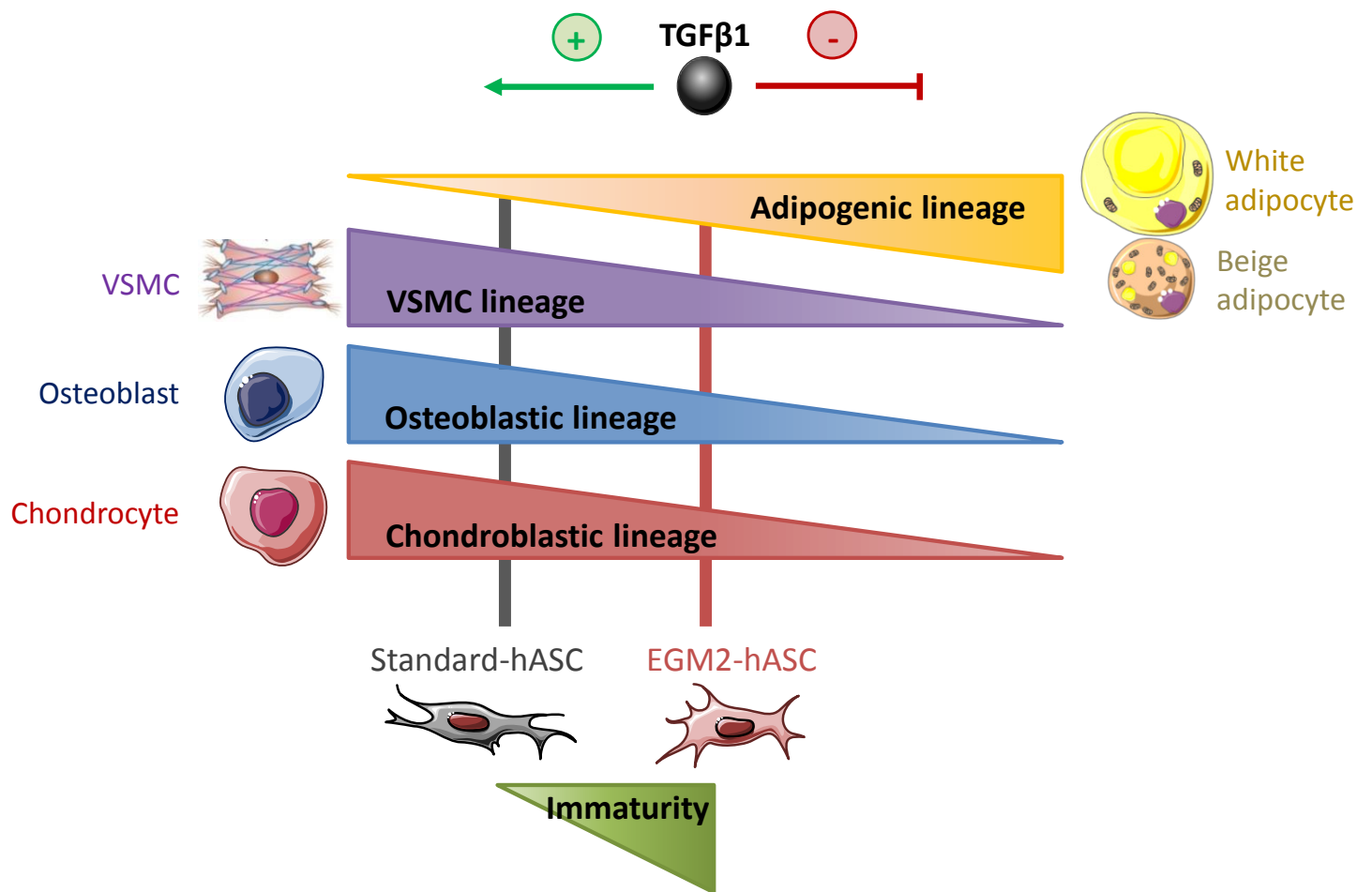
**Fig 5 Inhibition of TGFβ1 effects on Standard-hASCs**



**Fig 6 Graphical abstract**

TGF $\beta$ 1 induces differentiation toward osteoblast, chondroblast and VSMC lineages and conversely inhibits the adipogenic lineage of hASCs. With reduced TGF $\beta$ 1 content, EGM2 maintained high immaturity features of hASCs, permitting strong differentiation potential toward osteoblasts and chondroblasts, with a better extension for the adipogenic lineage, as compared with chronically TGF $\beta$ 1-primed Standard-hASCs. Artwork performed by using Powerpoint software.

Fig 6 Graphical abstract







## **Supplemental figures**

### **Cell immaturity and white/beige adipocyte-potential of primary human adipose-derived stromal cells are restrained by culture-medium TGF $\beta$ 1**

Hélène Leménager, Loïc M.A. Fiévet, Fabien Guilloton, Abderrahim Naji, Benoît Chaput, Narufumi Suganuma, Jean-Christophe Pagès, Luc Sensebé, Audrey Carrière, Louis Casteilla, Frédéric Deschaseaux

**Fig S1 Comparative characterization of Standard- and EGM2-hASCs**

**Fig S2 Lineage markers analysis in adipocytes from Standard- and EGM2-hASCs**

**Fig S3 PCA and GSEA analyses of adipogenic and anti-adipogenesis gene signatures**

**Fig S4 GSEA of osteoblast, chondroblast and VSMC gene signatures**

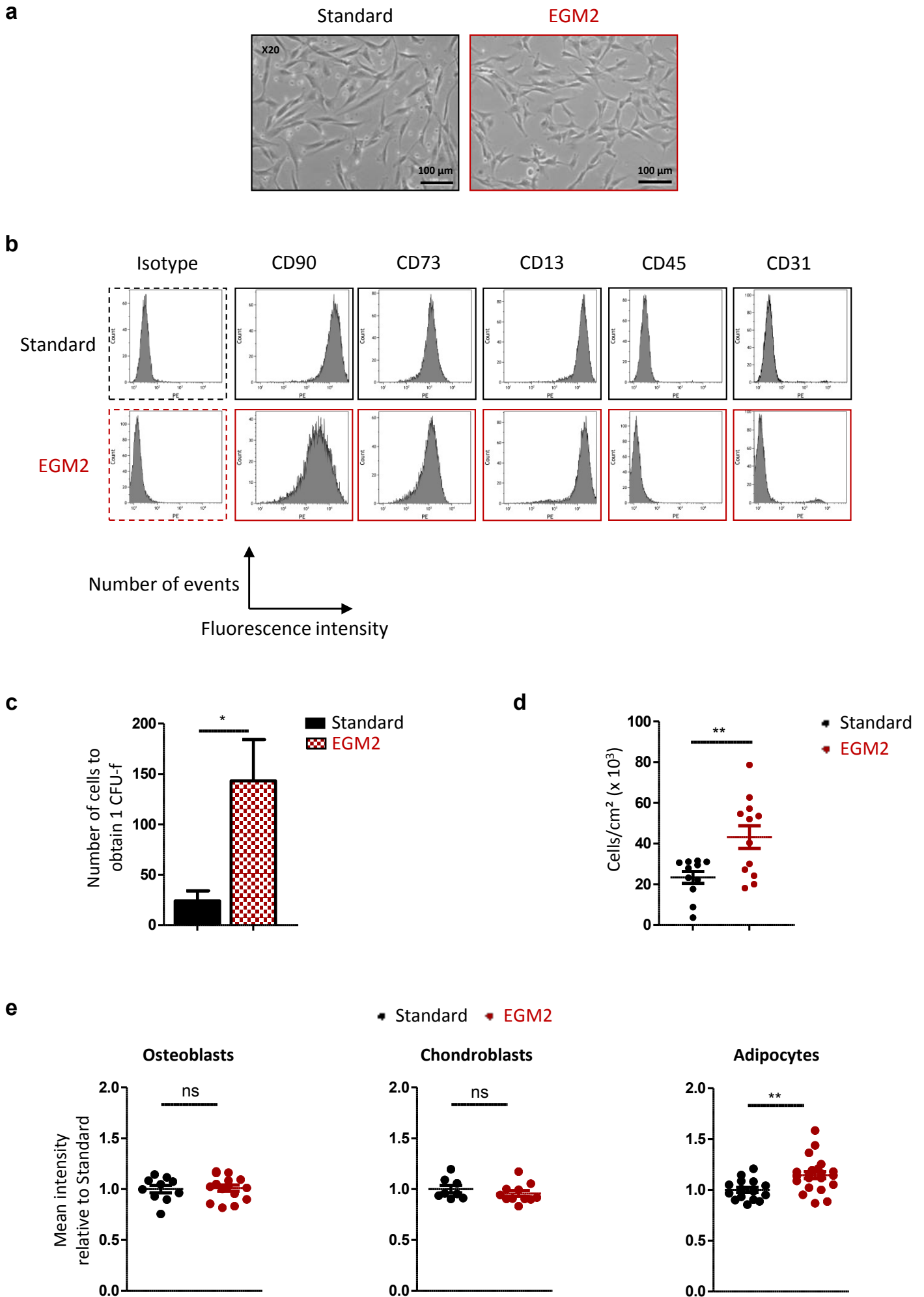
**Fig S5 Osteoblast, VSMC and adipocyte lineage under TGF $\beta$ 1 induction**

**Table S1 List of primers used in RT-qPCR**

### **Fig S1 Comparative characterization of Standard- and EGM2-hASCs**

**a-e** Standard-hASCs (black) and EGM2-hASCs (red) were analyzed at phenotypic (a-b) and functional (c-e) levels. \*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$ . **a** Morphology of both types of hASCs. Images are representative of 46 independent experiments. Photonic microscopy. Scale bar = 100  $\mu\text{m}$ , magnification = 20X. **b** Flow cytometry of both types of hASCs for CD90, CD73, CD13, CD45 and CD31 (all in PE), and negative isotype control in PE. **c** Number of cells to obtain 1 CFU-F in Standard (black) or EGM2 (red) medium.  $n=3$ , Mann-Whitney test. **d** Total number of living hASCs per  $\text{cm}^2$  of growth area counted by Malassez blade and blue trypan died cells staining at the end of expansion in both media.  $n=12$ , Wilcoxon test. **e** Mean intensity quantification of red (Alizarin red and Oil-red O) or blue (Alcian blue) colors in images acquired after osteogenesis, chondrogenesis or adipogenesis of both types of hASCs in Figure 1A. Mann-Whitney test.

**Fig S1 Comparative characterization of Standard- and EGM2-hASCs**

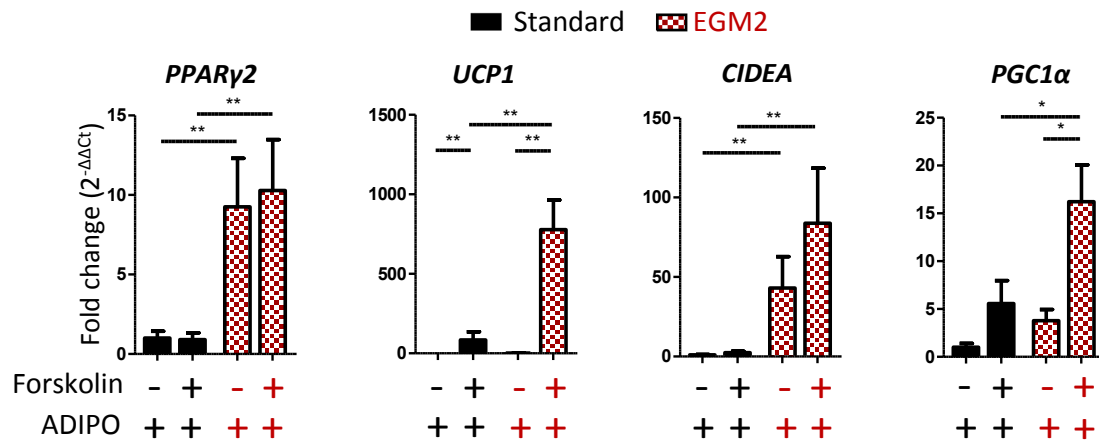


**Fig S2 Lineage markers analysis in adipocytes from Standard- and EGM2-hASCs**

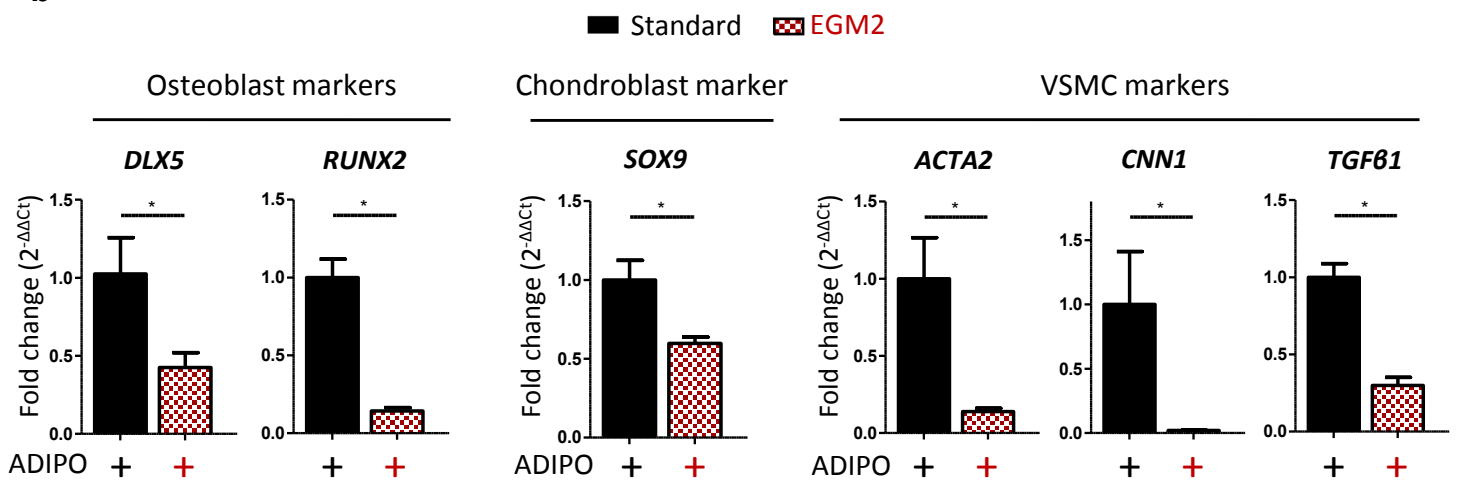
**a-b** Standard-hASCs (black) and EGM2-hASCs (red) were subjected to adipogenic differentiation and analyzed for expression of characteristic markers of adipocytes (a), osteoblasts, chondroblasts, and VSMCs (b) by RT-qPCR. \*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$ . **a** mRNA expression of *PPAR $\gamma$ 2*, *UCP1*, *CIDEA*, and *PGC1 $\alpha$*  in adipocytes overnight treated (+) or not (-) with 2  $\mu$ M forskolin. Data are expressed as fold change relative to both the housekeeping gene and untreated Standard condition. n=6, Mann-Whitney test. **b** mRNA expression of osteoblasts (*DLX5* and *RUNX2*, left), chondroblasts (*SOX9*, middle) and VSMCs (*ACTA2*, *CNN1*, and *TGF $\beta$ 1*, right). Data are expressed as fold change relative to both the housekeeping gene and Standard condition. n=4, Mann-Whitney test.

**Fig S2 Lineage markers analysis in adipocytes from Standard- and EGM2-hASCs**

**a**



**b**

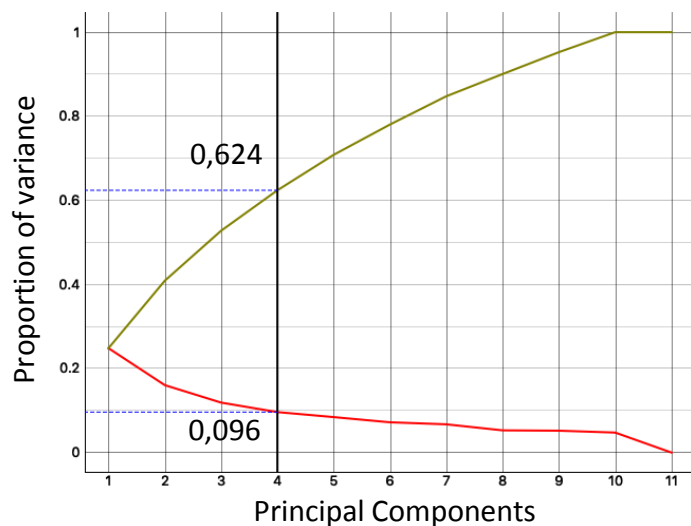


### **Fig S3 PCA and GSEA analyses of adipogenic and anti-adipogenesis gene signatures**

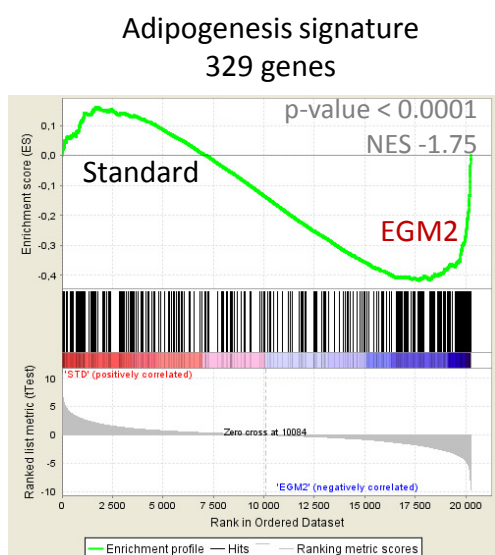
**a-e** Standard-hASCs (black, n=6) and EGM2-hASCs (red, n=5) were analyzed by high-throughput transcriptomic studies such as principal component analysis (**a**) and Gene Set Enrichment Analysis (**c-e**) for adipogenesis (**b-c**) and anti-adipogenesis signatures (**d-e**). \*,  $p < 0.05$ . **a** Proportion of variance of genes differentially expressed between both types of hASCs. **b,d** GSEA of Standard-hASCs and EGM2-hASCs. Results were statistically significant according to FWER p-values depicted on panels. **c** mRNA expression of representative markers of adipogenesis signature (*PPARG*, *PLIN2*, *CEBP $\beta$* , and *FABP3 to 5*) obtained from microarray studies. Wilcoxon test. **e** mRNA expression of representative markers of anti-adipogenesis signature (*KLF2*, *KLF3*, *CDKN1B*, *NCOA2*, *VDR*, and *TCF7L2*) obtained from microarray studies. Wilcoxon test.

**Fig S3 PCA and GSEA analyses of adipogenic and anti-adipogenesis gene signatures**

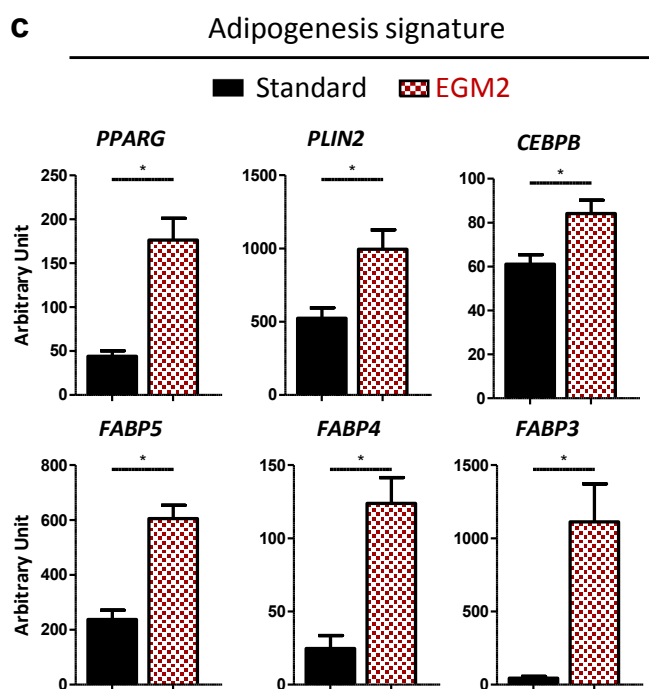
**a**



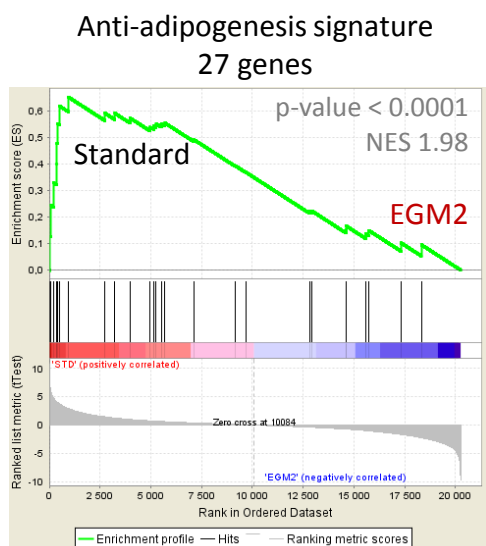
**b**



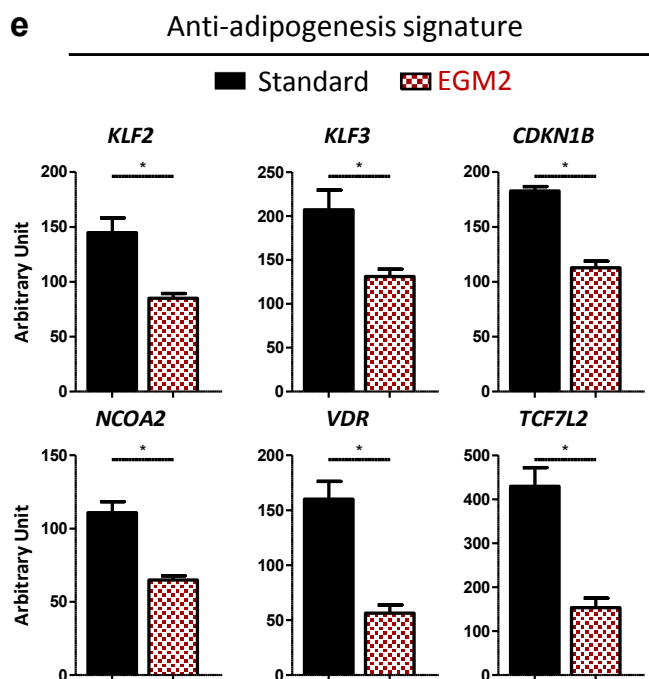
**c**



**d**



**e**

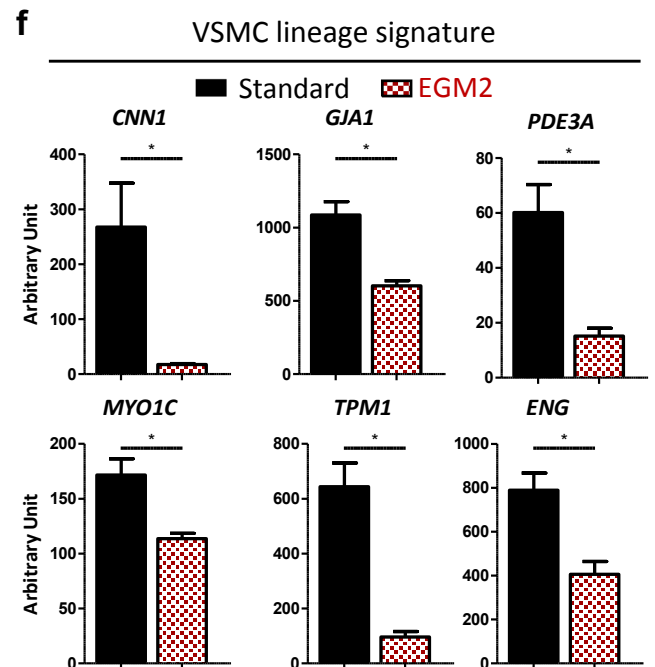
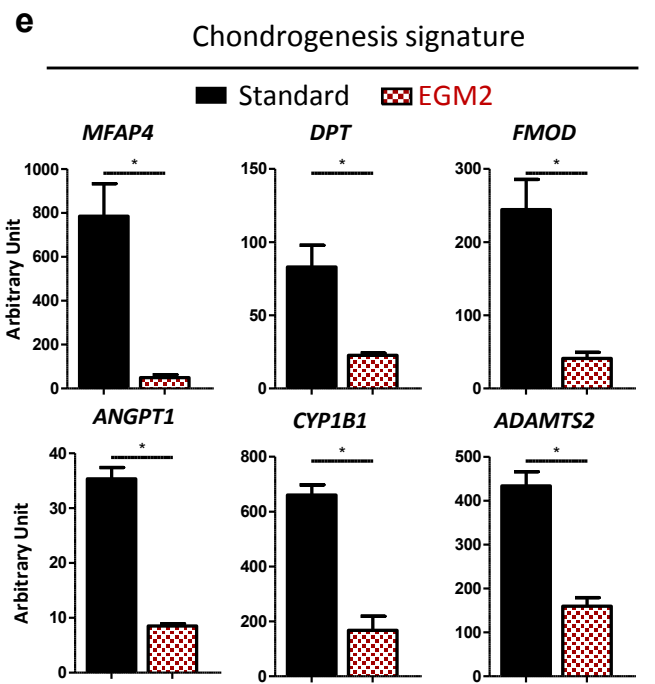
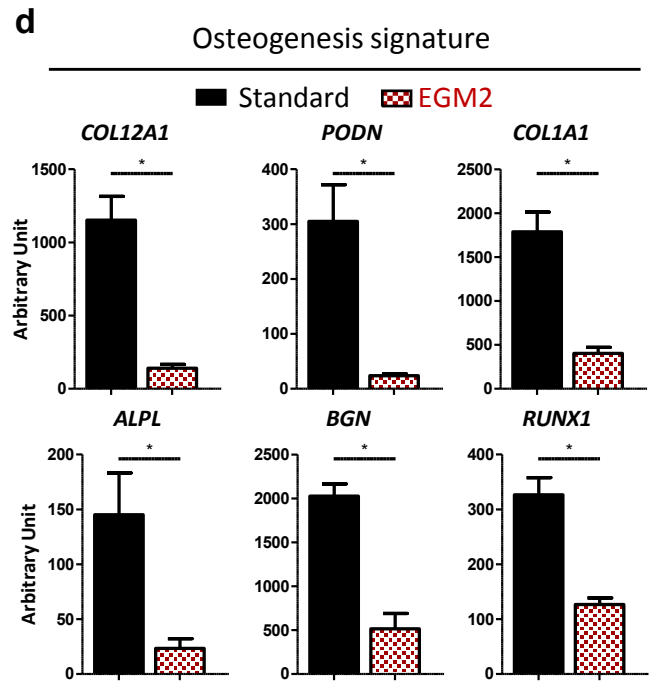
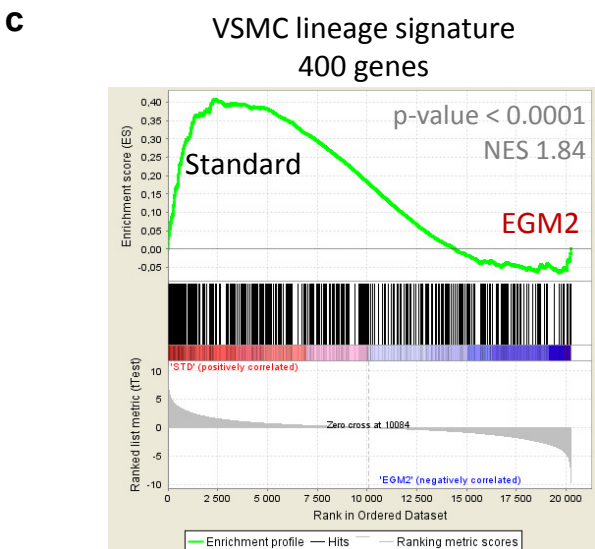
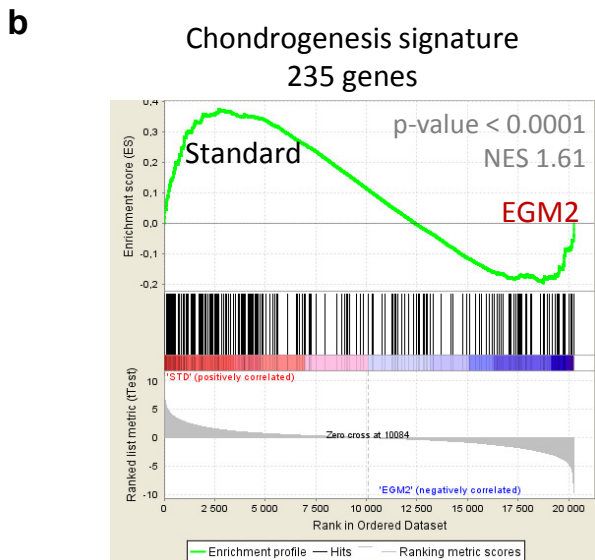
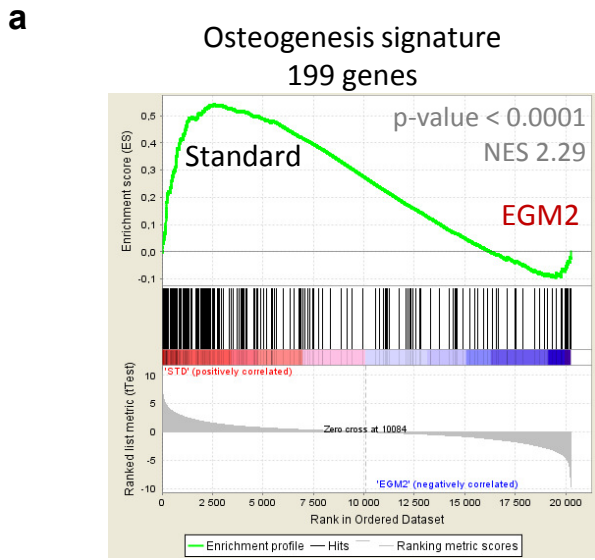




**Fig S4 GSEA of osteoblast, chondroblast and VSMC gene signatures**

**a-f** Standard-hASCs (black, n=6) and EGM2-hASCs (red, n=5) were analyzed by GSEA for osteogenesis (**a,d**), chondrogenesis (**b,e**) and VSMC lineage (**c,f**) gene signatures. \*, p<0.05. **a,b,c** GSEA of Standard-hASCs and EGM2-hASCs. Results were statistically significant according to FWER p-values depicted on panels. **d** mRNA expression of representative markers of osteogenesis signature (*COL12A1*, *PODN*, *COL1A1*, *ALPL*, *BGN*, and *RUNX1*) obtained from microarray studies. **e** mRNA expression of representative markers of chondrogenesis signature (*MFAP4*, *DPT*, *FMOD*, *ANGPT1*, *CYP1B1*, and *ADAMTS2*) obtained from microarray studies. **f** mRNA expression of representative markers of VSMC signature (*CNN1*, *GJAI*, *PDE3A*, *MYO1C*, *TPMI*, and *ENG*) obtained from microarray studies.

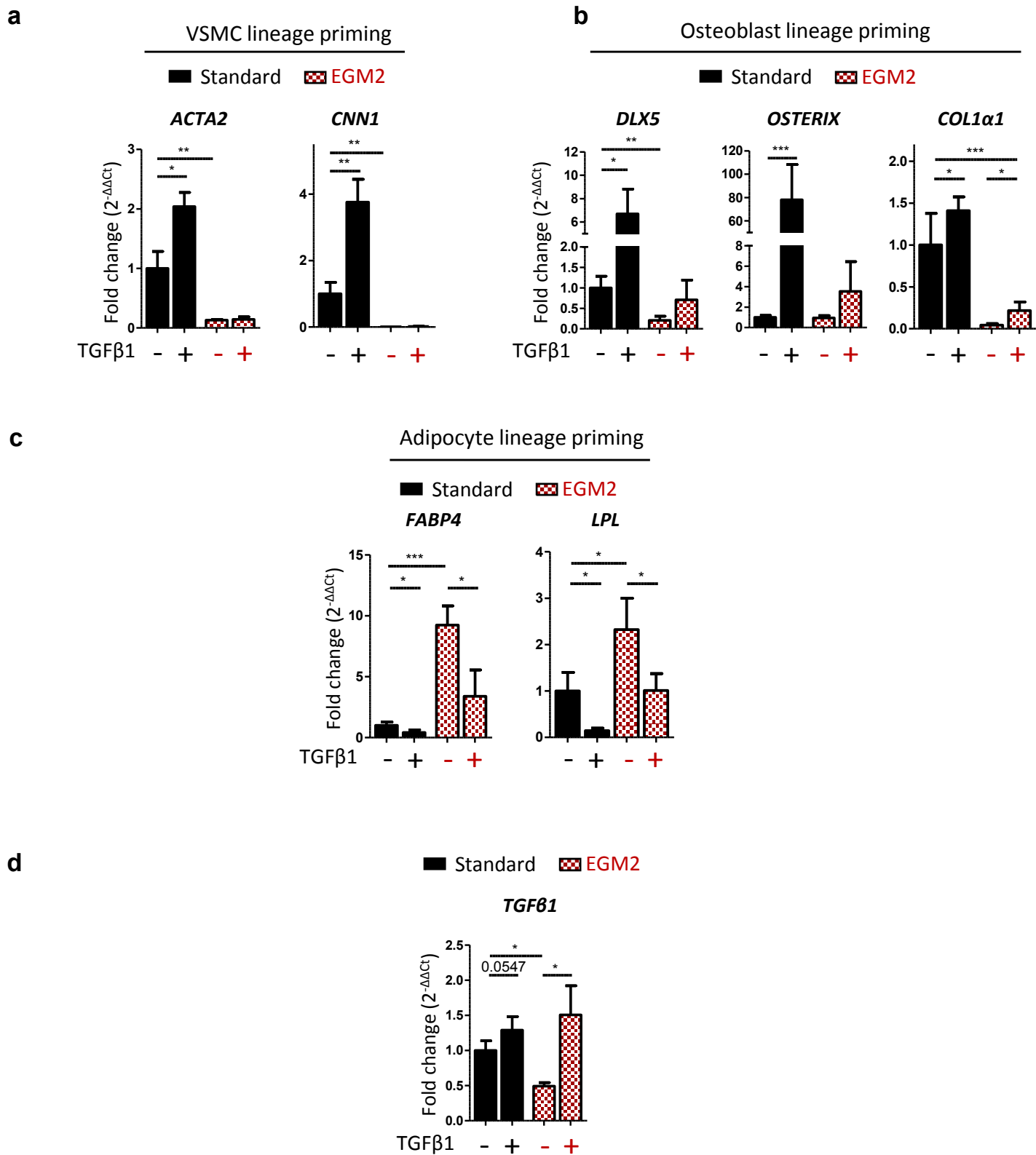
**Fig S4 GSEA of osteoblast, chondroblast and VSMC gene signatures**



### **Fig S5 Osteoblast, VSMC and adipocyte lineage under TGFβ1 induction**

**a-d** Standard-hASCs (black) and EGM2-hASCs (red) were treated (+) or not (-) with 10 ng/mL recombinant hTGFβ1 for 3 days and analyzed by RT-qPCR (a-d). Mann-Whitney test. \*, p<0.05, \*\*, p<0.01, \*\*\* p<0.001. **a** mRNA expression of characteristic markers of VSMCs (*ACTA2* and *CNN1*). Data are expressed as fold change relative to both the housekeeping gene and Standard untreated condition. n=7. **b** mRNA expression of characteristic markers of osteoblasts (*DLX5*, *OSTERIX*, and *COL1α1*). Data are expressed as fold change relative to both the housekeeping gene and Standard untreated condition. n=7. **c** mRNA expression of characteristics markers of adipocytes (*FABP4* and *LPL*). Data are expressed as fold change relative to both the housekeeping gene and Standard untreated condition. n=7. **d** mRNA expression of characteristics markers of *TGFβ1*. Data are expressed as fold change relative to both the housekeeping gene and Standard untreated condition. n=7.

**Fig S5 Osteoblast, VSMC and adipocyte lineage under TGFβ1 induction**



**Table S1 List of primers used in RT-qPCR**

Target gene	Reverse	Forward
<b>ACTA2</b>	CAG ATC CAG ACG CAT GAT GGC A	CTA TGC CTC TGG ACG CAC AAC T
<b>ADIPOQ</b>	TCA GAA ACA GGC ACA CAA CTC A	TGC CCC AGC AAG TGT AAC C
<b>ALPL</b>	GCT GGC AGT GGT CAG ATG TT	CTA TCC TGG CTC CGT GCT CC
<b>CEBP<math>\alpha</math></b>	CTG CAG GTG GCT GCT CAT	GCC GGG AGA ACT CTA ACT CC
<b>CIDEA</b>	GCT ATT CCC GAC CTC TTC GG	AGT CCT GTT GAC CCC GCT C
<b>CNN1</b>	ATT TCC GCT CCT GCT TCT CTG	CCA ACG ACC TGT TTG AGA ACA
<b>COL1<math>\alpha</math>1</b>	GAG CAG GAG CCG GAG GTC CA	GCT AAC CCC CTC CCC AGC CA
<b>DLX5</b>	GCC ATT CAC CAT TCT CAC CTC	TAC CCA GCC AAA GCT TAT GCC
<b>FABP4</b>	GCG AAC TTC AGT CCA GGT CA	AAA CTG GTG GTG GAA TGC GT
<b>HAPLN</b>	CCA GGA GTT CGG ATG CTC TC	GGA GAA AGA GCG CTA GCT
<b>LPL</b>	TAG GGC ATC TGA GAA CGA GTC	GGT CGA AGC ATT GGA ATC CAG
<b>OSTERIX</b>	GCC TTG CCA TAC ACC TTG C	CTC CTG CGA CTG CCC TAA T
<b>PGC1<math>\alpha</math></b>	TCG TGC TGA TAT TCC TCG TAG CT	CCG CAC GCA CCG AAA
<b>PPAR<math>\gamma</math>2</b>	CCA CGG AGC TGA TCC CAA	GAT ACA CTG TCT GCA AAC ATA TCA C
<b>PPIA (housekeeping)</b>	TCT TTG GGA CCT TGT CTG CAA	GCC GAG GAA AAC CGT GTA CTA T
<b>RPLP0 (housekeeping)</b>	TAG TTG GAC TTC CAG GTC GC	CGT CCT CGT GGA AGT GAC AT
<b>RUNX2</b>	GCT CAC GTC GCT CAT TTT GC	ATT CCT GTA GAT CCG AGC ACC
<b>SOX9</b>	GCT GTA GTG TGC GAG GTT GAA	AGC GAA CGC ACA TCA AGA C
<b>TGF<math>\beta</math>1</b>	GTT GCT GAG GTA TCG CCA GGA A	TAC CTG AAC CCG TGT TGC TCT C
<b>UCP1</b>	CCA GGA TCC AAG TCG CAA GA	GTG TGG CCA ACT GTG CAA TG
<b>YWHAZ (housekeeping)</b>	TCT CAG CAC CTT CCG TCT TT	AGC AGG CTG AGC GAT ATG AT

ACTA2: smooth muscle actin 2; ADIPOQ: adiponectin; ALPL: alkaline phosphatase biomineralization associated; CEBP $\alpha$ : CCAAT enhancer binding protein alpha; CIDEA: cell death inducing DFFA like effector A; CNN1: calponin 1; COL1 $\alpha$ 1: collagen type 1 $\alpha$ 1; DLX5: distal-less homeobox 5; FABP4: fatty acid binding protein 4; HAPLN: hyaluronan and proteoglycan link protein 1; LPL: lipoprotein lipase; PGC1 $\alpha$ : PPAR $\gamma$  coactivator 1 alpha; PPAR $\gamma$ 2: peroxisome proliferator activated receptor gamma 2; PPIA: Peptidylprolyl Isomerase A; RPLP0: Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0; SOX9: sex determining region Y-box 2; TGF $\beta$ 1: transforming growth factor beta 1; UCP1: uncoupling protein 1; YWHAZ: Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Zeta









## **Chapitre 2 : SOX2 et adipogenèse.**

### **RÉSUMÉ**

L'obésité est un facteur de risque majeur pour les maladies cardiovasculaires et le diabète de type 2. Cette pathologie résulte entre autres d'un déséquilibre de la balance énergétique, dans laquelle le TA a un rôle clé. Il existe plusieurs types d'adipocytes, qui sont les cellules fonctionnelles du TA. D'une part, les adipocytes blancs qui stockent l'énergie, et d'autre part les adipocytes bruns et beiges qui la consomment. De par leur grande capacité de consommation de lipides et leur caractère inductible, les adipocytes beiges ouvrent des perspectives thérapeutiques contre les maladies associées à l'obésité, comme cela a été décrit *in vivo* chez la souris. Les adipocytes beiges sont issus de la différenciation des ASC. Nous nous sommes intéressés aux mécanismes moléculaires régulant l'obtention d'adipocytes beiges à partir de deux modèles d'ASC humaines, et par l'utilisation d'un modèle murin. Cette étude a révélé que la protéine SOX2 était surexprimée lors du processus d'adipogenèse, et ce d'autant plus lorsque les ASC étaient induites vers une différenciation adipocytaire beige. De plus, l'expression de SOX2 est positivement corrélée d'une part à la formation des adipocytes beiges, et d'autre part à l'activation des adipocytes bruns, *in vivo* chez la souris exposée au froid. Ainsi, SOX2 semble être un facteur clé impliqué dans le potentiel de brunissement du TA et l'obtention d'adipocytes beiges/bruns *in vivo* et *in vitro*. De manière inattendue, nos travaux mettent donc en lumière l'expression du facteur SOX2 au sein des adipocytes blancs, beiges et bruns. Ceci ouvre de nouvelles pistes de développement à visée thérapeutique mais impose la compréhension du rôle de SOX2 dans la physiologie des adipocytes.



## INTRODUCTION

Dans nos travaux précédents, nous avons réalisé une étude transcriptomique à grande échelle de comparaison entre les ASC-Standard et – EGM2. En sus du TGF $\beta$ 1 pour les ASC-Standard, cette analyse a identifié la protéine SOX2 comme facteur impliqué dans la signature des ASC-EGM2 (données non montrées). Ces ASC ont démontré une plus grande capacité à donner des adipocytes blancs et beiges par rapport aux ASC classiquement cultivées en milieu Standard. La perte de SOX2 de CSM dérivées de sang de cordon ombilical humain par transfection avec des siRNA et shRNA spécifiques, diminue la capacité de ces cellules à donner des adipocytes *in vitro*<sup>409</sup>. En effet, lorsque ces CSM n'exprimant pas ou moins SOX2 étaient mises en différenciation adipocytaire, il a été observé une diminution du marquage lipidique *Oil Red O* ainsi qu'une diminution de la quantité protéique de PPAR $\gamma$  et C/EBP $\beta$ , facteurs déterminants du lignage adipocytaire. À l'inverse, les potentiels ostéoblastique et chondroblastique des CSM étaient augmentés. Les auteurs ont mis en évidence le facteur Dickkopf1 (DKK1) comme cible génomique de SOX2 dans la détermination du destin cellulaire. DKK1 est un inhibiteur de la voie Wnt par liaison au corécepteur LRP6. La voie Wnt est connue comme stimulant la différenciation ostéoblastique des CSM. En parallèle, l'équipe de Seo E et al. a montré que la surexpression lentivirale du gène SOX2 augmentait le potentiel des BM-MSc murines à donner des adipocytes *Oil Red O*<sup>+</sup> exprimant PPAR $\gamma$ <sup>410</sup>. Dans ce contexte, SOX2 activerait la transcription de *Yes-Associated Protein 1* (YAP1), un facteur de transcription activé en réponse à des contraintes mécaniques d'étirement du cytosquelette cellulaire. Connaissant le rôle de la protéine SOX2 en tant que facteur pionnier dans la reprogrammation et l'accessibilité au génome cellulaire, nous nous sommes interrogés sur son rôle moléculaire au cours de l'adipogenèse.

D'autre part, tous les adipocytes issus des BM-MSc murines par le processus d'adipogenèse étaient SOX2<sup>+</sup><sup>410</sup>. Nous avons donc étudié l'expression du gène SOX2 dans des adipocytes matures *in vitro* et *in vivo*. Les TA murins sont hétérogènes du point de vue de leur potentiel thermogénique. Contrairement au TA blanc inguinal qui brunit en réponse à certains stimuli tels que l'exposition au froid<sup>101</sup> ou une stimulation de type  $\beta$ 3-adrénergique<sup>411</sup>, le TA blanc épидidymaire est



considéré comme un vrai TA blanc dépourvu de capacités thermogéniques<sup>171</sup>. De plus, une analyse tri-dimensionnelle d'imagerie sur l'intégralité du TA inguinal d'une souris adulte, réalisée par le laboratoire, a mis en évidence une hétérogénéité du potentiel de brunissement selon la localisation dans le tissu. Il a été montré que la région centrale, nommée SLA pour *segmentable lobule area*, avait un fort potentiel de brunissement lorsque les souris étaient exposées au froid, tandis que l'aine, ou NSLA pour *non segmentable lobule area*, avait un phénotype d'adipocytes blancs non convertibles<sup>173</sup>. Connaissant les grandes capacités de plasticité des adipocytes, nous nous sommes interrogés sur le rôle de la protéine SOX2 dans cette plasticité.



## MATERIELS ET METHODES

L'ensemble des matériels et méthodes de cette étude sont redondants avec ceux de la précédente étude portant sur le TGF $\beta$ 1. En voici ci-dessous les différences.

Étude *in vivo* : des souris C57Bl/6JOLA mâles de 2 mois élevées à 21°C (température ambiante - RT) ont été mises au froid (4°C) pendant 1, 3 ou 7 jours ou maintenues à RT afin d'obtenir des adipocytes beiges par conversion (1 jour) et différenciation (3 et 7 jours). Leur TA brun (BAT) et leurs TAs blancs inguinal (ING) et epididymaire (EPI) ont été analysés par western blotting et immunofluorescence.

Études *in vitro* : après leur expansion en milieu EGM2, les ASC humaines ont été mises en différenciation adipocytaire pendant 11 jours dans de l' $\alpha$ MEM supplémenté par deux cocktails adipogéniques différents : d'une part 1  $\mu$ M dexaméthasone, 5  $\mu$ g/mL insuline, 1  $\mu$ M rosiglitazone et 60  $\mu$ M indométhacine avec 10% sérum de veau fœtal (modèle 1) ; ou d'autre part 1  $\mu$ M dexaméthasone, 1  $\mu$ g/mL insuline et 0.5 mM IsoButylMethylXanthine (IBMX) avec 2% sérum de veau fœtal (modèle 2). Des cellules humaines hMADs au passage 18 ont été amplifiées dans un milieu de prolifération contenant du DMEM glutamax supplémenté en 10% sérum de veau fœtal, 10 mM HEPES et 5 ng/mL hFGF2. Le milieu est renouvelé tous les 2 à 3 jours. A confluence les cellules ont été lysées en RIPA pour une analyse western blot (cellules non différenciées) ou induites en différenciation adipocytaire dans du DMEM glutamax mélangé à volume/volume avec du HAM F12 et supplémenté avec 0.86  $\mu$ M insuline, 10  $\mu$ g/mL transferrine, 0.2 nM T3, 1  $\mu$ M rosiglitazone, 100  $\mu$ M IBMX et 1  $\mu$ M dexaméthasone. Après 3 jours, le milieu est remplacé par un milieu de différenciation ne contenant pas d'IBMX ni de dexaméthasone. Pour une différenciation en adipocytes blancs, la rosiglitazone est également enlevée dès 10 jours mais pour leur conversion en adipocytes beiges la rosiglitazone est rajoutée de 17 à 20 jours. Pour une différenciation en adipocytes beiges, la rosiglitazone est maintenue pendant les 20 jours de différenciation. Les milieux de différenciation sont renouvelés tous les 3 à 4 jours. Tous les milieux contiennent 1% d'un mélange d'antibiotiques de type pénicilline et streptomycine.

Analyses : l'ensemble des techniques utilisées dans cette étude sont strictement identiques avec celles exposées dans le chapitre 1 des résultats. Concernant l'immunofluorescence sur tissu, après fixation les tissus ont été inclus





en agarose 2% et tranchés sur 200µm au vibroslice (World Precision Instruments ; Sarasota, FL, USA) avant d'être immunomarqués. Liste des anticorps primaires utilisés : SOX2 (ab97959, Abcam ; Cambridge, UK), PPAR $\gamma$  (2443S, Cell Signaling Technology ; Danvers, MA, USA), Bodipy (d3835, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA),  $\beta$ -actine (A5441, Sigma-Aldrich ; Saint-Louis, MO, USA), Total OXPHOS human WB antibody cocktail (ab110411, Abcam), UCP1 (IF : don de Daniel Ricquier ; WB : UCP11-A,  $\alpha$ -diagnostic ; San Antonio, TX, USA),  $\beta$ -tubuline (ab6046, Abcam), DAPI (D9542, Sigma). Liste des anticorps secondaires utilisés : WB : Goat anti-mouse ou anti-rabbit IgG-HRP conjugate (1706516 ou 1706515 respectivement, Biorad ; Hercules, CA, USA) ; IF : Donkey Alexa-488nm ou -555nm anti-rabbit IgG (A21206 ou A31572 respectivement, Thermo Fisher).



## RESULTATS

Des ASC humaines primaires ont été mises en différenciation adipocytaire et l'expression protéique du gène SOX2 a été analysée. La différenciation adipocytaire est hétérogène à partir de cultures primaires d'ASC (**Fig 1A**). Nos résultats montrent que la protéine SOX2 est surexprimée dans les adipocytes riches en lipides par rapport aux cellules moins différenciées qui sont Bodipy<sup>low</sup>. De plus, l'augmentation protéique de PPAR $\gamma$  après différenciation adipocytaire des ASC (**Fig 1B**), s'accompagne de l'augmentation protéique de SOX2 (**Fig 1C**). Une analyse cinétique au cours de l'adipogenèse induite par deux cocktails de différenciation adipogéniques différents indique que l'apparition de gouttelettes lipidiques au sein des cellules par microscopie corrèle avec l'augmentation protéique de SOX2 (34 kDa) (**Fig 1D et 1E**). À noter l'augmentation du nombre de mitochondries et des 5 complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale dans les adipocytes par rapport aux ASC non différenciées (**Fig 1F et S1a**). Ainsi, nos résultats montrent l'augmentation de SOX2 dans les adipocytes *in vitro* chez l'humain.

Nous avons également évalué l'expression adipocytaire *in vivo* dans un modèle murin. Nos résultats montrent que SOX2 est exprimé dans le TA blanc inguinal des souris (**Fig 2A**). Lorsque des souris sont exposées au froid (4°C), il y a apparition d'adipocytes beiges, comme on peut le voir par l'induction protéique d'UCP1 (**Fig 2A**). De manière intéressante, la protéine SOX2 augmente également en réponse au *browning* du tissu, même si elle est diminuée jusqu'au niveau basal après 7 jours d'exposition au froid (**Fig 2A**). De plus, SOX2 est enrichi dans la zone à fort potentiel brun du TA inguinal, SLA, par rapport à la région à faible potentiel brun, NSLA (**Fig 2B**). Nos résultats montrent que la quantité protéique de SOX2 augmente en réponse au froid dans ces deux zones. Nous avons aussi étudié l'expression de SOX2 dans le TA brun et dans le TA périgonadique connu pour être réfractaire au brunissement. Nos résultats montrent l'augmentation de SOX2 au niveau protéique dans le TA inguinal par rapport au TA épидidymaire, ainsi que dans le TA brun par rapport au TA inguinal (**Fig S1b**). De plus, quand nous étudions l'activation du TA brun, les résultats révèlent une augmentation d'UCP1 et de SOX2 en réponse au froid au niveau protéique (**Fig 2C**). Nous mettons ainsi en évidence une corrélation positive significative entre l'expression protéique de SOX2



et celle d'UCP1 dans le TA brun et le TA blanc inguinal (**Fig 2D**). Enfin, la protéine UCP1 n'est pas détectée dans le TA blanc épидидymaire et les taux protéiques de SOX2 diminuent après 7 jours d'exposition au froid (**Fig S1c**). Une analyse par immunofluorescence révèle un fort marquage de SOX2 au niveau cytoplasmique des cellules du TA inguinal, même si quelques noyaux sont aussi SOX2<sup>+</sup> (flèches) (**Fig 3A, 3B et S1d**). De manière intéressante, tous les adipocytes UCP1<sup>+</sup> semblent être SOX2<sup>+</sup>. Enfin, le nombre de cellules ayant un noyau positif pour le marquage SOX2 augmente en réponse au froid dans le TA brun (flèches) (**Fig 3C et S1e**). Ainsi, nos résultats mettent en évidence un lien entre l'expression de la protéine SOX2 et les adipocytes beiges et bruns *in vivo* chez la souris.

Afin de confirmer nos résultats chez l'humain, nous avons mis en différenciation adipocytaire blanche et beige des hMADs et avons étudié l'expression protéique de SOX2 et UCP1 dans les adipocytes obtenus. En adéquation avec nos résultats obtenus sur des ASC primaires, SOX2 est surexprimé après différenciation adipocytaire des hMADs (**Fig 4A**). De manière intéressante, SOX2 est surexprimé après différenciation adipocytaire de type beige par rapport à une différenciation de type blanche (**Fig 4B**). Une analyse cinétique lors de la différenciation adipocytaire beige montre l'apparition de gouttelettes à partir du huitième jour de différenciation des cellules par microscopie (**Fig 4C**). SOX2 est détectée au niveau protéique à partir du huitième jour de différenciation (**Fig 4C**). La protéine UCP1 quant à elle est détectée à partir du quatorzième jour de différenciation. Ainsi, nos résultats confirment le lien entre l'expression de SOX2 et les adipocytes beiges *in vitro* chez l'humain, et suggèrent que l'expression de SOX2 précéderait celle d'UCP1.

# **Résultats préliminaires**

## **SOX2 and adipogenesis**

Hélène Leménager<sup>1</sup>, Damien Lagarde<sup>1</sup>, Benoît Chaput<sup>3</sup>, Christian Dani<sup>2</sup>, Louis Casteilla<sup>1</sup>, Luc Sensebé<sup>1</sup>, Audrey Carrière<sup>1</sup>, Frédéric Deschaseaux<sup>1</sup>

<sup>1</sup> STROMALab, Etablissement Français du Sang-Occitanie (EFS), Inserm 1031, University of Toulouse, National Veterinary School of Toulouse (ENVT), ERL5311 CNRS, Toulouse, France

<sup>2</sup> Université Nice Sophia Antipolis, iBV, UMR CNRS/INSERM, Faculté de Médecine, Nice, France

<sup>3</sup> Department of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery, Rangueil University Hospital, Toulouse, France

# **Figures**

## **SOX2 and adipogenesis**

Hélène Leménager<sup>1</sup>, Damien Lagarde<sup>1</sup>, Benoît Chaput<sup>3</sup>, Christian Dani<sup>2</sup>, Louis Casteilla<sup>1</sup>, Luc Sensebé<sup>1</sup>, Audrey Carrière<sup>1</sup>, Frédéric Deschaseaux<sup>1</sup>

**Figure 1 : Augmentation de SOX2 lors de l'adipogenèse des ASC**

**Figure 2 : Augmentation de SOX2 lors de la formation d'adipocytes beiges/bruns *in vivo***

**Figure 3 : Localisation de SOX2 lors de la formation d'adipocytes beiges/bruns *in vivo***

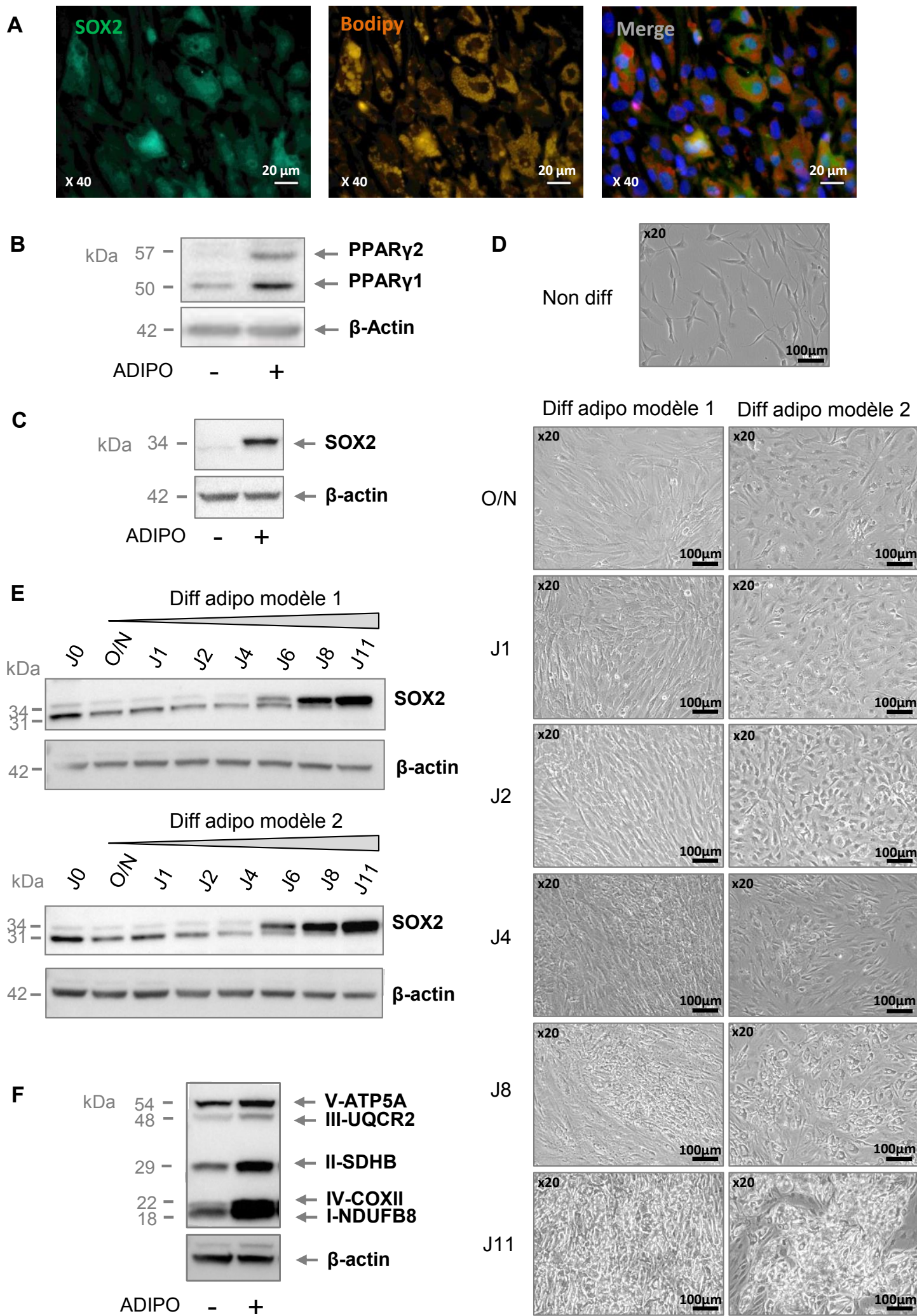
**Figure 4 : Augmentation de SOX2 lors de l'adipogenèse beige des hMADs**



### **Figure 1 : Augmentation de SOX2 lors de l'adipogenèse des ASC**

**(A-F)** Des ASC primaires humaines ont été mises en différenciation adipocytaire pendant 11 jours et analysées par microscopie pour leur contenu en gouttelettes lipidiques **(A et D)** et par western blotting pour l'expression de différentes protéines **(B, C E, F)**. **A.** Marquage de SOX2 et du contenu lipidique (Bodipy) par immunofluorescence. Les noyaux sont marqués au DAPI. Microscopie à épifluorescence. Grossissement x40. Barre d'échelle 20µm. **B-C.** Expression protéique de PPARγ **(B)** et de SOX2 **(C)** dans des ASC non différenciées (-) ou différenciées en adipocytes (+) pendant 11 jours. La β-actine sert de contrôle de charge. **D.** Morphologie des ASC non différenciées (Non diff) ou mises en différenciation adipocytaire selon une cinétique de 11 jours dans deux modèles de différenciation (voir le matériel et méthodes pour la description des modèles). Microscopie optique. Grossissement x20. Barre d'échelle 100µm. **E.** Expression protéique de SOX2 dans des ASC non différenciées (J0) ou mises en différenciation adipocytaire selon une cinétique de 11 jours dans deux modèles de différenciation. La β-actine sert de contrôle de charge. **F.** Expression protéique des 5 complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale (I à V) dans des ASC non différenciées (-) ou différenciées en adipocytes (+) pendant 11 jours. La β-actine sert de contrôle de charge.

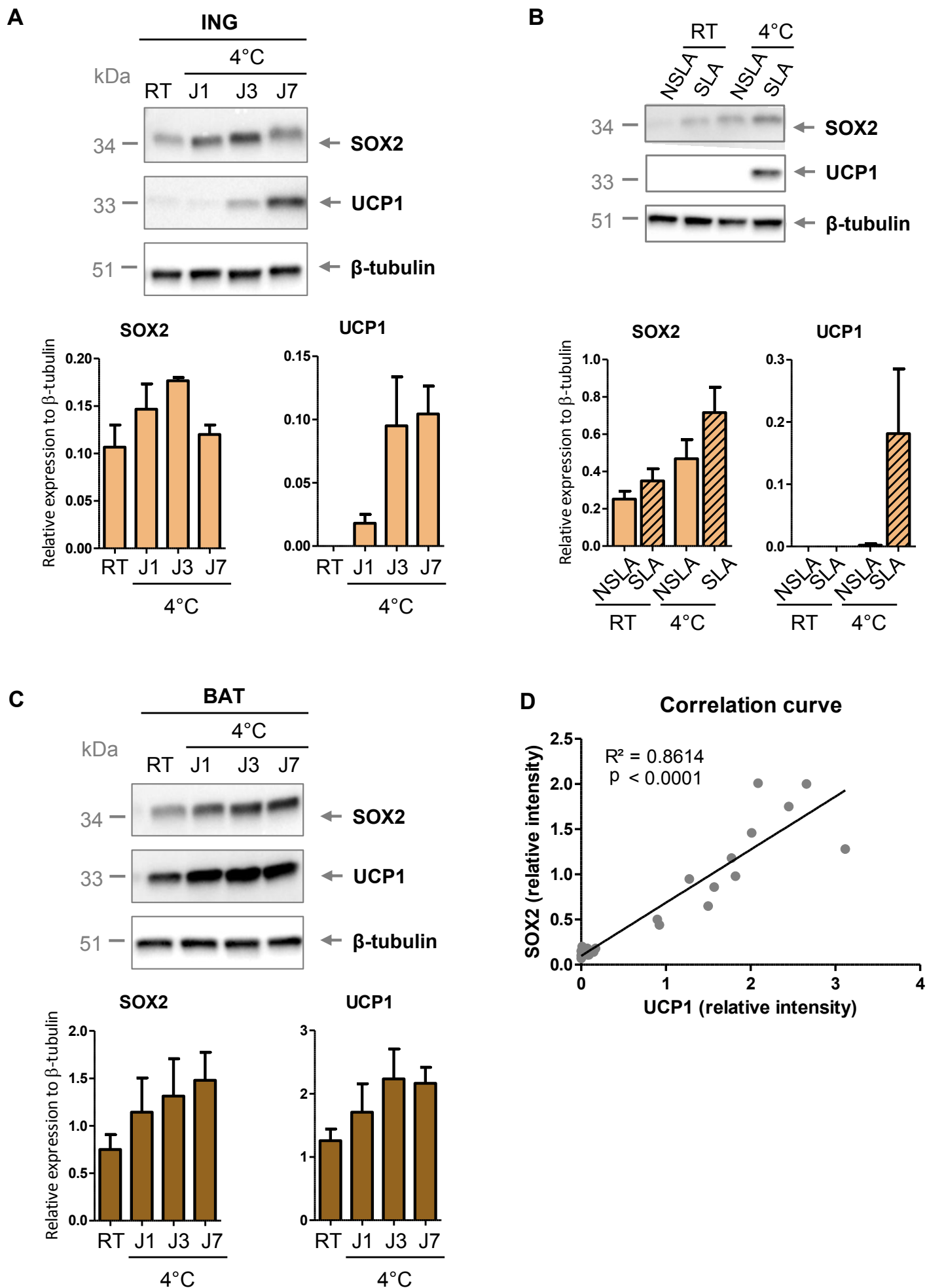
**Figure 1 : Augmentation de SOX2 lors de l'adipogenèse des ASC**



**Figure 2 : Augmentation de SOX2 lors de la formation d'adipocytes beiges/bruns *in vivo***

**(A-D)** Des souris ont été mises au froid (4°C) ou gardées à température ambiante (21°C ; RT) et l'expression protéique de SOX2 et UCP1 a été analysée par western blotting dans leur tissu adipeux inguinal **(A-B)** et brun **(C)** et une courbe de corrélation a été réalisée entre SOX2 et UCP1 **(D)**. **A, C.** Des souris ont été mises au froid pendant 1, 3, ou 7 jours (J1, J3 ou J7 respectivement). La  $\beta$ -tubuline sert de contrôle de charge. **B.** Des souris ont été mises au froid pendant 2 jours et le tissu adipeux inguinal a été divisé selon sa région non lobulisable (NSLA) et sa région lobulisable (SLA). La  $\beta$ -tubuline sert de contrôle de charge. **D.** Courbe de corrélation entre l'expression protéique de SOX2 et celle d'UCP1 dans le tissu adipeux inguinal total et le tissu adipeux brun.

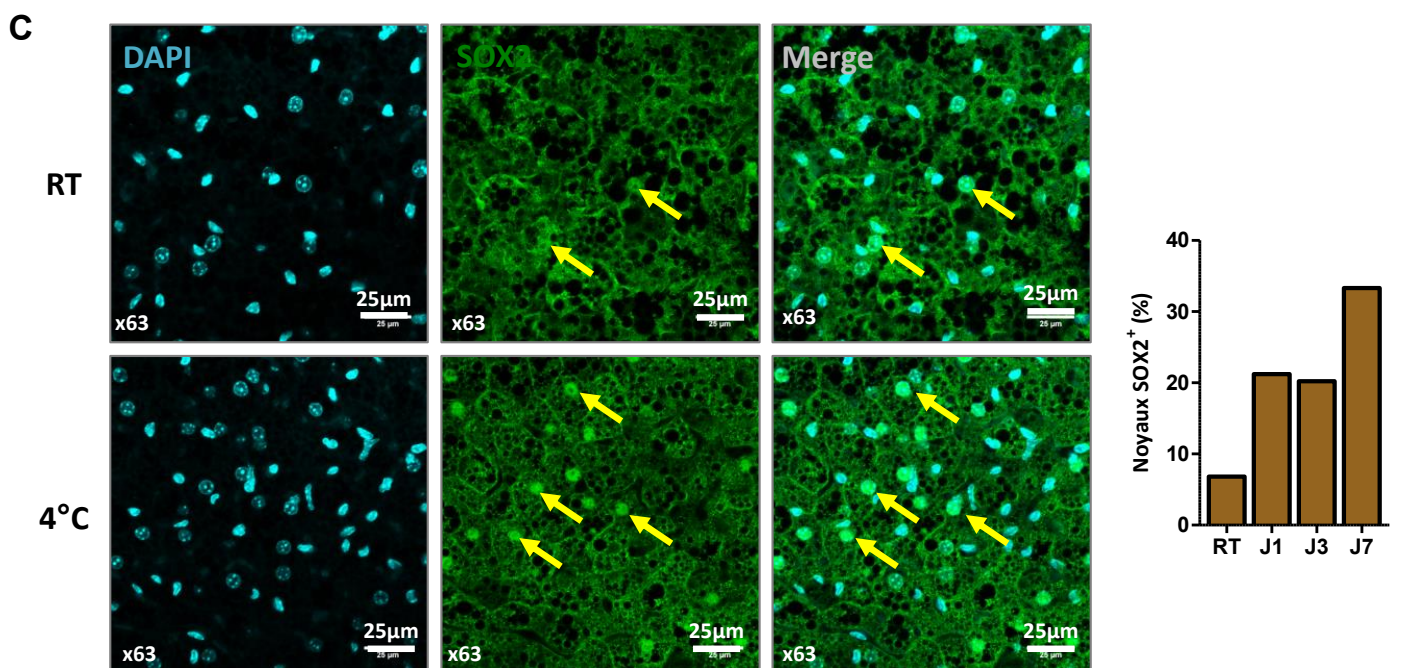
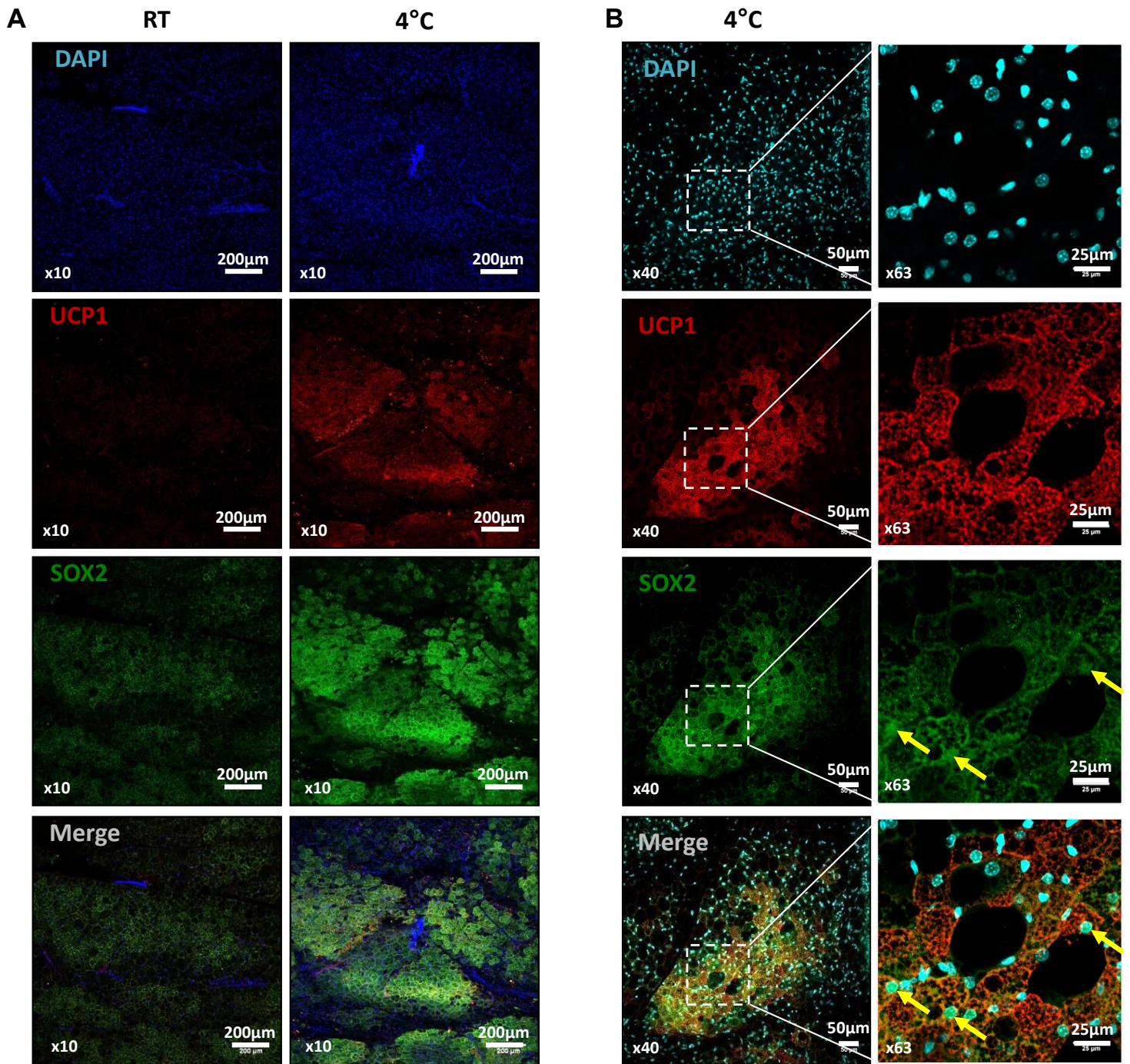
**Figure 2 : Augmentation de SOX2 lors de la formation d'adipocytes beiges/bruns *in vivo***



**Figure 3 : Localisation de SOX2 lors de la formation d'adipocytes beiges/bruns *in vivo***

**A.** Marquage de SOX2 (vert) et d'UCP1 (rouge) par immunofluorescence sur des tranches de tissu adipeux inguinal de souris mises au froid (4°C) pendant 7 jours ou gardées à température ambiante (21°C ; RT). Les noyaux sont marqués au DAPI. Microscopie confocale. Grossissement x10. Barre d'échelle 200µm.**B.** Marquage de SOX2 (vert) et d'UCP1 (rouge) par immunofluorescence sur des tranches de tissu adipeux inguinal de souris mises au froid (4°C) pendant 7 jours. Les noyaux sont marqués au DAPI. Les noyaux positifs en SOX2 sont marqués d'une flèche jaune. Microscopie confocale. Grossissement x40 et zoom x63. Barre d'échelle 50µm et zoom 25µm. **C.** Marquage de SOX2 (vert) par immunofluorescence sur des tranches de tissu adipeux brun de souris mises au froid (4°C) pendant 1 jour ou gardées à température ambiante (21°C ; RT). Les noyaux sont marqués au DAPI. Les noyaux positifs en SOX2 sont marqués d'une flèche jaune. Microscopie confocale. Grossissement x63. Barre d'échelle 25µm.

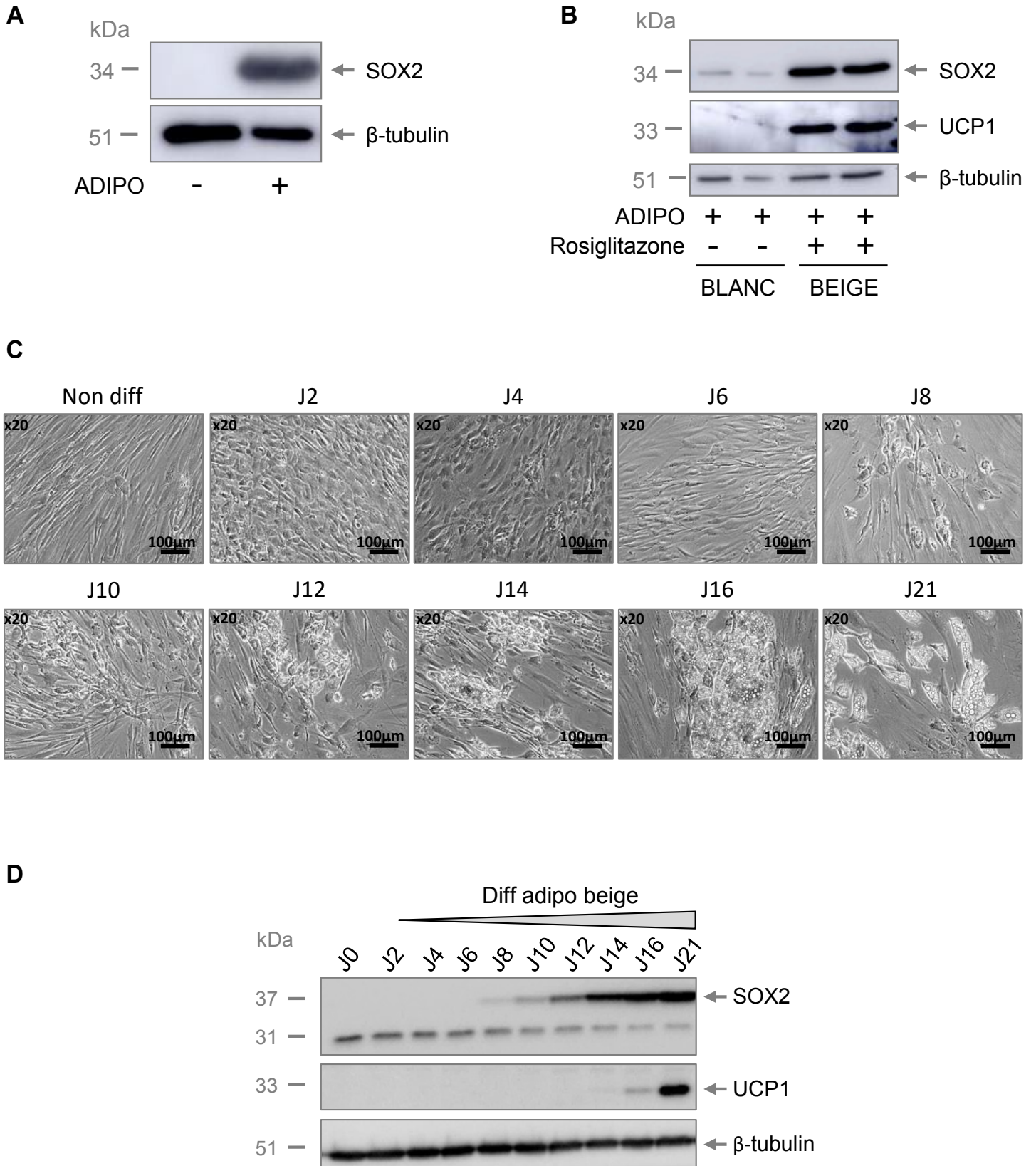
**Figure 3 : Localisation de SOX2 lors de la formation d'adipocytes beiges/bruns *in vivo***



#### **Figure 4 : Augmentation de SOX2 lors de l'adipogenèse beige des hMADs**

**(A-D)** Des hMADs ont été mises en différenciation adipocytaire pendant 21 jours et analysées par western blotting pour l'expression de différentes protéines **(A, B et D)** et par microscopie pour leur contenu en gouttelettes lipidiques **(C)**. **A.** Expression protéique de SOX2 dans des hMADs non différenciées (-) ou différenciées en adipocytes (+) pendant 21 jours. La  $\beta$ -tubuline sert de contrôle de charge. **B.** Expression protéique de SOX2 et d'UCP1 dans des hMADs différenciées en adipocytes (+) pendant 21 jours selon une différenciation en adipocytes blanc (rosiglitazone -) ou beige (rosiglitazone +). La  $\beta$ -tubuline sert de contrôle de charge. **C.** Morphologie des hMADs non différenciées (Non diff) ou mises en différenciation adipocytaire beige selon une cinétique de 21 jours. Microscopie optique. Grossissement x20. Barre d'échelle 100 $\mu$ m. **D.** Expression protéique de SOX2 et d'UCP1 dans des hMADs non différenciées (J0) ou mises en différenciation adipocytaire beige selon une cinétique de 21 jours. La  $\beta$ -tubuline sert de contrôle de charge.

**Figure 4 : Augmentation de SOX2 lors de l'adipogenèse beige des hMADs**







# **Supplemental figure**

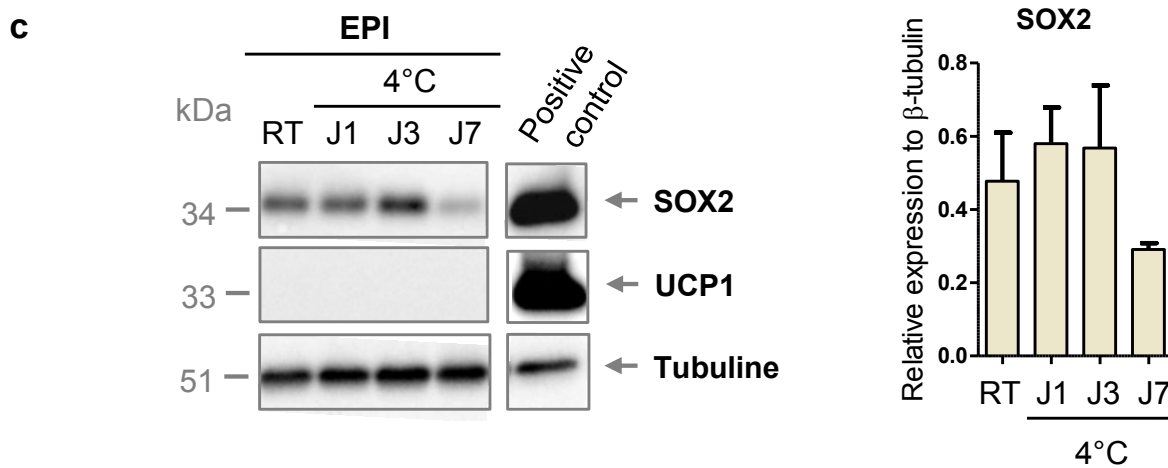
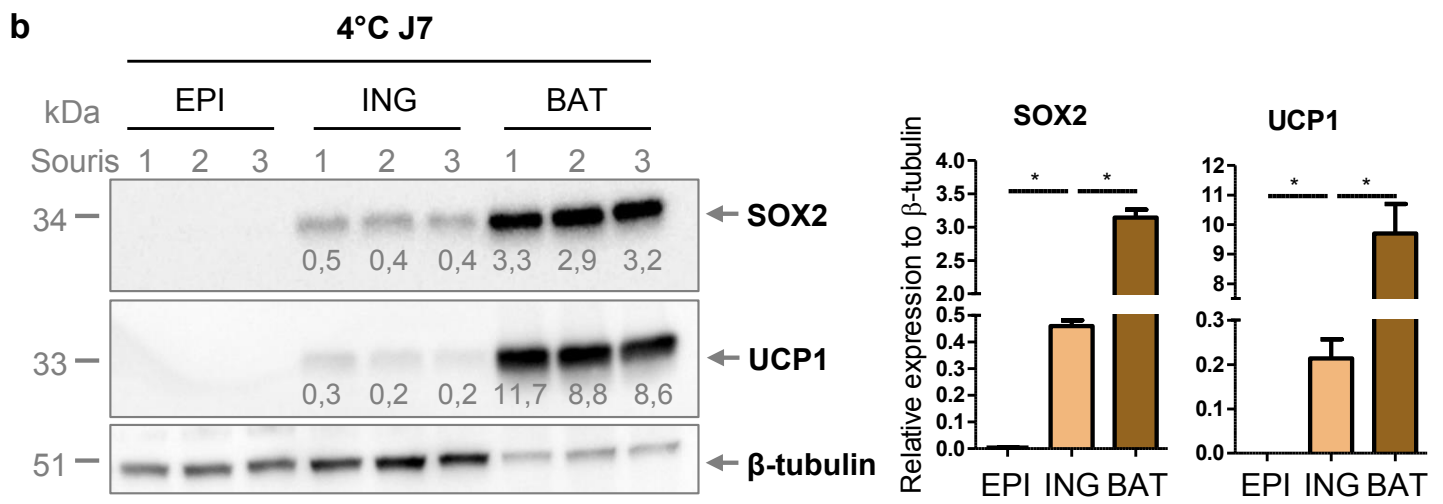
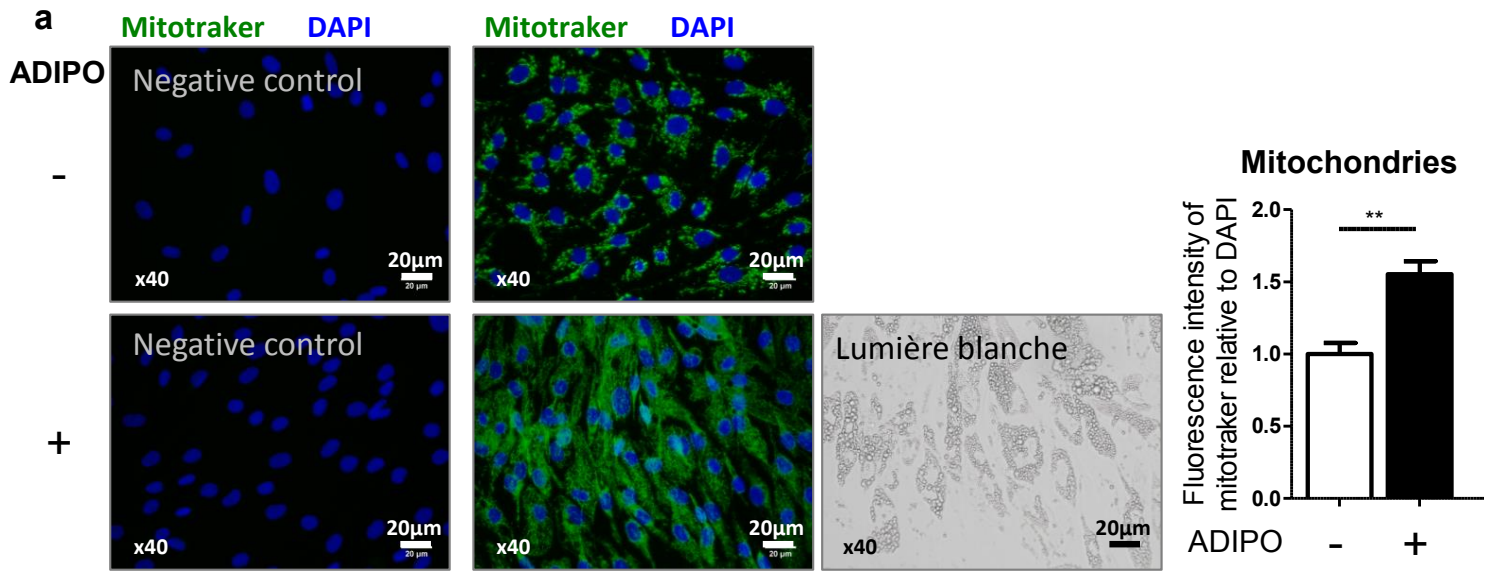
## **SOX2 and adipogenesis**

Hélène Leménager<sup>1</sup>, Damien Lagarde<sup>1</sup>, Benoît Chaput<sup>3</sup>, Christian Dani<sup>2</sup>, Louis Casteilla<sup>1</sup>, Luc Sensebé<sup>1</sup>, Audrey Carrière<sup>1</sup>, Frédéric Deschaseaux<sup>1</sup>

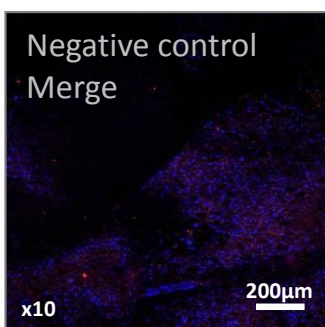
**Figure S1 :**

**a.** Marquage de MTC02 (Mitotraker) par immunofluorescence dans des ASC non différenciées (-) ou mises en différenciation adipocytaire (+) pendant 11 jours. Les noyaux sont marqués au DAPI. Microscopie à épifluorescence. Grossissement x40. Barre d'échelle 20µm. Un contrôle négatif sans anticorps primaire a été réalisé (Negative control). **b.** Des souris ont été mises au froid pendant 7 jours et l'expression protéique de SOX2 et UCP1 a été analysée par western blotting dans le tissu adipeux épидидymaire (EPI), inguinal (ING) et brun (BAT). La  $\beta$ -tubuline sert de contrôle de charge. **c.** Des souris ont été mises au froid pendant 1, 3, ou 7 jours (J1, J3 ou J7 respectivement) ou gardées à température ambiante (21°C ; RT) et l'expression protéique de SOX2 et UCP1 a été analysée par western blotting. La  $\beta$ -tubuline sert de contrôle de charge. Un contrôle positif a été réalisé sur du tissu adipeux brun murin (Positive control). **d.** Contrôles négatifs sans anticorps primaire par immunofluorescence des figures 3A et 3B. **e.** Contrôle négatif sans anticorps primaire par immunofluorescence de la figure 3C.

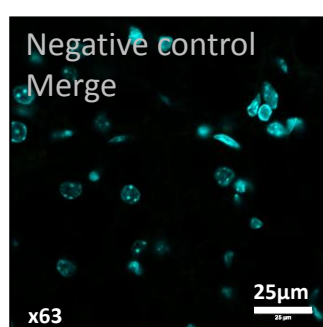
**Figure S1**



**d** ING 4°C x10

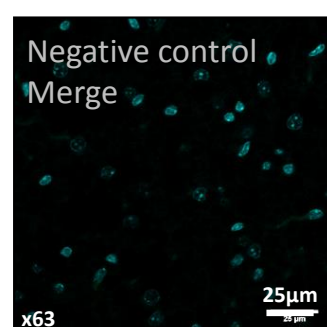


ING 4°C x63



**e**

BAT 4°C x63





## DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Nous identifions ici pour la première fois la surexpression de SOX2 dans des adipocytes *in vitro* et *in vivo*, et ce de manière plus importante lorsque les adipocytes ont un phénotype beige/brun.

Associé à l'immaturation et à la pluripotence des cellules, l'expression de SOX2 au sein de cellules différenciées, telles que les fibroblastes, contribue à leur reprogrammation. Les cellules pluripotentes induites (iPS) qui en résultent possèdent de fortes potentialités de (re)différenciation par stimulation définie, et exhibent un phénotype très immature. Il a donc été intéressant d'observer la surexpression physiologique de SOX2 au sein de cellules différenciées telles que les adipocytes *in vitro* et *in vivo*. La fonction de SOX2 au sein des adipocytes devra être déterminée. Les adipocytes sont des cellules ayant un métabolisme très orienté vers les lipides. Comment la protéine SOX2 pourrait être impliquée dans la régulation du métabolisme lipidique reste à découvrir. De plus, nous montrons que SOX2 est plus exprimé dans les adipocytes de phénotype beige ou brun, par rapport aux adipocytes blancs. Ces cellules diffèrent notamment par l'expression d'un programme thermogénique, incluant la protéine UCP1, et des gènes de la mitochondriogenèse. La protéine SOX2 pourrait ainsi être impliquée dans ces processus. Enfin, décrit comme facteur pionnier ou facteur de plasticité, SOX2 pourrait réguler la plasticité des adipocytes différenciés en modifiant l'épigénétisme. Ces travaux devront être poursuivis notamment par des expériences perte et/ou gain de fonction afin de confirmer l'importance et le rôle de SOX2 au sein des adipocytes.

Nos travaux sont préliminaires, mais par le fait qu'ils révèlent l'expression d'un facteur inattendu, SOX2, au sein des adipocytes blancs, beiges et bruns *in vitro* chez l'humain et *in vivo* chez la souris, ouvrent un champ particulièrement excitant sur le plan des connaissances et des perspectives thérapeutiques.



# **DISCUSSION**





Dans ces travaux scientifiques, nous nous sommes intéressés aux mécanismes moléculaires régulant le devenir cellulaire des ASC. Nous avons dans un premier temps étudié l'impact des conditions de culture sur l'immaturation et les potentialités des ASC primaires humaines. Nous avons montré que le TGFβ1 contenu dans le sérum de culture altérait l'immaturation des ASC et leur potentialité de différenciation en adipocytes, y compris à travers le lignage adipocytaire beige. Ceci du fait de leur engagement vers les lignages VML et ostéo-chondroblastiques initié par le TGFβ1. Dans un second temps, nous avons caractérisé les mécanismes moléculaires impliqués dans l'adipogenèse et la plasticité cellulaire. Notre étude a mis en avant l'expression d'un facteur inattendu, SOX2, au sein des adipocytes matures *in vivo* et *in vitro*.

### **1. Identification des CSM :**

L'identité d'une cellule est définie à un instant donné par la description de ses caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles. Les CSM ont été définies par la société internationale pour la thérapie cellulaire (ISCT) en 2006 par un ensemble de critères minimum qui permettent leur identification<sup>234</sup> : leur capacité à adhérer au plastique et à proliférer *in vitro* en colonies dans des conditions de culture standard, ainsi que leur capacité à se différencier au minimum en adipocyte, chondroblaste et ostéoblaste en réponse aux inducteurs adéquats. Le dernier critère étant l'expression des marqueurs de surface CD105, CD73, CD90, et l'absence des marqueurs CD45, CD14 ou CD11b, et CD79a ou CD19. Cependant, il est aujourd'hui décrit différentes sous-populations de CSM au sein d'un même tissu<sup>172,217,404,412</sup>, et des différences phénotypiques et fonctionnelles existent entre les CSM selon le tissu dont elles sont issues<sup>3,413</sup>. Les CSM n'ont ainsi pas les mêmes potentialités de différenciation. Dans notre étude, nous avons utilisé deux milieux de culture aux propriétés différentes et réalisé une analyse globale et intégrée des potentialités de différenciation des ASC vers différents lignages. À partir d'ASC humaines en culture primaire, nous montrons que les méthodes de culture modifient l'identité des CSM. Notamment, l'activité du TGFβ1 contenu dans le sérum de veau fœtal (additif courant dans les milieux de culture) modifie les potentialités de différenciation des CSM cultivées en modifiant leur degré d'immaturation ainsi que l'engagement de ces cellules dans différents lignages du



mésoderme. L'impact du TGF $\beta$ 1 sur l'engagement des CSM vers les lignages ostéoblastique, chondroblastique, VML et adipocytaire avait été montré dans la littérature. Cependant, ces études ont été réalisées de manière isolée sur un lignage unique, et à partir de CSM porcines, après transfection virale<sup>414</sup>, ou de BM-MSCs murines triées<sup>415</sup>, ou encore de cellules humaines multipotentielles mais mal définies<sup>416</sup>. Nous montrons pour la première fois, par une analyse globale de l'ensemble des potentialités mésodermiques des ASC, que le TGF $\beta$ 1 engage les ASC humaines primaires vers les lignages ostéoblastique, chondroblastique et VML. Cet engagement induit par le TGF $\beta$ 1 altère l'immaturation et les potentialités de différenciation en adipocytes des ASC. De plus, la capacité de différenciation en adipocytes beiges des ASC est diminuée. Or, cette voie de différenciation adipocytaire, ainsi que le lignage VML, ne sont pas systématiquement analysés par nos confrères scientifiques. Pourtant, comme cela a été montré chez la souris, les adipocytes beiges représentent un espoir thérapeutique contre les maladies associées à l'obésité, telles que le diabète de type 2<sup>407</sup>.

Le degré d'immaturation d'une cellule résulte de l'intégration de signaux extérieurs inhibant son orientation vers une identité différenciée. Il est supposé que les cellules les plus immatures n'expriment pas les marqueurs des cellules matures. Au vu de nos résultats, on peut dire que les ASC cultivées en milieu Standard ont un degré d'immaturation limité du fait de leur *priming* par le TGF $\beta$ 1 contenu dans le sérum induisant un engagement vers les lignages ostéoblastique, chondroblastique et VML, et par conséquent une plus faible capacité de différenciation en adipocytes. Toutefois, bien que plus immatures par la surexpression des marqueurs dits de « *souchitude* » SOX2, OCT4 et NANOG, les ASC cultivées en milieu EGM2 expriment des marqueurs de lignages mésodermiques. Cela va dans le sens des études de Dov Zipori, qui propose qu'une cellule souche immature peut néanmoins exprimer à bas bruit de nombreux gènes associés à la différenciation. La différenciation correspondrait alors à une diminution d'expression des gènes non spécifiques du lignage induit, et une surexpression de ceux impliqués dans le lignage induit<sup>208</sup>. Aussi, nous avons étudié l'expression des marqueurs d'ostéoblaste, chondroblaste et cellule VML après différenciation adipocytaire des ASC. L'expression de l'ensemble de ces marqueurs était plus faible après différenciation adipocytaire, par rapport aux ASC non



différenciées (données non montrées). Cependant, une expression faible de ces marqueurs non-adipocytaires a été détectée au sein des adipocytes issus de la différenciation des ASC, et était augmentée lorsque les ASC avaient été pré-engagées dans les lignages ostéoblastique, chondroblastique et VML par le TGFβ1 contenu dans le sérum de culture (figure S2b). Au contraire, alors que l'expression des marqueurs de cellules des lignages ostéoblastique, chondroblastique et VML diminuait, les marqueurs du lignage adipocytaire étaient surexprimés après différenciation adipocytaire des ASC (figure 2). À l'échelle clonale, en culture les BM-MSCs expriment de nombreux marqueurs de lignage dans un état non induit pour la différenciation<sup>417</sup>, ce qui soutient l'hypothèse de Dov Zipori. Notons cependant que dans la majorité des articles de la littérature, et qui s'intéressent à la différenciation des CSM, les BM-MSCs sont cultivées en milieu de type Standard. L'expression par les BM-MSCs de ces nombreux marqueurs de différenciation, même à bas bruit, pourrait donc être uniquement due à un priming exercé, entre autres, par le TGFβ1 contenu dans le sérum de culture.

Le phénotype des ASC cultivées en milieu EGM2, et notamment leur immaturité, est-il acquis par les méthodes de culture (reprogrammation cellulaire), ou inhérent à leur phénotype natif qui serait conservé *in vitro* ? Après tri cellulaire et *single cell RNA-seq*, il a été identifié récemment chez la souris et chez l'humain, différentes populations d'ASC *in vivo*. Les populations Dpp4<sup>+</sup> et Icam1<sup>+</sup> ont des propriétés différentes *in vitro*. Les cellules portant le marqueur Dpp4 se différencient moins bien en adipocytes que les cellules Icam1<sup>+</sup>, comme cela a été montré par un plus faible marquage lipidique au *Bodipy* ainsi qu'une plus faible expression d'*Adipoq*, *Pparg* et *Plin1*<sup>404</sup>. Ces propriétés pourraient s'expliquer par une sensibilité différente au TGFβ1. En effet, les capacités de différenciation adipocytaire des ASC Dpp4<sup>+</sup> *in vitro* sont abolies en présence de TGFβ1, alors qu'elles ne sont que partiellement éteintes dans les cellules Icam1<sup>+</sup>. De plus, un traitement TGFβ1 des ASC Icam1<sup>+</sup> oriente ces cellules vers le phénotype des cellules Dpp4<sup>+</sup>. Nos résultats viennent appuyer cette étude et montrent que le TGFβ1 diminue les potentialités de différenciation en adipocytes des ASC. On peut donc suggérer que les cellules Dpp4<sup>+</sup> sont stimulées *in situ* par le TGFβ1 endogène, et que ce priming est conservé *in vitro*, altérant leurs potentialités adipogéniques en culture, tel que décrit par Merrick et al. Ainsi, les cellules



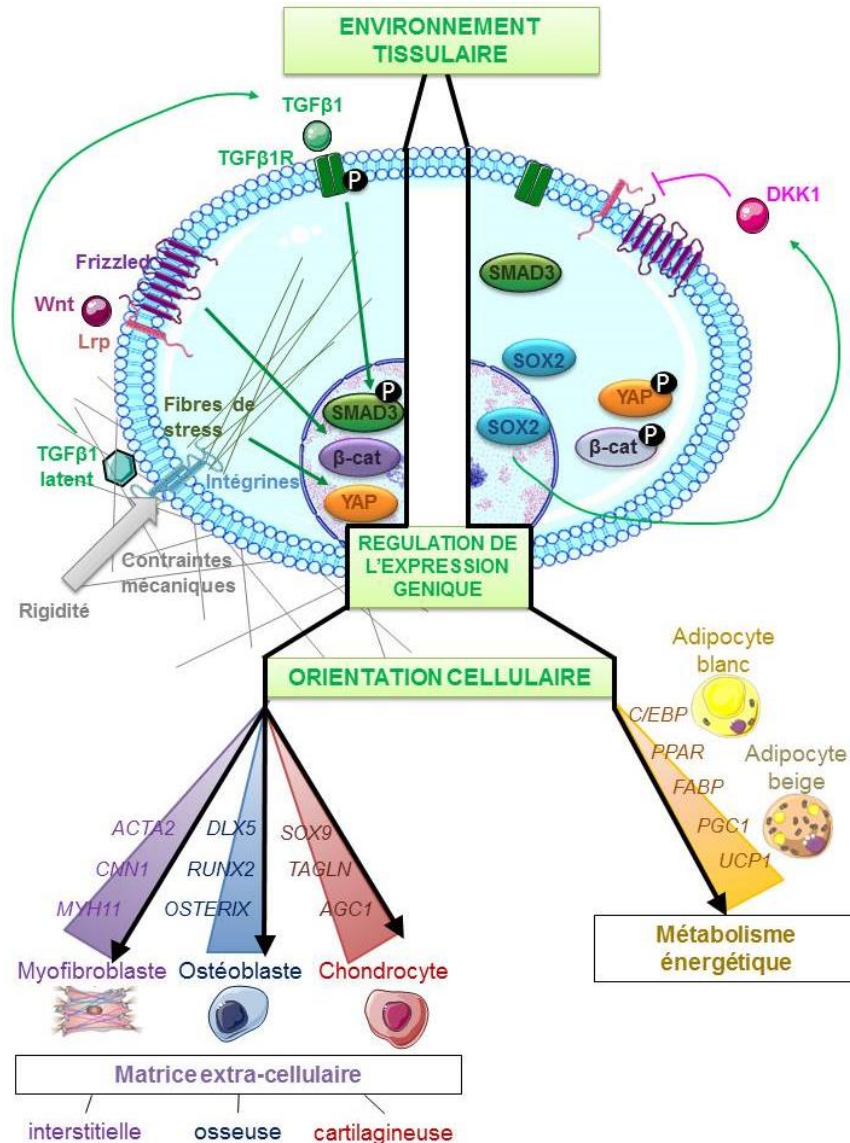
garderaient en mémoire les signaux de *priming* qu'elles ont reçu *in vivo* dans leur microenvironnement. Cette hypothèse expliquerait le fait que les ASC aient davantage de potentialités adipogéniques *in vitro* que les BM-MSCs<sup>3</sup>. Il est cependant étonnant que les ASC-EGM2 surexpriment significativement  $2.4 \pm 0.2$  fois plus le marqueur Dpp4 par rapport aux ASC-Standard, qui expriment inversement  $2 \pm 0.1$  fois moins le marqueur Icam1 par rapport aux ASC-EGM2. Ces données viennent de l'analyse de nos données de transcriptomique (données non montrées). Cette analyse ne colle pas exactement avec les potentialités adipocytaires observées sur les ASC Dpp4<sup>+</sup> et Icam1<sup>+</sup> par l'équipe de Merrick et al. Cette différence devra donc faire l'objet d'études complémentaires. Il serait intéressant d'évaluer comparativement l'immaturation et le *priming* dépendants du TGFβ1 des ASC cultivées en EGM2 ou -Standard, ainsi que des ASC exprimant Dpp4<sup>+</sup> ou Icam1<sup>+</sup>, et les potentialités respectives de ces cellules vers les différentes voies de différenciation d'intérêt thérapeutique. Une analyse moléculaire approfondie permettrait une identification de marqueurs de ces populations d'intérêt *in vivo*.

Par ailleurs, nos travaux montrent que les ASC-EGM2 conservent des capacités adipogéniques plus longtemps que les ASC-Standard en culture à long terme (figures 2d et 2e). Il est connu que le potentiel adipogénique des BM-MSC diminue au fur et à mesure des passages en culture<sup>418</sup>. Or les cultures primaires contiennent plusieurs populations hétérogènes de colonies. La trypsinisation et l'ensemencement répété des ASC sur un support rigide pourraient sélectionner peu à peu des CFU orientées vers les lignages ostéoblastique, chondroblastique et VML aux dépens des CFU orientées vers le lignage adipogénique. Cette sélection pourrait être favorisée par le milieu Standard alors que le milieu EGM2 maintiendrait des CFU adipogéniques plus longtemps en culture. De même, le milieu EGM2 pourrait maintenir des cellules plus immatures en culture, ayant donc davantage de potentialités, que le milieu Standard. Une étude clonale devrait donc être menée afin de savoir s'il s'agit des mêmes cellules acquérant des propriétés différentes du fait du milieu dans lequel elles sont cultivées, ou s'il s'agit de cellules différentes sélectionnées par le milieu de culture.

La CSM ne doit donc pas être considérée comme un type cellulaire bien défini. Étant donné la grande hétérogénéité de CSM décrites dans la littérature, il



**Figure 23 : Régulations moléculaires du devenir des CSM**



Représentation graphique et simplifiée des hypothèses énoncées dans la partie discussion du manuscrit. Les contraintes mécaniques générées par un environnement tissulaire rigide induisent l'activation du TGFβ1 latent séquestré dans la matrice-extracellulaire. Suite à la fixation du TGFβ1 sur son récepteur spécifique, le facteur de transduction du signal SMAD3 est phosphorylé et relocalisé dans le noyau des CSM. En parallèle, les contraintes mécaniques exercées par le microenvironnement cellulaire induisent l'activation de la voie de signalisation Hippo et l'activité nucléaire du facteur de transduction du signal YAP. Enfin, l'activation de la voie de signalisation Wnt par la cytokine contenue dans le micro-environnement permet la localisation nucléaire de la β-caténine. Un dialogue positif entre ces trois voies de signalisation est décrit dans la littérature<sup>419</sup>. Les activités nucléaires des facteurs SMAD3, YAP et β-caténine induisent notamment l'expression de marqueurs appartenant aux lignages VML, ostéoblastique et chondrocytaire, et inhibent l'expression des marqueurs du lignage adipocytaire. Dans un environnement tissulaire mou, les voies de signalisation du TGFβ1 et Hippo sont inactives. La voie de signalisation Wnt est inhibée par l'activité de DKK1, induite par l'activité transcriptionnelle de SOX2, et la CSM s'engage dans le lignage adipocytaire.

Source : Hélène Leménager, STROMALab

faut aujourd'hui considérer la CSM comme un ensemble d'identités cellulaires différentes au niveau phénotypique et fonctionnel. Il est donc nécessaire de mieux caractériser l'identité des différentes sous-populations de CSM, en complément des critères minimum énoncés en 2006 par l'ISCT. L'étude systématique d'un ensemble de facteurs quantitatifs, standardisés et ramenés à un référentiel commun permettra une meilleure compréhension des phénomènes biologiques observés. Le référentiel peut être établi par, par exemple, la génération d'une lignée cellulaire de CSM et la mise en place d'un consortium sur les méthodes de culture et d'analyse de ces cellules. L'expression du MSCA1, DPP4, ICAM1, CD146, CD34, CD271 devront systématiquement être analysées dans les CSM d'intérêt et comparées à la lignée de CSM de référence. De même, il est nécessaire d'établir des protocoles de différenciation standardisés dans les lignages mésodermiques et de quantifier le degré de différenciation obtenu par rapport aux CSM de référence. La comparaison de l'ensemble de ces études par une analyse bioinformatique à grande échelle permettra d'établir une cartographie non exhaustive des différentes CSM. Ceci afin d'identifier le type de CSM le plus adapté pour chaque type de thérapie cellulaire.

## **2. Régulations extracellulaires du devenir des CSM :**

Nous montrons par nos travaux que le TGF $\beta$ 1 engage les ASC vers les lignages ostéoblastiques, chondroblastiques et VML, à l'opposé de leurs potentialités adipogéniques. Il semble donc y avoir une relation exclusive entre les lignages ostéoblastiques, chondroblastiques et VML d'une part et le lignage adipocytaire d'autre part (voir figure 23).

Quelles caractéristiques de ces lignages sont incompatibles avec une orientation vers une différenciation adipogénique ? L'engagement dans le lignage ostéoblastique mène à la formation d'ostéoblastes, et à la synthèse d'une MEC de type osseuse riche en collagène de type 1 et à sa minéralisation au stade terminal<sup>420</sup>. L'engagement dans le lignage chondroblastique est caractérisé par la formation de chondroblastes et la synthèse d'une MEC de type cartilagineuse riche en fibres de collagènes de type 2 et en protéoglycanes, l'aggrécane en majorité. Enfin, l'engagement dans le lignage VML conduit à la formation de cellules VML localisées dans la paroi de certains vaisseaux sanguins. Décrites comme étant associées à un phénotype contractile de type myofibroblastique ou synthétique de



MEC de type fibroblastique<sup>325</sup>, ces cellules ont ainsi de grandes capacités sécrétoires de MEC fibreuse<sup>421</sup>. Une MEC enrichie en fibres de collagènes est plus dure mécaniquement qu'une MEC enrichie en fibronectine par exemple, du fait notamment de la structure fibrillaire et la présence de pontages entre fibres. Les CSM humaines, peu importe leur tissu d'origine (moelle osseuse, TA ou cordon ombilical), se différencient spontanément en myofibroblastes dans une culture contenant du sérum et sur un support rigide tel que le plastique des flacons de culture classiques<sup>250</sup>. De par cette adhérence au plastique, ces données expliquent que les ASC-EGM2, malgré les plus faibles quantités de sérum contenues dans le milieu de culture, expriment des marqueurs du lignage VML. Les tissus osseux et cartilagineux sont également rigides, respectivement  $10^6$  et  $10^5$  Pa, selon le module d'élasticité de Young<sup>422</sup>, et soumis à des contraintes mécaniques importantes (compression, cisaillement, élongation,...)<sup>423</sup>. Par exemple, l'articulation de la hanche supporte une compression locale de 7 MPa en 0.15 secondes lorsqu'un individu monte les escaliers, soit l'équivalent d'environ trois fois le poids du corps<sup>424</sup>. Ces contraintes peuvent induire l'expression de TGF $\beta$ 1<sup>425</sup> et la synthèse et la maturation de la MEC<sup>426</sup>. De plus, les mouvements mécaniques de la MEC favorisent l'activation et la libération du TGF $\beta$ 1 « latent » en rompant son interaction avec la LAP<sup>427,428</sup>. Ainsi, en réponses aux contraintes biomécaniques, on observe une boucle d'activation entre la synthèse de TGF $\beta$ 1 et de la production/maturation d'une MEC, pouvant mener à une augmentation de la rigidité des tissus et à la fibrose.

Comment la production de MEC aurait-elle un effet « anti-adipocytaire » ? Le TA est un tissu mou. Chez la souris par exemple le TA blanc a un module de Young d'environ 3 kPa<sup>338</sup>. Le TA brun par contre, du fait de sa composition en mitochondries est un peu plus rigide (environ 4.5 kPa). Il a été récemment montré que des ASC mises en culture sur un substrat rigide se différenciaient mieux en ostéoblastes, alors qu'inversement un support mou favorisait leur différenciation en adipocytes<sup>250,429</sup>. À noter que les taux de TGF $\beta$ 1 circulants sont augmentés chez l'homme obèse<sup>430</sup>, probablement du à l'inflammation chronique de bas bruit qui est décrite dans cette pathologie. Ceci pourrait être une des causes qui expliquerait que le TA sous-cutané de personnes obèses contienne plus de fibres matricielles totales (échelle tissulaire) et autour des adipocytes (échelle cellulaire), pouvant



contribuer à la fibrose du tissu. Ces fibres sont principalement constituées de collagènes de type I, III et VI<sup>200</sup>. Or cette fibrose est corrélée positivement à la rigidité physique du tissu et à des paramètres biocliniques de mauvais pronostic<sup>431</sup>. Pellegrinelli et collaborateurs ont étudié l'impact des contraintes mécaniques retrouvées *in situ* dans le TA sous-cutané d'obèses sur les adipocytes. Grâce à un modèle de culture en trois dimensions, ils ont étudié les effets de la compression d'un hydrogel contenant des adipocytes *ex vivo* en comparaison avec ceux cultivés en présence de TA sous-cutané décellularisé de patients obèses. Dans les deux modèles, lorsque les adipocytes sont comprimés physiquement il y a une surexpression de gènes de stress du réticulum et une augmentation de la sécrétion de cytokines inflammatoires IL-6 et G-CSF<sup>200</sup>. Il n'est donc pas étonnant que les patients qui ont un TA sous-cutané plus fibreux et de plus forts taux d'IL-6 circulante répondent moins bien à la chirurgie bariatrique en termes de perte d'IMC et d'amélioration du profil lipidique<sup>431</sup>. Les adipocytes comprimés sécrètent également du *Connective Tissue Growth Factor* (CTGF), facteur pro-fibrotique bien connu dont la synthèse est stimulée par l'activation de la voie TGFβ1. Le CTGF peut engager les précurseurs adipocytaires vers un phénotype de type fibroblastique et la sécrétion de MEC<sup>200</sup>. De manière intéressante, l'ensemble de ces effets n'est pas observé lorsque les adipocytes sont cultivés en présence de TA décellularisé issu de sujets non-obèses. Ainsi, bien que le facteur déclenchant la pathologie ne soit pas clairement identifié, on peut penser que les effets délétères de l'obésité résultent de la combinatoire locale et chronique de pressions mécaniques et d'un environnement inflammatoire altérant la fonction des adipocytes. L'obésité pourrait être vue comme une cicatrice permanente et non résolue, expliquant la fibrose du TA et les effets délétères du TGFβ1 dans cette pathologie. De manière intéressante, des souris déficientes pour le facteur de transduction du signal du TGFβ1, SMAD3, sont protégées de l'obésité induite par un régime riche en graisse. Ceci vient du *browning* de leur TA blanc<sup>430</sup>. Ainsi, en plus d'induire la synthèse de MEC<sup>200</sup>, et d'inhiber l'adipogenèse<sup>432</sup>, comme nous le confirmons ici, le TGFβ1 inhibe la capacité du TA blanc à brunir. De plus, nous avons observé un plus grand nombre de cellules riches en fibres de stress αSMA<sup>+</sup> après différenciation adipocytaire des ASC-Standard que dans des conditions de culture EGM2, plus faibles en TGFβ1 (données non montrées). Il semble donc que



les cellules retiennent le *priming* exercé par le TGF $\beta$ 1 en culture, ce qui suggère le passage d'un stade verrouillé et déterminé vers le lignage VML. Il est donc primordial de caractériser les mécanismes moléculaires de ce verrou afin de maîtriser le devenir des ASC. Nos travaux montrent que l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique du récepteur au TGF $\beta$ 1 permet de restaurer les potentialités de différenciation des ASC en adipocytes beiges.

Pour conclure, notre étude phénotypique et fonctionnelle intégrée met en lumière l'importance du TGF $\beta$ 1 dans le devenir des ASC. Nous suggérons également que le TGF $\beta$ 1 impacte la fonction des adipocytes du fait de son rôle profibrotique. Lorsqu'il est dérégulé, le TGF $\beta$ 1 est délétère pour l'organisme du fait de son implication dans les processus de fibrose/cicatrisation en général, et le développement pathologique de l'obésité. Une thérapie ciblée et contrôlée visant le TGF $\beta$ 1 ou l'activité de sa voie de signalisation pourrait s'avérer utile dans la prise en charge du syndrome métabolique.

### **3. La transduction des signaux extracellulaires :**

Le TGF $\beta$ 1 est une cytokine extracellulaire qui régule le devenir des ASC. Or le devenir d'une cellule dépend de son environnement et de sa capacité à y répondre. Ceci est vrai pour toutes les cellules, mais plus particulièrement vrai pour les cellules souches qui ont des capacités de différenciation, donc de devenir, étendues. La régulation des voies de transduction des signaux extracellulaires joue un rôle majeur dans la différenciation des CSM. Plus particulièrement, les contraintes mécaniques et la signalisation Wnt semblent avoir un rôle prépondérant dans la détermination du devenir des CSM. Par une étude de la bibliographie de manière intégrée mais non exhaustive, je vais ici proposer un mécanisme de régulation moléculaire impliqué dans les capacités de différenciation des CSM. La voie de signalisation Wnt débute par la fixation des molécules Wnt au récepteur Frizzled<sup>433</sup>. L'activation du récepteur empêche la dégradation de la  $\beta$ -caténine intracellulaire, alors relocalisée dans le noyau, où elle régule l'expression de gènes cibles. La voie Wnt est primordiale dans la détermination du devenir de la CSM vers le lignage ostéoblastique, aux dépens du lignage adipogénique<sup>434</sup>. La délétion de la  $\beta$ -caténine dans les ostéoblastes murins *in vivo* induit leur conversion en adipocytes FABP4<sup>+435</sup>. À l'inverse, l'activation de la voie Wnt diminue





l'expression protéique de PPAR $\gamma$ 2 et C/EBP $\alpha$ <sup>436</sup>. De plus, la  $\beta$ -caténine interagit directement avec la protéine YAP sous sa forme cytoplasmique phosphorylée et inactive<sup>437</sup>. Cette interaction favorise la localisation cytoplasmique de la  $\beta$ -caténine et l'inhibition de son activité transcriptionnelle. YAP est un facteur de transduction de signaux environnementaux de type mécanique qui régule la transcription de gènes cibles en réponse notamment à l'étirement du cytosquelette<sup>438</sup>. Il est inactivé par phosphorylation et relocalisation dans le cytoplasme. Il a été montré que des CSM cultivées sur un support rigide (40 kPa) ne se différenciaient pas en ostéoblastes si l'expression protéique de YAP était inhibée par des siRNA spécifiques. La différenciation adipocytaire de ces CSM dépourvues de YAP atteint le même niveau que des CSM cultivées sur substrat mou (1 kPa). Enfin, la surexpression de la forme nucléaire de YAP (non phosphorylée) dans les CSM cultivées sur substrat mou permet de retrouver leurs capacités de différenciation en ostéoblastes. Ces travaux montrent que l'activité anti-adipogénique d'un environnement mécanique dur peut-être levée par suppression du message de transduction du signal YAP et induction vers le lignage de reprogrammation, ici l'adipogenèse. Par ailleurs, la diminution de l'expression protéique de YAP diminue l'accumulation nucléaire de SMAD *in vivo*, et diminue la quantité de protéine SMAD2/3, même sous stimulation au TGF $\beta$ 1<sup>439</sup>. La  $\beta$ -caténine, YAP et la signalisation du TGF $\beta$ 1 semblent donc jouer un rôle concomitant dans l'orientation des CSM vers le lignage ostéoblastique en réponse à un environnement physique (mécanique) et chimique (molécules de signalisation).

Il a été montré que la protéine SOX2 régulait négativement la voie Wnt à plusieurs niveaux. L'activité génomique de SOX2 induit la transcription de DKK1, inhibiteur connu du récepteur Lrp6 de la voie Wnt<sup>409</sup>. L'interaction directe de SOX2 dans sa partie C-terminale avec la  $\beta$ -caténine inhibe l'activité transcriptionnelle de cette dernière<sup>440</sup>. Enfin, SOX2 est localisé au niveau des promoteurs d'inhibiteurs de la voie Wnt tels qu' Adenomatous Polyposis Coli et Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$ <sup>440</sup>. De cette manière, SOX2 favorise l'adipogenèse des CSM. De manière intéressante, nos travaux montrent que les adipocytes surexpriment SOX2 par rapport aux CSM. De plus, nous révélons une forte localisation cytoplasmique de SOX2 dans les adipocytes.



#### 4. Rôle de SOX2 dans les adipocytes :

SOX2 est associé au maintien de la pluripotence des cellules souches et à leurs capacités d'auto-renouvellement. Il est exprimé par de nombreuses cellules immatures telles que les cellules souches épithéliales<sup>403</sup>, les progéniteurs neuraux<sup>441</sup>, les cellules souches cancéreuses<sup>442</sup>, etc. Il est également utilisé lors des processus de reprogrammation cellulaire afin de transformer une cellule mature en cellule pluripotente induite iPS<sup>376</sup>. Ainsi, l'expression de SOX2 est associée à un phénotype de cellules très immatures. Il est donc étonnant de le trouver surexprimé dans des adipocytes, qui sont les cellules matures du lignage adipocytaire. On peut donc se demander si, comparativement à d'autres lignages, la différenciation adipocytaire ne serait pas une différenciation immature. Compte tenu des différents phénotypes décrits des adipocytes, il est évident que ces cellules sont plastiques et démontrent certaines potentialités. Peut-être donc que les adipocytes gardent un certain degré d'immaturité par rapport à d'autres types cellulaires matures. Ceci afin de faire face aux variations environnementales, notamment énergétiques ou thermiques.

Quel est le rôle de la protéine SOX2 dans les adipocytes ? SOX2 est décrit dans d'autres types cellulaires comme facteur de transcription et en tant que facteur pionnier. Il a été préalablement décrit grâce à un Chromatin Immunoprecipitation assay (ChIP) et un test d'expression de la luciférase que la protéine SOX2 se fixait sur le promoteur de DKK1 et induisait sa transcription<sup>409</sup>. La perte d'expression de la protéine SOX2 dans des CSM dérivées de sang de cordon ombilical humain par transfection avec un shRNA spécifique, abroge la capacité de ces cellules à donner des adipocytes *in vitro*. Or, l'expression ectopique de DKK1 dans ces CSM restaure leur capacité de différenciation en adipocytes, comme démontré par l'augmentation de l'expression protéique de PPAR $\gamma$  et C/EBP $\beta$  ainsi que l'augmentation du marquage *Oil Red O*. Il semblerait donc que SOX2 joue le rôle de facteur de transcription activateur de la transcription de DKK1 au cours de l'adipogenèse. Les mêmes résultats ont été obtenus pour la cible de SOX2 YAP1 dans des progéniteurs ostéogéniques chez la souris<sup>410</sup>. De plus, une analyse *in silico* a révélé de nombreux sites d'interaction de la protéine SOX2 dans les promoteurs proximaux de PPAR $\gamma$ 2, UCP1 et PGC1 $\alpha$  chez l'humain (données non



montrées). D'autre part, SOX2 est connu pour son rôle en tant que facteur pionnier, notamment dans les processus de reprogrammation cellulaire. Une analyse d'images en temps réel à l'échelle de la cellule unique montre que SOX2 est le premier facteur à se fixer au niveau de la chromatine des gènes parmi les quatre facteurs de reprogrammation OCT4 (O), SOX2 (S), KLF4 (K) et c-MYC (M) [OSKM]<sup>397</sup>. La protéine scannerait alors la chromatine par glissements et sautilllements le long de l'ADN plutôt que par des sauts en trois dimensions (entre des chromosomes ou des régions de chromosomes différents). Son partenaire OCT4 facilite son interaction avec le nucléosome<sup>363</sup>. La fixation de SOX2 au niveau du nucléosome s'accompagne d'une torsion conformationnelle de ce dernier. Une analyse par microarrays a révélé que 90% des gènes silencieux ciblés par OSKM répondaient au niveau transcriptionnel dans les 48h suivant la fixation de ces facteurs au niveau des enhanceurs<sup>364</sup>. Pour la question du rôle de la protéine SOX2 dans la différenciation adipocytaire, et la conversion en adipocytes beiges, il serait donc nécessaire de déterminer le rôle de SOX2 en tant que facteur de transcription ou en tant que facteur pionnier dans les adipocytes.

Un ChIP-qPCR et un essai luciférase permettront de montrer le rôle de SOX2 en tant que facteur de transcription de cibles particulières. Cette analyse pourra être réalisée lors de la conversion des adipocytes beiges *in vivo* (avant et après exposition des souris au froid) et *in vitro* (avant et après traitement à la rosiglitazone des adipocytes blancs dérivés de cellules hMADs). Concernant son rôle en tant que facteur pionnier, une étude croisée entre un ChIP-sequencing dirigé contre SOX2 et un Assay for Transposase-Accessible Chromatin with highthroughput sequencing permettra de corrélérer la localisation génomique de SOX2 à l'ouverture de la chromatine. Cette approche combinée a été initiée et des échantillons biologiques ont été recueillis, mais l'étude n'a pas pu aboutir faute de budget, le laboratoire ne maîtrisant pas la technologie elle devait être sous-traitée.

De plus, lors du processus de reprogrammation cellulaire, SOX2 est retrouvé au niveau des régions enhanceurs de la chromatine de manière précoce, tandis que sa localisation au niveau des promoteurs est augmentée dans les étapes tardives, en interaction avec KLF4 et c-MYC<sup>364,380</sup>. Il ne faut donc pas exclure la possibilité que SOX2 joue le double rôle facteur de transcription et de facteur pionnier, en fonction du temps d'exposition des souris au froid, ou selon le type de TA concerné.



Enfin, ces études devront être complétées par des expériences de perte et gain de fonction. Tout d'abord, une expérience gain de fonction est nécessaire pour confirmer le lien direct entre SOX2 et le phénotype beige/brun des adipocytes. Des vecteurs lentiviraux MS2 ont été mis au point par un collaborateur du laboratoire<sup>A,443</sup>. Il s'agit d'un vecteur lentiviral de transfert d'ARNm, non intégratif et non réplicatif, qui a démontré une grande efficacité et rapidité d'effet *in vitro* et *in vivo*. L'utilisation de ce système permettrait une surexpression de SOX2 *in vitro* et *in vivo*. Une collaboration en ce sens a été engagée. L'ajout de SOX2 recombinant ou de vecteurs lentiviraux de type MS2 surexprimant SOX2 dans les adipocytes blancs *in vitro*, et/ou par injection intra-tissulaire *in vivo*, sera-t-elle suffisante pour induire une conversion des adipocytes blancs en adipocytes beiges ? Ou augmentera-t-elle la capacité de conversion des adipocytes blancs en adipocytes beiges en réponse à une exposition au froid *in vivo* chez la souris ou une stimulation  $\beta$ 3-adrénergique de type CL316,243 ou forskoline *in vitro* chez l'humain ? À l'inverse, une expérience perte de fonction de type siRNA ou shRNA serait difficile à réaliser car l'ARNm de SOX2 ne varie pas lors de l'obtention d'adipocytes beiges *in vivo* et *in vitro* (données non montrées). De plus, l'ARNm de SOX2 n'est pas détecté par RT-qPCR dans des ASC humaines (données non montrées). Il a récemment été développé un inhibiteur synthétique de la fonctionnalité de SOX2 par compétition avec son site de liaison sur l'ADN, le pyrroleimidazole polyamide S2 (PIPS2). Ainsi, l'utilisation du PIPS2 est à envisager dans le cadre d'une étude *in vitro* chez l'humain avec les hMADs<sup>444</sup>. Il serait alors intéressant de savoir si inhiber la liaison de SOX2 sur l'ADN empêchera la conversion des adipocytes blancs en beiges ou leur obtention à partir des progéniteurs par le processus de différenciation. De plus, l'impact sur l'activité du TA brun chez la souris devra également être étudié. Enfin, une analyse par immunoprécipitation de protéines associées à SOX2 permettrait d'étudier l'implication de son partenaire OCT4 dans son rôle en tant que facteur de transcription ou pionnier dans les processus biologiques discutés ici. Cette étude, si elle est couplée à de la spectrométrie de masse, permettrait d'identifier les facteurs en interaction avec SOX2 impliqués dans ces processus.

---

<sup>A</sup> Ils sont actuellement commercialisés par une entreprise.





Qu'il joue le rôle de facteur de transcription ou pionnier, il serait intéressant de déterminer les cibles de SOX2. Nous montrons ici par une étude cinétique au cours de la différenciation adipocytaire que SOX2 est détecté dans les ASC et les hMADs à l'instant où des gouttelettes sont visibles par microscopie dans les cellules. Si la nature lipidique des gouttelettes est confirmée par un marquage à l'*Oil Red O* ou au *Nile Red*, on pourra supposer que SOX2 est lié à la modification du métabolisme des lipides. Cette hypothèse expliquerait le maintien de son expression dans les adipocytes matures observé *in vitro* et *in vivo*. Cependant, cette hypothèse est réfutée du fait que SOX2 soit sous-exprimé dans le TA blanc épидидymaire par rapport au TA inguinal et au TA brun. En effet, le TA blanc épидидymaire est composé d'adipocytes blancs uniloculaires qui assurent la gestion des acides gras, au même titre que les autres TA, tel que le TA blanc inguinal.

D'autre part, les adipocytes bruns et beiges sont enrichis en mitochondries par rapport aux adipocytes blancs. Il a été montré que l'expression d'UCP1 était couplée à la mitochondriogenèse et au *turn-over* mitochondrial dans le TA brun de souris exposées au froid<sup>445</sup>. Nos résultats chez la souris montrent que l'expression de SOX2 est en amont de celle d'UCP1 dans le TA inguinal en réponse au froid. Ces résultats supportent l'implication de SOX2 dans la mitochondriogenèse. Cependant, nous montrons que l'expression d'UCP1 dans le TA brun est concomitante à celle de SOX2, même si une analyse cinétique plus stricte lors des premières 24h de mise au froid des souris reste nécessaire. Chez l'humain, nous montrons que l'ensemble des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale sont surexprimés après différenciation adipocytaire des ASC. Nos résultats montrent également l'augmentation du nombre de mitochondries dans les adipocytes issus de la différenciation des ASC. Ainsi, SOX2 pourrait être lié au processus de mitochondriogenèse. Une analyse *in silico* a révélé la présence de sites de fixation de SOX2 dans le promoteur du gène PGC1 $\alpha$ , facteur maître de la mitochondriogenèse (données non montrées). La réalisation d'un CHIP-qPCR spécifique permettra de déterminer si PGC1 $\alpha$  est une cible génomique de SOX2.

Par ailleurs, une analyse préliminaire du réseau mitochondrial a été réalisée *in vitro* sur des ASC humaines induites en différenciation adipocytaire (données non montrées). Bien que l'expérience nécessite d'être reproduite, l'analyse phénotypique du *mitotraker* MTC02 par immunofluorescence ne permet pas



d'établir de lien entre la présence nucléaire de SOX2 spécifiquement retrouvée dans quelques cellules et la mitochondriogenèse. En effet, alors que le marquage du *mitotraker* était identique entre deux cellules voisines, l'une montrait une localisation majoritairement nucléaire de SOX2, alors que SOX2 était majoritairement localisé dans le cytoplasme de la cellule voisine (données non montrées). L'hypothèse était que SOX2 active la transcription des gènes de la mitochondriogenèse, et conférerait également à la cellule la capacité d'exprimer d'UCP1. La présence nucléaire de SOX2 aurait alors marqué les pré-adipocytes beiges. Ces expériences devront être reproduites et les investigations poursuivies. De plus, alors qu'il est classiquement décrit par imagerie comme ayant une localisation nucléaire, nous mettons en évidence un marquage important et diffus de SOX2 dans le cytoplasme des cellules *in vitro* et *in vivo*. Le marquage cytoplasmique versus nucléaire de SOX2 que nous observons *in vitro* et *in vivo* devra être confirmé par fractionnement subcellulaire et Western Blotting. Nos résultats par immunofluorescence montrent que SOX2 est majoritairement localisé dans de gros noyaux ronds chez la souris (voir figures) et chez l'humain (données non montrées). Dans ces noyaux, SOX2 ne semble pas co-localiser avec des foci de DAPI qui pourrait correspondre à de l'hétérochromatine. Une étude devra être menée afin de savoir quel type cellulaire est concerné par ce marquage. Il pourrait s'agir d'adipocytes matures en phase G0, ou de cellules en prolifération. Nos résultats révèlent un fort marquage cytoplasmique de SOX2 dans les adipocytes. Nous sommes les premiers à décrire ceci. Connaissant l'interaction de YAP sous sa forme cytoplasmique avec la  $\beta$ -caténine<sup>437</sup>, et l'effet pro-adipocytaire de cette interaction, on peut supposer qu'un mécanisme similaire existe pour SOX2. En effet, bien que la localisation intracellulaire de SOX2 et de la  $\beta$ -caténine n'aient pas été identifiés dans les ostéoblastes, l'interaction directe de SOX2 dans sa partie C-terminale avec la  $\beta$ -caténine inhibe l'activité transcriptionnelle pro-ostéoblastique de cette dernière<sup>440</sup>. Au sein des adipocytes, SOX2 pourrait ainsi être modifié post-traductionnellement (nous y reviendrons plus loin), ce qui favoriserait sa relocalisation cytoplasmique et la séquestration de la  $\beta$ -caténine dans le cytoplasme des cellules, pour maintenir l'identité adipocytaire. Il est donc possible que le rôle de SOX2 dans les adipocytes ne s'explique pas par une fonction au niveau nucléaire.



Enfin, il a été décrit par tracking d'adipocytes *in vivo* chez la souris, qu'un pool d'adipocytes du TA inguinal s'inter-convertissement entre un phénotype beige exprimant UCP1 et un phénotype blanc en fonction des stimuli de l'organisme et des conditions de température environnementales<sup>104</sup>. Lors de ces variations, les cellules gardent une mémoire épigénétique de leur conversion, notamment par des marques d'histone de type H3K4me1<sup>9</sup>. Lors d'une réexposition des animaux au froid, les gènes du programme thermogénique sont plus fortement induits que chez les souris qui n'ont pas été préalablement exposées au froid. Cette mémoire augmente la capacité des animaux à maintenir leur homéothermie (+7°C après 4h d'exposition à 4°C)<sup>9</sup>. Dans cette étude, les auteurs proposent le récepteur aux glucocorticoïdes et le facteur de transcription Zfp423 comme induisant la reprogrammation directe des adipocytes beiges en blancs lors d'une réexposition à thermoneutralité (30°C). Lors de cette reprogrammation, les cellules passent d'un profil épigénétique à un autre. Aussi, si SOX2 joue le rôle de facteur pionnier dans l'adipocyte, peut-être que sa fonction serait liée à l'épigénétique et la mémoire de cette marque et conditionnerait le phénotype plastique. Aussi, on peut se poser la question suivante : si un tel mécanisme de plasticité est démontré dans l'adipocyte, SOX2 pourrait-il contribuer à la plasticité d'autres types cellulaires ?

Cependant, considérer SOX2 comme la molécule de la plasticité reviendrait à montrer la nécessité de sa fonction dans d'autres processus de plasticité cellulaire. Par exemple, une étude devra être menée en ce sens lors du shift des cellules VML entre un phénotype synthétique et contractile. Les cellules de Schwann sont également des cellules plastiques. Elles existent dans un phénotype myélinisant autour des fibres nerveuses de gros diamètre telles que les motoneurones ou certaines fibres sensorielles. Elles contribuent ainsi à la propagation du potentiel d'action. Les cellules de Schwann existent également dans un phénotype non-myélinisant, entourant les axones de petit diamètre<sup>446</sup>. Elles participent alors en outre à la transmission synaptique du messageur nerveux. Suite à une blessure tissulaire, il a été montré un processus de transdifférenciation d'une cellule de Schwann myélinisante à une cellule de Schwann non myélinisante<sup>447</sup>. Il s'agirait d'une dé-différenciation puis d'une re-différenciation. Cependant, SOX2 ne serait pas impliqué dans ce processus, bien qu'il soit fortement exprimé par le précurseur immature et qu'il inhibe la myélinisation des



cellules de Schwann *in vivo* chez la souris<sup>448</sup>. Des études plus poussées devront être menées afin de déterminer l'importance de SOX2 dans les processus de plasticité cellulaire.

Pour finir, nos résultats par western blot de SOX2 révèlent une bande à 31 kDa qui diminue lors de la différenciation adipocytaire des ASC humaines et des hMADs *in vitro*. Il semble y avoir un passage de relais entre cette forme à 31 kDa avec la forme communément rapportée dans la littérature de SOX2 (34 kDa). Ces résultats ont été confirmés sur les ASC avec un autre anticorps (données non montrées). Toutefois, une expérience de compétition avec du SOX2 recombinant devra être réalisée afin de confirmer la spécificité du signal observé. À noter que SOX2 est une protéine qui fait l'objet de plusieurs types de régulations au niveau post-traductionnel. Par exemple, l'acétylation de la lysine 73 augmente son export nucléaire et inhibe sa fonction nucléaire<sup>392</sup>. De plus, la méthylation de sa lysine 119 par Set7 induit l'ubiquitination de SOX2 et sa dégradation par le protéasome, facilitant la différenciation des cellules ES vers un lignage de type ectodermique<sup>388</sup>. À l'inverse, la phosphorylation de SOX2 par AKT1 sur sa tyrosine 118 augmente sa stabilité et l'auto-renouvellement des cellules ES murines<sup>386</sup>. Comme cela a été montré par immunofluorescence et protéines marquées, K119Met et T118Phospho sont mutuellement exclusives, ce qui contribue à réguler le devenir des cellules ES<sup>388</sup>. Les modifications post-traductionnelles de SOX2 sont nombreuses et ne seront pas cataloguées ici. Mais une recherche complémentaire est nécessaire afin de déterminer quel type de modification post-traductionnelle peut générer cette différence de 3 kDa. Cependant, le poids moléculaire apparent classiquement rapporté de SOX2 dans la littérature est 34 kDa. On peut donc suggérer un processus différent, c'est-à-dire que SOX2 serait tronquée d'environ 27 acides aminés dans les ASC et hMADs par rapport aux adipocytes. Des formes tronquées de SOX2 ont été décrites au cours du développement neural chez la souris<sup>387</sup>, mais nos résultats ne correspondent pas à ceux observés dans cette étude. De plus, les anticorps utilisés dans notre étude ciblent tous deux la partie C-terminale de la protéine. Un séquençage protéique pourrait être réalisé afin de confirmer cette hypothèse. Si tel est le cas, il serait nécessaire d'identifier l'enzyme responsable de ce clivage. À noter que SOX2 possède un site de liaison à l'ADN, ainsi que des séquences d'import et d'export nucléaire (NLS et NES respectivement). Cette





modification, si elle est confirmée, pourrait jouer un rôle sur la localisation nucléaire versus cytoplasmique de SOX2, sa demi-vie ou son interaction avec des partenaires protéiques ou nucléiques. Comme nous en avons discuté plus haut, une interaction cytoplasmique avec la  $\beta$ -caténine est suggérée dans la régulation du devenir des ASC lors de l'adipogenèse.

## 5. Maîtriser le devenir des CSM :

L'ensemble de nos travaux montre comment le devenir des cellules est régulé par l'environnement extracellulaire et les molécules de signalisation intracellulaires. Contrôler le devenir des cellules ouvre de nouvelles perspectives en thérapie cellulaire et bioingénierie. Les CSM représentent un grand espoir en médecine régénérative du fait de leurs nombreuses fonctions, notamment leurs potentialités de différenciation. Dans le cadre d'une thérapie de reconstruction osseuse par exemple, il faudrait privilégier l'utilisation de BM-MSCs cultivées sur support rigide bio-compatible et contrôler le devenir des cellules *in vivo*. Ce contrôle pourra s'exercer par exemple par la mise au point de biomatériaux permettant la libération contrôlée de TGF $\beta$ 1 et BMP *in situ*. À l'inverse, l'obtention d'adipocytes beiges et bruns contre les maladies associées à l'obésité passera par l'utilisation d'hydrogels bio-compatibles et l'induction du programme adipogénique en ciblant notamment PPAR $\gamma$  et C/EBP $\alpha/\beta$ . De plus, si la fonction de SOX2 dans les adipocytes est identifiée, l'induction et le contrôle de cette protéine pourrait être intéressante. Enfin, il est important également d'inhiber les voies de signalisation Wnt, TGF $\beta$ 1 et YAP.

Nos travaux montrent l'impact du sérum de culture sur la biologie des ASC. Le sérum est un additif courant dans les milieux de culture destinés à la recherche. Cependant, l'origine bovine du sérum n'est pas compatible avec une utilisation clinique. Aussi, aujourd'hui les CSM destinées à de la thérapie sont amplifiées dans du milieu contenant du lysat plaquettaire humain. Nous montrons que le TGF $\beta$ 1 contenu dans le sérum a un rôle majeur sur la détermination des ASC vers un phénotype d'ostéoblaste, chondroblaste et cellule VML. Il est donc important de déterminer les taux de TGF $\beta$ 1 contenus dans le lysat plaquettaire utilisé en clinique. Aussi, avons-nous caractérisé les ASC et BM-MSCs primaires humaines après culture dans un milieu contenant du lysat plaquettaire, en comparaison avec



leurs homologues cultivés en milieu Standard (contenant du sérum de veau foetal), ou en milieu EGM2 (données non montrées). Les résultats obtenus montrent que les cellules cultivées en lysat plaquettaire ont un phénotype plus proche des cellules maintenues en milieu Standard, que celles cultivées en conditions EGM2 (résultats non montrés). Cependant, une forte variabilité de nos résultats était fonction du donneur de lysat plaquettaire. Nous n'avons pas étudié les concentrations de TGF $\beta$ 1 dans ces conditions, mais une étude en ce sens devra être menée.

L'enjeu de la bio-ingénierie et des thérapies cellulaires est de contrôler dans l'espace et dans le temps le devenir des CSM *in vivo*.



# **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

---



1. Najj, A. *et al.* Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* (2019) doi:10.1007/s00018-019-03125-1.
2. Monsarrat, P. *et al.* An Innovative, Comprehensive Mapping and Multiscale Analysis of Registered Trials for Stem Cell-Based Regenerative Medicine. *Stem Cells Transl. Med.* **5**, 826–835 (2016).
3. Noël, D. *et al.* Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal-stromal cells despite similar differentiation potentials. *Exp. Cell Res.* **314**, 1575–1584 (2008).
4. Poissonnet, C. M., Burdi, A. R. & Bookstein, F. L. Growth and development of human adipose tissue during early gestation. *Early Hum. Dev.* **8**, 1–11 (1983).
5. Peterson, M. J., Czerwinski, S. A. & Siervogel, R. M. Development and validation of skinfold-thickness prediction equations with a 4-compartment model. *Am. J. Clin. Nutr.* **77**, 1186–1191 (2003).
6. Craigie, D. Case of Inflammation of the Adipose Tissue, Forming the Sheath of the Carotid Artery, Followed by Erosion and Perforation of the Arterial Tissue and Fatal Hemorrhage; with Some Remarks on the Peculiarities of Inflammation of the Adipose Tissue. *Edinb. Med. Surg. J.* **48**, 396–412 (1837).
7. Frayn, K. N. Integration of substrate flow in vivo: some insights into metabolic control. *Clin. Nutr. Edinb. Scotl.* **16**, 277–282 (1997).
8. Wertheimer, E. & Shapiro, B. The physiology of adipose tissue. *Physiol. Rev.* **28**, 451–464 (1948).
9. Roh, H. C. *et al.* Warming Induces Significant Reprogramming of Beige, but Not Brown, Adipocyte Cellular Identity. *Cell Metab.* **27**, 1121-1137.e5 (2018).
10. Waldén, T. B., Hansen, I. R., Timmons, J. A., Cannon, B. & Nedergaard, J. Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, 'brite,' and white adipose tissues. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **302**, E19-31 (2012).
11. Chabowski, A. *et al.* Insulin stimulates fatty acid transport by regulating expression of FAT/CD36 but not FABPpm. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **287**, E781-789 (2004).
12. Matschinsky, F. *et al.* Glucokinase as pancreatic beta cell glucose sensor and diabetes gene. *J. Clin. Invest.* **92**, 2092–2098 (1993).
13. Laforest, S., Labrecque, J., Michaud, A., Cianflone, K. & Tchernof, A. Adipocyte size as a determinant of metabolic disease and adipose tissue dysfunction. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **52**, 301–313 (2015).
14. Sbarbati, A. *et al.* Subcutaneous adipose tissue classification. *Eur. J. Histochem. EJH* **54**, e48 (2010).
15. Tauchi-Sato, K., Ozeki, S., Houjou, T., Taguchi, R. & Fujimoto, T. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique Fatty Acid composition. *J. Biol. Chem.* **277**, 44507–44512 (2002).
16. Greenberg, A. S. *et al.* Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. *J. Biol. Chem.* **266**, 11341–11346 (1991).
17. Tansey, J. T. *et al.* Functional studies on native and mutated forms of perilipins. A role in protein kinase A-mediated lipolysis of triacylglycerols. *J. Biol. Chem.* **278**, 8401–8406 (2003).
18. Nishino, N. *et al.* FSP27 contributes to efficient energy storage in murine white adipocytes by promoting the formation of unilocular lipid droplets. *J. Clin. Invest.* **118**, 2808–2821 (2008).





19. Rubio-Cabezas, O. *et al.* Partial lipodystrophy and insulin resistant diabetes in a patient with a homozygous nonsense mutation in CIDEA. *EMBO Mol. Med.* **1**, 280–287 (2009).
20. Harms, M. J. *et al.* Mature Human White Adipocytes Cultured under Membranes Maintain Identity, Function, and Can Transdifferentiate into Brown-like Adipocytes. *Cell Rep.* **27**, 213–225.e5 (2019).
21. Muller, S. *et al.* Human adipose stromal-vascular fraction self-organizes to form vascularized adipose tissue in 3D cultures. *Sci. Rep.* **9**, 7250 (2019).
22. Gordon, R. S. & Cherkes, A. Unesterified fatty acid in human blood plasma. *J. Clin. Invest.* **35**, 206–212 (1956).
23. Duncan, R. E., Ahmadian, M., Jaworski, K., Sarkadi-Nagy, E. & Sul, H. S. Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annu. Rev. Nutr.* **27**, 79–101 (2007).
24. Zimmermann, R. *et al.* Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* **306**, 1383–1386 (2004).
25. Eaton, S., Bartlett, K. & Pourfarzam, M. Mammalian mitochondrial beta-oxidation. *Biochem. J.* **320 ( Pt 2)**, 345–357 (1996).
26. Stephen, J. M. *et al.* The infrapatellar fat pad is a dynamic and mobile structure, which deforms during knee motion, and has proximal extensions which wrap around the patella. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc. Off. J. ESSKA* **26**, 3515–3524 (2018).
27. Bennett, M. B. & Ker, R. F. The mechanical properties of the human subcalcaneal fat pad in compression. *J. Anat.* **171**, 131–138 (1990).
28. Zhang, H.-M., Yan, Y.-P., Qi, K.-M., Wang, J.-Q. & Liu, Z.-F. Anatomical structure of the buccal fat pad and its clinical adaptations. *Plast. Reconstr. Surg.* **109**, 2509–2518; discussion 2519–2520 (2002).
29. Selthofer-Relatić, K. & Bošnjak, I. Myocardial fat as a part of cardiac visceral adipose tissue: physiological and pathophysiological view. *J. Endocrinol. Invest.* **38**, 933–939 (2015).
30. Alexopoulos, N. *et al.* Epicardial adipose tissue and coronary artery plaque characteristics. *Atherosclerosis* **210**, 150–154 (2010).
31. Iozzo, P. *et al.* Contribution of glucose tolerance and gender to cardiac adiposity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **94**, 4472–4482 (2009).
32. Packer, M. Epicardial Adipose Tissue May Mediate Deleterious Effects of Obesity and Inflammation on the Myocardium. *J. Am. Coll. Cardiol.* **71**, 2360–2372 (2018).
33. Rácz, L., Maros, T. N. & Seres-Sturm, L. Structural characteristics and functional significance of the buccal fat pad (corpus adiposum buccae). *Morphol. Embryol. (Bucur.)* **35**, 73–77 (1989).
34. Ponrartana, S. *et al.* Brown adipose tissue in the buccal fat pad during infancy. *PLoS One* **9**, e89533 (2014).
35. Broccaioli, E. *et al.* Mesenchymal Stem Cells from Bichat’s Fat Pad: In Vitro Comparison with Adipose-Derived Stem Cells from Subcutaneous Tissue. *BioResearch Open Access* **2**, 107–117 (2013).
36. Alexander, C. M. *et al.* Dermal white adipose tissue: a new component of the thermogenic response. *J. Lipid Res.* **56**, 2061–2069 (2015).
37. Driskell, R. R., Jahoda, C. A. B., Chuong, C.-M., Watt, F. M. & Horsley, V. Defining dermal adipose tissue. *Exp. Dermatol.* **23**, 629–631 (2014).
38. Wojciechowicz, K., Gledhill, K., Ambler, C. A., Manning, C. B. & Jahoda, C. A. B. Development of the mouse dermal adipose layer occurs independently of subcutaneous adipose tissue and is marked by restricted early expression of FABP4. *PLoS One* **8**, e59811 (2013).



39. Larson, J. D., Tierney, W. S., Ozturk, C. N. & Zins, J. E. Defining the fat compartments in the neck: a cadaver study. *Aesthet. Surg. J.* **34**, 499–506 (2014).
40. Kasza, I. *et al.* Syndecan-1 is required to maintain intradermal fat and prevent cold stress. *PLoS Genet.* **10**, e1004514 (2014).
41. Festa, E. *et al.* Adipocyte lineage cells contribute to the skin stem cell niche to drive hair cycling. *Cell* **146**, 761–771 (2011).
42. Plikus, M. V. *et al.* Regeneration of fat cells from myofibroblasts during wound healing. *Science* **355**, 748–752 (2017).
43. Zhang, L. *et al.* Innate immunity. Dermal adipocytes protect against invasive *Staphylococcus aureus* skin infection. *Science* **347**, 67–71 (2015).
44. Ingalls, A. M., Dickie, M. M. & Snell, G. D. Obese, a new mutation in the house mouse. *J. Hered.* **41**, 317–318 (1950).
45. Zhang, Y. *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**, 425–432 (1994).
46. Kristóf, E. *et al.* Interleukin-6 released from differentiating human beige adipocytes improves browning. *Exp. Cell Res.* **377**, 47–55 (2019).
47. Fasshauer, M. & Blüher, M. Adipokines in health and disease. *Trends Pharmacol. Sci.* **36**, 461–470 (2015).
48. Rosenbaum, M. *et al.* Low-dose leptin reverses skeletal muscle, autonomic, and neuroendocrine adaptations to maintenance of reduced weight. *J. Clin. Invest.* **115**, 3579–3586 (2005).
49. Zhou, Y. & Rui, L. Leptin signaling and leptin resistance. *Front. Med.* **7**, 207–222 (2013).
50. Morton, G. J., Cummings, D. E., Baskin, D. G., Barsh, G. S. & Schwartz, M. W. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* **443**, 289–295 (2006).
51. Pénicaud, L., Meillon, S. & Brondel, L. Leptin and the central control of feeding behavior. *Biochimie* **94**, 2069–2074 (2012).
52. Kennedy, G. C. The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **140**, 578–596 (1953).
53. Fain, J. N., Madan, A. K., Hiler, M. L., Cheema, P. & Bahouth, S. W. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* **145**, 2273–2282 (2004).
54. Chan, J. L., Heist, K., DePaoli, A. M., Veldhuis, J. D. & Mantzoros, C. S. The role of falling leptin levels in the neuroendocrine and metabolic adaptation to short-term starvation in healthy men. *J. Clin. Invest.* **111**, 1409–1421 (2003).
55. Ahima, R. S. *et al.* Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* **382**, 250–252 (1996).
56. Ruan, H. *et al.* Profiling gene transcription in vivo reveals adipose tissue as an immediate target of tumor necrosis factor-alpha: implications for insulin resistance. *Diabetes* **51**, 3176–3188 (2002).
57. Stouthard, J. M. *et al.* Endocrinologic and metabolic effects of interleukin-6 in humans. *Am. J. Physiol.* **268**, E813–819 (1995).
58. Maeda, K. *et al.* cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (adipose most abundant gene transcript 1). 1996. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **425**, 556–559 (2012).



59. Arita, Y. *et al.* Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. 1999. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **425**, 560–564 (2012).
60. Kanda, H. *et al.* MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J. Clin. Invest.* **116**, 1494–1505 (2006).
61. Xu, H. *et al.* Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **112**, 1821–1830 (2003).
62. Shimomura, I. *et al.* Enhanced expression of PAI-1 in visceral fat: possible contributor to vascular disease in obesity. *Nat. Med.* **2**, 800–803 (1996).
63. Steppan, C. M. *et al.* The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* **409**, 307–312 (2001).
64. Boucher, J. *et al.* Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology* **146**, 1764–1771 (2005).
65. Tatemoto, K. *et al.* Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **251**, 471–476 (1998).
66. Gourdy, P. *et al.* Apelin administration improves insulin sensitivity in overweight men during hyperinsulinaemic-euglycaemic clamp. *Diabetes Obes. Metab.* **20**, 157–164 (2018).
67. Ziouzenkova, O. *et al.* Lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins generates PPAR ligands: evidence for an antiinflammatory role for lipoprotein lipase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 2730–2735 (2003).
68. Sramkova, V. *et al.* Apolipoprotein M: a novel adipokine decreasing with obesity and upregulated by calorie restriction. *Am. J. Clin. Nutr.* (2019) doi:10.1093/ajcn/nqy331.
69. Thomou, T. *et al.* Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues. *Nature* **542**, 450–455 (2017).
70. Stanford, K. I. *et al.* Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *J. Clin. Invest.* **123**, 215–223 (2013).
71. Wu, J. *et al.* Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* **150**, 366–376 (2012).
72. Whittle, A. J. *et al.* BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions. *Cell* **149**, 871–885 (2012).
73. Cereijo, R. *et al.* CXCL14, a Brown Adipokine that Mediates Brown-Fat-to-Macrophage Communication in Thermogenic Adaptation. *Cell Metab.* **28**, 750-763.e6 (2018).
74. Gnad, T. *et al.* Adenosine activates brown adipose tissue and recruits beige adipocytes via A2A receptors. *Nature* **516**, 395–399 (2014).
75. García-Alonso, V. *et al.* Prostaglandin E2 Exerts Multiple Regulatory Actions on Human Obese Adipose Tissue Remodeling, Inflammation, Adaptive Thermogenesis and Lipolysis. *PloS One* **11**, e0153751 (2016).
76. Whittle, A. J. *et al.* Soluble LR11/SorLA represses thermogenesis in adipose tissue and correlates with BMI in humans. *Nat. Commun.* **6**, 8951 (2015).
77. Rao, R. R. *et al.* Meteorin-like is a hormone that regulates immune-adipose interactions to increase beige fat thermogenesis. *Cell* **157**, 1279–1291 (2014).
78. Blondin, D. P. & Haman, F. Shivering and nonshivering thermogenesis in skeletal muscles. *Handb. Clin. Neurol.* **156**, 153–173 (2018).
79. Ma, S. W., Nadeau, B. E. & Foster, D. O. A nonocclusive cannula for sampling venous blood from the interscapular brown fat of conscious rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **64**, 1434–1439 (1986).



80. Bonnot, E. The Interscapular Gland. *J. Anat. Physiol.* **43**, 43–58 (1908).
81. Aherne, W. & Hull, D. The Site of Heat Production in the Newborn Infant. *Proc. R. Soc. Med.* **57**, 1172–1173 (1964).
82. Heaton, J. M. The distribution of brown adipose tissue in the human. *J. Anat.* **112**, 35–39 (1972).
83. Huttunen, P., Hirvonen, J. & Kinnula, V. The occurrence of brown adipose tissue in outdoor workers. *Eur. J. Appl. Physiol.* **46**, 339–345 (1981).
84. Hany, T. F. *et al.* Brown adipose tissue: a factor to consider in symmetrical tracer uptake in the neck and upper chest region. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **29**, 1393–1398 (2002).
85. Cohade, C., Osman, M., Pannu, H. K. & Wahl, R. L. Uptake in supraclavicular area fat ('USA-Fat'): description on 18F-FDG PET/CT. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **44**, 170–176 (2003).
86. Leitner, B. P. *et al.* Mapping of human brown adipose tissue in lean and obese young men. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 8649–8654 (2017).
87. Cypess, A. M. *et al.* Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N. Engl. J. Med.* **360**, 1509–1517 (2009).
88. Virtanen, K. A. *et al.* Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N. Engl. J. Med.* **360**, 1518–1525 (2009).
89. Nedergaard, J., Bengtsson, T. & Cannon, B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **293**, E444–452 (2007).
90. van Marken Lichtenbelt, W. D. *et al.* Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N. Engl. J. Med.* **360**, 1500–1508 (2009).
91. Lidell, M. E. *et al.* Evidence for two types of brown adipose tissue in humans. *Nat. Med.* **19**, 631–634 (2013).
92. Sacks, H. & Symonds, M. E. Anatomical locations of human brown adipose tissue: functional relevance and implications in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* **62**, 1783–1790 (2013).
93. Yoneshiro, T. *et al.* Brown adipose tissue, whole-body energy expenditure, and thermogenesis in healthy adult men. *Obes. Silver Spring Md* **19**, 13–16 (2011).
94. Wang, Q. *et al.* Brown adipose tissue activation is inversely related to central obesity and metabolic parameters in adult human. *PLoS One* **10**, e0123795 (2015).
95. Bartelt, A. *et al.* Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat. Med.* **17**, 200–205 (2011).
96. Ma, S. W. & Foster, D. O. Uptake of glucose and release of fatty acids and glycerol by rat brown adipose tissue in vivo. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **64**, 609–614 (1986).
97. Chondronikola, M. *et al.* Brown adipose tissue improves whole-body glucose homeostasis and insulin sensitivity in humans. *Diabetes* **63**, 4089–4099 (2014).
98. Chondronikola, M. *et al.* Brown Adipose Tissue Activation Is Linked to Distinct Systemic Effects on Lipid Metabolism in Humans. *Cell Metab.* **23**, 1200–1206 (2016).
99. Saito, M. *et al.* High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes* **58**, 1526–1531 (2009).
100. Liu, X. *et al.* Brown Adipose Tissue Transplantation Reverses Obesity in Ob/Ob Mice. *Endocrinology* **156**, 2461–2469 (2015).
101. Cousin, B. *et al.* Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: molecular and morphological characterization. *J. Cell Sci.* **103 ( Pt 4)**, 931–942 (1992).





102. Chouchani, E. T. *et al.* Mitochondrial ROS regulate thermogenic energy expenditure and sulfenylation of UCP1. *Nature* **532**, 112–116 (2016).
103. Finlin, B. S. *et al.* Human adipose beiging in response to cold and mirabegron. *JCI Insight* **3**, (2018).
104. Rosenwald, M., Perdikari, A., Rüllicke, T. & Wolfrum, C. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat. Cell Biol.* **15**, 659–667 (2013).
105. Boström, P. *et al.* A PGC1- $\alpha$ -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* **481**, 463–468 (2012).
106. Stanford, K. I., Middelbeek, R. J. W. & Goodyear, L. J. Exercise Effects on White Adipose Tissue: Beiging and Metabolic Adaptations. *Diabetes* **64**, 2361–2368 (2015).
107. Norheim, F. *et al.* The effects of acute and chronic exercise on PGC-1 $\alpha$ , irisin and browning of subcutaneous adipose tissue in humans. *FEBS J.* **281**, 739–749 (2014).
108. Ricquier, D., Nechad, M. & Mory, G. Ultrastructural and biochemical characterization of human brown adipose tissue in pheochromocytoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **54**, 803–807 (1982).
109. Sidossis, L. S. *et al.* Browning of Subcutaneous White Adipose Tissue in Humans after Severe Adrenergic Stress. *Cell Metab.* **22**, 219–227 (2015).
110. Petruzzelli, M. *et al.* A switch from white to brown fat increases energy expenditure in cancer-associated cachexia. *Cell Metab.* **20**, 433–447 (2014).
111. Salisbury, E. A. *et al.* Characterization of Brown Adipose-Like Tissue in Trauma-Induced Heterotopic Ossification in Humans. *Am. J. Pathol.* **187**, 2071–2079 (2017).
112. Jespersen, N. Z. *et al.* A classical brown adipose tissue mRNA signature partly overlaps with brite in the supraclavicular region of adult humans. *Cell Metab.* **17**, 798–805 (2013).
113. Cannon, B. & Nedergaard, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.* **84**, 277–359 (2004).
114. Echtay, K. S. Mitochondrial uncoupling proteins--what is their physiological role? *Free Radic. Biol. Med.* **43**, 1351–1371 (2007).
115. Ricquier, D. & Bouillaud, F. The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem. J.* **345 Pt 2**, 161–179 (2000).
116. Vidal-Puig, A. J. *et al.* Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. *J. Biol. Chem.* **275**, 16258–16266 (2000).
117. Jabůrek, M. *et al.* Transport function and regulation of mitochondrial uncoupling proteins 2 and 3. *J. Biol. Chem.* **274**, 26003–26007 (1999).
118. Bouchard, C., Pérusse, L., Chagnon, Y. C., Warden, C. & Ricquier, D. Linkage between markers in the vicinity of the uncoupling protein 2 gene and resting metabolic rate in humans. *Hum. Mol. Genet.* **6**, 1887–1889 (1997).
119. Ramsden, D. B. *et al.* Human neuronal uncoupling proteins 4 and 5 (UCP4 and UCP5): structural properties, regulation, and physiological role in protection against oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Brain Behav.* **2**, 468–478 (2012).
120. Gorgoglione, R. *et al.* The human uncoupling proteins 5 and 6 (UCP5/SLC25A14 and UCP6/SLC25A30) transport sulfur oxyanions, phosphate and dicarboxylates. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **1860**, 724–733 (2019).
121. Heaton, G. M., Wagenvoort, R. J., Kemp, A. & Nicholls, D. G. Brown-adipose-tissue mitochondria: photoaffinity labelling of the regulatory site of energy dissipation. *Eur. J. Biochem.* **82**, 515–521 (1978).



122. Hittelman, K. J., Lindberg, O. & Cannon, B. Oxidative phosphorylation and compartmentation of fatty acid metabolism in brown fat mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **11**, 183–192 (1969).
123. Rafael, J., Ludolph, H. J. & Hohorst, H. J. [Mitochondria from brown adipose tissue: uncoupling of respiratory chain phosphorylation by long fatty acids and recoupling by guanosine triphosphate]. *Hoppe. Seylers Z. Physiol. Chem.* **350**, 1121–1131 (1969).
124. Ricquier, D. & Kader, J. C. Mitochondrial protein alteration in active brown fat: a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **73**, 577–583 (1976).
125. Cassard, A. M. *et al.* Human uncoupling protein gene: structure, comparison with rat gene, and assignment to the long arm of chromosome 4. *J. Cell. Biochem.* **43**, 255–264 (1990).
126. Aquila, H., Link, T. A. & Klingenberg, M. The uncoupling protein from brown fat mitochondria is related to the mitochondrial ADP/ATP carrier. Analysis of sequence homologies and of folding of the protein in the membrane. *EMBO J.* **4**, 2369–2376 (1985).
127. Klingenberg, M. & Winkler, E. The reconstituted isolated uncoupling protein is a membrane potential driven H<sup>+</sup> translocator. *EMBO J.* **4**, 3087–3092 (1985).
128. Villarroya, F., Peyrou, M. & Giral, M. Transcriptional regulation of the uncoupling protein-1 gene. *Biochimie* **134**, 86–92 (2017).
129. Bonet, M. L., Oliver, P. & Palou, A. Pharmacological and nutritional agents promoting browning of white adipose tissue. *Biochim. Biophys. Acta* **1831**, 969–985 (2013).
130. Crichton, P. G., Lee, Y. & Kunji, E. R. S. The molecular features of uncoupling protein 1 support a conventional mitochondrial carrier-like mechanism. *Biochimie* **134**, 35–50 (2017).
131. Leone, V. & Faraldo-Gómez, J. D. Structure and mechanism of the ATP synthase membrane motor inferred from quantitative integrative modeling. *J. Gen. Physiol.* **148**, 441–457 (2016).
132. Muzik, O. *et al.* 15O PET measurement of blood flow and oxygen consumption in cold-activated human brown fat. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **54**, 523–531 (2013).
133. Enerbäck, S. *et al.* Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature* **387**, 90–94 (1997).
134. Bertholet, A. M. *et al.* Mitochondrial Patch Clamp of Beige Adipocytes Reveals UCP1-Positive and UCP1-Negative Cells Both Exhibiting Futile Creatine Cycling. *Cell Metab.* **25**, 811-822.e4 (2017).
135. Ikeda, K. *et al.* UCP1-independent signaling involving SERCA2b-mediated calcium cycling regulates beige fat thermogenesis and systemic glucose homeostasis. *Nat. Med.* **23**, 1454–1465 (2017).
136. Finucane, M. M. *et al.* National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *Lancet Lond. Engl.* **377**, 557–567 (2011).
137. Tartaglia, M., Gelb, B. D. & Zenker, M. Noonan syndrome and clinically related disorders. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **25**, 161–179 (2011).
138. Keys, A., Fidanza, F., Karvonen, M. J., Kimura, N. & Taylor, H. L. Indices of relative weight and obesity. *J. Chronic Dis.* **25**, 329–343 (1972).
139. Berrington de Gonzalez, A. *et al.* Body-mass index and mortality among 1.46 million white adults. *N. Engl. J. Med.* **363**, 2211–2219 (2010).
140. Prospective Studies Collaboration *et al.* Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet Lond. Engl.* **373**, 1083–1096 (2009).



141. Kahn, S. E., Hull, R. L. & Utzschneider, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* **444**, 840–846 (2006).
142. Kissebah, A. H. & Krakower, G. R. Regional adiposity and morbidity. *Physiol. Rev.* **74**, 761–811 (1994).
143. Emerging Risk Factors Collaboration *et al.* Separate and combined associations of body-mass index and abdominal adiposity with cardiovascular disease: collaborative analysis of 58 prospective studies. *Lancet Lond. Engl.* **377**, 1085–1095 (2011).
144. Madonna, R., Massaro, M., Scoditti, E., Pescetelli, I. & De Caterina, R. The epicardial adipose tissue and the coronary arteries: dangerous liaisons. *Cardiovasc. Res.* **115**, 1013–1025 (2019).
145. Maclure, K. M. *et al.* Weight, diet, and the risk of symptomatic gallstones in middle-aged women. *N. Engl. J. Med.* **321**, 563–569 (1989).
146. Fritscher, L. G., Mottin, C. C., Canani, S. & Chatkin, J. M. Obesity and obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome: the impact of bariatric surgery. *Obes. Surg.* **17**, 95–99 (2007).
147. Calle, E. E., Rodriguez, C., Walker-Thurmond, K. & Thun, M. J. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1625–1638 (2003).
148. Wilcox, G. Insulin and insulin resistance. *Clin. Biochem. Rev.* **26**, 19–39 (2005).
149. Sherling, D. H., Perumareddi, P. & Hennekens, C. H. Metabolic Syndrome. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* **22**, 365–367 (2017).
150. Matsuzawa, Y. Pathophysiology and molecular mechanisms of visceral fat syndrome: the Japanese experience. *Diabetes. Metab. Rev.* **13**, 3–13 (1997).
151. Boyko, E. J., Fujimoto, W. Y., Leonetti, D. L. & Newell-Morris, L. Visceral adiposity and risk of type 2 diabetes: a prospective study among Japanese Americans. *Diabetes Care* **23**, 465–471 (2000).
152. Després, J. P. *et al.* Role of deep abdominal fat in the association between regional adipose tissue distribution and glucose tolerance in obese women. *Diabetes* **38**, 304–309 (1989).
153. Abildgaard, J. *et al.* Ectopic Lipid Deposition Is Associated With Insulin Resistance in Postmenopausal Women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **103**, 3394–3404 (2018).
154. Neeland, I. J. *et al.* Dysfunctional adiposity and the risk of prediabetes and type 2 diabetes in obese adults. *JAMA* **308**, 1150–1159 (2012).
155. Granér, M. *et al.* Cardiac steatosis associates with visceral obesity in nondiabetic obese men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **98**, 1189–1197 (2013).
156. Arner, P. Regional adiposity in man. *J. Endocrinol.* **155**, 191–192 (1997).
157. Mårin, P. *et al.* The morphology and metabolism of intraabdominal adipose tissue in men. *Metabolism.* **41**, 1242–1248 (1992).
158. Shen, W. *et al.* Adipose tissue quantification by imaging methods: a proposed classification. *Obes. Res.* **11**, 5–16 (2003).
159. Wajchenberg, B. L. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr. Rev.* **21**, 697–738 (2000).
160. Björntorp, P. ‘Portal’ adipose tissue as a generator of risk factors for cardiovascular disease and diabetes. *Arterioscler. Dallas Tex* **10**, 493–496 (1990).
161. Appleton, S. L. *et al.* Diabetes and cardiovascular disease outcomes in the metabolically healthy obese phenotype: a cohort study. *Diabetes Care* **36**, 2388–2394 (2013).
162. Hussain, I. & Garg, A. Lipodystrophy Syndromes. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **45**, 783–797 (2016).



163. Garg, A. Acquired and inherited lipodystrophies. *N. Engl. J. Med.* **350**, 1220–1234 (2004).
164. Herrero, L., Shapiro, H., Nayer, A., Lee, J. & Shoelson, S. E. Inflammation and adipose tissue macrophages in lipodystrophic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 240–245 (2010).
165. Huang-Doran, I., Sleigh, A., Rochford, J. J., O’Rahilly, S. & Savage, D. B. Lipodystrophy: metabolic insights from a rare disorder. *J. Endocrinol.* **207**, 245–255 (2010).
166. Haque, W. A., Shimomura, I., Matsuzawa, Y. & Garg, A. Serum adiponectin and leptin levels in patients with lipodystrophies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**, 2395 (2002).
167. Ajluni, N., Dar, M., Xu, J., Neidert, A. H. & Oral, E. A. Efficacy and Safety of Metreleptin in Patients with Partial Lipodystrophy: Lessons from an Expanded Access Program. *J. Diabetes Metab.* **7**, (2016).
168. Oral, E. A. *et al.* Leptin-replacement therapy for lipodystrophy. *N. Engl. J. Med.* **346**, 570–578 (2002).
169. Araújo-Vilar, D. & Santini, F. Diagnosis and treatment of lipodystrophy: a step-by-step approach. *J. Endocrinol. Invest.* **42**, 61–73 (2019).
170. Wang, Q. A., Tao, C., Gupta, R. K. & Scherer, P. E. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat. Med.* **19**, 1338–1344 (2013).
171. Zhang, F. *et al.* An Adipose Tissue Atlas: An Image-Guided Identification of Human-like BAT and Beige Depots in Rodents. *Cell Metab.* **27**, 252-262.e3 (2018).
172. Estève, D. *et al.* Lobular architecture of human adipose tissue defines the niche and fate of progenitor cells. *Nat. Commun.* **10**, 2549 (2019).
173. Barreau, C. *et al.* Regionalization of browning revealed by whole subcutaneous adipose tissue imaging. *Obes. Silver Spring Md* **24**, 1081–1089 (2016).
174. Porter, C. *et al.* Human and Mouse Brown Adipose Tissue Mitochondria Have Comparable UCP1 Function. *Cell Metab.* **24**, 246–255 (2016).
175. Fukumura, D. *et al.* Paracrine regulation of angiogenesis and adipocyte differentiation during in vivo adipogenesis. *Circ. Res.* **93**, e88-97 (2003).
176. Tang, W. *et al.* White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science* **322**, 583–586 (2008).
177. Souza, L. E. B. *et al.* Pre-culture in endothelial growth medium enhances the angiogenic properties of adipose-derived stem/stromal cells. *Angiogenesis* **21**, 15–22 (2018).
178. Partsch, H., Stöberl, C., Urbanek, A. & Wenzel-Hora, B. I. Clinical use of indirect lymphography in different forms of leg edema. *Lymphology* **21**, 152–160 (1988).
179. Murano, I. *et al.* Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice. *J. Lipid Res.* **49**, 1562–1568 (2008).
180. Altintas, M. M. *et al.* Mast cells, macrophages, and crown-like structures distinguish subcutaneous from visceral fat in mice. *J. Lipid Res.* **52**, 480–488 (2011).
181. Harman-Boehm, I. *et al.* Macrophage infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations: effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **92**, 2240–2247 (2007).
182. Clément, K. *et al.* Weight loss regulates inflammation-related genes in white adipose tissue of obese subjects. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **18**, 1657–1669 (2004).
183. Nishimura, S. *et al.* CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat. Med.* **15**, 914–920 (2009).
184. Bowers, R. R. *et al.* Sympathetic innervation of white adipose tissue and its regulation of fat cell number. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **286**, R1167-1175 (2004).





185. Youngstrom, T. G. & Bartness, T. J. Catecholaminergic innervation of white adipose tissue in Siberian hamsters. *Am. J. Physiol.* **268**, R744-751 (1995).
186. Bamshad, M., Aoki, V. T., Adkison, M. G., Warren, W. S. & Bartness, T. J. Central nervous system origins of the sympathetic nervous system outflow to white adipose tissue. *Am. J. Physiol.* **275**, R291-299 (1998).
187. Bamshad, M., Song, C. K. & Bartness, T. J. CNS origins of the sympathetic nervous system outflow to brown adipose tissue. *Am. J. Physiol.* **276**, R1569-1578 (1999).
188. Vitali, A. *et al.* The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes. *J. Lipid Res.* **53**, 619–629 (2012).
189. Giordano, A., Morroni, M., Santone, G., Marchesi, G. F. & Cinti, S. Tyrosine hydroxylase, neuropeptide Y, substance P, calcitonin gene-related peptide and vasoactive intestinal peptide in nerves of rat periovarian adipose tissue: an immunohistochemical and ultrastructural investigation. *J. Neurocytol.* **25**, 125–136 (1996).
190. Yang, K., Guan, H., Arany, E., Hill, D. J. & Cao, X. Neuropeptide Y is produced in visceral adipose tissue and promotes proliferation of adipocyte precursor cells via the Y1 receptor. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **22**, 2452–2464 (2008).
191. Ye, L. *et al.* Fat cells directly sense temperature to activate thermogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 12480–12485 (2013).
192. Bartness, T. J., Vaughan, C. H. & Song, C. K. Sympathetic and sensory innervation of brown adipose tissue. *Int. J. Obes. 2005* **34 Suppl 1**, S36-42 (2010).
193. Desautels, M., Dulos, R. A. & Mozaffari, B. Selective loss of uncoupling protein from mitochondria of surgically denervated brown adipose tissue of cold-acclimated mice. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* **64**, 1125–1134 (1986).
194. Song, C. K. *et al.* Melanocortin-4 receptor mRNA expressed in sympathetic outflow neurons to brown adipose tissue: neuroanatomical and functional evidence. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **295**, R417-428 (2008).
195. Ricci, M. R. *et al.* Isoproterenol decreases leptin release from rat and human adipose tissue through posttranscriptional mechanisms. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **288**, E798-804 (2005).
196. Fu, L. *et al.* beta-adrenoceptor agonists downregulate adiponectin, but upregulate adiponectin receptor 2 and tumor necrosis factor-alpha expression in adipocytes. *Eur. J. Pharmacol.* **569**, 155–162 (2007).
197. Giordano, A., Frontini, A. & Cinti, S. Adipose organ nerves revealed by immunohistochemistry. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **456**, 83–95 (2008).
198. Sun, K., Tordjman, J., Clément, K. & Scherer, P. E. Fibrosis and adipose tissue dysfunction. *Cell Metab.* **18**, 470–477 (2013).
199. Alkhouli, N. *et al.* The mechanical properties of human adipose tissues and their relationships to the structure and composition of the extracellular matrix. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **305**, E1427-1435 (2013).
200. Pellegrinelli, V. *et al.* Human adipocyte function is impacted by mechanical cues. *J. Pathol.* **233**, 183–195 (2014).
201. van der Rest, M. *et al.* Structure and function of the fibril-associated collagens. *Biochem. Soc. Trans.* **19**, 820–824 (1991).



202. Pierleoni, C., Verdenelli, F., Castellucci, M. & Cinti, S. Fibronectins and basal lamina molecules expression in human subcutaneous white adipose tissue. *Eur. J. Histochem. EJH* **42**, 183–188 (1998).
203. Divoux, A. *et al.* Fibrosis in human adipose tissue: composition, distribution, and link with lipid metabolism and fat mass loss. *Diabetes* **59**, 2817–2825 (2010).
204. Pasarica, M. *et al.* Adipose tissue collagen VI in obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **94**, 5155–5162 (2009).
205. Arner, E. *et al.* Adipocyte turnover: relevance to human adipose tissue morphology. *Diabetes* **59**, 105–109 (2010).
206. Spalding, K. L. *et al.* Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* **453**, 783–787 (2008).
207. Till, J. E. & McCULLOCH, E. A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat. Res.* **14**, 213–222 (1961).
208. Zipori, D. The nature of stem cells: state rather than entity. *Nat. Rev. Genet.* **5**, 873–878 (2004).
209. Morrison, S. J. & Kimble, J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* **441**, 1068–1074 (2006).
210. Kiel, M. J. *et al.* Haematopoietic stem cells do not asymmetrically segregate chromosomes or retain BrdU. *Nature* **449**, 238–242 (2007).
211. Barker, N. *et al.* Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* **449**, 1003–1007 (2007).
212. de Rooij, D. G. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reprod. Camb. Engl.* **121**, 347–354 (2001).
213. Ito, M. *et al.* Wnt-dependent de novo hair follicle regeneration in adult mouse skin after wounding. *Nature* **447**, 316–320 (2007).
214. Kuang, S., Kuroda, K., Le Grand, F. & Rudnicki, M. A. Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell* **129**, 999–1010 (2007).
215. Tavazoie, M. *et al.* A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell Stem Cell* **3**, 279–288 (2008).
216. Kiel, M. J. *et al.* SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* **121**, 1109–1121 (2005).
217. Sacchetti, B. *et al.* Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell* **131**, 324–336 (2007).
218. Luche, E. *et al.* Differential Hematopoietic Activity in White Adipose Tissue Depending on its Localization. *J. Cell. Physiol.* **230**, 3076–3083 (2015).
219. Li, L. & Xie, T. Stem cell niche: structure and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**, 605–631 (2005).
220. Thomson, J. A. & Marshall, V. S. Primate embryonic stem cells. *Curr. Top. Dev. Biol.* **38**, 133–165 (1998).
221. Owen, M. & Friedenstein, A. J. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found. Symp.* **136**, 42–60 (1988).
222. Zuk, P. A. *et al.* Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell* **13**, 4279–4295 (2002).
223. Pittenger, M. F. *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143–147 (1999).



224. Dennis, J. E., Carillet, J.-P., Caplan, A. I. & Charbord, P. The STRO-1+ marrow cell population is multipotential. *Cells Tissues Organs* **170**, 73–82 (2002).
225. Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M. & Nagasawa, T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* **25**, 977–988 (2006).
226. Kopen, G. C., Prockop, D. J. & Phinney, D. G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 10711–10716 (1999).
227. Sanchez-Ramos, J. *et al.* Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp. Neurol.* **164**, 247–256 (2000).
228. Makino, S. *et al.* Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J. Clin. Invest.* **103**, 697–705 (1999).
229. Young, R. G. *et al.* Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* **16**, 406–413 (1998).
230. Schwartz, R. E. *et al.* Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J. Clin. Invest.* **109**, 1291–1302 (2002).
231. Petersen, B. E. *et al.* Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* **284**, 1168–1170 (1999).
232. Takashima, Y. *et al.* Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. *Cell* **129**, 1377–1388 (2007).
233. Caplan, A. I. Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* **9**, 641–650 (1991).
234. Dominici, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315–317 (2006).
235. Bourin, P. *et al.* Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy* **15**, 641–648 (2013).
236. Lee, R. H. *et al.* Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **14**, 311–324 (2004).
237. Mitchell, J. B. *et al.* Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells Dayt. Ohio* **24**, 376–385 (2006).
238. Friedenstein, A. J., Gorskaja, J. F. & Kulagina, N. N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp. Hematol.* **4**, 267–274 (1976).
239. Di Nicola, M. *et al.* Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* **99**, 3838–3843 (2002).
240. Maccario, R. *et al.* Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica* **90**, 516–525 (2005).
241. Aggarwal, S. & Pittenger, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* **105**, 1815–1822 (2005).



242. Aldinucci, A. *et al.* Inhibition of immune synapse by altered dendritic cell actin distribution: a new pathway of mesenchymal stem cell immune regulation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **185**, 5102–5110 (2010).
243. Nauta, A. J., Kruisselbrink, A. B., Lurvink, E., Willemze, R. & Fibbe, W. E. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **177**, 2080–2087 (2006).
244. Espagnolle, N., Balguerie, A., Arnaud, E., Sensebé, L. & Varin, A. CD54-Mediated Interaction with Pro-inflammatory Macrophages Increases the Immunosuppressive Function of Human Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cell Rep.* **8**, 961–976 (2017).
245. Spaggiari, G. M., Capobianco, A., Becchetti, S., Mingari, M. C. & Moretta, L. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood* **107**, 1484–1490 (2006).
246. Timmons, J. A. *et al.* Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 4401–4406 (2007).
247. Ren, D., Collingwood, T. N., Rebar, E. J., Wolffe, A. P. & Camp, H. S. PPARgamma knockdown by engineered transcription factors: exogenous PPARgamma2 but not PPARgamma1 reactivates adipogenesis. *Genes Dev.* **16**, 27–32 (2002).
248. Lustig, M., Gefen, A. & Benayahu, D. Adipogenesis and lipid production in adipocytes subjected to sustained tensile deformations and elevated glucose concentration: a living cell-scale model system of diabetes. *Biomech. Model. Mechanobiol.* **17**, 903–913 (2018).
249. Mor-Yossef Moldovan, L. *et al.* Cell shape alteration during adipogenesis is associated with coordinated matrix cues. *J. Cell. Physiol.* **234**, 3850–3863 (2019).
250. Talele, N. P., Fradette, J., Davies, J. E., Kapus, A. & Hinz, B. Expression of  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin Determines the Fate of Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cell Rep.* **4**, 1016–1030 (2015).
251. Cristancho, A. G. & Lazar, M. A. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 722–734 (2011).
252. Tang, Q.-Q., Otto, T. C. & Lane, M. D. Commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 9607–9611 (2004).
253. Tseng, Y.-H. *et al.* New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature* **454**, 1000–1004 (2008).
254. Wang, Q. A. *et al.* Distinct regulatory mechanisms governing embryonic versus adult adipocyte maturation. *Nat. Cell Biol.* **17**, 1099–1111 (2015).
255. Cristancho, A. G. *et al.* Repressor transcription factor 7-like 1 promotes adipogenic competency in precursor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 16271–16276 (2011).
256. Gupta, R. K. *et al.* Transcriptional control of preadipocyte determination by Zfp423. *Nature* **464**, 619–623 (2010).
257. Shao, M. *et al.* Zfp423 Maintains White Adipocyte Identity through Suppression of the Beige Cell Thermogenic Gene Program. *Cell Metab.* **23**, 1167–1184 (2016).
258. Rodeheffer, M. S., Birsoy, K. & Friedman, J. M. Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo. *Cell* **135**, 240–249 (2008).
259. Rajakumari, S. *et al.* EBF2 determines and maintains brown adipocyte identity. *Cell Metab.* **17**, 562–574 (2013).





260. Qian, H. *et al.* Molecular characterization of prospectively isolated multipotent mesenchymal progenitors provides new insight into the cellular identity of mesenchymal stem cells in mouse bone marrow. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 661–677 (2013).
261. Seale, P. *et al.* PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* **454**, 961–967 (2008).
262. Lepper, C. & Fan, C.-M. Inducible lineage tracing of Pax7-descendant cells reveals embryonic origin of adult satellite cells. *Genes. N. Y. N* **2000** **48**, 424–436 (2010).
263. Berry, D. C., Jiang, Y. & Graff, J. M. Mouse strains to study cold-inducible beige progenitors and beige adipocyte formation and function. *Nat. Commun.* **7**, 10184 (2016).
264. Lee, Y.-H., Petkova, A. P., Mottillo, E. P. & Granneman, J. G. In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by  $\beta$ 3-adrenoceptor activation and high-fat feeding. *Cell Metab.* **15**, 480–491 (2012).
265. Long, J. Z. *et al.* A smooth muscle-like origin for beige adipocytes. *Cell Metab.* **19**, 810–820 (2014).
266. Barquissau, V. *et al.* White-to-brite conversion in human adipocytes promotes metabolic reprogramming towards fatty acid anabolic and catabolic pathways. *Mol. Metab.* **5**, 352–365 (2016).
267. Himms-Hagen, J. *et al.* Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **279**, C670–681 (2000).
268. Lee, Y.-H., Petkova, A. P., Konkar, A. A. & Granneman, J. G. Cellular origins of cold-induced brown adipocytes in adult mice. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **29**, 286–299 (2015).
269. Altshuler-Keylin, S. *et al.* Beige Adipocyte Maintenance Is Regulated by Autophagy-Induced Mitochondrial Clearance. *Cell Metab.* **24**, 402–419 (2016).
270. Wang, Y.-L., Lin, S.-P., Hsieh, P. C. H. & Hung, S.-C. Concomitant beige adipocyte differentiation upon induction of mesenchymal stem cells into brown adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **478**, 689–695 (2016).
271. Inagaki, T., Sakai, J. & Kajimura, S. Transcriptional and epigenetic control of brown and beige adipose cell fate and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 527 (2017).
272. Logan, D. C. The mitochondrial compartment. *J. Exp. Bot.* **57**, 1225–1243 (2006).
273. Taanman, J. W. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim. Biophys. Acta* **1410**, 103–123 (1999).
274. Calvo, S. E. & Mootha, V. K. The mitochondrial proteome and human disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **11**, 25–44 (2010).
275. Scarpulla, R. C. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochim. Biophys. Acta* **1813**, 1269–1278 (2011).
276. Wu, Z. *et al.* Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* **98**, 115–124 (1999).
277. Rodriguez, A.-M. *et al.* Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J. Exp. Med.* **201**, 1397–1405 (2005).
278. Rodriguez, A.-M. *et al.* Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **315**, 255–263 (2004).
279. Rodriguez, A.-M., Elabd, C., Amri, E.-Z., Ailhaud, G. & Dani, C. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie* **87**, 125–128 (2005).



280. Elabd, C. *et al.* Human multipotent adipose-derived stem cells differentiate into functional brown adipocytes. *Stem Cells Dayt. Ohio* **27**, 2753–2760 (2009).
281. Elabd, C. *et al.* Human adipose tissue-derived multipotent stem cells differentiate in vitro and in vivo into osteocyte-like cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **361**, 342–348 (2007).
282. Roux, C. *et al.* Chondrogenic potential of stem cells derived from adipose tissue: a powerful pharmacological tool. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **440**, 786–791 (2013).
283. Shoji, T. *et al.* Local transplantation of human multipotent adipose-derived stem cells accelerates fracture healing via enhanced osteogenesis and angiogenesis. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **90**, 637–649 (2010).
284. Pisani, D. F. *et al.* Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells into ‘Brite’ (Brown-in-White) Adipocytes. *Front. Endocrinol.* **2**, 87 (2011).
285. Taura, D. *et al.* Adipogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells: comparison with that of human embryonic stem cells. *FEBS Lett.* **583**, 1029–1033 (2009).
286. Ahfeldt, T. *et al.* Programming human pluripotent stem cells into white and brown adipocytes. *Nat. Cell Biol.* **14**, 209–219 (2012).
287. Mohsen-Kanson, T. *et al.* Differentiation of human induced pluripotent stem cells into brown and white adipocytes: role of Pax3. *Stem Cells Dayt. Ohio* **32**, 1459–1467 (2014).
288. Hafner, A.-L. *et al.* Brown-like adipose progenitors derived from human induced pluripotent stem cells: Identification of critical pathways governing their adipogenic capacity. *Sci. Rep.* **6**, 32490 (2016).
289. Guénantin, A.-C. *et al.* Functional Human Beige Adipocytes From Induced Pluripotent Stem Cells. *Diabetes* **66**, 1470–1478 (2017).
290. van Harmelen, V. *et al.* Effect of BMI and age on adipose tissue cellularity and differentiation capacity in women. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* **27**, 889–895 (2003).
291. Hoffstedt, J. *et al.* Regional impact of adipose tissue morphology on the metabolic profile in morbid obesity. *Diabetologia* **53**, 2496–2503 (2010).
292. Tchoukalova, Y. D. *et al.* Regional differences in cellular mechanisms of adipose tissue gain with overfeeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 18226–18231 (2010).
293. Gealekman, O. *et al.* Depot-specific differences and insufficient subcutaneous adipose tissue angiogenesis in human obesity. *Circulation* **123**, 186–194 (2011).
294. Nishimura, S. *et al.* Adipogenesis in obesity requires close interplay between differentiating adipocytes, stromal cells, and blood vessels. *Diabetes* **56**, 1517–1526 (2007).
295. Spencer, M. *et al.* Adipose tissue extracellular matrix and vascular abnormalities in obesity and insulin resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96**, E1990-1998 (2011).
296. Hammarstedt, A., Graham, T. E. & Kahn, B. B. Adipose tissue dysregulation and reduced insulin sensitivity in non-obese individuals with enlarged abdominal adipose cells. *Diabetol. Metab. Syndr.* **4**, 42 (2012).
297. McLaughlin, T. *et al.* Inflammation in subcutaneous adipose tissue: relationship to adipose cell size. *Diabetologia* **53**, 369–377 (2010).
298. Jernås, M. *et al.* Separation of human adipocytes by size: hypertrophic fat cells display distinct gene expression. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **20**, 1540–1542 (2006).
299. Misra, A. & Vikram, N. K. Clinical and pathophysiological consequences of abdominal adiposity and abdominal adipose tissue depots. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* **19**, 457–466 (2003).



300. Datta, R., Podolsky, M. J. & Atabai, K. Fat fibrosis: friend or foe? *JCI Insight* **3**, (2018).
301. Khan, T. *et al.* Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 1575–1591 (2009).
302. Friedman, S. L., Neuschwander-Tetri, B. A., Rinella, M. & Sanyal, A. J. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat. Med.* **24**, 908–922 (2018).
303. Gray, S. L. & Vidal-Puig, A. J. Adipose tissue expandability in the maintenance of metabolic homeostasis. *Nutr. Rev.* **65**, S7-12 (2007).
304. Mota, M., Banini, B. A., Cazanave, S. C. & Sanyal, A. J. Molecular mechanisms of lipotoxicity and glucotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism.* **65**, 1049–1061 (2016).
305. Tan, C. Y. & Vidal-Puig, A. Adipose tissue expandability: the metabolic problems of obesity may arise from the inability to become more obese. *Biochem. Soc. Trans.* **36**, 935–940 (2008).
306. Adams, T. D. *et al.* Long-term mortality after gastric bypass surgery. *N. Engl. J. Med.* **357**, 753–761 (2007).
307. Camastra, S. *et al.* Muscle and adipose tissue morphology, insulin sensitivity and beta-cell function in diabetic and nondiabetic obese patients: effects of bariatric surgery. *Sci. Rep.* **7**, 9007 (2017).
308. Adami, G. F. *et al.* Magnetic resonance spectroscopy facilitates assessment of intramyocellular lipid changes: a preliminary short-term study following biliopancreatic diversion. *Obes. Surg.* **15**, 1233–1237 (2005).
309. Hui, S. C. N. *et al.* Observed changes in brown, white, hepatic and pancreatic fat after bariatric surgery: Evaluation with MRI. *Eur. Radiol.* **29**, 849–856 (2019).
310. Rabkin, S. W. & Campbell, H. Comparison of reducing epicardial fat by exercise, diet or bariatric surgery weight loss strategies: a systematic review and meta-analysis. *Obes. Rev. Off. J. Int. Assoc. Study Obes.* **16**, 406–415 (2015).
311. Faust, I. M., Johnson, P. R., Stern, J. S. & Hirsch, J. Diet-induced adipocyte number increase in adult rats: a new model of obesity. *Am. J. Physiol.* **235**, E279-286 (1978).
312. Boon, M. R. & van Marken Lichtenbelt, W. D. Brown Adipose Tissue: A Human Perspective. *Handb. Exp. Pharmacol.* **233**, 301–319 (2016).
313. Carrière, A. *et al.* Browning of white adipose cells by intermediate metabolites: an adaptive mechanism to alleviate redox pressure. *Diabetes* **63**, 3253–3265 (2014).
314. Brooks, G. A. Lactate shuttles in nature. *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 258–264 (2002).
315. Jeanson, Y., Carrière, A. & Casteilla, L. A New Role for Browning as a Redox and Stress Adaptive Mechanism? *Front. Endocrinol.* **6**, 158 (2015).
316. Fisher, F. M. *et al.* FGF21 regulates PGC-1 $\alpha$  and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev.* **26**, 271–281 (2012).
317. Huang, Z. *et al.* The FGF21-CCL11 Axis Mediates Beiging of White Adipose Tissues by Coupling Sympathetic Nervous System to Type 2 Immunity. *Cell Metab.* **26**, 493-508.e4 (2017).
318. Jeanson, Y. *et al.* Lactate induces FGF21 expression in adipocytes through a p38-MAPK pathway. *Biochem. J.* **473**, 685–692 (2016).
319. Wang, W. *et al.* A PRDM16-Driven Metabolic Signal from Adipocytes Regulates Precursor Cell Fate. *Cell Metab.* **30**, 174-189.e5 (2019).
320. De Matteis, R. *et al.* In vivo physiological transdifferentiation of adult adipose cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* **27**, 2761–2768 (2009).
321. Morroni, M. *et al.* Reversible transdifferentiation of secretory epithelial cells into adipocytes in the mammary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 16801–16806 (2004).



322. Giordano, A., Smorlesi, A., Frontini, A., Barbatelli, G. & Cinti, S. White, brown and pink adipocytes: the extraordinary plasticity of the adipose organ. *Eur. J. Endocrinol.* **170**, R159–171 (2014).
323. Palou, A., Sánchez, J. & Picó, C. Nutrient-gene interactions in early life programming: leptin in breast milk prevents obesity later on in life. *Adv. Exp. Med. Biol.* **646**, 95–104 (2009).
324. Sanchez-Gurmaches, J. & Guertin, D. A. Adipocytes arise from multiple lineages that are heterogeneously and dynamically distributed. *Nat. Commun.* **5**, 4099 (2014).
325. Alexander, M. R. & Owens, G. K. Epigenetic control of smooth muscle cell differentiation and phenotypic switching in vascular development and disease. *Annu. Rev. Physiol.* **74**, 13–40 (2012).
326. Cherepanova, O. A. *et al.* Activation of the pluripotency factor OCT4 in smooth muscle cells is atheroprotective. *Nat. Med.* **22**, 657–665 (2016).
327. Haskins, R. M. *et al.* Klf4 has an unexpected protective role in perivascular cells within the microvasculature. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **315**, H402–H414 (2018).
328. Liu, Y. *et al.* Kruppel-like factor 4 abrogates myocardin-induced activation of smooth muscle gene expression. *J. Biol. Chem.* **280**, 9719–9727 (2005).
329. Salmon, M., Gomez, D., Greene, E., Shankman, L. & Owens, G. K. Cooperative binding of KLF4, pELK-1, and HDAC2 to a G/C repressor element in the SM22 $\alpha$  promoter mediates transcriptional silencing during SMC phenotypic switching in vivo. *Circ. Res.* **111**, 685–696 (2012).
330. Owens, G. K., Kumar, M. S. & Wamhoff, B. R. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol. Rev.* **84**, 767–801 (2004).
331. Banai, S. *et al.* PDGF-receptor tyrosine kinase blocker AG1295 selectively attenuates smooth muscle cell growth in vitro and reduces neointimal formation after balloon angioplasty in swine. *Circulation* **97**, 1960–1969 (1998).
332. Kenagy, R. D., Hart, C. E., Stetler-Stevenson, W. G. & Clowes, A. W. Primate smooth muscle cell migration from aortic explants is mediated by endogenous platelet-derived growth factor and basic fibroblast growth factor acting through matrix metalloproteinases 2 and 9. *Circulation* **96**, 3555–3560 (1997).
333. Couffignal, T., Dupl a, C., Moreau, C., Lamazi re, J. M. & Bonnet, J. Regulation of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 in human vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* **74**, 225–234 (1994).
334. Loppnow, H. & Libby, P. Proliferating or interleukin 1-activated human vascular smooth muscle cells secrete copious interleukin 6. *J. Clin. Invest.* **85**, 731–738 (1990).
335. Speer, M. Y. *et al.* Smooth muscle cells give rise to osteochondrogenic precursors and chondrocytes in calcifying arteries. *Circ. Res.* **104**, 733–741 (2009).
336. Csepegi, C., Jiang, M. & Frolov, A. Somatic cell plasticity and Niemann-pick type C2 protein: adipocyte differentiation and function. *J. Biol. Chem.* **285**, 30347–30354 (2010).
337. El Agha, E. *et al.* Two-Way Conversion between Lipogenic and Myogenic Fibroblastic Phenotypes Marks the Progression and Resolution of Lung Fibrosis. *Cell Stem Cell* **20**, 571 (2017).
338. Tharp, K. M. *et al.* Actomyosin-Mediated Tension Orchestrates Uncoupled Respiration in Adipose Tissues. *Cell Metab.* **27**, 602–615.e4 (2018).
339. Sun, P. D. & Davies, D. R. The cystine-knot growth-factor superfamily. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **24**, 269–291 (1995).





340. de Larco, J. E. & Todaro, G. J. Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**, 4001–4005 (1978).
341. Wrana, J. L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F. & Massagué, J. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* **370**, 341–347 (1994).
342. Huse, M. *et al.* The TGF beta receptor activation process: an inhibitor- to substrate-binding switch. *Mol. Cell* **8**, 671–682 (2001).
343. Wu, J. W. *et al.* Crystal structure of a phosphorylated Smad2. Recognition of phosphoserine by the MH2 domain and insights on Smad function in TGF-beta signaling. *Mol. Cell* **8**, 1277–1289 (2001).
344. Moustakas, A., Souchelnytskyi, S. & Heldin, C. H. Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J. Cell Sci.* **114**, 4359–4369 (2001).
345. Gentry, L. E., Liubin, M. N., Purchio, A. F. & Marquardt, H. Molecular events in the processing of recombinant type 1 pre-pro-transforming growth factor beta to the mature polypeptide. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 4162–4168 (1988).
346. Hyytiäinen, M., Penttinen, C. & Keski-Oja, J. Latent TGF-beta binding proteins: extracellular matrix association and roles in TGF-beta activation. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **41**, 233–264 (2004).
347. Miyazono, K., Olofsson, A., Colosetti, P. & Heldin, C. H. A role of the latent TGF-beta 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF-beta 1. *EMBO J.* **10**, 1091–1101 (1991).
348. Nunes, I., Gleizes, P. E., Metz, C. N. & Rifkin, D. B. Latent transforming growth factor-beta binding protein domains involved in activation and transglutaminase-dependent cross-linking of latent transforming growth factor-beta. *J. Cell Biol.* **136**, 1151–1163 (1997).
349. Annes, J. P., Munger, J. S. & Rifkin, D. B. Making sense of latent TGFbeta activation. *J. Cell Sci.* **116**, 217–224 (2003).
350. Coffey, R. J. *et al.* Selective inhibition of growth-related gene expression in murine keratinocytes by transforming growth factor beta. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 3088–3093 (1988).
351. Gomis, R. R. *et al.* A FoxO-Smad synexpression group in human keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 12747–12752 (2006).
352. Sánchez-Capelo, A. Dual role for TGF-beta1 in apoptosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* **16**, 15–34 (2005).
353. Yang, Y.-A., Zhang, G.-M., Feigenbaum, L. & Zhang, Y. E. Smad3 reduces susceptibility to hepatocarcinoma by sensitizing hepatocytes to apoptosis through downregulation of Bcl-2. *Cancer Cell* **9**, 445–457 (2006).
354. Zhu, L. *et al.* Hepatic deletion of Smad7 in mouse leads to spontaneous liver dysfunction and aggravates alcoholic liver injury. *PLoS One* **6**, e17415 (2011).
355. Pardali, K. & Moustakas, A. Actions of TGF-beta as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1775**, 21–62 (2007).
356. Sinclair, A. H. *et al.* A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* **346**, 240–244 (1990).
357. Cutter, A. R. & Hayes, J. J. A brief review of nucleosome structure. *FEBS Lett.* **589**, 2914–2922 (2015).
358. Li, B., Carey, M. & Workman, J. L. The role of chromatin during transcription. *Cell* **128**, 707–719 (2007).
359. ENCODE Project Consortium. A user’s guide to the encyclopedia of DNA elements (ENCODE). *PLoS Biol.* **9**, e1001046 (2011).



360. Nicetto, D. *et al.* H3K9me3-heterochromatin loss at protein-coding genes enables developmental lineage specification. *Science* **363**, 294–297 (2019).
361. Kharchenko, P. V. *et al.* Comprehensive analysis of the chromatin landscape in *Drosophila melanogaster*. *Nature* **471**, 480–485 (2011).
362. Iwafuchi-Doi, M. & Zaret, K. S. Cell fate control by pioneer transcription factors. *Dev. Camb. Engl.* **143**, 1833–1837 (2016).
363. Soufi, A. *et al.* Pioneer transcription factors target partial DNA motifs on nucleosomes to initiate reprogramming. *Cell* **161**, 555–568 (2015).
364. Soufi, A., Donahue, G. & Zaret, K. S. Facilitators and impediments of the pluripotency reprogramming factors' initial engagement with the genome. *Cell* **151**, 994–1004 (2012).
365. Reményi, A. *et al.* Crystal structure of a POU/HMG/DNA ternary complex suggests differential assembly of Oct4 and Sox2 on two enhancers. *Genes Dev.* **17**, 2048–2059 (2003).
366. Gurdon, J. B. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **10**, 622–640 (1962).
367. Davis, R. L., Weintraub, H. & Lassar, A. B. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* **51**, 987–1000 (1987).
368. Kulesa, H., Frampton, J. & Graf, T. GATA-1 reprograms avian myelomonocytic cell lines into eosinophils, thromboblats, and erythroblats. *Genes Dev.* **9**, 1250–1262 (1995).
369. Xie, H., Ye, M., Feng, R. & Graf, T. Stepwise reprogramming of B cells into macrophages. *Cell* **117**, 663–676 (2004).
370. Postlethwait, J. H. & Schneiderman, H. A. A clonal analysis of determination in Antennapedia a homoeotic mutant of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **64**, 176–183 (1969).
371. Schnewly, S., Klemenz, R. & Gehring, W. J. Redesigning the body plan of *Drosophila* by ectopic expression of the homoeotic gene Antennapedia. *Nature* **325**, 816–818 (1987).
372. Frischer, L. E., Hagen, F. S. & Garber, R. L. An inversion that disrupts the Antennapedia gene causes abnormal structure and localization of RNAs. *Cell* **47**, 1017–1023 (1986).
373. Takahashi, K. & Yamanaka, S. A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 183–193 (2016).
374. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663–676 (2006).
375. Karagiannis, P. *et al.* Induced Pluripotent Stem Cells and Their Use in Human Models of Disease and Development. *Physiol. Rev.* **99**, 79–114 (2019).
376. Takahashi, K. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861–872 (2007).
377. Yamanaka, S. Elite and stochastic models for induced pluripotent stem cell generation. *Nature* **460**, 49–52 (2009).
378. Papapetrou, E. P. *et al.* Stoichiometric and temporal requirements of Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc expression for efficient human iPSC induction and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 12759–12764 (2009).
379. Liu, P., Chen, M., Liu, Y., Qi, L. S. & Ding, S. CRISPR-Based Chromatin Remodeling of the Endogenous Oct4 or Sox2 Locus Enables Reprogramming to Pluripotency. *Cell Stem Cell* **22**, 252–261.e4 (2018).



380. Narayan, S., Bryant, G., Shah, S., Berrozpe, G. & Ptashne, M. OCT4 and SOX2 Work as Transcriptional Activators in Reprogramming Human Fibroblasts. *Cell Rep.* **20**, 1585–1596 (2017).
381. Chassaing, N. *et al.* Molecular findings and clinical data in a cohort of 150 patients with anophthalmia/microphthalmia. *Clin. Genet.* **86**, 326–334 (2014).
382. Ormsbee Golden, B. D., Wuebben, E. L. & Rizzino, A. Sox2 expression is regulated by a negative feedback loop in embryonic stem cells that involves AKT signaling and FoxO1. *PLoS One* **8**, e76345 (2013).
383. Peng, C. *et al.* A unilateral negative feedback loop between miR-200 microRNAs and Sox2/E2F3 controls neural progenitor cell-cycle exit and differentiation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **32**, 13292–13308 (2012).
384. Xu, N., Papagiannakopoulos, T., Pan, G., Thomson, J. A. & Kosik, K. S. MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells. *Cell* **137**, 647–658 (2009).
385. Shahryari, A., Jazi, M. S., Samaei, N. M. & Mowla, S. J. Long non-coding RNA SOX2OT: expression signature, splicing patterns, and emerging roles in pluripotency and tumorigenesis. *Front. Genet.* **6**, 196 (2015).
386. Jeong, C.-H. *et al.* Phosphorylation of Sox2 cooperates in reprogramming to pluripotent stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* **28**, 2141–2150 (2010).
387. Lim, S. *et al.* Cyclin-Dependent Kinase-Dependent Phosphorylation of Sox2 at Serine 39 Regulates Neurogenesis. *Mol. Cell. Biol.* **37**, e00201-17 (2017).
388. Fang, L. *et al.* A methylation-phosphorylation switch determines Sox2 stability and function in ESC maintenance or differentiation. *Mol. Cell* **55**, 537–551 (2014).
389. Van Hoof, D. *et al.* Phosphorylation dynamics during early differentiation of human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* **5**, 214–226 (2009).
390. Rigbolt, K. T. G. *et al.* System-wide temporal characterization of the proteome and phosphoproteome of human embryonic stem cell differentiation. *Sci. Signal.* **4**, rs3 (2011).
391. Yoon, D. S. *et al.* SIRT1 directly regulates SOX2 to maintain self-renewal and multipotency in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* **32**, 3219–3231 (2014).
392. Baltus, G. A. *et al.* Acetylation of sox2 induces its nuclear export in embryonic stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* **27**, 2175–2184 (2009).
393. Tsuruzoe, S. *et al.* Inhibition of DNA binding of Sox2 by the SUMO conjugation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **351**, 920–926 (2006).
394. Jang, H. *et al.* O-GlcNAc regulates pluripotency and reprogramming by directly acting on core components of the pluripotency network. *Cell Stem Cell* **11**, 62–74 (2012).
395. Zhao, H., Zhang, Y., Dai, H., Zhang, Y. & Shen, Y. CARM1 mediates modulation of Sox2. *PLoS One* **6**, e27026 (2011).
396. Liu, Z. & Kraus, W. L. Catalytic-Independent Functions of PARP-1 Determine Sox2 Pioneer Activity at Intractable Genomic Loci. *Mol. Cell* **65**, 589-603.e9 (2017).
397. Chen, J. *et al.* Single-molecule dynamics of enhanceosome assembly in embryonic stem cells. *Cell* **156**, 1274–1285 (2014).
398. Pan, X. *et al.* Site-specific Disruption of the Oct4/Sox2 Protein Interaction Reveals Coordinated Mesendodermal Differentiation and the Epithelial-Mesenchymal Transition. *J. Biol. Chem.* **291**, 18353–18369 (2016).



399. Kopp, J. L., Ormsbee, B. D., Desler, M. & Rizzino, A. Small increases in the level of Sox2 trigger the differentiation of mouse embryonic stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* **26**, 903–911 (2008).
400. Chew, J.-L. *et al.* Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 6031–6046 (2005).
401. Carey, B. W. *et al.* Reprogramming factor stoichiometry influences the epigenetic state and biological properties of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **9**, 588–598 (2011).
402. Avilion, A. A. *et al.* Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* **17**, 126–140 (2003).
403. Arnold, K. *et al.* Sox2(+) adult stem and progenitor cells are important for tissue regeneration and survival of mice. *Cell Stem Cell* **9**, 317–329 (2011).
404. Merrick, D. *et al.* Identification of a mesenchymal progenitor cell hierarchy in adipose tissue. *Science* **364**, (2019).
405. Crisan, M. *et al.* A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* **3**, 301–313 (2008).
406. Jiang, Y., Berry, D. C., Tang, W. & Graff, J. M. Independent stem cell lineages regulate adipose organogenesis and adipose homeostasis. *Cell Rep.* **9**, 1007–1022 (2014).
407. Min, S. Y. *et al.* Human ‘brite/beige’ adipocytes develop from capillary networks, and their implantation improves metabolic homeostasis in mice. *Nat. Med.* **22**, 312–318 (2016).
408. Corselli, M., Chen, C.-W., Crisan, M., Lazzari, L. & Péault, B. Perivascular ancestors of adult multipotent stem cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 1104–1109 (2010).
409. Park, S. B. *et al.* SOX2 has a crucial role in the lineage determination and proliferation of mesenchymal stem cells through Dickkopf-1 and c-MYC. *Cell Death Differ.* **19**, 534–545 (2012).
410. Seo, E. *et al.* SOX2 regulates YAP1 to maintain stemness and determine cell fate in the osteo-adipo lineage. *Cell Rep.* **3**, 2075–2087 (2013).
411. Liu, D. *et al.* Activation of mTORC1 is essential for  $\beta$ -adrenergic stimulation of adipose browning. *J. Clin. Invest.* **126**, 1704–1716 (2016).
412. Tormin, A. *et al.* CD146 expression on primary nonhematopoietic bone marrow stem cells is correlated with in situ localization. *Blood* **117**, 5067–5077 (2011).
413. Han, Z. C., Du, W. J., Han, Z. B. & Liang, L. New insights into the heterogeneity and functional diversity of human mesenchymal stem cells. *Biomed. Mater. Eng.* **28**, S29–S45 (2017).
414. Xia, W. *et al.* Adenoviral transduction of hTGF-beta1 enhances the chondrogenesis of bone marrow derived stromal cells. *Biotechnol. Lett.* **31**, 639–646 (2009).
415. Zhao, L., Jiang, S. & Hantash, B. M. Transforming growth factor beta1 induces osteogenic differentiation of murine bone marrow stromal cells. *Tissue Eng. Part A* **16**, 725–733 (2010).
416. Yang, H. *et al.* Transforming growth factor-beta increases the expression of vascular smooth muscle cell markers in human multi-lineage progenitor cells. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* **17**, BR55-61 (2011).
417. Delorme, B. *et al.* Specific lineage-priming of bone marrow mesenchymal stem cells provides the molecular framework for their plasticity. *Stem Cells Dayt. Ohio* **27**, 1142–1151 (2009).
418. Muraglia, A., Cancedda, R. & Quarto, R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J. Cell Sci.* **113** ( Pt 7), 1161–1166 (2000).
419. Wang, J., Liu, S., Heallen, T. & Martin, J. F. The Hippo pathway in the heart: pivotal roles in development, disease, and regeneration. *Nat. Rev. Cardiol.* **15**, 672–684 (2018).





420. Young, M. F., Kerr, J. M., Ibaraki, K., Heegaard, A. M. & Robey, P. G. Structure, expression, and regulation of the major noncollagenous matrix proteins of bone. *Clin. Orthop.* 275–294 (1992).
421. Hinz, B. *et al.* The Myofibroblast. *Am. J. Pathol.* **170**, 1807–1816 (2007).
422. Janmey, P. A. & Miller, R. T. Mechanisms of mechanical signaling in development and disease. *J. Cell Sci.* **124**, 9–18 (2011).
423. Frost, H. M. Bone ‘mass’ and the ‘mechanostat’: a proposal. *Anat. Rec.* **219**, 1–9 (1987).
424. Hodge, W. A. *et al.* Contact pressures in the human hip joint measured in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 2879–2883 (1986).
425. Takahashi, K. *et al.* Hydrostatic pressure influences mRNA expression of transforming growth factor-beta 1 and heat shock protein 70 in chondrocyte-like cell line. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* **15**, 150–158 (1997).
426. Kannus, P. *et al.* Effect of starting age of physical activity on bone mass in the dominant arm of tennis and squash players. *Ann. Intern. Med.* **123**, 27–31 (1995).
427. Sakata, R., Ueno, T., Nakamura, T., Ueno, H. & Sata, M. Mechanical stretch induces TGF-beta synthesis in hepatic stellate cells. *Eur. J. Clin. Invest.* **34**, 129–136 (2004).
428. Wipff, P.-J., Rifkin, D. B., Meister, J.-J. & Hinz, B. Myofibroblast contraction activates latent TGF-beta1 from the extracellular matrix. *J. Cell Biol.* **179**, 1311–1323 (2007).
429. Zhang, T. *et al.* Regulating osteogenesis and adipogenesis in adipose-derived stem cells by controlling underlying substrate stiffness. *J. Cell. Physiol.* **233**, 3418–3428 (2018).
430. Yadav, H. *et al.* Protection from obesity and diabetes by blockade of TGF- $\beta$ /Smad3 signaling. *Cell Metab.* **14**, 67–79 (2011).
431. Abdennour, M. *et al.* Association of adipose tissue and liver fibrosis with tissue stiffness in morbid obesity: links with diabetes and BMI loss after gastric bypass. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **99**, 898–907 (2014).
432. Choy, L., Skillington, J. & Derynck, R. Roles of autocrine TGF-beta receptor and Smad signaling in adipocyte differentiation. *J. Cell Biol.* **149**, 667–682 (2000).
433. Takada, R. *et al.* Monounsaturated fatty acid modification of Wnt protein: its role in Wnt secretion. *Dev. Cell* **11**, 791–801 (2006).
434. Takada, I., Kouzmenko, A. P. & Kato, S. Wnt and PPARgamma signaling in osteoblastogenesis and adipogenesis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **5**, 442–447 (2009).
435. Song, L. *et al.* Loss of wnt/ $\beta$ -catenin signaling causes cell fate shift of preosteoblasts from osteoblasts to adipocytes. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **27**, 2344–2358 (2012).
436. Kang, S. *et al.* Wnt signaling stimulates osteoblastogenesis of mesenchymal precursors by suppressing CCAAT/enhancer-binding protein alpha and peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J. Biol. Chem.* **282**, 14515–14524 (2007).
437. Imajo, M., Miyatake, K., Imura, A., Miyamoto, A. & Nishida, E. A molecular mechanism that links Hippo signalling to the inhibition of Wnt/ $\beta$ -catenin signalling. *EMBO J.* **31**, 1109–1122 (2012).
438. Dupont, S. *et al.* Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* **474**, 179–183 (2011).
439. Szeto, S. G. *et al.* YAP/TAZ Are Mechanoregulators of TGF- $\beta$ -Smad Signaling and Renal Fibrogenesis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **27**, 3117–3128 (2016).



440. Seo, E., Basu-Roy, U., Zavadil, J., Basilico, C. & Mansukhani, A. Distinct functions of Sox2 control self-renewal and differentiation in the osteoblast lineage. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 4593–4608 (2011).
441. Zhang, S. & Cui, W. Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation. *World J. Stem Cells* **6**, 305–311 (2014).
442. Wuebben, E. L. & Rizzino, A. The dark side of SOX2: cancer - a comprehensive overview. *Oncotarget* **8**, 44917–44943 (2017).
443. Prel, A. *et al.* Highly efficient in vitro and in vivo delivery of functional RNAs using new versatile MS2-chimeric retrovirus-like particles. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* **2**, 15039 (2015).
444. Taniguchi, J. *et al.* A synthetic DNA-binding inhibitor of SOX2 guides human induced pluripotent stem cells to differentiate into mesoderm. *Nucleic Acids Res.* **45**, 9219–9228 (2017).
445. Lu, Y. *et al.* Mitophagy is required for brown adipose tissue mitochondrial homeostasis during cold challenge. *Sci. Rep.* **8**, 8251 (2018).
446. Griffin, J. W. & Thompson, W. J. Biology and pathology of nonmyelinating Schwann cells. *Glia* **56**, 1518–1531 (2008).
447. Jessen, K. R. & Mirsky, R. The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves. *J. Physiol.* **594**, 3521–3531 (2016).
448. Roberts, S. L. *et al.* Sox2 expression in Schwann cells inhibits myelination in vivo and induces influx of macrophages to the nerve. *Dev. Camb. Engl.* **144**, 3114–3125 (2017).



# **ANNEXES**

---



# SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

## Human adipose stromal-vascular fraction self-organizes to form vascularized adipose tissue in 3D cultures

Sandra Muller<sup>1</sup>, Isabelle Ader<sup>1</sup>, Justine Creff<sup>1,2,3</sup>, Hélène Leménager<sup>1</sup>, Pauline Achard<sup>1</sup>, Louis Casteilla<sup>1</sup>, Luc Sensebé<sup>1</sup>, Audrey Carrière<sup>1</sup> & Frédéric Deschaseaux<sup>1</sup>

Native human subcutaneous adipose tissue (AT) is well organized into unilocular adipocytes interspersed within dense vascularization. This structure is completely lost under standard culture conditions and may impair the comparison with native tissue. Here, we developed a 3-D model of human white AT reminiscent of the cellular architecture found *in vivo*. Starting with adipose progenitors derived from the stromal-vascular fraction of human subcutaneous white AT, we generated spheroids in which endogenous endothelial cells self-assembled to form highly organized endothelial networks among stromal cells. Using an optimized adipogenic differentiation medium to preserve endothelial cells, we obtained densely vascularized spheroids containing mature adipocytes with unilocular lipid vacuoles. *In vivo* study showed that when differentiated spheroids were transplanted in immunodeficient mice, endothelial cells within the spheroids connected to the recipient circulatory system, forming chimeric vessels. In addition, adipocytes of human origin were still observed in transplanted mice. We therefore have developed an *in vitro* model of vascularized human AT-like organoids that constitute an excellent tool and model for any study of human AT.

3-D type cultures have sparked great interest in basic research labs and for translational science. This interest is probably due to the limitations of 2-D cultures with conditions very different from native (*in vivo*) tissues, which may lead to untransferable results to *in vivo* situations<sup>1</sup>. Regarding native tissues, all cells reside within a 3-D complex environment composed of a large number of extracellular matrix molecules and are dispersed geometrically in 3-D space in the correct place. This situation offers biophysical interactions that induce specific biological responses<sup>2</sup>. Overall, these structures build up to give rise to functional organs.

2-D culture systems provide relevant models for research studies but are too simplistic and do not mimic the composition and spatial structures found *in vivo*. Therefore, labs have begun to develop 3-D culture types for many epithelial and non-epithelial tissues to resume the native tissue function, its cellular heterogeneity as well as the formation of specific niches where 3-D architectures are crucial<sup>1,3,4</sup>. Adipose tissue (AT) has a crucial role in the maintenance of whole body metabolic homeostasis<sup>5</sup> and attempts to culture adipocytes in 3-D have been described<sup>6-9</sup>.

Human white AT is highly vascularized, and its vasculature is essential for functioning. Indeed<sup>10</sup>, each adipocyte is in close contact with nearby endothelial cells (ECs). This contact allows for the blood flow to fetch nutrients, oxygen, growth factors, hormones, cytokines (e.g., adipokines) and other cells (e.g., immune cells) required for AT homeostasis. ECs also constitute a niche for adipocyte progenitors (APs) because of their perivascular/endothelial origins<sup>11-14</sup>. The crucial role of vascularization is also true for the biology of beige APs<sup>15</sup> and for trans-differentiation of some "white" adipocytes into beige adipocytes. These latter express the uncoupling protein-1 (UCP1) following noradrenergic stress, and assume a role in non-shivering thermogenesis, as classical brown adipocytes present in brown AT<sup>5,16,17</sup>. In addition, direct observations in human samples or the use of lineage-tracing technologies in mouse models showed that during development and AT expansion in adults, angiogenesis and

<sup>1</sup>STROMALab, Etablissement Français du Sang-Occitanie (EFS), Inserm 1031, University of Toulouse, National Veterinary School of Toulouse (ENVT), ERL5311 CNRS, Toulouse, France. <sup>2</sup>LBCMCP, Centre de Biologie Int egrative (CBI) CNRS, University of Toulouse, Toulouse, France. <sup>3</sup>LAAS-CNRS University of Toulouse CNRS, Toulouse, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to F.D. (email: [frederic.deschaseaux@efs.sante.fr](mailto:frederic.deschaseaux@efs.sante.fr))



adipogenesis are concomitant or interdependent, and adipocytes as well as APs regulate angiogenesis by cell-cell contact and the production of cytokines<sup>11,15,18–20</sup>. Hence, vascularisation is a crucial parameter to take into account in generating a functional model as close as possible to the native one.

Generating vascularized AT transplants also offers an additional advantage for engraftment purposes. With lack of vascularization, grafts of tissues produced *ex vivo* often lead to short-term integration and morbidity of the donor site, along with hypoxia and cell death<sup>21,22</sup>. In contrast, engineered pre-vascularized tissues accelerate the connection with the *in situ* vessels and support their survival and functionality<sup>23</sup>. Some previous studies aimed at engineering a vascularized AT *in vitro*. The strategy usually consisted of generating adipocytes from APs, then adding ECs onto adipocytes<sup>6,9,24–27</sup>. However, this method does not recapitulate AT development because ECs and adipocytes are usually obtained from diverse biological sources and sometimes different organisms, which precludes the use of these engineered tissues for autologous grafts.

To counteract these problems, we aimed to produce an adipose structure by using the stromal-vascular fraction (SVF) of AT as a source of APs and endogenous ECs. According to the results obtained from different *in vitro* conditions, we opted for a unique medium as a main condition to culture the SVF in 3-D, a medium similar to that used for the culture of ECs and perivascular cells but also for APs<sup>15,28,29</sup>. We then assessed the ability of APs to form small spheroid-like structures with AT characteristics and functions. To maintain the adipose vascular network, we needed to develop an adipogenic milieu preventing the loss of ECs. We considered the good self-organized vessels and unilocular adipocytes obtained in our 3-D biological structures as AT organoids. In addition, these AT organoids were engrafted efficiently into nude mice by connecting their vascularization with those of the host. Our new experimental model of human AT organoids represents an invaluable tool for *ex vivo* studies mimicking *in vivo* conditions.

## Results

### Development of culture conditions for vascular network formation and adipogenesis in 2-D.

Given the importance of vessels in AT, we aimed to develop culture conditions allowing to preserve endogenous ECs along with APs. We adjusted these experimental conditions in 2-D before testing them in 3-D. Thus, after seeding human SVF in specific medium that allowed for expanding both APs and ECs as demonstrated previously by Min *et al.* (EGM2<sup>15</sup>), we analyzed endothelial networks and compared them with standard culture ( $\alpha$ MEM with 10% FCS) currently used as reference for mesenchymal stem cells cultures<sup>30</sup>. As demonstrated by CD31 staining, vascular networks were longer and more highly branched with EGM2 than standard culture (Fig. 1). In addition, endothelial networks derived from EGM2 were lined by perivascular vascular smooth muscle cells strongly expressing the  $\alpha$ SMA isoform (Fig. 1A). Some endothelial organizations resembled tubes (Supplementary Fig. S1) that were never observed under standard culture conditions. Therefore, EGM2 offered better conditions for obtaining ECs, which could self-organize into capillary-like structures.

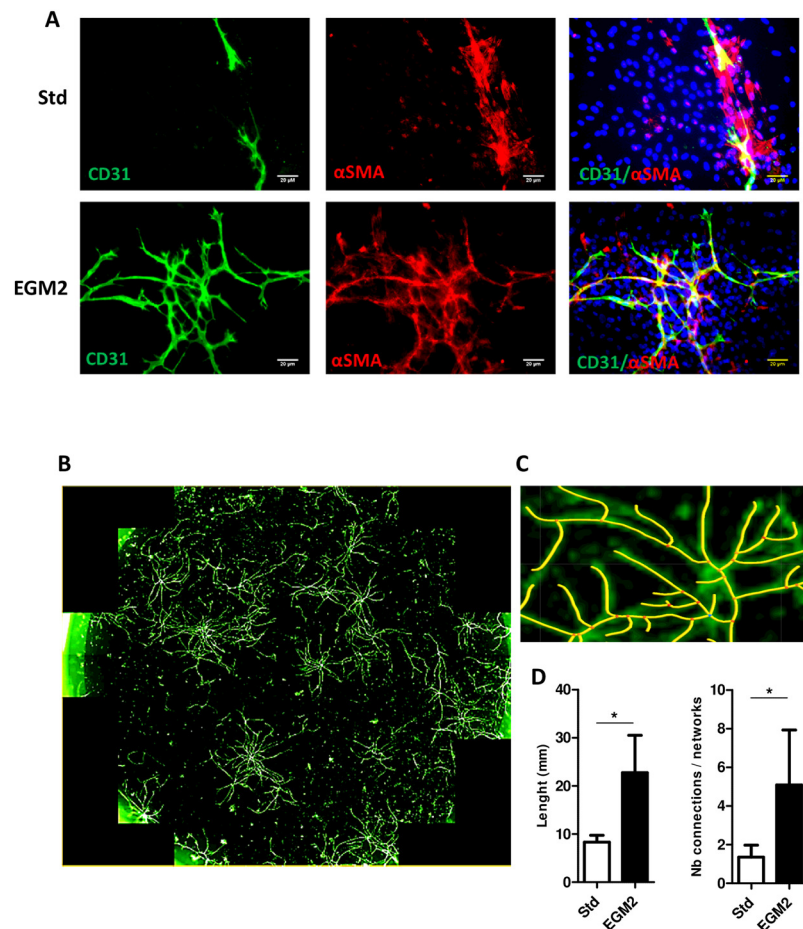
We then assessed the adipocyte differentiation ability of APs present in these cultures by replacing the EGM2 medium by  $\alpha$ MEM-2% FCS supplemented with different adipogenic molecules. After testing several combinations, the standard cocktail (mainly consisting peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ 2 [PPAR $\gamma$ 2] agonist rosiglitazone, 3-isobutyl-1-methylxanthine [IBMX], insulin, dexamethasone and indomethacin) was the most efficient to induce the differentiation of APs into mature adipocytes, as demonstrated by the presence of numerous lipid droplets (Supplementary Fig. S2) and by the expression of adipocyte markers (PPAR $\gamma$ 2, lipoprotein lipase [LPL] and adipocyte lipid-binding protein [AP2], Supplementary Fig. 2). However, this standard cocktail condition was strongly detrimental for ECs because the endothelial networks disappeared (Supplementary Fig. S2). Therefore, we developed a more physiological adipogenic cocktail compatible with ECs. Besides apotransferrin and insulin, which are present in classical differentiation medium, we added BMP7, a cytokine that promotes brown/beige adipogenesis *in vivo* and *in vitro*<sup>31,32</sup>. In addition to these molecules, we added free fatty acids (hereafter named intralipids), which can elicit both *de novo* synthesis and internalisation of fatty acids within adipocytes, thus mimicking the physiological situation. This new adipogenic cocktail led to the preservation of ECs and the formation of lipid droplets as well as increased expression of adipocyte markers (Supplementary Fig. S2), although to a lesser extent than with standard cocktail.

### Generation and characterization of vascularized adipose spheroids.

We then asked whether features observed in 2D culture conditions could be preserved or improved in spheroids. Cells from SVF were cultured in EGM2 in ULA plastic (avoiding their adhesion on the plastic culture flasks) and with stirring (Fig. 2A). After 5 days of culture, small and dispersed cellular aggregates formed in the wells. Pipetting the medium helped with the formation of a unique spheroid per well (Fig. 2B). Six days after seeding, spheroids were incorporated into matrigel droplets and cultured further for 4 days under stirring, which allowed for sprouting (Fig. 2C). Although stirring contributed to improving the diffusion of nutrients and oxygen within the spheroid, the matrigel step was necessary to prevent spheroid condensation and the formation of a necrotic core (Fig. 2D).

At this step of the culture process, we checked the identity and localization of the different types of cells constituting spheroids, particularly ECs. CD31-expressing ECs were able to self-assemble into a dense and highly organized vascular network spanning the spheroid (Fig. 3A,B). Remarkably, tubular structures containing lumen were formed by ECs (Fig. 3C) and closely resembled the morphology of blood vessels found *in vivo*. Moreover,  $\alpha$ SMA-positive perivascular cells (Fig. 3J) and expression of the extracellular matrix protein collagen IV of basal lamina were found along the vessels, thus completing their structural organization (Fig. 3G–I).

To test whether our culture conditions maintained the phenotype of native APs, we checked the expression of CD34, a protein known to typify APs *in vivo* but whose expression is greatly decreased in 2-D culture<sup>33</sup>. To distinguish APs from ECs, which also express CD34, spheroids were co-labeled with CD31. Although some cells did not have CD34 staining, a fraction of cells negative for CD31 still expressed CD34 after 4 days in matrigel (Fig. 3D–F), which indicates a preserved population of APs inside the spheroids. Therefore, spheroids generated



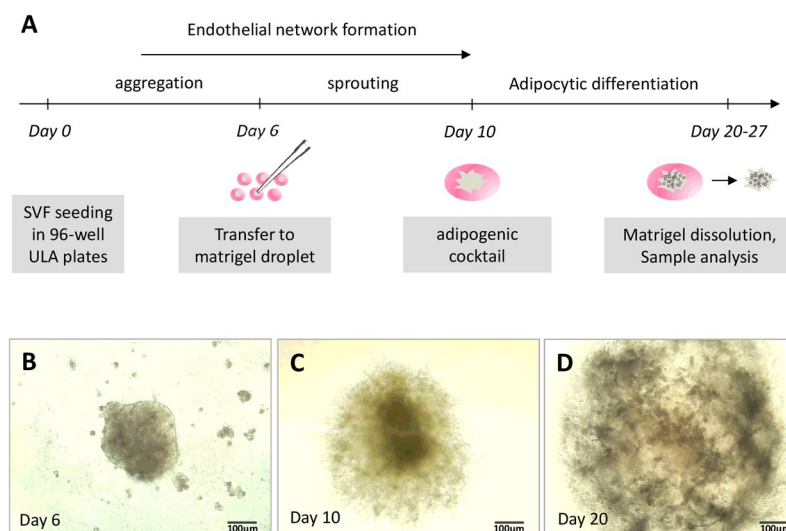
**Figure 1.** 2-D capillary-like structures formed by stromal-vascular fraction (SVF)-derived cells. Adipocyte progenitors obtained from SVF were cultured under two conditions: standard (Std) or endothelial growth medium 2 (EGM2). (A) After several days, cultures were fixed and stained with anti-CD31 and/or anti- $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA) antibodies labelling endothelial cells (ECs) and perivascular smooth muscle cells, respectively. Nuclei were detected by DAPI staining. The preparations were then observed by confocal microscopy (bar = 20  $\mu$ m). (B) Endothelial networks visualized by CD31 staining; the whole surface of a well was scanned by using the Operetta™ screening system. (C) The size of endothelial capillaries and number of connections were measured. (D) Data are mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ .

by SVF under our 3-D conditions were well vascularized with fully formed vessels and still contained phenotypically defined APs.

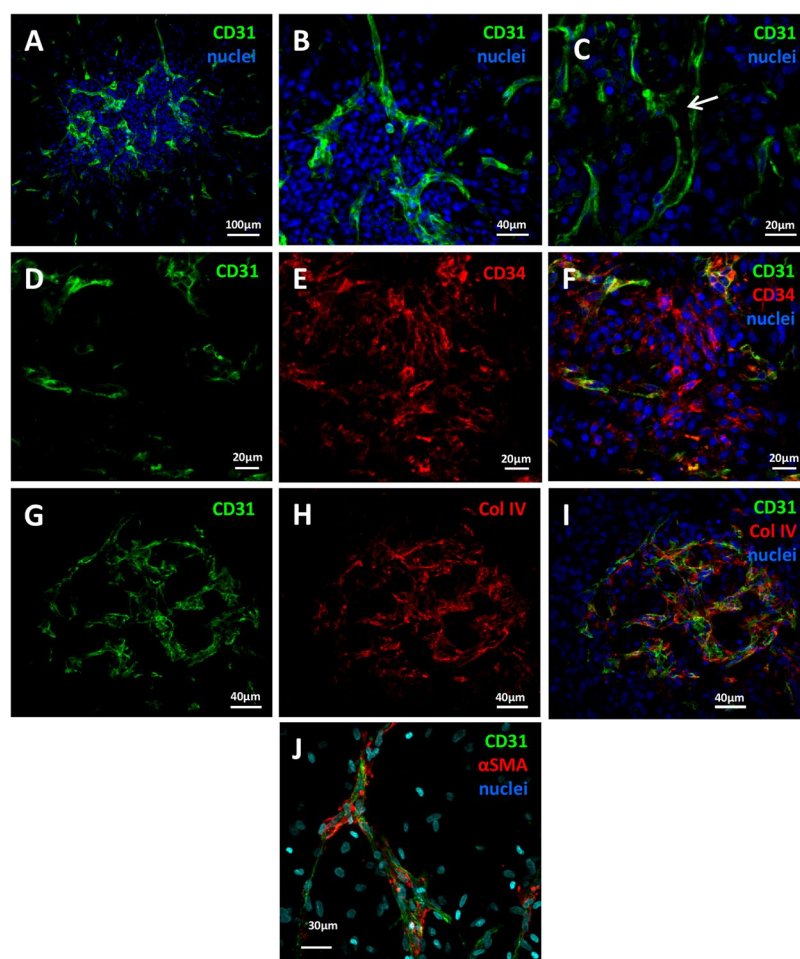
Vascularized spheroids were then incubated with the  $\alpha$ MEM-2% FCS intralipid/BMP7-based cocktail tested above under 2-D conditions and selected for its ability to preserve ECs. After 10 days of differentiation induction, some cells with large and unilocular lipid droplets were stained by the BODIPY probe (Fig. 4A–C). CD31 staining revealed that the endothelial network was intact 10 and 17 days after differentiation (Fig. 4A,B). Lipid accumulation further increased with time, many adipocytes being unilocular even at day 17 post-differentiation (Fig. 4B). This feature is reminiscent of adipocytes found *in vivo* but rarely observed in 2-D culture. Perilipin, a protein that coats the surface of lipid droplets in adipocytes, was strongly expressed and located around large vacuoles, which confirms a consistent adipocyte phenotype (Fig. 4C).

To confirm the initiation of an adipocyte-differentiation program, we analysed the expression of early and late markers of adipocyte differentiation by quantitative RT-PCR. As expected, the expression of *PPAR* $\gamma$ 2, *AP2*, *LPL* and adiponectin Q (*ADIPOQ*) was increased after 10 days of induction with the adipogenic cocktail (Fig. 4D). Therefore, our 3-D culture conditions allowed for the formation of spheres resembling AT constituted by vessels and adipocytes.

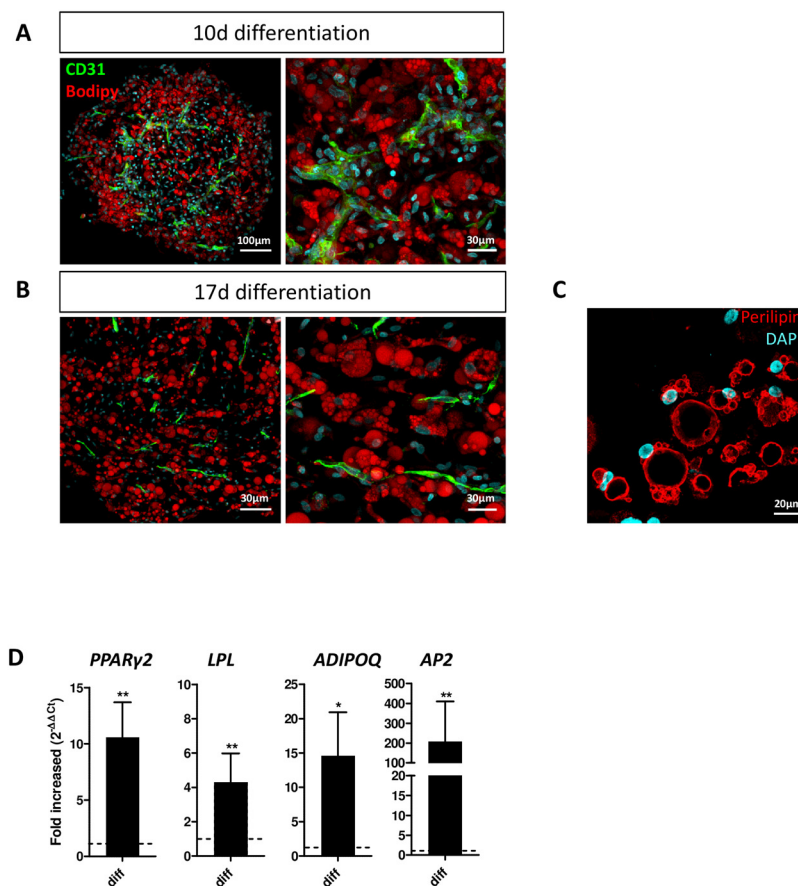
We then assessed whether adipocytes present in spheroids maintained their plasticity toward the brown/beige phenotype after cultivating them in presence of the growth factor BMP7, previously shown to favor brown/beige differentiation<sup>31,32</sup> and after an acute treatment with forskolin, a well-known browning inducer through cAMP signaling<sup>34</sup>. We found that UCP1 and peroxisome proliferator-activated receptor c coactivator 1 (PGC1 $\alpha$ ) mRNA levels were strongly increased following forskolin treatment, suggesting that adipocytes in spheroids preserved their plasticity toward the beige lineage (Supplementary Fig. S2). Therefore, our 3-D culture conditions allowed for the formation of spheres resembling AT containing vessels and adipocytes which maintained their plasticity.



**Figure 2.** Process to obtain vascularized spheroids. (A) Protocol for obtaining spheroids during the 4 weeks of experiments. The formation of spheroids was followed under a photonic microscope: (B) spheroid in stirring liquid culture; (C) spheroid sprouting within Matrigel before differentiation induction; and (D) spheroid after 10 days of culture in adipogenic medium. (B–D are representative images).



**Figure 3.** Vascularized spheroids in 3-D culture. Spheroids embedded in Matrigel were fixed and permeabilized for confocal microscopy investigation. Vessels containing ECs and perivascular cells were depicted by anti-CD31 and anti- $\alpha$ SMA staining, respectively (A–C and J). APs were detected as CD34+/CD31– cells (D–F). The basal membrane was viewed by anti-collagen IV (Col IV) staining (G–I).



**Figure 4.** Adipocytes in vascularized spheroids. Vascularized spheroids were committed to the adipocyte lineage at up to 10–17 days. (A,B) Samples were observed by confocal microscopy. ECs were labelled with anti-CD31 antibody (A,B), and adipocytes with BODIPY (A,B) or perilipin (C); nuclei were stained with DAPI. The expression of adipocyte markers *PPAR* $\gamma$ 2, *LPL*, *ADIPOQ* and *AP2* was evaluated by qRT-PCR at 10 days after the induction of spheroid differentiation versus undifferentiation (D). Data are mean  $\pm$  SEM. \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ .

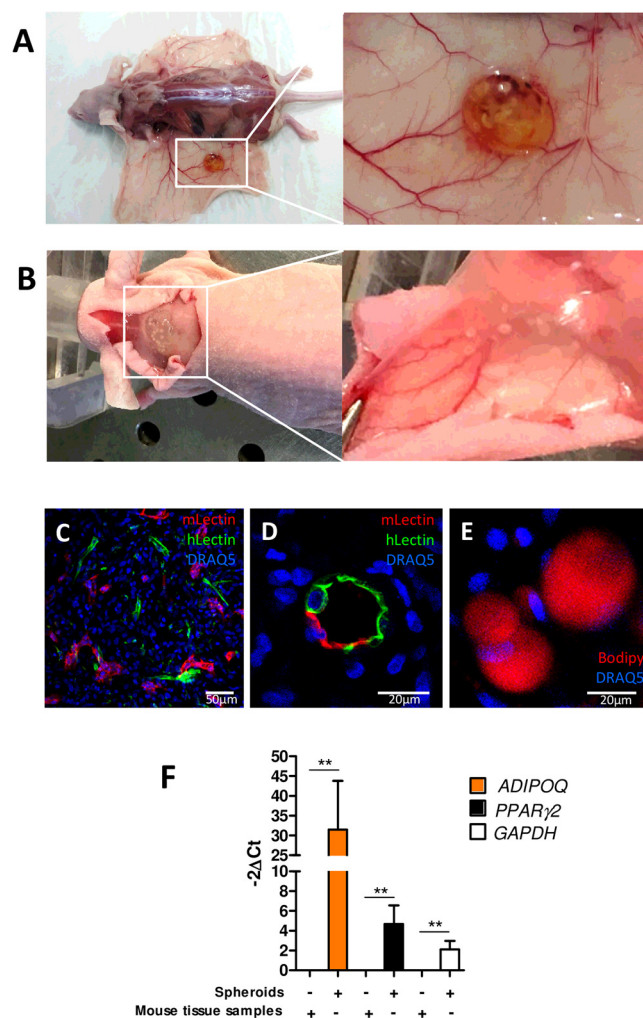
**Transplantation of vascularized adipose spheroids *in vivo*.** To demonstrate that the endothelial networks formed in the differentiated spheroids were functional, we tested the potential of vascularized adipose spheroids for engrafting. After their adipogenic differentiation, 25 to 30 spheroids were implanted subcutaneously into nude mice near the subcutaneous inguinal fat pad or along interscapular brown AT. Injected mice did not show any sign of inflammation, and spheroids remained in the injection area for at least 7 days (Fig. 5A,B). The interscapular injection site was more efficient for maintaining spheroids than the inguinal AT site (not shown). After dissection, we found dense vascularisation around the plug as compared with the non-injected side (Fig. 5B). To determine whether the human vascular networks of the engrafted spheroids were connected to the recipient circulatory system, we injected both human- and mouse-specific lectins in the retro-orbital sinus before mice were euthanized. Confocal imaging revealed that the spheroids were perfused by a functional microvascular network because both lectins were easily detected (Fig. 5C). Of note, some vessels contained both human and mouse ECs, thereby suggesting chimeric vessels (Fig. 5D).

Inside the transplanted spheroids, adipocytes were still detected (Fig. 5E). Quantitative RT-PCR of the human adipocyte-specific markers *ADIPOQ* and *PPAR* $\gamma$ 2 revealed adipocytes of human origin inside vascularized adipose spheroids (Fig. 5F). These data show the functionality of vascularization of spheroids, which can easily spread and establish connections *in vivo* with the host, and reflects the good tolerance of injected cells by host. Moreover, large human unilocular adipocytes were detectable in the explants, so adipocytes-containing spheroids can be maintained *in vivo* after transplantation.

## Discussion

We developed a protocol to generate human 3-D structures *in vitro* that closely resemble the cellular architecture of human AT. These adipose spheroids could be engrafted in immune-deficient mice by connecting their own vascularization to the host one, which allowed for maintaining human adipocyte integrity.

Organoids can be generated from pluripotent or adult stem cells as well as some tissue progenitors<sup>35,36</sup>. Takebe *et al.* obtained organoids of different organs after their dissociation and *in vitro* reorganization<sup>23</sup>. However, organoids must be vascularized. Thus, the investigators performed experiments allowing for the formation of



**Figure 5.** *In vivo* engraftment of vascularized adipocyte spheroids. After adipocyte differentiation, vascularized spheroids were subcutaneously injected near inguinal AT or interscapular brown AT in mice. (A) After day 7, transplants were harvested and sites of injections were highly vascularized. (B) To reveal the connection of the endothelial network of spheroids and host vascularization, both murin and human fluorescent lectins were injected in living mice. Both murin and human vessels were observed inside the adipose spheroids (C) as were chimeric vessels (D). Intra-spheroid adipocytes were stained with BODIPY (E). Human adipocytes remaining in spheroids were revealed by assessing the expression of the human adipocyte-specific markers *ADIPOQ* and *PPAR $\gamma$ 2* by qRT-PCR (F). Mouse tissue samples were tested to highlight the human specificity of the primers used. Data are mean  $\pm$  SEM. \*\* $p < 0.01$ .

a functional endothelial network interspersed within organoids, but they needed to add ECs originating from unrelated tissue. The vascularization of AT is of primary importance as well. Indeed, there is a tight relation between ECs and APs. Abundant literature describes the role of APs in EC survival, proliferation, and organization into vascular cords *in vitro* via the secretion of bioactive molecules and cell-cell interactions<sup>37</sup>. The cooperation between APs and ECs in vascular assembly has also been demonstrated *in vivo* in transplantation studies<sup>38</sup>. In mice, adipocyte lineage tracing studies indicate that the vasculature precedes adipocyte formation and provides a niche supporting both white and brown APs<sup>11,39</sup>. Therefore, preserving ECs within 3-D adipose structures in culture is required for the future development of this technology. The strong interdependence between vascular progenitors and APs also underlines the crucial use of EGM2 type medium for expanding them compared to standard culture conditions. This explains why we adopt this, as done by Min *et al.*<sup>15</sup> who also compared these two culture conditions and found that EGM2-like medium was necessary for vascular development and APs. In addition, they pinpointed the role of single factors VEGF, hFGF2, hEGF and IGF1 in this phenomenon. These specific conditions and molecular compositions could be gathered in more well-defined serum free medium which can thus be suitable for a clinical use<sup>25</sup>.

Although human adipose spheroids have been generated<sup>40,41</sup>, some lacked vascularization. Some research groups reported exogenous ECs (such as human umbilical vein ECs) added on adipose-derived spheroids<sup>9,26</sup>. Other work attempted to obtain 3-D-cultured adipose tissue models. These protocols used murine cells or organotypic-like cultures (i.e., culture of small AT explants), achieving AT-like structures with or without

vascularization<sup>27,40–44</sup>. However, the use of exogenous ECs to form vessels inside the spheres could generate some artefacts. Indeed, the whole population of ECs is highly heterogeneous. This heterogeneity depends on the types of vessels or the tissue origin: ECs from large vessels are phenotypically and functionally different than those from smaller vessels such as sinusoid, microvessels and arterioles. Moreover, ECs from liver, the central nervous system, and bone marrow have common features but also consistent differences depending on the function of the tissue where they reside<sup>45</sup>. To improve the development of spheroids, we established culture conditions allowing for spheroid vascularization with endogenous ECs (i.e. of AT origin). By keeping endogenous ECs surrounded by perivascular cells and APs, our vascularized AT model could recreate the native environment, which would explain why our AT-organoids were relatively well maintained even *in vivo*. Besides being important for adipocyte biology, this structure could also allow for study of the different actors of the perivascular niche that play a significant role in the fate of APs<sup>20</sup>.

To obtain such results, we needed to set up culture conditions that enabled both the maintenance of vascular integrity and the differentiation of adipocytes. Contrary to pharmacological molecules commonly used to initiate adipogenesis *in vitro*, our more physiological adipogenic cocktail preserved ECs. The pharmacological factors used (IBMX, rosiglitazone and indomethacine) might have issues related to growth and/or viability of ECs<sup>46,47</sup>, which led to inhibition of spheroid vascularization, as reported by others<sup>46–48</sup>. Although pharmacological factors did not have any toxic effect on ECs in monocultures (HUVEC, data not shown), the differential responses of ECs to these molecules might be explained by the type of cultures (mono versus co-cultures), highlighting the possible role of APs in ECs survival.

Despite reduced adipogenic induction, we were still able to generate unilocular adipocytes, a mechanism tightly related to physiological situations. Indeed, fatty acids (included in our differentiation medium) play a major role in the adipogenesis process, both by internalization in lipid droplets and activation of PPAR $\gamma$ , the master regulator of adipogenesis<sup>16</sup>. This inclusion strengthens the similarity of adipose organoids and native AT and constitutes an interesting model to further study the link between adipogenesis and angiogenesis in humans.

The vascularization of adipose organoids is important for the reasons described above but also for the crucial functions that ECs play in the normal and pathological context of AT even if unclear. Modulation of the adipose vasculature has emerged as a potential strategy to treat obesity. Intriguingly, both repression and induction of AT vasculature can improve metabolism in obesity, and the effect of anti-angiogenic treatments varies depending on the patient's age and obesity status<sup>49</sup>. Nevertheless, these studies underline the importance of the EC source. Therefore, ECs from patients' AT would better help predict the outcome in drug discovery.

Even after their xeno-transplantation in mice, human ECs and adipocytes were still detected in our study. Also, chimeric vessels were obtained. This observation underlines that spheroid vascularization is viable and functional, with strong ability to be integrated with the host vasculature. Of note, addition of matrigel during spheroid implantation helped their vascularization as described by Laib *et al.*<sup>50</sup>, but other biomaterials such as fibrin should be tested for clinical perspectives. The fact that human adipocytes were found to be preserved in the host environment suggest that they could be used in numerous metabolic studies. Nevertheless, we lack *in vivo* functional investigations for evaluating the relevance of this model for the ability of white adipocytes to be converted into beige cells or to stock and transform metabolites, as is normally done for this type of cell.

Overall, our adipose organoids have several potential benefits. First, the generation of mature unilocular adipocytes together with an organized vascular network provides a more physiological platform to study human ATs *in vitro* under normal and pathological contexts. Second, because of the ability of adipose organoids to respond to browning inducers, they are a valuable model to decipher the mechanisms involved and to test new drugs for therapy of obesity and associated disorders. Third, all of these studies could be performed in different settings such as for large-scale drug screening of micro-chip technologies. Finally, they constitute an interesting model to further study the link between adipogenesis and angiogenesis in humans. These organoids could also answer the need for vascularized autologous AT for transplantation, because we found that they could be transplanted in mice and anastomosed promptly with the host vasculature.

In conclusion, we herein developed a model of vascularized AT-like spheroids using SVF of AT as a source of APs and ECs. Differentiated spheroids transplanted into mice connected to the recipient circulatory system, highlighting the functionality of the endothelial network and the relevance of adipospheres for multiple applications.

## Methods

**SVF isolation from human adipose tissue.** Human SVF was isolated from subcutaneous adipose tissue obtained from human non-obese donors (body mass index <26 kg/m<sup>2</sup>) undergoing elective abdominal dermolipectomy (plastic surgery department, CHU Toulouse, France). Our experimental protocols were approved by French research ministry's institutional ethics committee (No: DC-2015-23-49) and informed consent was obtained from all subjects in line with current regulations (no subjects under 18 were included). The AT was dissociated and underwent enzymatic digestion in  $\alpha$ MEM (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) supplemented with penicillin and streptomycin (p/s) without serum, with 13.6 U/mL collagenase NB4 (Serva Electrophoresis; Heidelberg, Germany) and 10 U/mL dispase (Roche; Bâle, Switzerland) for 45 min at 37°C under stirring. The digestion was filtered with a 100- $\mu$ m Nylon net filter (Steriflip, Millipore, Burlington, MA, USA) and centrifuged (600 g, 10 min). The pellet containing SVF was resuspended in  $\alpha$ MEM with p/s without serum, and erythrocytes were lysed for 3 min at 4°C by using lysis buffer. Lysis was stopped with the addition of  $\alpha$ MEM with p/s without serum. To eliminate the lysed cells, another centrifugation was performed (600 g, 10 min). The SVF obtained was then resuspended either in endothelial growth medium 2 (EGM2; PromoCell; Heidelberg, Germany) or  $\alpha$ MEM complemented by 10% Fetal Calf Serum (FCS, standard culture medium, Life Technologies), and 1 U/ $\mu$ L pulmozyme (Life Technologies) was added. Cells were counted by using an automatic cell counter (Countess, Invitrogen; Carlsbad, CA, USA) and seeded in EGM2 or standard medium at 4000 cells/cm<sup>2</sup> for 2-D cultures

Target	Forward primer	Reverse primer
<i>PPIA</i>	GCCGAGGAAAACCGTGTACTA	GCCGAGGAAAACCGTGTACTAT
<i>GAPDH</i>	TTGACAAAGTGGTCGTTG	CTGGCGCTGAGTACGTCG
<i>PPAR<math>\gamma</math>2</i>	GATACACTGTCTGCAAACATATCAC	CCACGGAGCTGATCCCAA
<i>AP2</i>	AAACTGGTGGTGAATGCGT	GCGAACTTCAGTCCAGGTCA
<i>LPL</i>	GGTCGAAGCATTGGAATCCAG	TAGGGCATCTGAGAACGAGTC
<i>ADIPOQ</i>	TGCCCCAGCAAGTGTAAACC	TCAGAAACAGGCACACAACCTCA
<i>UCP1</i>	GTGTGCCCAACTGTGCAATG	CCAGGATCCAAGTCGCAAGA
<i>PGC1<math>\alpha</math></i>	CCGCACGCACCGAAA	TCGTGCTGATATTCCTCGTAGCT

**Table 1.** Sequences of primers used in QRT-PCR.

or 25 000 cells/well in 96-well ultra-low attachment (ULA) plates with a round bottom (Costar, ThermoFisher; Waltham, MA, USA) for 3-D culture.

**Endothelial networks in 2-D conditions.** After 2 weeks of expansion, SVF-derived cells were seeded at  $1 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> in a flask coated with a solution of 0.1% (v/v) gelatin. At day 10, cells were fixed, permeabilized with 0.1% (v/v) triton X100 (Sigma) and incubated with the antibodies anti-CD31 (ref: JC70A, Dako; Santa Clara, CA, USA) and/or anti- $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA; ref: 202M-9, Sigma) to evaluate the formation of vessels. 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma) was used to stain nuclei. Cells were observed under a Nikon Eclipse TE2000-S confocal microscope (Nikon; Champigny sur Marne, France). Quantification of vessel length and the number of vessels involved the use of the FilamentTracer module of Imaris software (Bitplane; Zurich, Switzerland).

**Adipocyte differentiation in 2-D conditions.** SVF was seeded at 100,000 cells/cm<sup>2</sup> in EGM2 and cultured for 8 days before differentiation. Cells were then cultured for 14 days in different adipogenic media: the classical medium ( $\alpha$ MEM supplemented with 2% FCS, 1  $\mu$ M Dexamethasone, 60  $\mu$ M Indomethacine, 2  $\mu$ M Rosiglitazone, 5  $\mu$ g/mL Insulin, and 450  $\mu$ M (3-isobutyl-1-methylxanthine, IBMX, for the first 3 days), or  $\alpha$ MEM-2% FCS supplemented with Intralipids (1/100), Insuline (5  $\mu$ g/mL), or Bone Morphogenetic Protein 7 (BMP7, 50 ng/mL)<sup>32</sup>.

**Spheroid formation, incorporation in matrigel and differentiation.** For each culture step, the medium was changed every 2–3 days, pipetted for cell aggregation and incubated at 37°C under stirring (70 rpm). When cell aggregates formed a unique spheroid per well, usually six days after the SVF was seeded, spheroids were incorporated in 40  $\mu$ L matrigel (growth factor-reduced, Corning; New York, USA), one by one, and seeded in EGM2 in ULA and ultra-low cluster 24-well plates with a flat bottom (Corning). This step was essential to avoid the formation of a necrotic core since matrigel inclusion allows cell migration, generating a spheroid with lower cell density and better access to nutrients and oxygen. After 4 days, spheroids were differentiated by using an adipogenic cocktail composed of intralipids 0.2% v/v (Sigma I141; St. Louis, MO, USA), 50 ng/mL BMP7 (R&D Systems; Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA), insulin 5  $\mu$ g/mL and apotransferin 10  $\mu$ g/mL diluted in  $\alpha$ MEM and p/s with 2% FCS (Life Technologies). Spheroids could be then maintained in culture for at least 17 days after differentiation without any sign of cell death. Thermogenic genes were induced in spheroids by treating them with 50  $\mu$ M forskolin (Tocris; Bio-Techne) for 4 h.

**RNA extraction, reverse transcription and quantitative PCR.** After the Matrigel was washed in cold phosphate buffered saline (PBS), spheroids were lysed in Qiazol, and total RNA was extracted by using the Qiagen RNeasy Micro kit (Qiagen; Hilden, Germany). Reverse transcription involved 219–1000 ng RNA with the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA). cDNA was synthesized in a thermal cycler (2720 Applied Biosystems) with the program 10 min at 25°C, 120 min at 37°C and 5 min at 85°C.

qPCR involved the SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) with 375 nmol/L of the primers listed in Table 1. After centrifugation, reactions involved use of the StepOne device (Applied Biosystem). Data were analysed by using StepOne software. Relative expression was calculated by the  $\Delta\Delta$ CT method and normalized to the reference gene PPIA.

**Immunofluorescence staining of spheroids.** Spheroids were washed with cold PBS (Life Technologies) until the disappearance of Matrigel. Spheroids and explanted plugs were fixed with formaldehyde 3.7% (Sigma Aldrich) overnight at 4°C and washed 3 times with PBS. They were embedded in 4% agarose and cut into 150- $\mu$ m sections by using a VibroSlice (Campden Instruments; Lafayette, IN, USA). Sections were permeabilized and blocked in PBS + 0.2% Triton X100 + 5% serum (horse or donkey) (Sigma) for 30 min at room temperature, then incubated overnight at 4°C with primary antibodies diluted in PBS + 0.2% Triton X100 + 5% serum. The following antibodies were used: anti-CD31 (ref: JC70A, Dako), anti-perilipin A/B (ref: P1873, Sigma), anti-laminin (ref: M3F7, Developmental Studies Hybridoma Bank [DSHB]; University of Iowa, Iowa City, IA, USA), anti-collagen IV (ref: C4, DSHB), and anti- $\alpha$ -SMA (ref: 202M-9, Sigma). Secondary antibodies coupled with Alexa fluorochromes 488, 555, 594, 647 (Life Technologies) were diluted 1:400 in PBS + 0.2% Triton X100 and added to sections for 1.5 hr at room temperature. Sections were then washed 3 times and stained with the nuclear marker DRAQ5 (1:1000; BioStatus; Loughborough, UK) or DAPI 1:10000 for 15 min. To mark adipocyte lipids, sections were incubated with BODIPY 1:1000 (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA) for 30 min before the nuclear marker and

washed 3 times. Sections were observed by Operetta™ screening system (PerkinElmer; Courtaboeuf, France) or by confocal microscopy (Zeiss LSM-780 or Zeiss LSM-510; Zeiss; Oberkochen; Germany). Images were processed by using Fiji (an open-source platform for biological-image analysis<sup>51</sup>) and Imaris software (Bitplane).

**Implantation of spheroids and mice experimentation.** Female NMRI/Nu (nu/nu) mice 6 weeks old were obtained from Elevage Janvier (Le Genest Saint Isle, France). All experiments were performed with 7-week-old mice. Mice were housed in a barrier facility with high-efficiency particulate air-filtered racks. Animals were maintained according to the guidelines of the European Community Council (2010/63/UE) and experimental protocols were approved by the French ethics committee (protocol reference no.: 13/5273/B/02). In order to concentrate the spheroids in a small volume, the matrigel was dissolved in cold PBS. A mixture containing 1.2% methylcellulose (w/v), one-third 10 mg/ml fibrinogen, and one-third EC basal medium at a 1:1:1 ratio supplemented with 1 µg/ml vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor 2 (R&D Systems) was prepared. A total of 25–30 spheroids was resuspended in 200 µl of this mixture<sup>50</sup>. Just before injection in mice, 3 U thrombin and 200 µl Matrigel was added. Recipient mice were anesthetized by isoflurane inhalation and spheroids were injected into their right flank with a large diameter syringe (19G) to avoid damaging spheroids. After 1 or 2 weeks, human-specific lectin (Biotinylated Ulex Europaeus Agglutinin I) or mouse-specific lectin (Rhodamine Griffonia Simplicifolia I; CliniSciences, Nanterre, France) was injected in the retro-orbital vein of recipient mice, and 20 min later, mice were euthanized by cervical dislocation. After plug excision, spheroids showed a round morphology indicating that they were intact after transplantation. Plugs were fixed overnight at 4 °C in 4% paraformaldehyde. To visualize human vasculature, staining was performed with Alexa Fluor 488 streptavidin (Life Technologies).

**Statistical analysis.** Quantitative data are expressed as mean ± SEM. Groups were compared by a one-sample *t* test and a Gaussian distribution-free Wilcoxon matched pairs test otherwise. The statistical significance was set at  $p < 0.05$ . Statistical analysis was performed with Prism 5 (Graphpad™).

## References

1. Simian, M. & Bissell, M. J. Organoids: A historical perspective of thinking in three dimensions. *J Cell Biol* **216**, 31–40 (2017).
2. Chen, C. S., Mrksich, M., Huang, S., Whitesides, G. M. & Ingber, D. E. Geometric control of cell life and death. *Science* **276**, 1425–1428 (1997).
3. Sasai, Y. Next-Generation Regenerative Medicine: Organogenesis from Stem Cells in 3D Culture. *Cell Stem Cell* **12**, 520–530 (2013).
4. Vega, S. L. *et al.* Combinatorial hydrogels with biochemical gradients for screening 3D cellular microenvironments. *Nature Communications* **9**, 614 (2018).
5. Cohen, P. & Spiegelman, B. M. Cell biology of fat storage. *Molecular Biology of the Cell* **27**, 2523–2527 (2016).
6. Pellegrinelli, V., Rouault, C., Veyrie, N., Clement, K. & Lacasa, D. Endothelial cells from visceral adipose tissue disrupt adipocyte functions in a three-dimensional setting: partial rescue by angiopoietin-1. *Diabetes* **63**, 535–549 (2014).
7. Abbott, R. D. *et al.* The Use of Silk as a Scaffold for Mature, Sustainable Unilocular Adipose 3D Tissue Engineered Systems. *Adv Healthc Mater* **5**, 1667–1677 (2016).
8. Abbott, R. D. *et al.* Variability in responses observed in human white adipose tissue models. *J Tissue Eng Regen Med* **12**, 840–847 (2018).
9. Kang, J. H., Gimble, J. M. & Kaplan, D. L. *In vitro* 3D model for human vascularized adipose tissue. *Tissue Eng Part A* **15**, 2227–2236 (2009).
10. Cao, Y. Angiogenesis and vascular functions in modulation of obesity, adipose metabolism, and insulin sensitivity. *Cell Metab* **18**, 478–489 (2013).
11. Han, J. *et al.* The spatiotemporal development of adipose tissue. *Development* **138**, 5027–5037 (2011).
12. Tran, K. V. *et al.* The vascular endothelium of the adipose tissue gives rise to both white and brown fat cells. *Cell Metab* **15**, 222–229 (2012).
13. Long, J. Z. *et al.* A smooth muscle-like origin for beige adipocytes. *Cell Metab* **19**, 810–820 (2014).
14. Volz, A. C., Huber, B. & Kluger, P. J. Adipose-derived stem cell differentiation as a basic tool for vascularized adipose tissue engineering. *Differentiation* **92**, 52–64 (2016).
15. Min, S. Y. *et al.* Human 'brite/beige' adipocytes develop from capillary networks, and their implantation improves metabolic homeostasis in mice. *Nat Med* **22**, 312–318 (2016).
16. Cristancho, A. G. & Lazar, M. A. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 722–734 (2011).
17. Seale, P. *et al.* Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *J Clin Invest* **121**, 96–105 (2011).
18. Wassermann, F. & Mc, D. T. Electron microscopic study of the fine structure of the fat cell as related to function. *Annu Rep Div Biol Med Res Argonne Natl Lab ANL-6264*, 68–80 (1960).
19. Tang, W. *et al.* White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science (New York, N.Y.)* **322**, 583–586 (2008).
20. Hepler, C., Vishvanath, L. & Gupta, R. K. Sorting out adipocyte precursors and their role in physiology and disease. *Genes Dev* **31**, 127–140 (2017).
21. Wittmann, K. *et al.* Engineering vascularized adipose tissue using the stromal-vascular fraction and fibrin hydrogels. *Tissue Eng Part A* **21**, 1343–1353 (2015).
22. Vermette, M. *et al.* Production of a new tissue-engineered adipose substitute from human adipose-derived stromal cells. *Biomaterials* **28**, 2850–2860 (2007).
23. Takebe, T. *et al.* Vascularized and Complex Organ Buds from Diverse Tissues via Mesenchymal Cell-Driven Condensation. *Cell Stem Cell* **16**, 556–565 (2015).
24. Huber, B., Czaja, A. M. & Kluger, P. J. Influence of epidermal growth factor (EGF) and hydrocortisone on the co-culture of mature adipocytes and endothelial cells for vascularized adipose tissue engineering. *Cell Biol Int* **40**, 569–578 (2016).
25. Volz, A. C., Hack, L., Atzinger, F. B. & Kluger, P. J. Completely defined co-culture of adipogenic differentiated ASCs and microvascular endothelial cells. *ALTEX* **35**, 464–476 (2018).
26. Sorrell, J. M., Baber, M. A., Traktuev, D. O., March, K. L. & Caplan, A. I. The creation of an *in vitro* adipose tissue that contains a vascular-adipocyte complex. *Biomaterials* **32**, 9667–9676 (2011).
27. Aubin, K. *et al.* Characterization of *In Vitro* Engineered Human Adipose Tissues: Relevant Adipokine Secretion and Impact of TNF- $\alpha$ . *PLoS ONE* **10**, e0137612 (2015).
28. Elabd, C. *et al.* Human multipotent adipose-derived stem cells differentiate into functional brown adipocytes. *Stem Cells* **27**, 2753–2760 (2009).



29. Crisan, M. *et al.* Purification and long-term culture of multipotent progenitor cells affiliated with the walls of human blood vessels: myoendothelial cells and pericytes. *Methods Cell Biol* **86**, 295–309 (2008).
30. Pittenger, M. F. *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143–147 (1999).
31. Elsen, M. *et al.* BMP4 and BMP7 induce the white-to-brown transition of primary human adipose stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **306**, C431–440 (2014).
32. Boon, M. R. *et al.* BMP7 activates brown adipose tissue and reduces diet-induced obesity only at subthermoneutrality. *PLoS ONE* **8**, e74083 (2013).
33. Maumus, M. *et al.* Native human adipose stromal cells: localization, morphology and phenotype. *Int J Obes (Lond)* **35**, 1141–1153 (2011).
34. Bartelt, A. & Heeren, J. Adipose tissue browning and metabolic health. *Nature Reviews. Endocrinology* **10**, 24–36 (2014).
35. Clevers, H. Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell* **165**, 1586–1597 (2016).
36. Lancaster, M. A. & Knoblich, J. A. Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies. *Science* **345**, 1247125 (2014).
37. Merfeld-Clauss, S., Gollahalli, N., March, K. L. & Traktuev, D. O. Adipose tissue progenitor cells directly interact with endothelial cells to induce vascular network formation. *Tissue Eng Part A* **16**, 2953–2966 (2010).
38. Traktuev, D. O. *et al.* Robust functional vascular network formation *in vivo* by cooperation of adipose progenitor and endothelial cells. *Circ Res* **104**, 1410–1420 (2009).
39. Sanchez-Gurmaches, J. & Guertin, D. A. Adipocyte lineages: tracing back the origins of fat. *Biochim Biophys Acta* **1842**, 340–351 (2014).
40. Klingelhutz, A. J. *et al.* Scaffold-free generation of uniform adipose spheroids for metabolism research and drug discovery. *Sci Rep* **8**, 523 (2018).
41. Yang, J. P. *et al.* Metabolically Active Three-Dimensional Brown Adipose Tissue Engineered from White Adipose-Derived Stem Cells. *Tissue Eng Part A* **23**, 253–262 (2017).
42. Verseijden, F. *et al.* Prevascular structures promote vascularization in engineered human adipose tissue constructs upon implantation. *Cell Transplant* **19**, 1007–1020 (2010).
43. Zhang, K. *et al.* Strategy for constructing vascularized adipose units in poly(l-glutamic acid) hydrogel porous scaffold through inducing *in-situ* formation of ASCs spheroids. *Acta Biomater* **51**, 246–257 (2017).
44. Tseng, H., Daquinag, A. C., Souza, G. R. & Kolonin, M. G. Three-Dimensional Magnetic Levitation Culture System Simulating White Adipose Tissue. *Methods Mol Biol* **1773**, 147–154 (2018).
45. Regan, E. R. & Aird, W. C. Dynamical systems approach to endothelial heterogeneity. *Circ Res* **111**, 110–130 (2012).
46. Leitman, D. C., Fiscus, R. R. & Murad, F. Forskolin, phosphodiesterase inhibitors, and cyclic AMP analogs inhibit proliferation of cultured bovine aortic endothelial cells. *J Cell Physiol* **127**, 237–243 (1986).
47. Sheu, W. H., Ou, H. C., Chou, F. P., Lin, T. M. & Yang, C. H. Rosiglitazone inhibits endothelial proliferation and angiogenesis. *Life Sci* **78**, 1520–1528 (2006).
48. Davison, P. M. & Karasek, M. A. Human dermal microvascular endothelial cells *in vitro*: effect of cyclic AMP on cellular morphology and proliferation rate. *J Cell Physiol* **106**, 253–258 (1981).
49. Honek, J. *et al.* Brown adipose tissue, thermogenesis, angiogenesis: pathophysiological aspects. *Horm Mol Biol Clin Investig* **19**, 5–11 (2014).
50. Laib, A. M. *et al.* Spheroid-based human endothelial cell microvessel formation *in vivo*. *Nat Protoc* **4**, 1202–1215 (2009).
51. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* **9**, 676–682 (2012).

## Acknowledgements

This work was supported by the EFS scientific council (APR 2014), Inserm, CNRS and “Région Occitanie”. The authors thank the Tri-Genotoul and Anexplo-Genotoul (US006/CREFRE, INSERM/Univ. Toulouse; Toulouse, France).

## Author Contributions

J.C., H.L. and P.A. performed some experiments. S.M., I.A., A.C. and F.D. were involved in the study design and conception, completion of experiments, data acquisition, analysis and interpretation, and manuscript preparation. L.C. and L.S. helped in study design. All authors read and approved the final manuscript.

## Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43624-6>.

**Competing Interests:** The authors declare no competing interests.

**Publisher’s note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article’s Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019









Les adipocytes sont les unités fonctionnelles du tissu adipeux (TA). Les adipocytes blancs du TA blanc assurent le stockage et la libération de l'énergie au sein de l'organisme, principalement sous forme d'acides gras<sup>1</sup>. A l'opposé, les adipocytes bruns du TA brun ont une grande capacité à consommer les acides gras par l'activité de la protéine UnCoupling Protein 1 (UCP1)<sup>2</sup>. Enfin, il a été observé des adipocytes UCP1<sup>+</sup> dans le TA blanc, notamment en réponse à une exposition au froid<sup>3</sup>. Ces adipocytes sont appelés adipocytes beiges et sont issus de deux processus : d'une part via l'adipogenèse à partir des cellules souches/stromales mésenchymateuses du TA (ASC), et d'autre part par la conversion des adipocytes blancs en beiges<sup>4</sup>. Ce processus de conversion est réversible, ce qui montre le caractère très plastique de ces cellules. Le but de la thèse a été de caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans les processus d'adipogenèse et de plasticité cellulaire. Pour ce faire, nous avons utilisé des modèles innovants de culture d'ASC humaines et réalisé des expériences *in vivo* chez la souris.

Compte tenu de la localisation péri-vasculaire et péricytaire des ASC *in vivo*<sup>5,6</sup>, nous nous sommes intéressés à l'utilisation du milieu *Endothelial Growth Medium 2* (EGM2) pour leur expansion *in vitro*, comme une alternative aux méthodes de culture Standard (milieu de type Eagle's medium supplémenté en sérum de veau fœtal). Nos travaux ont montré que le TGFβ1 contenu dans le sérum de culture altérait le caractère immature des ASC par leur engagement dans des voies de différenciation de type ostéoblastique, chondroblastique et vasculaire musculaire lisse. Aussi, grâce à sa faible quantité en sérum, et donc en TGFβ1, le milieu EGM2 permet de conserver l'immaturité des ASC en culture ainsi que leurs fortes capacités à se différencier en adipocytes, notamment vers le phénotype beige.

D'autre part, nous montrons que les ASC qui présentaient un fort potentiel à générer des adipocytes beiges sur-exprimaient la protéine SOX2. Nos résultats montrent que l'expression de SOX2 est positivement corrélée d'une part à la formation des adipocytes beiges et d'autre part à l'activation des adipocytes bruns *in vivo* chez la souris exposée au froid. De plus, une étude réalisée *in vitro* chez l'humain par l'utilisation de deux modèles d'ASC, a révélé que la protéine SOX2 était surexprimée lors du processus d'adipogenèse, et ce d'autant plus lorsque les cellules étaient orientées vers une différenciation adipocytaire beige. Ainsi, SOX2 semble être un facteur clé impliqué dans le potentiel de brunissement du TA et la plasticité des adipocytes *in vivo* et *in vitro*.

Cette thèse a donc permis d'une part d'améliorer la compréhension de l'impact des conditions de culture sur la biologie des ASC et d'autre part de mettre en lumière des molécules impliquées dans la plasticité des adipocytes.

---

Adipocytes are the functional units of adipose tissue (AT). Within white AT, white adipocytes contribute to both storage and release of energy within the organism, mainly in the form of fatty acids<sup>1</sup>. On the other hand, brown adipocytes, from brown AT, have a high capacity to consume fatty acids. This results from the activity of the UnCoupling Protein 1 (UCP1)<sup>2</sup>. Finally, UCP1<sup>+</sup> adipocytes have been described in white AT, notably in response to cold exposure<sup>3</sup>. These adipocytes are named beige adipocytes and are generated through two pathways: on one hand via adipogenesis from adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells (ASC), and on the other hand by conversion of white-to-beige adipocytes<sup>4</sup>. Being a reversible process, beige conversion highlights the plasticity of these cells. The aim of the thesis was to characterize the molecular mechanisms involved in both processes, by using culture models of human ASC and *in vivo* mice models.

Given the perivascular and pericyte localization of ASC *in vivo*<sup>5,6</sup>, we investigated the use of *Endothelial Growth Medium 2* (EGM2) for their *in vitro* expansion as an alternative to Standard culture conditions (Eagle's medium supplemented with fetal calf serum). Our results showed that the TGFβ1 contained in serum of culture medium altered the relative immature state of ASC. Indeed, TGFβ1 induces their commitment toward osteoblastic, chondroblastic or vascular smooth muscle lineage. Also, the small amount of serum in EGM2 medium, and thus low TGFβ1 concentration, preserves ASC immaturity in culture, as well as their strong capacities to differentiate into adipocytes, including beige phenotype.

We showed that ASC with high potential to generate beige adipocytes over-expressed SOX2 protein. Our results also showed that expression of SOX2 was positively correlated to both formation of beige adipocytes and to brown adipocytes activation *in vivo* in cold-exposed mice. In addition, using two types of human ASC models *in vitro*, we observed that SOX2 was overexpressed during adipogenesis, and even more when cells were differentiated into beige adipocytes. Thus, SOX2 appears to be a key factor involved in AT browning potential and adipocyte plasticity *in vivo* and *in vitro*.

This thesis has allowed the access to a better understanding of the impact of culture conditions on the biology of ASC and highlighted molecules involved in the plasticity of adipocytes.

- 
1. Duncan, R. E., Ahmadian, M., Jaworski, K., Sarkadi-Nagy, E. & Sul, H. S. Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annu. Rev. Nutr.* **27**, 79–101 (2007).
  2. Cypess, A. M. *et al.* Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N. Engl. J. Med.* **360**, 1509–1517 (2009).
  3. Finlin, B. S. *et al.* Human adipose beiging in response to cold and mirabegron. *JCI Insight* **3**, (2018).
  4. Rosenwald, M., Perdikari, A., Rülicke, T. & Wolfrum, C. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat. Cell Biol.* **15**, 659–667 (2013).
  5. Crisan, M. *et al.* A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* **3**, 301–313 (2008).
  6. Tang, W. *et al.* White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science* **322**, 583–586 (2008).