



**HAL**  
open science

# Formes monogéniques de lipomatose de Launois-Bensaude : étude clinique et moléculaire, et modélisation cellulaire

Émilie Capel

► **To cite this version:**

Émilie Capel. Formes monogéniques de lipomatose de Launois-Bensaude : étude clinique et moléculaire, et modélisation cellulaire. Endocrinologie et métabolisme. Sorbonne Université, 2019. Français. NNT : 2019SORUS501 . tel-02937880

**HAL Id: tel-02937880**

**<https://theses.hal.science/tel-02937880>**

Submitted on 14 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.

## Sorbonne Université

École doctorale de Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

ED 394

*Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA) – INSERM UMR\_S 938 / Equipe du Pr B. Fève*

*« Lipodystrophies, adaptations métaboliques et hormonales, et vieillissement »*

# **Formes monogéniques de lipomatose de Launois-Bensaude : étude clinique et moléculaire, et modélisation cellulaire**

Par Emilie CAPEL

Thèse de doctorat de Sciences

Dirigée par les Pr Corinne VIGOUROUX et le Dr Isabelle JÉRU

Présentée et soutenue publiquement le 18 décembre 2019

Devant un jury composé de :

**Pr Fabrizio ANDREELLI**, PU-PH

Président du jury

**Dr Bénédicte GABORIT**, PU-PH

Rapportrice

**Dr Jocelyne MAGRÉ**, CR

Rapportrice

**Dr Séverine LEDOUX**, MCU-PH

Examinatrice

**Pr Corinne VIGOUROUX**, PU-PH

Directrice de thèse

**Dr Isabelle JÉRU**, MCU-PH

Co-directrice de thèse





## Sorbonne Université

École doctorale de Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

ED 394

*Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA) – INSERM UMR\_S 938 / Equipe du Pr B. Fève*

*« Lipodystrophies, adaptations métaboliques et hormonales, et vieillissement »*

# **Formes monogéniques de lipomatose de Launois-Bensaude : étude clinique et moléculaire, et modélisation cellulaire**

Par Emilie CAPEL

Thèse de doctorat de Sciences

Dirigée par les Pr Corinne VIGOUROUX et le Dr Isabelle JÉRU

Présentée et soutenue publiquement le 18 décembre 2019

Devant un jury composé de :

**Pr Fabrizio ANDREELLI**, PU-PH

Président du jury

**Dr Bénédicte GABORIT**, PU-PH

Rapportrice

**Dr Jocelyne MAGRÉ**, CR

Rapportrice

**Dr Séverine LEDOUX**, MCU-PH

Examinatrice

**Pr Corinne VIGOUROUX**, PU-PH

Directrice de thèse

**Dr Isabelle JÉRU**, MCU-PH

Co-directrice de thèse



## **Formes monogéniques de lipomatose de Launois-Bensaude : étude clinique et moléculaire, et modélisation cellulaire**

### **RESUME**

Ce travail initié en lien avec le centre de référence des Pathologies Rares de la Résistance à l'Insuline et de l'Insulino-Sensibilité, s'intéresse à l'étude de la physiopathologie de formes rares de syndromes lipodystrophiques. Parmi ceux-ci, la lipomatose de Launois-Bensaude (LLB) est caractérisée par la présence de masses lipomateuses associées à des troubles métaboliques. Nous avons investigué la plus grande cohorte de patients atteints de LLB due au variant p.Arg707Trp du gène *MFN2*, codant la mitofusine 2, une protéine de la fusion mitochondriale. Nous avons également étudié une patiente présentant des symptômes compatibles avec une LLB porteuse d'un nouveau variant p.Glu943Glyfs\*22 de *LIPE*, codant la lipase hormono-sensible, enzyme-clé de la lipolyse adipocytaire. Les caractéristiques de ces patients porteurs de variants de *MFN2* et *LIPE* sur le plan clinico-biologique et tissulaire, permettent de mieux définir les particularités de la LLB au sein des syndromes lipodystrophiques. Nous avons isolé les cellules souches adipocytaires (ASC) des lipomes et utilisé ce modèle pour évaluer le retentissement des variants sur la différenciation et les fonctions adipocytaires. Les études morphologiques (microscopie optique et électronique) et fonctionnelles (immuno-histochimie, expression génique et protéique, lipolyse et respiration mitochondriale) des lipomes et/ou des ASC, montrent des altérations adipocytaires multiples avec un phénotype thermogénique des adipocytes LLB-*MFN2*. La lipodystrophie associée à *MFN2* pourrait provenir d'une altération de la balance de différenciation adipocytaire blanche/beige.

*Mots-clés : Lipodystrophie - Lipomatose de Launois-Bensaude - Mitofusine 2 - Lipase hormono-sensible - Cellules souches adipocytaires - Mitochondrie*

## **Monogenic forms of multiple symmetric lipomatosis: clinical and molecular study, and cell modelling**

### **ABSTRACT**

This work, initiated in cooperation with the rare diseases reference center 'Pathologies de la Résistance à l'Insuline et de l'Insulino-Sensibilité', focuses on the pathophysiology of rare lipodystrophic syndromes. Among them, Launois-Bensaude lipomatosis, also called multiple symmetric lipomatosis (MSL), is characterized by upper-body lipomatous masses and frequent metabolic alterations. We have investigated the largest reported series of patients with MSL due to the *MFN2* p.Arg707Trp variant. *MFN2* encodes mitofusin 2, a protein involved in mitochondrial fusion. Additionally, a patient with clinical symptoms consistent with MSL, harboring a new p. Glu943Glyfs\*22 variant of *LIPE*, encoding hormone-sensitive lipase, a key enzyme in the lipolysis pathway, has also been studied. The clinical, biological and adipose tissue characteristics of patients carrying *MFN2* and *LIPE* variants, allow for a better definition of MSL within the lipodystrophic syndromes. We have isolated adipose-derived stem cells (ASC) from lipomas and used this cellular model to assess the impact of variants on adipocyte differentiation and functions. Morphological (optic and electronic microscopy) and functional studies (immunohistochemistry, gene and protein expression, lipolysis, and mitochondrial respiration) on pseudo-lipomas and/or on ASC show numerous adipose dysfunctions and highlight the thermogenic phenotype of adipocytes from *MFN2*-MSL patients. This *MFN2*-related lipodystrophy could result from a misbalance of white and beige adipocyte differentiation.

*Keywords: Lipodystrophy - Multiple symmetric lipomatosis - Mitofusin 2 - Hormone-sensitive lipase - Adipose-derived stem cells - Mitochondria*



# Remerciements

---

*En premier lieu, je tiens à remercier tous les membres du jury qui ont accepté spontanément et avec enthousiasme de participer à l'évaluation de mon travail de thèse. Tout d'abord, le [Pr Fabrizio Andreelli](#) qui me fait l'honneur de la présider. J'adresse mes sincères remerciements à mes rapportrices, le [Dr Bénédicte Gaborit](#) et le [Dr Jocelyne Magré](#), pour l'intérêt qu'elles ont porté à ce travail et pour avoir consacré de leur temps à la lecture et l'évaluation de ce manuscrit. Je remercie en particulier le [Dr Séverine Ledoux](#) pour avoir suivi année après année l'évolution de mes recherches lors de mes comités de suivi de thèse et d'avoir accepté de prendre part à ce jury.*

*Je tiens à remercier chaleureusement le [Pr Jacqueline Capeau](#) qui m'a accueillie il y a de ça maintenant un peu plus d'une décennie dans son équipe « Lipodystrophies génétiques et acquises » du jeune Centre de Recherche Saint-Antoine qu'elle a fédéré et dirigé. Je la remercie d'avoir accordé sa confiance à une toute jeune diplômée de M2 qui brodait à ses heures perdues.*

*L'ensemble de ce travail a été co-dirigé par le [Pr Corinne Vigouroux](#) et le [Dr Isabelle Jérù](#). Je vous suis infiniment reconnaissante de m'avoir suivie dans ce projet avant tout personnel mais aussi professionnel, et de m'avoir proposé un sujet de thèse le moment venu. Un grand merci à vous deux pour m'avoir épaulée, soutenue et encouragée durant ces trois années de thèses. Même après presque dix années dans le laboratoire, j'ai encore beaucoup appris à vos côtés et toujours avec implication, gentillesse et bienveillance.*

*Je souhaite également remercier le [Pr Bruno Fève](#), chef de notre équipe, d'avoir accepté que je ne me consacre qu'à une seule thématique pendant ces quelques mois à l'heure où les ITA sont une monnaie rare et précieuse.*

*Un IMMENSE merci à [Martine Auclair](#), ma maman de labo. Elle n'a qu'un fils dans la vie mais elle a énormément de filles et fils adoptifs de labo ! Et je suis fière d'en faire partie (enfin je l'espère 😊). Merci de m'avoir initiée à des techniques que je ne connaissais pas ou ne maîtrisais pas depuis plus de dix ans. Merci de m'avoir fait confiance, de m'avoir donné des responsabilités au sein de l'équipe et de m'avoir fait découvrir le fonctionnement du CRSA. Et surtout merci d'égayer nos déjeuners avec des sujets très riches et variés, et pour tes bons gâteaux avec au top du top celui au citron ! Je n'ose même pas imaginer en 2021 🙏, tu vas devoir venir au 27 rue de Chaligny au moins deux midis par semaine !*

*Une Martine peut en cacher une autre, alors je remercie également le [Dr Martine Caron-Debarle](#) de m'avoir chaleureusement accueillie à mon arrivée et d'avoir remis au goût du jour cette décision de faire une thèse et qui maintenant profite pleinement de sa retraite.*

À [Jennifer Gorwood](#) et au [Dr Héroïse Dalle](#) mes co-thésardes ou presque. Bien qu'une génération nous sépare (oui oui, je suis la dinosaure des thésardes de l'équipe ;-)), vous faites partie de mes références et quelles références ! Toutes mes félicitations Dr **Héroïse** Dalle et bon courage pour cette dernière année Jennifer. Si je peux t'aider n'hésite pas !

À [Matthieu Mantecon](#) (encore avec nous dans un autre [sous-groupe](#)), au [Dr Anne-Claire Guénantin](#) et au [Dr Nolwenn Briand](#), de l'ancien groupe iPS. Au total quatre chouettes années dans un autre univers fantastique qu'est celui des cellules souches. La cellule iPS est exigeante et quelquefois capricieuse mais quels beaux projets aboutis juste au début de ma thèse. Un grand merci à Jacqueline et Corinne de m'avoir fait confiance et donné l'opportunité de me former à ces techniques spécifiques pour les développer au laboratoire avec nos deux post-doc bretonnes maintenant expatriées.

Merci à [Camille Sollier](#), brillante et agréable étudiante en M2 et médecin. Tu as été d'une aide précieuse pour faire avancer une partie de ce projet. Même si tu n'étais pas familière avec la paillasse, tu as su mettre à profit ta curiosité, ta motivation et ta persévérance pour le devenir. Je te souhaite de poursuivre ta carrière comme tu l'entends. La plus belle manip est en toi, prends soin de toi et je te souhaite de belles aventures. Au plaisir de te revoir à Saint-Antoine.

Merci à [Yves Chrétien](#) pour ta bienveillance, ta pédagogie pour la maîtrise des outils informatiques et aussi ta disponibilité dans des moments critiques. Photoshop et Illustrator ne sont plus des gros mots ! Merci également au [Dr Jean-Louis Delaunay](#) pour tes quelques / nombreux coups de mains techniques ou mécaniques et ta bonne humeur.

Un merci tout particulier à [Marie Garcia](#), qui a rejoint son sud natal au début de ma thèse mais qui a été une collègue hors pair, dynamique, drôle et impliquée pendant les six années passées dans l'équipe.

J'ai une pensée affectueuse pour [Betty Jacquin](#), [Martine Mergey](#) et [Marie-José Blivet Van-Eggelpoel](#) qui m'ont accueillie à bras ouverts dans les équipes Capeau/Housset et qui profitent depuis quelques années de leurs retraites grandement méritées.

Merci à tous les autres membres de l'équipe anciens comme présents : Dr Camille Vatier, Dr Véronique Béréziat, Dr Claire Lagathu, Dr Marthe Moldes, Dr Bénédicte Antoine, Dr Emilie Courty, Dr Alexandra Grosfeld, Dr Nathalie di Clemente, Dr Chrystèle Racine, Dr Carine Beaupère (qui a soutenu sa thèse peu de temps avant que je ne débute la mienne, qui m'encourageait dans ses remerciements et qui est de retour au labo depuis peu, la boucle est bouclée !), Dr Olivier Lascols, Dr Guillaume Bidault, Dr Caroline Le Dour, Dr Chloé Lefèvre, Dr Ghislaine Guillemain, Dr Bertrand Blondeau, Arnaud Noisette, Adeline Muscat, Karine Poussin et Natacha Roblot. Je souhaite bon courage à Camille Bourgneuf et Alexandrine Liboz qui franchiront le cap de la soutenance avec brio j'en suis sûre.

Merci également à la bienveillance des personnels du CRSA que je côtoie dans les instances du centre ou pour des projets notamment [Sylvie Dumont](#), [Fatiha Merabtène](#) et [Brigitte Solhonne](#) pour la plateforme anapath et [Romain Morichon](#) pour la plateforme imagerie.

Une pensée toute particulière à la [team Poudlargenne 2018](#) alias [Jennifer Gorwood](#), [Dr Pauline Bardin](#) !, [Camille Bourgneuf](#), [Marion Millerand](#), [Indira Toillon](#) et le célèbre Titou aka [Grégoire Stym-Popper](#). Si on m'avait dit que j'aurai l'honneur de faire partie de cette belle brochette de membres du comité organisateur des doctorants pour le séminaire annuel du CRSA, je n'y aurai pas cru. Un gros merci à vous toutes et tous et en particulier à Jennifer qui m'a poussée à vous rejoindre. Sans quoi j'aurai raté cette belle aventure. Vous êtes talentueux !

Merci aux [patients](#) sans quoi cette étude n'aurait pas été possible. Par leur volonté de participer aux travaux de recherche, petit à petit nous arriverons à améliorer leur confort de vie.

Enfin à toute ma [famille](#) et [amis](#), qui m'ont soutenue et encouragée pendant ces trois années. Merci sincèrement à toutes et tous.

Un immense, chaleureux, grand et tendre MERCI à toi [Julien](#) mais aussi mes filles [Laurenn](#) et [Flavie](#) pour ces derniers mois à me soutenir, ~~me supporter~~, me soulager au quotidien pour que je puisse mener à bien cette fameuse thèse. Concilier thèse et vie de maman n'est pas chose facile, mais j'y suis arrivée aussi grâce à vous. Quelle chance j'ai de vous avoir ! Cette thèse c'est un peu la vôtre aussi. 2020 sera plus cool... quoique... après les travaux de recherche il y a les travaux de bricolage ;-) !



# Sommaire

---

Remerciements .....	i
Abréviations principales .....	vi
Table des illustrations et tableaux .....	ix
Avant-propos .....	1
Introduction .....	3
<b>Chapitre I : Physiologie du tissu adipeux.....</b>	<b>3</b>
A. Composition du tissu adipeux .....	4
1. Hétérogénéité cellulaire .....	4
2. Plasticité du tissu adipeux .....	7
B. Structure et fonctions métaboliques des tissus adipeux .....	10
1. Le tissu adipeux blanc.....	10
2. Le tissu adipeux brun.....	24
3. Le tissu adipeux beige .....	30
C. Fonction sécrétoire du tissu adipeux .....	31
1. La leptine .....	32
2. L'adiponectine .....	33
3. Une des <i>brown</i> adipokines ou batokines : <i>Fibroblaste Growth Factor-21</i> (FGF21) .	34
D. Le processus de différenciation adipocytaire ou adipogenèse : de la cellule souche à l'adipocyte mature .....	36
1. La détermination .....	36
2. La différenciation adipocytaire.....	37
3. Les principaux facteurs de transcription .....	38
E. La cellule souche adipocytaire adulte humaine ou Adipose-derived Stem Cell (ASC) : un nouveau modèle d'étude physiopathologique .....	42
<b>Chapitre II : Les syndromes lipodystrophiques et les lipomatoses : éléments de physiopathologie.....</b>	<b>45</b>
A. Les syndromes lipodystrophiques.....	45
1. Les lipodystrophies acquises : généralisées et partielles .....	49
2. Les lipodystrophies génétiques : généralisées ou CGL et partielles ou FPLD .....	50
B. La lipomatose de Launois-Bensaude .....	54
1. Généralités .....	54
2. Les différentes étiologies de la maladie .....	54
<b>Chapitre III : La mitofusine 2, une protéine clé de la fusion mitochondriale</b>	<b>56</b>
A. Structure et rôle au sein de la mitochondrie .....	56
B. Les variants pathogènes de <i>MFN2</i> et leur retentissement pathologique .....	59
<b>Chapitre IV : La Lipase Hormono-Sensible.....</b>	<b>64</b>
A. Structure et rôle au sein de l'adipocyte .....	64
B. Les variants pathogènes de <i>LIPE</i> et leur retentissement fonctionnel .....	65
Résultats .....	69

<b>Chapitre I : La lipomatose de Launois-Bensaude due aux variants pathogènes de <i>MFN2</i> – spectre clinique et impact sur le tissu adipeux.....</b>	<b>69</b>
A. Contexte et objectifs de l'étude.....	69
B. Résultats.....	72
C. Conclusion.....	90
<b>Chapitre II : La lipomatose de Launois-Bensaude due aux variants pathogènes de <i>LIPE</i> – spectre clinique et impact sur le tissu adipeux.....</b>	<b>91</b>
A. Contexte et objectifs de l'étude.....	91
B. Résultats.....	92
C. Conclusion.....	101
<b>Chapitre III : Modélisation de la physiopathologie de lipomatose de Launois-Bensaude – utilisation des cellules souches adipocytaires (ASC) issues des patientes LLB-<i>MFN2</i> et LLB-<i>LIPE</i> .....</b>	<b>103</b>
A. Contexte et objectifs de l'étude.....	103
B. Matériel et méthodes .....	104
C. Résultats.....	108
1. Mise au point et validation d'un protocole de différenciation beige.....	108
2. Impact des variants de LLB- <i>MFN2</i> et - <i>LIPE</i> sur la différenciation adipocytaire blanche des ASC <i>in vitro</i> .....	109
3. Impact des variants de LLB- <i>MFN2</i> et - <i>LIPE</i> sur la différenciation adipocytaire beige des ASC <i>in vitro</i> .....	118
D. Conclusion.....	120
<b>Discussion générale / Perspectives .....</b>	<b>122</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>131</b>
<b>Annexe 1.....</b>	<b>157</b>
<b>Annexe 2.....</b>	<b>167</b>

# Abréviations principales

---

<sup>18</sup> F-FDG	<sup>18</sup> F-fluorodésoxyglucose
AC	adénylate cyclase
ACC	acétyl-CoA carboxylase
ACSL	<i>long chain fatty acyl-CoA synthetase</i>
ADIPOQ	adiponectine
ADNc	acide desoxyribonucléique complémentaire
ADNmt	acide desoxyribonucléique mitochondrial
ADP	adénosine diphosphate
AG(L)	acide gras (libre)
AGPAT	<i>1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase</i>
AMP(c)	adénosine monophosphate (cyclique)
ARN	acide ribonucléique
ASC	<i>adipose-derived stem cells</i>
ATGL	<i>adipose triglyceride lipase</i>
ATP	adénosine triphosphate
β-AR	récepteur β-adrénergique
C/EBPα/β/δ	<i>CCAAT/enhancer-binding protein alpha/beta/delta</i>
CGI-58	<i>comparative gene identification 58</i>
CGL	lipodystrophie congénitale généralisée
CITED1	<i>Cbp/p300 interacting transactivator with Glu/Asp rich carboxy-terminal domain 1</i>
CL	citrate lyase
CMT	Charcot-Marie-Tooth
CSM	cellule souche mésenchymateuse
DAG	diacylglycérol
DEXA	<i>dual-energy X-ray absorptiometry</i>
DGAT	diacylglycérol acyl-transférase
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FAS	<i>fatty acid synthase</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FPLD	lipodystrophie partielle familiale de type Dunnigan
FSV	fraction stroma-vasculaire
G3P	glycérol-3-phosphate
GL	gouttelette lipidique
GLUT4	<i>glucose transporter type 4</i>
GPAT	glycérol-3-phosphate acyl transférase
GTP	guanosine triphosphate
HPRT	hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase
IMC	indice de masse corporelle
IRS	<i>insulin receptor substrate</i> / substrat du récepteur de l'insuline
kDa	kilo Dalton
LHS	lipase hormono-sensible
LLB	lipomatose de Launois-Bensaude
LPL	lipoprotéine lipase
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>

MEC	matrice extracellulaire
MERRF	<i>myoclonic epilepsy ragged red fibers</i>
MFN1/2	mitofusine 1/2
MGL	monoglycérade lipase
MME	membrane mitochondriale externe
MMI	membrane mitochondriale interne
MSC	cellule souche mésenchymateuse
MSL	<i>multiple symmetric lipomatosis</i>
Myf5	<i>myogenic factor 5</i>
PDGFR $\alpha/\beta$	<i>platelet derived growth factor receptor alpha/beta</i>
PEPCK-C	phosphoénolpyruvate carboxykinase cytosolique
PGC1 $\alpha$	<i>peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha</i>
PI3K	phosphatidyl-inositol 3-kinase
PKA	protéine kinase A
PLIN1	périlipine-1
PPAR $\gamma$	<i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
PRDM16	<i>PR/SET domain 16</i>
RE	réticulum endoplasmique
RI	récepteur de l'insuline
RXR	récepteur de l'acide 9-cis rétinolque
SMA	<i>smooth muscle actin</i>
SREBP-1c	<i>sterol regulatory element-binding protein-1c</i>
TA	tissu adipeux
TASC	tissu adipeux sous-cutané
TG	triglycérades
TMEM26	protéine transmembranaire 26
TZD	thiazolidinediones
UA	unité arbitraire
UCP1	<i>uncoupling protein 1</i>
VLDL	<i>very low density lipoprotein</i>



# Table des illustrations et tableaux

---

Figure 1 : Composition cellulaire du tissu adipeux.....	4
Figure 2 : Origines développementales et marqueurs des adipocytes blancs, beiges et bruns.....	9
Figure 3 : Localisation des tissus adipeux blancs chez l'Homme.....	11
Figure 4 : Dimorphisme sexuel de la localisation du tissu adipeux blanc.....	12
Figure 5 : Localisation des tissus adipeux blancs sous-cutanés et viscéraux chez l'Homme selon un axe dorso-ventral.....	14
Figure 6 : Morphologie d'un adipocyte du tissu adipeux blanc.....	15
Figure 7 : Les principales voies de signalisation de l'insuline.....	18
Figure 8 : Représentation schématique de la voie de la lipogenèse et de la synthèse de triglycérides	20
Figure 9 : Représentation schématique de la voie de la lipolyse.....	22
Figure 10 : Métabolisme en période de jeûne dans l'adipocyte.....	23
Figure 11 : Localisation du tissu adipeux brun chez l'homme.....	25
Figure 12 : Morphologie d'un adipocyte du tissu adipeux brun.....	26
Figure 13 : Chaîne respiratoire mitochondriale (CRM) et rôle découplant de la protéine UCP1.....	28
Figure 14 : Schéma général de la thermogenèse adaptative dans l'adipocyte brun.....	29
Figure 15 : Principales adipokines secrétées par le tissu adipeux.....	32
Figure 16 : La différenciation adipocytaire, événements cellulaires et moléculaires.....	40
Figure 17 : Hétérogénéité régionale et fonctionnelle du tissu adipeux.....	44
Figure 18 : Le cycle de Randle.....	46
Figure 19 : Hypothèse alternative au cycle de Randle.....	47
Figure 20 : Syndromes lipodystrophiques et conséquences métaboliques.....	48
Figure 21 : Représentation schématique, topologie classique et dimérisation de MFN2.....	57
Figure 22 : Topologie et modèle de fusion mitochondriale selon Mattie et al, 2018.....	58
Figure 23 : Représentation schématique des interactions entre la mitochondrie et le réticulum endoplasmique.....	59
Figure 24 : Atteinte des neurones périphériques au cours de la CMT2A.....	60
Figure 25 : Représentation schématique des variants les plus communs de MFN2 liés à CMT2A.....	61
Figure 26 : Représentation schématique de la lipase hormono-sensible humaine.....	64
Figure 27 : Localisation des trois variants pathogènes de LIPE publiés à ce jour.....	65
Figure 40 : Retentissement adipocytaire des variants pathogènes de MFN2 p.Arg707Trp et de LIPE p.Glu943Glyfs*22.....	130
Tableau 1 : Présentation synthétique des caractéristiques cellulaires et des marqueurs moléculaires des adipocytes blancs, beiges et bruns chez l'Homme.....	41



# Avant-propos

---

Le tissu adipeux est un organe essentiel pour deux raisons principales. D'abord quantitativement, puisqu'il représente 15 à 35% du poids total chez l'Homme, cette proportion pouvant s'élever jusqu'à 50% et plus dans les cas d'obésité morbide, et puisqu'il s'agit du réservoir énergétique le plus important de l'organisme. Ensuite, qualitativement, puisqu'on sait aujourd'hui que le tissu adipeux présente de nombreuses capacités fonctionnelles, de type métabolique mais aussi endocrine, sécrétoire, immunitaire, inflammatoire, ainsi que des propriétés de différenciation, d'expansion et de remodelage qui lui confèrent une plasticité importante, longtemps sous-estimée. Le tissu adipeux ou plutôt les tissus adipeux, puisqu'une forte disparité fonctionnelle distingue les différents dépôts adipeux de l'organisme, régulent l'homéostasie générale grâce à cette grande diversité de fonctions.

Les lipodystrophies sont des pathologies affectant le tissu adipeux. Ces maladies se caractérisent par un défaut de développement, de répartition et/ou de fonction du tissu adipeux. Les conséquences métaboliques des lipodystrophies sont, pour la plupart, très similaires à celles retrouvées dans l'obésité androïde, problème de santé mondial. Même si ces deux types de pathologies semblent avoir un phénotype clinique différent, elles partagent de nombreux signes de dysfonction du tissu adipeux. Ainsi l'étude des lipodystrophies permet de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués dans les maladies métaboliques communes. Cela pourrait également permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans ces pathologies.

Dans le chapitre d'introduction, je commencerai par replacer le contexte de notre recherche portant sur le tissu adipeux dysfonctionnel. Je m'intéresserai aux tissus adipeux, leurs structures et leurs fonctions. Dans une deuxième partie je présenterai les éléments principaux de la physiopathologie du groupe hétérogène des lipodystrophies, incluant la lipomatose de Launois-Bensaude dont j'ai étudié plusieurs formes génétiques. Puis je décrirai l'état actuel des connaissances concernant les deux protéines dont les altérations font l'objet de mes travaux de thèse : la mitofusine 2 et la lipase hormono-sensible.

Mes travaux de recherche exposés ensuite visent (i) à décrire le phénotype de patients atteints de deux formes de lipomatose de Launois-Bensaude (LLB) d'origine génétique, (ii) à caractériser les lipomes des patients atteints de LLB associée aux variants homozygotes p.Arg707Trp de *MFN2* et p.Glu943Glyfs\*22 de *LIPE* et (iii) à étudier les effets de ces variants



pathogènes sur la différenciation et les fonctions adipocytaires grâce à l'isolement et à la culture, en conditions de différenciation adipocytaire blanche ou brune, de précurseurs adipocytaires (*adipose-derived stem cells* ou ASC) issus des lipomes des patients.

# Introduction

---

## Chapitre I : Physiologie du tissu adipeux

Le tissu adipeux (TA) a longtemps été négligé au plan scientifique et considéré uniquement comme un organe de stockage passif des graisses. Le TA est en effet le plus important réservoir énergétique du corps qui stocke l'énergie sous forme de triglycérides, et la libère sous la forme d'acides gras circulants en fonction des besoins de l'organisme. Le TA possède également une fonction sécrétoire importante qui a été définie dans un second temps (Zhang *et al.*, 1994). Il devient maintenant évident que le tissu adipeux, ou plutôt les tissus adipeux, agissent en collaboration au sein d'un véritable organe adipeux qui contribue de façon significative à la régulation de l'homéostasie énergétique chez l'Homme.

Deux types principaux de TA ont été identifiés chez les mammifères, le TA blanc et le TA brun, décrits initialement en fonction de leurs caractéristiques morphologiques. Outre une apparence macroscopique différente, ces deux tissus adipeux possèdent également des activités physiologiques distinctes. En effet, le TA brun joue un rôle dans la thermorégulation en produisant de la chaleur à partir de l'oxydation des lipides par la mitochondrie alors que le TA blanc est essentiel dans le stockage des lipides et leur mobilisation en cas de besoin. Dernièrement, un nouveau type d'adipocyte, les adipocytes beiges ou *brites* (pour *brown in white*) ont été décrits. Ces adipocytes, localisés dans le TA blanc, activables et similaires aux adipocytes du TA brun, sont doués d'une activité thermogénique (Ishibashi et Seale, 2010, Petrovic *et al.*, 2010, Vegiopoulos *et al.*, 2010).

Le TA blanc comprend différents dépôts anatomiques localisés dans les territoires sous-cutanés et viscéraux. Cette notion de localisation du TA est importante puisque selon que le TA est sous-cutané ou viscéral, et selon qu'il est localisé à la partie supérieure ou inférieure du corps, son organisation cellulaire, son activité métabolique et sécrétoire vont varier (Karpe et Pinnick, 2015, Van Harmelen *et al.*, 2004, Frayn *et al.*, 2003, Arner, 2001).

Ce premier chapitre s'intéressera à la composition, la structure, les fonctions métaboliques et sécrétoires ainsi qu'au développement des tissus adipeux.

## A. Composition du tissu adipeux

### 1. Hétérogénéité cellulaire

Dans de nombreux tissus, différents types cellulaires interagissent pour maintenir l'homéostasie et assurer les différentes fonctions tissulaires. Le tissu adipeux n'est pas une exception. Histologiquement, c'est un tissu conjonctif vascularisé et innervé composé d'un mince réseau de fibrilles de collagène entourant les cellules adipeuses ou adipocytes, unité cellulaire fonctionnelle de ce tissu. Hormis les adipocytes, d'autres cellules sont également présentes dans ce tissu et constituent la fraction stroma-vasculaire (FSV), que l'on peut facilement isoler des adipocytes matures par digestion à la collagénase et centrifugation douce (Rosen et Spiegelman, 2014). La fraction cellulaire non adipocytaire ou stromale du tissu adipeux est composée d'un ensemble complexe de cellules au sein d'une **matrice extracellulaire** (MEC) dynamique. On peut notamment distinguer des **progéniteurs** et des **précurseurs adipocytaires** (préadipocytes) à différents stades de développement, des cellules du système immunitaire inné, principalement des **macrophages**, et des cellules du système immunitaire adaptatif, principalement des **lymphocytes T**, ainsi que des **cellules endothéliales**, des **cellules musculaires lisses** formant un dense réseau de vaisseaux et de capillaires sanguins du TA, des cellules nerveuses et des **fibroblastes** (Cinti, 2005) (figure 1). Les progéniteurs, qui constituent un modèle cellulaire utilisé dans ce travail, feront l'objet d'un chapitre spécifique.

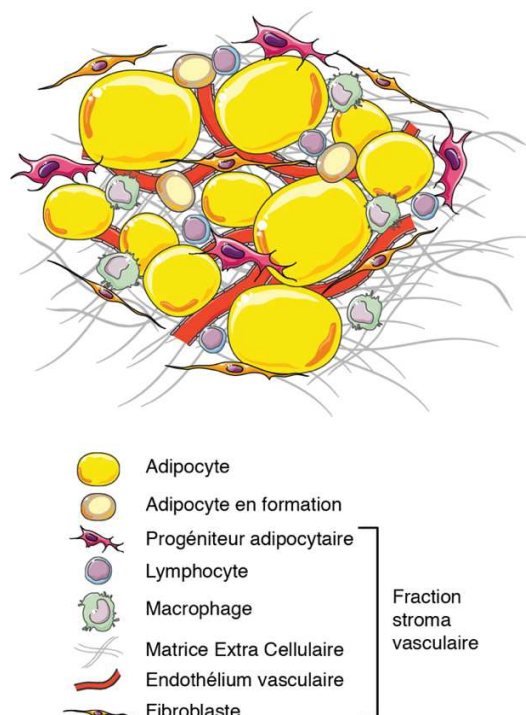


Figure 1 : Composition cellulaire du tissu adipeux (d'après Ouchi *et al.*, 2011)

### *Adipocytes*

Les adipocytes gorgés de lipides sont le type cellulaire majeur du TA. Ils occupent 90% du volume du tissu mais ne représentent que 20 à 40% du contenu cellulaire du tissu adipeux. Chaque gramme de TA contient 1 à 2 millions d'adipocytes pour 4 à 6 millions de cellules de la FSV (Kanneganti et Dixit, 2012). Il existe trois types principaux d'**adipocytes** : les **blancs**, les **bruns** et les **beiges**. La description de leurs caractéristiques distinctives sera développée dans la partie suivante.

### *Cellules endothéliales*

Le TA est très vascularisé ce qui signifie que les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses sont une composante de l'architecture du TA. Les cellules endothéliales contrôlent le passage des nutriments, des solutés et des hormones du flux sanguin vers l'espace extracellulaire et inversement. Morphologiquement, le TA présente un réseau capillaire dense (Bouloumie *et al.*, 2002). Le développement du TA est dépendant de l'angiogénèse. En effet, le traitement de souris obèses par des agents anti-angiogéniques induit une réduction significative de la masse adipeuse en lien avec la diminution de la vascularisation du tissu (Rupnick *et al.*, 2002). La néovascularisation apparaît donc comme un processus crucial pour l'adipogenèse et l'expansion du TA. En effet, les vaisseaux permettent un apport d'oxygène, de nutriments, d'hormones, de cellules immunitaires ainsi que de cellules souches dérivées de la moelle osseuse permettant un remodelage tissulaire adapté aux conditions nutritionnelles et hormonales (pour revue Cao, 2007).

### *Cellules immunitaires*

La présence de cellules immunitaires dans le TA est connue depuis de nombreuses années. Les cellules immunitaires représentent une large proportion de la fraction stroma-vasculaire du TA de sujets sains, leur nombre pouvant varier en fonction de la localisation du tissu (Bornstein *et al.*, 2000). Des anomalies quantitatives et qualitatives de ces cellules immunitaires du TA ont été décrites dans les pathologies du tissu adipeux. Il est ainsi maintenant clairement établi qu'au cours de l'obésité, il existe un profond remodelage tissulaire incluant un remaniement de la composition cellulaire. Plus particulièrement, l'obésité se caractérise par une infiltration macrophagique accrue qui reflète un état chronique d'inflammation de bas grade (Weisberg *et al.*, 2003). L'inflammation du TA joue aussi un rôle important dans la physiopathologie de plusieurs formes de lipodystrophies. Ainsi la lipodystrophie peut s'intégrer dans un tableau de

maladie systémique auto-inflammatoire d'origine génétique (Agarwal *et al.*, 2010). Dans les formes dites « acquises » de lipodystrophies, d'origine auto-immune ou associées aux antirétroviraux du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), mais aussi dans les formes génétiques liées aux variants du gène *LMNA* codant pour les lamines A et C, on peut retrouver une inflammation du TA avec des aspects de *crown-like structures* (structures en forme de couronnes) caractérisés par une infiltration de macrophages autour des adipocytes en involution (Araujo-Vilar *et al.*, 2012, Savage *et al.*, 2009, Lagathu *et al.*, 2007).

Les cellules de l'immunité innée, comme les neutrophiles ou les macrophages, sont impliquées dans la première réponse immunitaire non spécifique mise en jeu en présence d'un organisme pathogène. Les macrophages résidents du TA ont été les premières cellules immunitaires observées dans ce tissu en association avec l'obésité (Weisberg *et al.*, 2003). Des études menées chez la souris sous régime gras, ont montré la présence d'au moins deux populations de macrophages : les macrophages M1 pro-inflammatoires et les macrophages M2 anti-inflammatoires présents en plus forte proportion chez les souris non obèses (Lumeng *et al.*, 2008, Lumeng *et al.*, 2007).

Contrairement à l'immunité innée, le développement d'une immunité adaptative vis-à-vis d'un (ou plusieurs) antigène(s) découle de la reconnaissance de celui (ceux)-ci par des lymphocytes B ou T, dotés de récepteurs spécialisés. Cette interaction entraîne leur prolifération et leur différenciation en lymphocytes B et T effecteurs. La présence de lymphocytes T résidents dans la fraction stroma-vasculaire du TA a été mise en évidence en premier lieu chez la souris non-obèse (Caspar-Bauguil *et al.*, 2005). Puis, l'accumulation de lymphocytes T associés à des macrophages dans des structures en forme de couronne autour des adipocytes (*crown-like structures*) a été clairement mise en évidence dans des modèles d'obésité génétique ou induite par un régime (Wu *et al.*, 2007).

### ***La matrice extracellulaire***

La MEC est un composant majeur du stroma du tissu adipeux qui assure le support structural et les signaux biochimiques pour maintenir un TA fonctionnel. La MEC intervient dans la différenciation adipocytaire, au cours de laquelle sa composition et son abondance sont fortement modifiées. D'une structure riche en fibronectine, sa composition va évoluer vers une structure de type lame basale, composée essentiellement de laminine, collagène IV et d'élastine directement liés à des récepteurs membranaires tels que les intégrines. Des altérations de la MEC du TA ont été observées dans l'obésité (Sun *et al.*, 2013, Divoux et Clement, 2011) mais

aussi dans les syndromes lipodystrophiques de différentes étiologies (Weedon *et al.*, 2013, Gandotra *et al.*, 2011a, Bereziat *et al.*, 2011, Jan *et al.*, 2004). Des cultures de préadipocytes murins, porcins et humains réalisées sur différents supports matriciels ont révélé des différences d'adipogenèse selon le type de matrice utilisé suggérant le rôle essentiel de la composition et de l'organisation de la MEC dans la différenciation adipocytaire (Hemmrich *et al.*, 2005, Hausman *et al.*, 1996, Kuri-Harcuch *et al.*, 1984). Ainsi, l'ensemble de ces données souligne l'importance du remodelage de la MEC durant l'adipogenèse. Grâce à un remodelage dynamique par les métalloprotéinases matricielles (MMP), les tensions avec le cytosquelette sont modifiées en cas d'obésité (Sun *et al.*, 2013). Certains patients atteints d'une forme rare de lipodystrophie génétique associée à un variant du gène *LMNA* présentent une augmentation sérique de la MMP9 et une diminution de MMP3 qui pourrait jouer un rôle dans la maladie (Lombardi *et al.*, 2008).

Les composants de la MEC sont produits par les adipocytes, les préadipocytes et les cellules inflammatoires (Buechler *et al.*, 2015). Les dérégulations affectant la synthèse de la MEC et son *turnover* peuvent conduire à de la fibrose et à des dysfonctions du TA. La fibrose est une lésion du tissu conjonctif définie par l'augmentation des constituants fibrillaires de la MEC dans un tissu ou un organe suite à un processus réparatif. Elle est une composante fréquente des processus inflammatoires mais peut aussi survenir dans d'autres conditions pathologiques (pathologies vasculaires, métaboliques, nutritionnelles, endocriniennes, tumorales...). Elle est le résultat d'un processus physiopathologique complexe et peut déformer profondément la structure du tissu ou de l'organe où elle se développe et entraîner des conséquences fonctionnelles importantes (Wynn et Ramalingam, 2012).

## 2. Plasticité du tissu adipeux

Les adipocytes sont des cellules différenciées qui ne se divisent pas *in vivo*. L'adipogenèse est un processus physiologique très ordonné qui aboutit à la formation des adipocytes. Celle-ci est initiée durant le développement embryonnaire et varie selon les espèces. Chez l'Homme, le TA commence à se développer au cours du second trimestre de grossesse et peut s'accroître après la naissance (Poissonnet *et al.*, 1983, Poissonnet *et al.*, 1984). Les adipocytes sont renouvelés tout au long de la vie et sont hautement régulés que ce soit en nombre, en taille et pour leurs caractéristiques métaboliques. Le TA, contrairement à d'autres tissus, ne se renouvelle pas rapidement. L'évaluation de la demi-vie d'un adipocyte au carbone 14 dans le TA dans la population générale exposée aux essais nucléaires atmosphériques a permis de

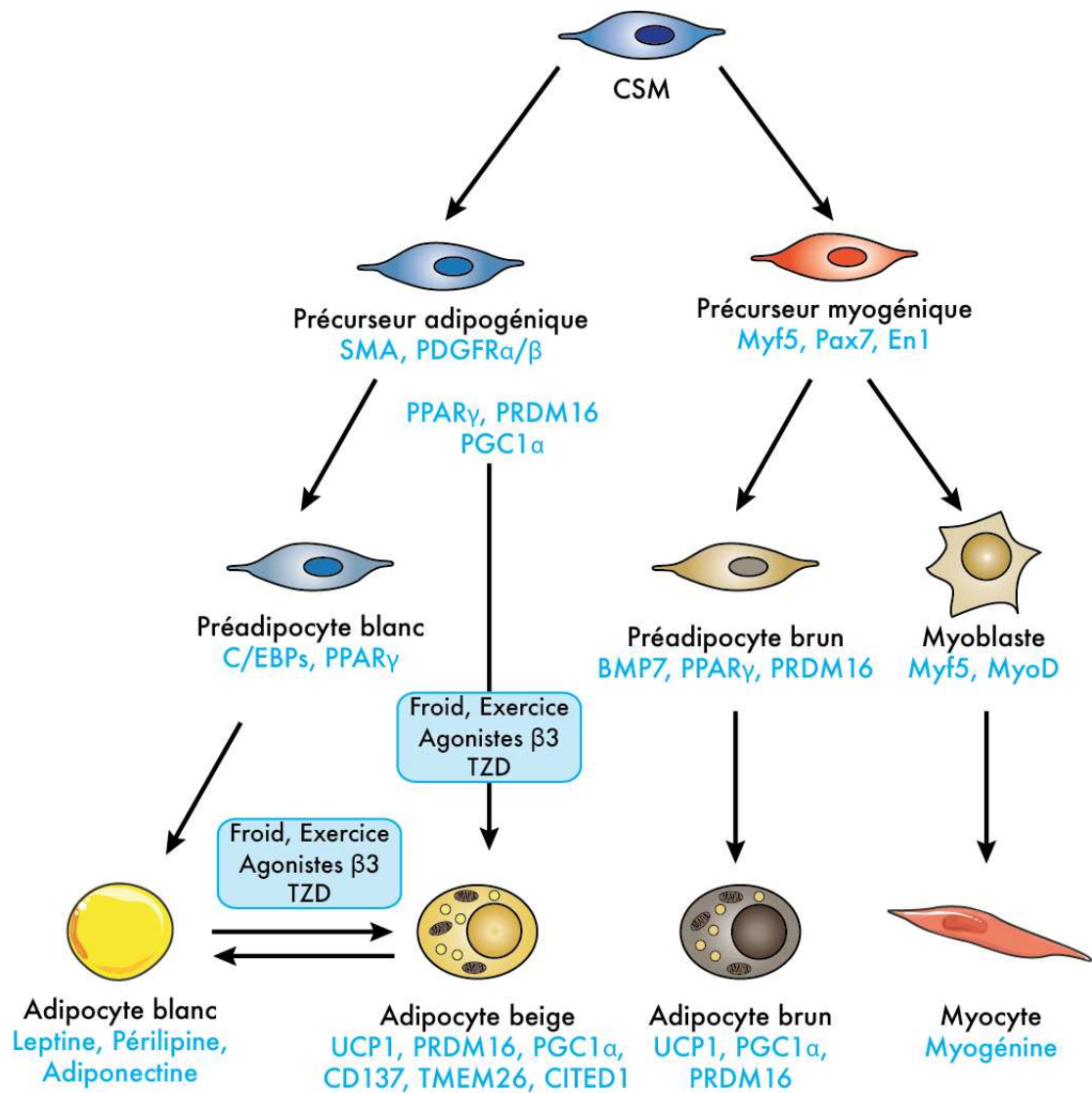
montrer qu'environ 10% des adipocytes se renouvellent chaque année chez l'Homme quels que soient l'âge et l'indice de masse corporelle (IMC) (Spalding *et al.*, 2008). La régénération des adipocytes dépend des capacités de renouvellement d'un pool de progéniteurs adipocytaires issus des **cellules souches mésenchymateuses (CSM)** (Rodeheffer *et al.*, 2008). Ces progéniteurs vont achever les étapes de différenciation pour former des adipocytes matures (figure 2). Cette différenciation vers le lignage préadipocytaire requiert l'action coordonnée d'un réseau complexe de molécules de signalisation produites au sein du TA, et d'un réseau complexe de facteurs de transcription et de cofacteurs (Cawthorn *et al.*, 2012, Lefterova et Lazar, 2009, pour revue Cristancho et Lazar, 2011). Les progéniteurs adipocytaires humains ont été identifiés dans la FSV du TA. Il existe une sous-population de cellules de la FSV qui a les caractéristiques de cellules-souches multipotentes (Zuk *et al.*, 2001). Ces cellules expriment à la fois des gènes d'adipocytes blancs et beiges et une densité accrue de mitochondries (Esteve *et al.*, 2015).

Les adipocytes blancs et beiges dériveraient de **précurseurs mésodermiques** communs aux cellules endothéliales qui exprimeraient les facteurs de l'actine musculaire lisse (SMA) et *platelet derived growth factor receptor alpha/beta* (PDGFR $\alpha/\beta$ ), alors que l'adipocyte brun dériverait de **précurseurs myogéniques** qui exprimeraient le facteur de transcription *myogenic factor 5* (Myf5) (Carriere *et al.*, 2013, Harms et Seale, 2013). L'adipocyte beige pourrait provenir soit de cellules matures pré-existantes non activées, soit d'une différenciation *de novo* et d'une maturation de précurseurs en réponse à un stimulus extérieur comme l'exposition au froid, l'activité physique ou la réponse aux agonistes  $\beta$ -adrénergiques ou aux thiazolidinediones (TZD), agonistes de *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR $\gamma$ ) (Vitali *et al.*, 2012, Himms-Hagen *et al.*, 2000).

Par des approches génomiques à grande échelle et de lignage cellulaire *in vivo*, de nombreuses études ont montré que les différents dépôts adipeux ont une origine développementale distincte. La plupart des adipocytes dérivent du feuillet embryonnaire mésodermique, mais suivant leur localisation anatomique, les adipocytes dérivent d'un sous-compartiment mésodermique particulier (somites, plaques latérales et mésoderme intermédiaire) (Sebo et Rodeheffer, 2019, pour revue Billon et Dani, 2012). De plus, Billon et coll. ont montré que les adipocytes du TA facial proviendraient des crêtes neurales dérivant de l'ectoderme (Billon *et al.*, 2007).

Le développement de lignées cellulaires pluripotentes ou unipotentes a largement contribué à l'identification et à la compréhension des événements cellulaires et moléculaires impliqués dans

la formation des adipocytes, i.e. la différenciation adipocytaire ou adipogenèse (Gregoire *et al.*, 1998). Notons que la majorité de ces modèles cellulaires sont d'origine embryonnaire et murine.



**Figure 2 : Origines développementales et marqueurs des adipocytes blancs, beiges et bruns**

Les cellules progénitrices des adipocytes, appelées cellules souches mésenchymateuses (MSC), sont issues du mésoderme. Les adipocytes bruns possèdent des origines communes avec les cellules musculaires squelettiques et proviennent d'un précurseur bipotent exprimant les marqueurs Myf5, paired-box 7 (Pax7) et engrailed 1 (En1). Les régulateurs coactivateurs PPAR $\gamma$ , PR domain containing 16 (PRDM16) et la protéine morphogénétique osseuse 7 (BMP7) permettent l'orientation de la différenciation en adipocyte brun et limitent celle en myoblaste. Les adipocytes blancs et beiges proviennent de précurseurs n'exprimant pas Myf5. Les adipocytes beiges expriment des marqueurs spécifiques tels que CD137, la protéine transmembranaire Transmembrane protein 26 (TMEM26) et la protéine Cbp/p300 interacting transactivator with Glu/Asp rich carboxy-terminal domain 1 (CITED1). Ils sont activables par certains stimuli dont l'exposition au froid, l'exercice physique, le traitement par les agonistes  $\beta$ -adrénergiques et les thiazolidinediones (TZD). Peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) est essentiel pour la différenciation en adipocyte brun. L'expression d'UCP1 (uncoupling protein 1) est spécifique des adipocytes thermogéniques. D'après Ghaben et Scherer, 2019, Ikeda *et al.*, 2018, Harms et Seale, 2013 et Cristancho et Lazar, 2011.



## B. Structure et fonctions métaboliques des tissus adipeux

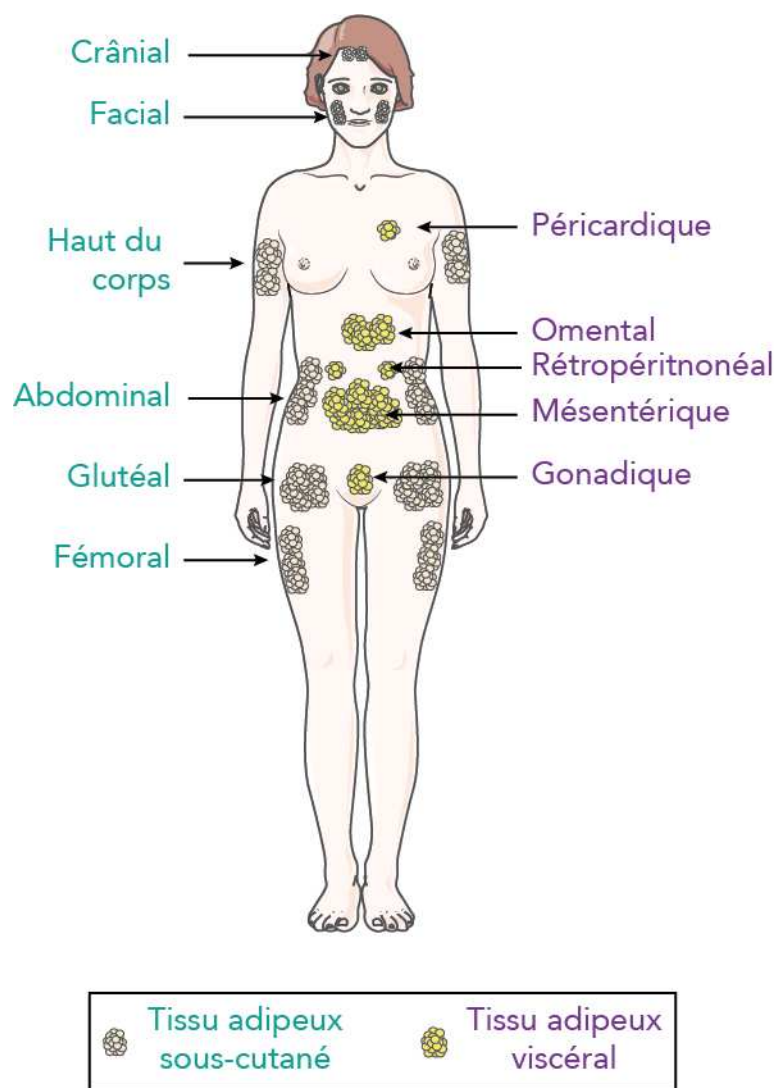
Tous les eucaryotes de la levure à l'Homme sont capables de stocker des calories sous la forme de gouttelettes lipidiques, mais seuls les Vertébrés possèdent des cellules spécialisées, les adipocytes (Ottaviani *et al.*, 2011).

### 1. Le tissu adipeux blanc

De nombreuses études ont montré que le TA blanc est doté de différentes fonctions. En effet, il est maintenant bien connu que ce tissu est non seulement capable de percevoir des signaux hormonaux et nerveux mais aussi qu'il sécrète de nombreuses molécules, appelées adipokines. Ces dernières peuvent agir aux niveaux local et systémique et régulent notamment la prise alimentaire et la réponse à l'insuline. Le TA blanc apparaît alors comme un véritable acteur de la régulation du métabolisme énergétique.

#### *Localisation du tissu adipeux blanc*

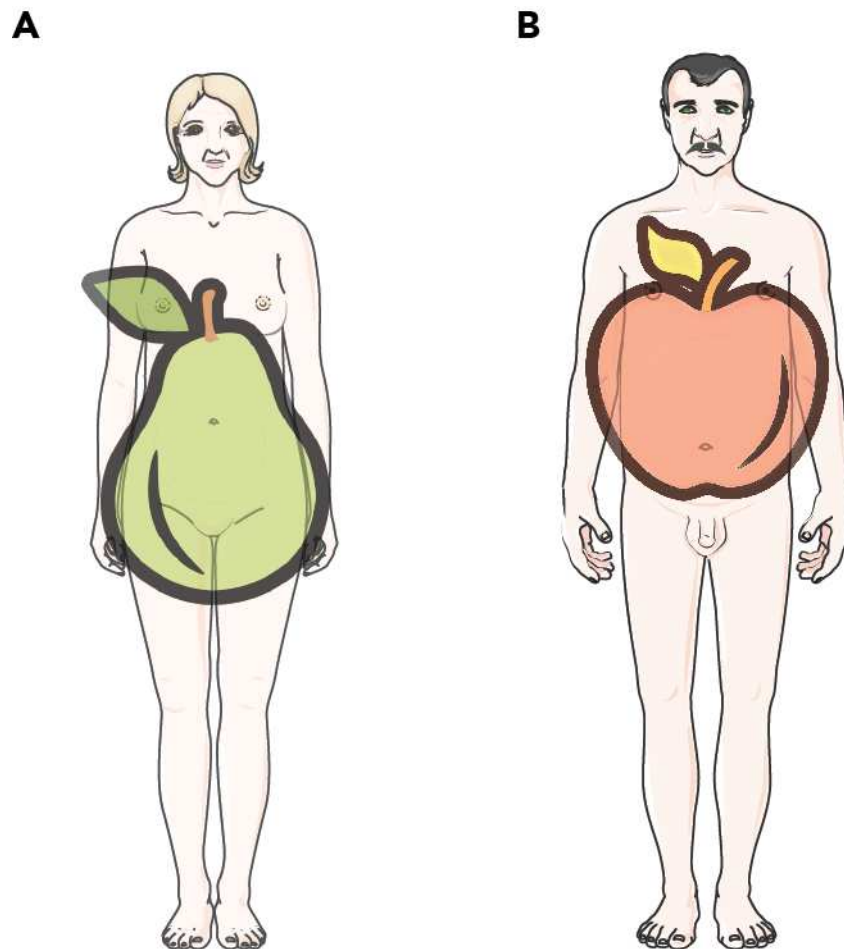
On distingue au moins deux types de TA blanc chez les Mammifères : le **tissu adipeux viscéral**, regroupant les dépôts adipeux localisés autour des organes de la cavité abdominale et le **tissu adipeux sous-cutané**, regroupant les dépôts adipeux situés sous la peau. On trouve également des dépôts adipeux dans la moelle osseuse et au niveau dermique. Chez l'Homme, le TA viscéral comprend les dépôts entourant le péricarde et les organes intra-abdominaux (mésentérique et omental principalement, gonadique et rétropéritonéal dans une moindre mesure) (Shen *et al.*, 2003). Ils sont impliqués dans toutes les activités métaboliques et associés aux comorbidités cardio-métaboliques. Les dépôts sous-cutanés sont quant à eux retrouvés au niveau crânial, facial, abdominal, fémoral et glutéal. Ils jouent un rôle mécanique, d'isolation thermique et de réserve énergétique (Alexander *et al.*, 2015, Kasza *et al.*, 2014) (figure 3).



**Figure 3 : Localisation des tissus adipeux blancs chez l'Homme (adapté de Schoettl *et al.*, 2018)**  
*Répartition anatomique des tissus adipeux blancs chez l'Homme. Les dépôts adipeux sous-cutanés sont indiqués en vert et les dépôts adipeux viscéraux en violet.*

Le TA blanc représente 10 à 20% du poids chez l'homme adulte et 20 à 35% chez la femme adulte. Les femmes ont une adiposité supérieure à celle des hommes. De plus, les hommes ont une adiposité plutôt centrale (TA viscéral et sous-cutané) dite androïde ou en forme de pomme concernant le haut du corps, alors que les femmes développent une adiposité préférentiellement dans la zone glutéo-fémorale du bas du corps (TA sous-cutané) dite gynoïde ou en forme de poire (Geer et Shen, 2009) (figure 4). Les facteurs qui gouvernent ce dimorphisme sexuel ne sont pas très clairs. Plusieurs études ont montré que ces deux répartitions des graisses conféraient un risque cardio-métabolique différent. Une répartition gynoïde du TA est associée à des effets métaboliques bénéfiques et cardio-protecteurs contrairement à la répartition androïde. Les adipocytes du TA viscéral sont métaboliquement plus actifs, plus sensibles à la lipolyse adipocytaire et résistants à l'insuline que ceux du TA glutéo-fémoral. Le TA viscéral s'expand plus volontiers par hypertrophie que par hyperplasie adipocytaire. Il est plus

susceptible à l'inflammation chronique et à la fibrose que le TA sous-cutané (Kahn *et al.*, 2019, Vishvanath et Gupta, 2019, Marcelin *et al.*, 2019, Karpe et Pinnick, 2015, Ibrahim, 2010, Wajchenberg, 2000, Vague, 1956).



**Figure 4 : Dimorphisme sexuel de la localisation du tissu adipeux blanc**  
*Répartition anatomique des tissus adipeux blancs chez la femme de type gynéoïde ou en forme de poire (A) et l'homme de type androïde ou en forme de pomme (B).*

### ***Le tissu adipeux viscéral***

Le TA viscéral ne représente que 5 à 20% du tissu adipeux total. Il n'est pas un lieu de stockage privilégié et sa capacité de prolifération semble faible, contrairement au tissu sous-cutané. Sa morphologie, plus irrégulière, est moins bien organisée que celle du tissu sous-cutané, mais son innervation et sa vascularisation sont plus importantes (figure 5). Il est en outre le siège d'une lipolyse intense, avec un renouvellement très rapide des acides gras qu'il stocke. Les adipocytes viscéraux sont plus résistants à l'action anti-lipolytique de l'insuline. Leurs faibles réserves énergétiques sont utilisées dans les situations de stress métabolique aigu, lorsqu'une disponibilité immédiate d'énergie est nécessaire. La lipolyse du TA viscéral conduit

à la production d'acides gras libres drainés par la veine porte qui vont directement être captés par le foie, favorisant le stockage hépatique des lipides et contribuant à la résistance à l'insuline.

### ***Le tissu adipeux sous-cutané***

Le TA sous-cutané (TASC) est organisé en lobules réguliers et métaboliquement plus stables que le viscéral. Les adipocytes sous-cutanés peuvent être de taille très variée reflétant la très grande plasticité de ce tissu. Leur grande capacité de stockage de graisse sous forme de triglycérides va permettre à l'organisme de gérer les surplus énergétiques (Lotta *et al.*, 2017, Vasan *et al.*, 2018, Ibrahim, 2010).

En cas de balance énergétique positive, le TASC grossit par hypertrophie des adipocytes matures (Cinti, 2005). Dans un deuxième temps, par un phénomène de cause à effet, le TASC s'accroît en augmentant le nombre d'adipocytes : on parle alors d'hyperplasie. Cette capacité à s'étendre pourrait aller jusqu'à atteindre une taille critique qui serait, au moins en partie, génétiquement déterminée et spécifique de chaque dépôt de TA (Virtue et Vidal-Puig, 2010). Les adipocytes ayant acquis leur taille maximale devraient ensuite augmenter en nombre grâce au recrutement de progéniteurs.

Une plus grande capacité de stockage du TA sous-cutané pourrait avoir un effet préventif et limiter l'accumulation de graisse viscérale. Ainsi, des expériences de suralimentation contrôlée chez l'Homme ont montré qu'une capacité d'expansion limitée du TA sous-cutané favorisait le développement de la masse du TA viscéral (Alligier *et al.*, 2013) tandis que le développement hyperplasique du TA sous-cutané glutéo-fémoral a été montré protecteur de l'insulino-résistance et du stockage ectopique des lipides (Karpe et Pinnick, 2015). Une étude a montré que l'hyperplasie est présente de manière prédominante dans la graisse sous-cutanée, alors que l'hypertrophie des cellules est plutôt observée dans les tissus sous-cutanés et viscéraux (Drolet *et al.*, 2008).

Enfin, au sein même du TASC abdominal, on distingue deux territoires, le TASC superficiel et le TASC profond selon leur localisation par rapport à l'aponévrose (figure 5). Les progéniteurs adipocytaires de la FSV du TASC superficiel sont plus sensibles aux stimuli pro-adipogéniques permettant la différenciation de nouveaux adipocytes que celles du TASC profond (Walker *et al.*, 2008). Ces données suggèrent que les origines développementales

distinctes des cellules progénitrices des différents dépôts se traduisent par des propriétés fonctionnelles différentes.

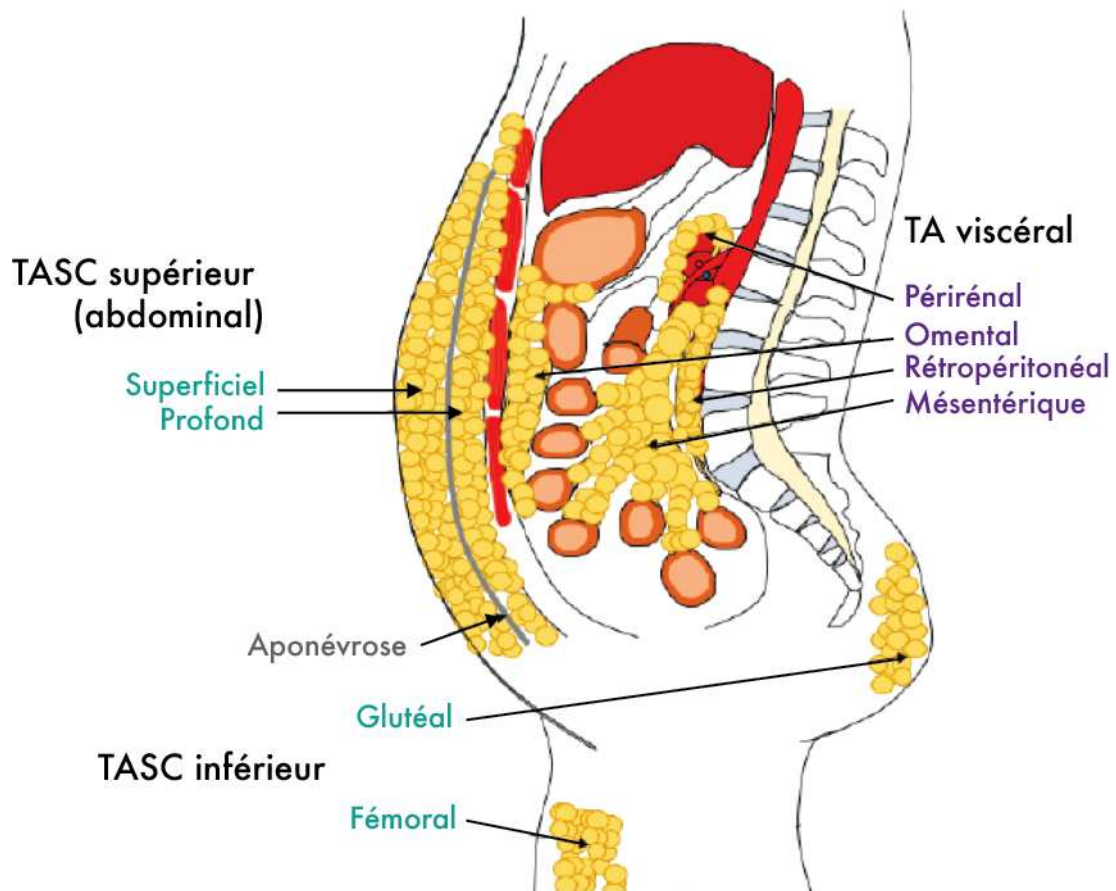
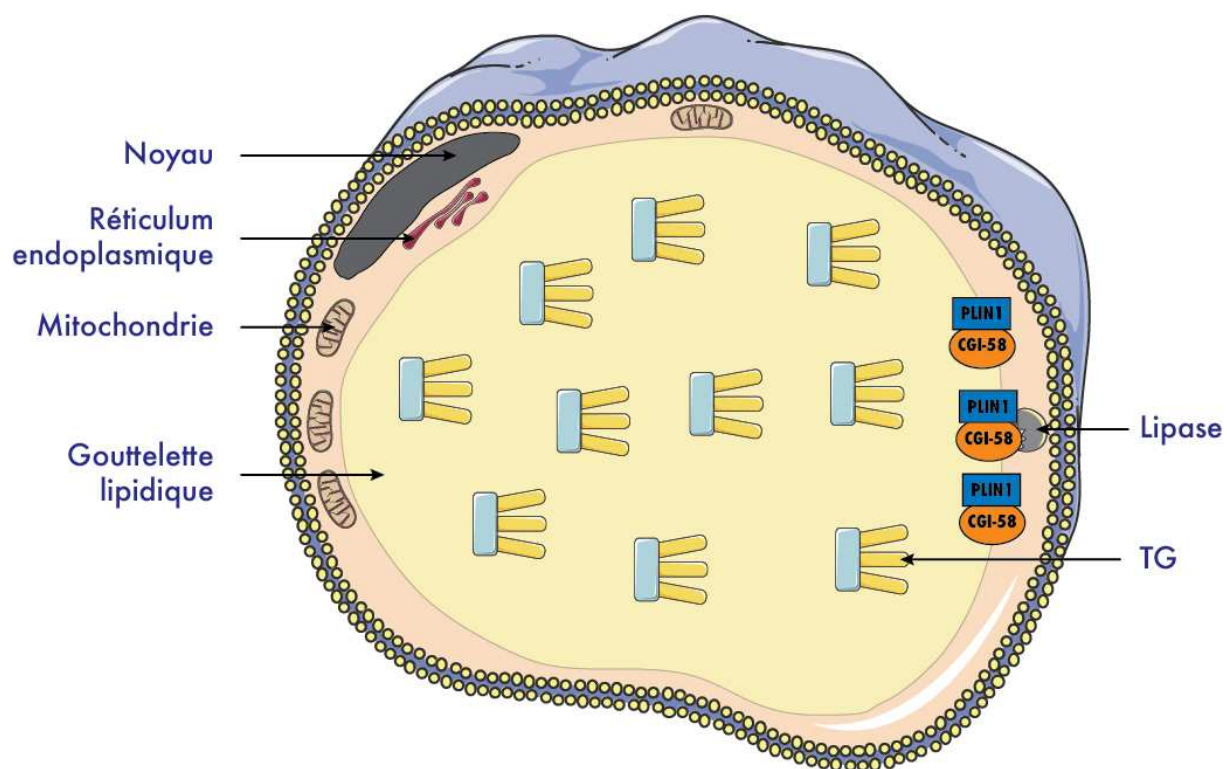


Figure 5 : Localisation des tissus adipeux blancs sous-cutanés et viscéraux chez l'Homme selon un axe dorso-ventral (adapté de Luong *et al.*, 2019)

### *Morphologie de l'adipocyte blanc*

Les adipocytes du TA blanc sont caractérisés chez l'Homme par une **vacuole lipidique unique** volumineuse composée de **triglycérides** (TG), qui occupe la totalité du cytoplasme repoussant ainsi le noyau et les mitochondries en faible quantité en périphérie (figure 6). Leur taille peut varier dans des proportions spectaculaires en fonction des conditions physiologiques et physiopathologiques. Le diamètre moyen d'un adipocyte varie entre 70 et 100  $\mu\text{m}$  et peut atteindre des valeurs supérieures à 200  $\mu\text{m}$  chez le sujet obèse.



**Figure 6 : Morphologie d'un adipocyte du tissu adipeux blanc (d'après Giralt et Villarroya, 2013)**

La périlipine est présente à la surface de la gouttelette lipidique. Par son interaction avec CGI-58 (co-activateur d'ATGL (adipose triglyceride lipase), elle protège de la dégradation des TG par les lipases cytosoliques. PLIN1 : périlipine-1, CGI-58 : comparative gene identification 58, TG : triglycéride.

Longtemps considérées comme des dépôts intracytoplasmiques inertes apparaissant dans les cellules suivant diverses conditions, les **gouttelettes lipidiques** (GL) constituent un réservoir intracellulaire de lipides. Les adipocytes sont le seul type cellulaire spécifiquement adapté au stockage des lipides sans que ceux-ci ne soient toxiques et ne compromettent l'intégrité fonctionnelle de la cellule. La GL, véritable organe cellulaire, est formée d'une monocouche composée de phospholipides entourant un cœur de lipides neutres principalement composé de TG et d'ester de cholestérol et revêtue de protéines appartenant à la famille des *perilipins* (PLIN) (Bartz *et al.*, 2007).

Au début des années 1990, la première protéine associée spécifiquement avec ces gouttelettes de lysats d'adipocytes de rongeurs fut découverte par l'équipe de Londos (Greenberg *et al.*, 1991), et appelée **périlipine**. Elle réalise une fonction primordiale en protégeant le contenu des gouttelettes d'une dégradation par les lipases intracytoplasmiques grâce en particulier à son interaction avec la protéine CGI-58 (*comparative gene identification 58*) (Tansey *et al.*, 2004) (figure 6). Ainsi les souris invalidées pour le gène de la périlipine sont minces et montrent un stockage de lipides limité dû à une lipolyse basale excessive (Tansey *et al.*, 2001). Chez

l'Homme, des variants hétérozygotes du gène *PLIN1* décalant le cadre de lecture sont responsables d'une forme de lipodystrophie familiale partielle dans laquelle la gouttelette lipidique n'est plus protégée de la lipolyse adipocytaire à l'état basal (Jeru *et al.*, 2019, Gandotra *et al.*, 2011a, Gandotra *et al.*, 2011b). La famille des périlipines comprend PLIN1, l'ADRP (*adipocyte differentiation related protein*) ou l'adipophiline ou PLIN2, TIP47 (*tail interacting protein*) ou PLIN3, PLIN4 et Oxpatperilipin 5 ou PLIN5 (Sztalryd et Brasaemle, 2017).

### ***Rôles métaboliques du tissu adipeux blanc***

Le TA occupe une place centrale dans la régulation de la balance énergétique. La régulation du métabolisme dépend essentiellement des demandes énergétiques de l'organisme. Lorsque la balance énergétique est positive (après un repas), l'excès de lipides et/ou de glucides alimentaires est stocké dans l'organisme sous forme de TG dans le TA. En cas de balance énergétique négative (jeûne, exercice physique ou froid par exemple), les TG sont hydrolysés au cours de la lipolyse adipocytaire et les acides gras sont libérés dans la circulation sanguine afin d'être utilisés comme substrat énergétique par les muscles squelettiques, le cœur, le cortex rénal et le foie. Pour cela, les adipocytes possèdent toute la machinerie enzymatique nécessaire au stockage des lipides et à la mobilisation de ces lipides (Fonseca-Alaniz *et al.*, 2007). De par sa morphologie, vacuole lipidique unique qui occupe très largement le volume cellulaire, la surface de la GL est à proximité directe du réticulum endoplasmique (RE) et de la mitochondrie où les TG sont estérifiés ou hydrolysés. Cette régulation stockage-mobilisation des réserves se réalise sous le contrôle de signaux nutritionnels (état nourri ou à jeun) et hormonaux (insuline et catécholamines principalement) auxquels les adipocytes sont capables de répondre très rapidement.

### ***Sensibilité à l'insuline du tissu adipeux***

Au niveau cellulaire, les effets de l'insuline découlent de la fixation spécifique de l'hormone à son récepteur. Le récepteur de l'insuline (RI), de type tyrosine kinase, est exprimé par toutes les cellules de l'organisme, mais surtout dans les trois tissus cibles majeurs que sont le foie, le muscle et le TA. Le RI appartient à la famille des récepteurs de facteur de croissance qui possèdent une activité tyrosine kinase dans leur domaine intracellulaire. Deux isoformes du RI existent, une forme longue (RI-B) et une forme courte (RI-A). L'expression des deux isoformes diffère selon les tissus. L'isoforme B serait d'avantage impliquée dans les effets métaboliques de l'insuline tandis que l'isoforme A serait responsable des effets prolifératifs et serait exprimée spécifiquement dans certaines tumeurs malignes chez l'Homme (Benabou *et al.*, 2019).

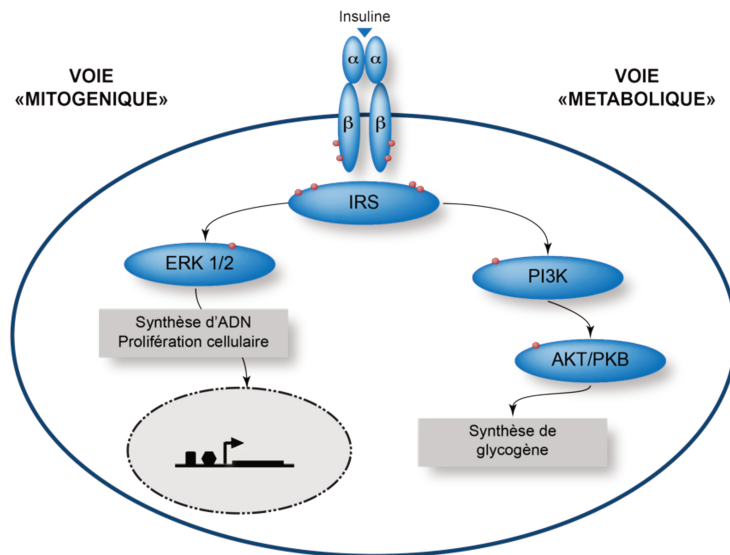
Le RI est formé de deux sous-unités  $\alpha$  extracellulaires reliées à deux sous-unités  $\beta$  transmembranaires. Chaque sous-unité  $\alpha$  possède un domaine de liaison à l'insuline. Le domaine intracellulaire de la sous-unité  $\beta$  contient un domaine catalytique de type tyrosine kinase assurant la liaison et la phosphorylation des substrats IRS (*insulin receptor substrat*) du RI (Jensen et De Meyts, 2009). Malgré une structure similaire à celle du récepteur de l'IGF-1 (*insulin growth factor 1*), l'affinité de l'IGF-1 pour le RI est 100 à 1000 fois plus faible (Kido *et al.*, 2001).

La fixation de l'insuline aux sous-unités  $\alpha$  induit un changement de conformation du RI et un rapprochement des sous-unités  $\beta$ . Dans cette configuration s'opère une autophosphorylation des tyrosines et l'activation (par phosphorylation) des IRS. L'activation des IRS aboutit à l'ancrage d'autres protéines impliquées dans les deux principales voies de la signalisation de l'insuline (figure 7). Il s'agit de la voie métabolique médiée par la PI3K (*phosphatidyl-inositol 3-kinase*) et de la voie de prolifération - différenciation via les MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) dont ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase*).

La voie PI3K est le relai majeur des actions métaboliques de l'insuline. L'activation de Akt/PKB (protéine kinase B) par PI3K induit la translocation à la membrane du transporteur *glucose transporter type 4* (GLUT4), la synthèse de glycogène ou encore la lipogenèse. Akt régule négativement la néoglucogenèse, inhibe la lipolyse adipocytaire et la production hépatique de glucose.

La voie des MAPK permet l'expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et différenciation adipocytaire via la translocation nucléaire de ERK1 et ERK2 activées (phosphorylées).





**Figure 7 : Les principales voies de signalisation de l'insuline (G. Bidault)**

$\alpha$  : sous-unité  $\alpha$  du récepteur de l'insuline (RI),  $\beta$  : sous-unité  $\beta$  du RI, Akt/PKB : protéine kinase B, ERK : extracellular signal-regulated kinase, IRS : protéine substrat du RI.

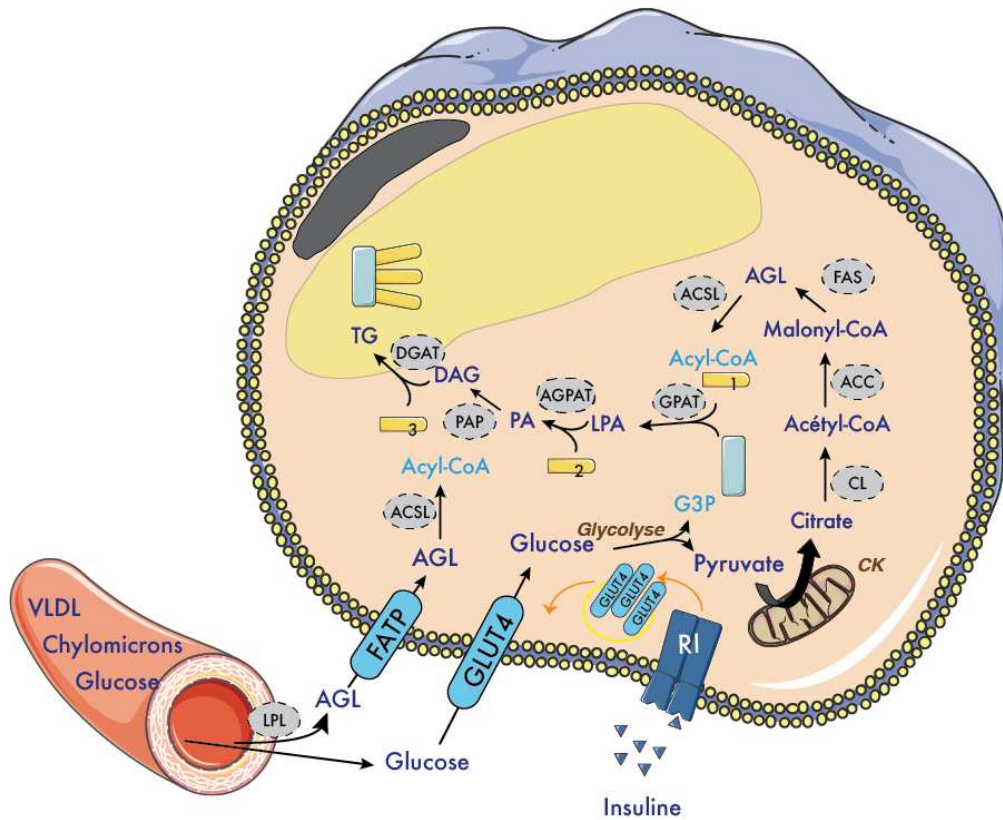
### *Synthèse et stockage des triglycérides*

Les acides gras nécessaires à la synthèse des TG sont obtenus dans l'adipocyte grâce à deux voies métaboliques principales. La première voie, la **lipogénèse** est la synthèse *de novo* d'acides gras à partir d'un substrat non lipidique : le glucose. Chez l'Homme, la lipogénèse est majoritairement **hépatique** et elle n'est qu'**accessoire** dans le **TA** sous stimulation par l'insuline et permet l'expansion de la gouttelette lipidique (Letexier *et al.*, 2003).

Dans le TA et le muscle squelettique, le glucose rentre dans la cellule par diffusion facilitée *via* le transporteur **GLUT4** sensible à l'insuline, localisé dans de petites vésicules microsomales proches de la membrane plasmique. Dans l'adipocyte, la fixation de l'insuline sur son récepteur membranaire spécifique stimule la transcription du gène *GLUT4* et active la translocation des vésicules vers la membrane plasmique. C'est par ce mécanisme que l'insuline stimule l'entrée du glucose dans l'adipocyte. Le glucose est alors métabolisé et entre dans la voie de la **glycolyse** pour aboutir à la synthèse de pyruvate. Le pyruvate entre dans la mitochondrie où il est transformé en **acétyl-CoA** grâce à la pyruvate deshydrogénase (PDH). La condensation de l'acétyl-CoA avec l'oxaloacétate au cours de la première étape du cycle de Krebs permet la formation du citrate. Ce dernier est exporté dans le cytoplasme lorsque les réserves énergétiques cellulaires sont importantes (en situation post-prandiale) puis scindé par la citrate lyase (CL) ce qui permet la libération d'acétyl-CoA. L'acétyl-CoA est ensuite transformé en malonyl-CoA par l'ACC (acétyl-CoA carboxylase) puis en acides gras libres (AGL) par la FAS (*fatty acid synthase*). Les AGL sont ensuite activés en **acyl-CoA** par l'ACSL (*long chain fatty acyl-CoA*

*synthetase*) pour servir à la synthèse des TG. Quatre réactions vont alors se succéder en associant une molécule de **glycérol-3-P** (G3P), qui provient du métabolisme du glucose dans l'adipocyte, à **trois molécules d'acides gras** pour donner une molécule de **triglycéride**. La première étape entraîne une estérification du G3P en acide lysophosphatidique (LPA) par l'action de la GPAT (*glycerol-3-phosphate acyl transferase*) présente au niveau de la membrane mitochondriale et dans le RE (selon son isoforme). L'AGPAT (*1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase*) catalyse ensuite l'estérification du LPA en acide phosphatidique, qui est déphosphorylé par la PAP (*phosphatidic acid phosphatase*) pour former un diacylglycérol (DAG). Enfin, le troisième acyl-CoA est ajouté par la DGAT (diacylglycérol acyl-transférase), essentiellement retrouvée dans le RE, pour former une molécule de TG (figure 8).

La deuxième voie correspond à la capture des AGL issus de l'alimentation. En effet, les TG alimentaires sont transportés dans le sang et circulent sous forme liée aux lipoprotéines, en particuliers les **chylomicrons**, en provenance de l'intestin, et les **VLDL** (*very low density lipoprotein*), en provenance du foie. Sous l'action d'une lipase localisée au niveau de l'endothélium vasculaire du tissu adipeux, la **LPL** (lipoprotéine lipase), l'hydrolyse des TG des lipoprotéines libère des AGL (Beigneux *et al.*, 2007). Ils sont transportés dans les adipocytes soit passivement soit par des transporteurs tels que CD36 et FATP (*fatty acid transport protein*). Ces AGL, tout d'abord complexés à la *fatty acid binding protein 4* (FABP4 ou aP2), sont ensuite activés en acyl-CoA par l'ACSL pour servir à la synthèse des TG par estérification du glycérol-3P synthétisé à partir du glucose, comme décrit ci-dessous (figure 8).



**Figure 8 : Représentation schématique de la voie de la lipogenèse et de la synthèse de triglycérides**

Les sources d'acides gras libres (AGL) pour la synthèse des triglycérides dans l'adipocyte incluent les acides gras de l'alimentation et ceux synthétisés par la lipogenèse de novo dans l'adipocyte (et le foie). Les AGL issus de l'hydrolyse des triglycérides portés par les lipoprotéines circulantes peuvent entrer dans l'adipocyte par les transporteurs FATP. En présence de glucose, l'insuline entraîne la translocation de GLUT4 du cytosol à la membrane plasmique adipocytaire. L'augmentation du flux de glucose conduit via la glycolyse et le cycle de Krebs à une production de citrate, qui est utilisé pour la synthèse d'acide gras dans le cytosol. La synthèse de TG nécessite l'estérification de trois AGL à une molécule de glycérol-3P. Les TG sont synthétisés dans RE puis stockés dans la GL. CL : citrate lyase, ACC : acetyl-CoA carboxylase, FAS : fatty acid synthase, ACSL : long chain fatty acyl-CoA ligase, GPAT : glycerol-3-P acyl transférase, AGPAT : 1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase, PAP : phosphatidic acid phosphatase, DGAT : diacylglycerol acyltransferase, AGL : acides gras libres, LPA : acide lysophosphatidique, PA : acide phosphatidique, DAG : diacylglycérol, TG : triglycéride, VLDL : very low density lipoprotein, LPL : lipoprotein lipase, GLUT4 : transporteur du glucose, FATP : fatty acid transport protein, CK : cycle de Krebs.

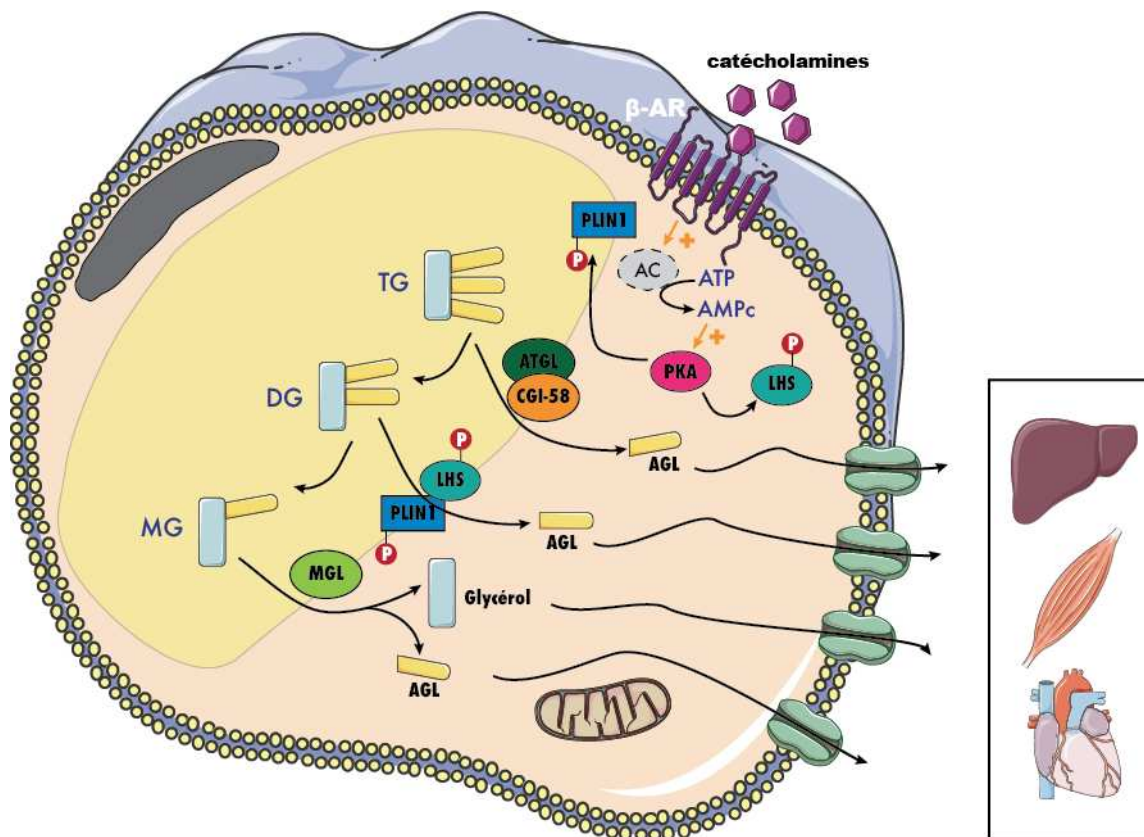
L'insuline est un régulateur majeur de cette fonction de stockage des triglycérides. Elle active la synthèse de la LPL adipocytaire, enzyme limitante de cette voie, et sa translocation à la face interne des capillaires sanguins (McTernan *et al.*, 2002). A l'état nourri, le fort taux d'insuline circulante stimule également la translocation à la membrane plasmique du transporteur de glucose majoritaire de l'adipocyte GLUT4 (Bryant *et al.*, 2002) ainsi que la glycolyse, permettant de fournir le glycérol-3P. Enfin l'insuline stimule fortement la lipogenèse *de novo* en augmentant l'activité et l'expression de la citrate lyase, de l'acétylCoA carboxylase, enzyme clé de la lipogénèse, et de la synthèse des acides gras (FAS) (Park et Kim, 1993).

### ***La lipolyse adipocytaire***

La lipolyse adipocytaire correspond à une réaction **d'hydrolyse** des **triglycérides** de la gouttelette lipidique. Celle-ci conduit à la libération dans le sang d'une part des **acides gras libres**, substrats énergétiques de la majorité des tissus de l'organisme en dehors du cerveau, et d'autre part du **glycérol**, capté par le foie qui l'utilise comme substrat de la néoglucogenèse si besoin. Ce mécanisme est mis en jeu durant les périodes de jeûne ou d'exercice physique et fournit de l'énergie aux tissus comme le foie, le muscle squelettique et le cœur. La lipolyse, qui réduit la taille de la gouttelette lipidique, met en jeu successivement 3 lipases et leurs régulateurs respectifs (Zechner, 2015) : la **triglycéride lipase adipocytaire** (ATGL), la **lipase hormono-sensible** (LHS) et la **monoglycéride lipase** (MGL) (Zechner *et al.*, 2009, Zimmermann *et al.*, 2004) (figure 9).

La surface de la gouttelette lipidique contient des protéines structurales et des enzymes métaboliques spécifiques à l'adipocyte qui répondent à la lipolyse sous l'influence d'hormones en augmentant l'expression et le recrutement de protéines additionnelles requises pour la lipolyse (Brasaemle *et al.*, 2004). L'activité lipolytique est positivement régulée par les **catécholamines** (adrénaline et noradrénaline) et certains agents pharmacologiques comme l'isoprotérénol et la forskoline. Au niveau de l'adipocyte, leur liaison aux récepteurs  $\beta$ -adrénergiques ( $\beta$ -AR) couplés à des protéines G stimule la production d'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) par l'AC (adénylate cyclase) à partir de l'ATP (adénosine triphosphate). L'AMPc active les enzymes lipolytiques *via* la stimulation de la protéine kinase dépendante de l'AMPc ou PKA (protéine kinase A) qui joue un rôle crucial dans la régulation de la lipolyse (Zechner *et al.*, 2005). En particulier, la phosphorylation de la périlipine-1, située sur la paroi de la GL, joue un rôle central dans la régulation de l'hydrolyse des molécules de TG (Takahashi *et al.*, 2013, Dalen *et al.*, 2004).

A l'état basal, la lipolyse est inhibée par l'insuline et par PLIN1 liée à CGI-58, le co-activateur de l'ATGL. Suite à la stimulation  $\beta$ -adrénergique, l'AMPc active la PKA. Cette dernière phosphoryle PLIN1, ce qui induit la libération de CGI-58 et l'activation d'ATGL qui se déplace à la surface de la gouttelette lipidique pour hydrolyser le premier acide gras d'une molécule de TG. En parallèle, la PKA phosphoryle la LHS qui se lie à PLIN1 et hydrolyse le diglycéride résultant en acide gras et monoglycéride. Ce dernier est hydrolysé par la MGL pour libérer le troisième acide gras et la molécule de glycérol. Les acides gras non estérifiés (appelés acides gras libres) et le glycérol sont libérés par voie sanguine et utilisés par les tissus périphériques.



**Figure 9 : Représentation schématique de la voie de la lipolyse (d'après Rutkowski *et al.*, 2015)**  
 Lors de la lipolyse, les TG sont hydrolysés, produisant des acides gras libres (AGL). Par la signalisation  $\beta$ -AR, la PKA phosphoryle LHS et PLIN1, provoquant la libération de CGI-58. ATGL se déplace à la surface de la gouttelette lipidique pour hydrolyser le premier AG d'une molécule de triglycéride. LHS phosphorylée se lie à PLIN1 et hydrolyse le diglycéride formant un monoglycéride, lui-même hydrolysé par la MGL produisant le troisième AG et une molécule de glycérol. Les AGL sont préférentiellement exportés vers le foie, le muscle et le cœur. TG : triglycérides, AGL : acide gras libre, PKA : protéine kinase A, LHS : lipase hormono-sensible, PLIN1 : périlipine-1, CGI-58 : comparative gene identification 58, ATGL : adipose triglyceride lipase, MGL : monoglyceride lipase.

D'autres facteurs ont un effet lipolytique puissant comme le peptide natriurétique atrial (ANP), sécrété par les myocytes des oreillettes du cœur lors de leur distension au cours d'un exercice physique (Morigny *et al.*, 2016). De façon similaire aux catécholamines, la liaison à son récepteur NPR-A (isoforme A du récepteur au peptide natriurétique) induit une élévation de guanosine monophosphate cyclique (GMPc) qui active une protéine kinase GMPc dépendante (Moro *et al.*, 2005), la PKG, impliquée dans la phosphorylation de la périlipine-1, qui active également la LHS (Sengenès *et al.*, 2003).

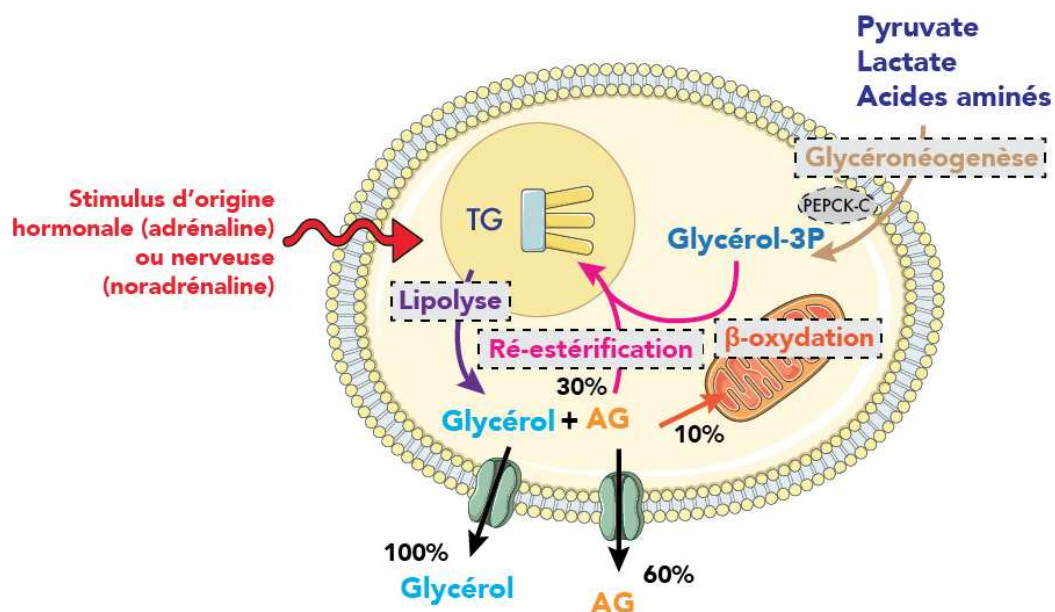
A l'inverse, en condition post-prandiale, l'insuline stimule l'activité phosphodiesterase ce qui conduit à une diminution de l'AMPc intracellulaire, transformé en AMP, et à une inhibition de la lipolyse. Aussi, l'induction de l'expression de NPR-C (isoforme C de NPR) favorise la clairance de l'ANP et joue un rôle anti-lipolytique. Le neuropeptide Y sécrété par le système



nerveux central ou encore les prostaglandines constituent également des facteurs anti-lipolytiques (Morigny *et al.*, 2016).

### **La ré-estérification des acides gras libres**

On s'attend à ce que trois molécules d'acide gras soient libérées pour une seule molécule de glycérol, ce qui n'est jamais le cas. Le rapport acide gras/glycérol libéré est toujours inférieur à trois (Forest *et al.*, 2003, Ballard *et al.*, 1967). Les acides gras provenant de la lipolyse sont en effet en partie ré-estérifiés (30-70%) ou oxydés lors de la  $\beta$ -oxydation dans la mitochondrie. La ré-estérification joue un rôle extrêmement important pour limiter la sortie des acides gras libres de la cellule, alors que le glycérol est libéré en grande partie. Le processus de ré-estérification nécessite la synthèse *de novo* de glycérol-3-phosphate (G3P). La principale source de G3P en période de jeûne se fait à partir de substrats non glucidiques (pyruvate, acides aminés, lactate) *via* une voie physiologique appelée la glycéronéogenèse (Beale *et al.*, 2003, Nye *et al.*, 2008). L'enzyme clé est la phosphoénolpyruvate carboxykinase cytosolique (PEPCK-C). Les acides gras issus de la lipolyse peuvent aussi être oxydés dans la mitochondrie (figure 10). La voie de la  $\beta$ -oxydation des acides gras n'est pas très active dans les adipocytes blancs car les mitochondries y sont peu abondantes, contrairement à ce qui est observé dans l'adipocyte brun qui utilise la  $\beta$ -oxydation mitochondriale des acides gras pour la thermogénèse. Cette oxydation contribue également à limiter la sortie des acides gras dans la circulation dans certaines conditions.



**Figure 10 : Métabolisme en période de jeûne dans l'adipocyte**

La lipolyse permet l'hydrolyse des triglycérides (TG) pour former du glycérol et des acides gras (AG). Le glycérol rejoint le sang par son transporteur aquaporin-7 (AQP7) et les AG empruntent le

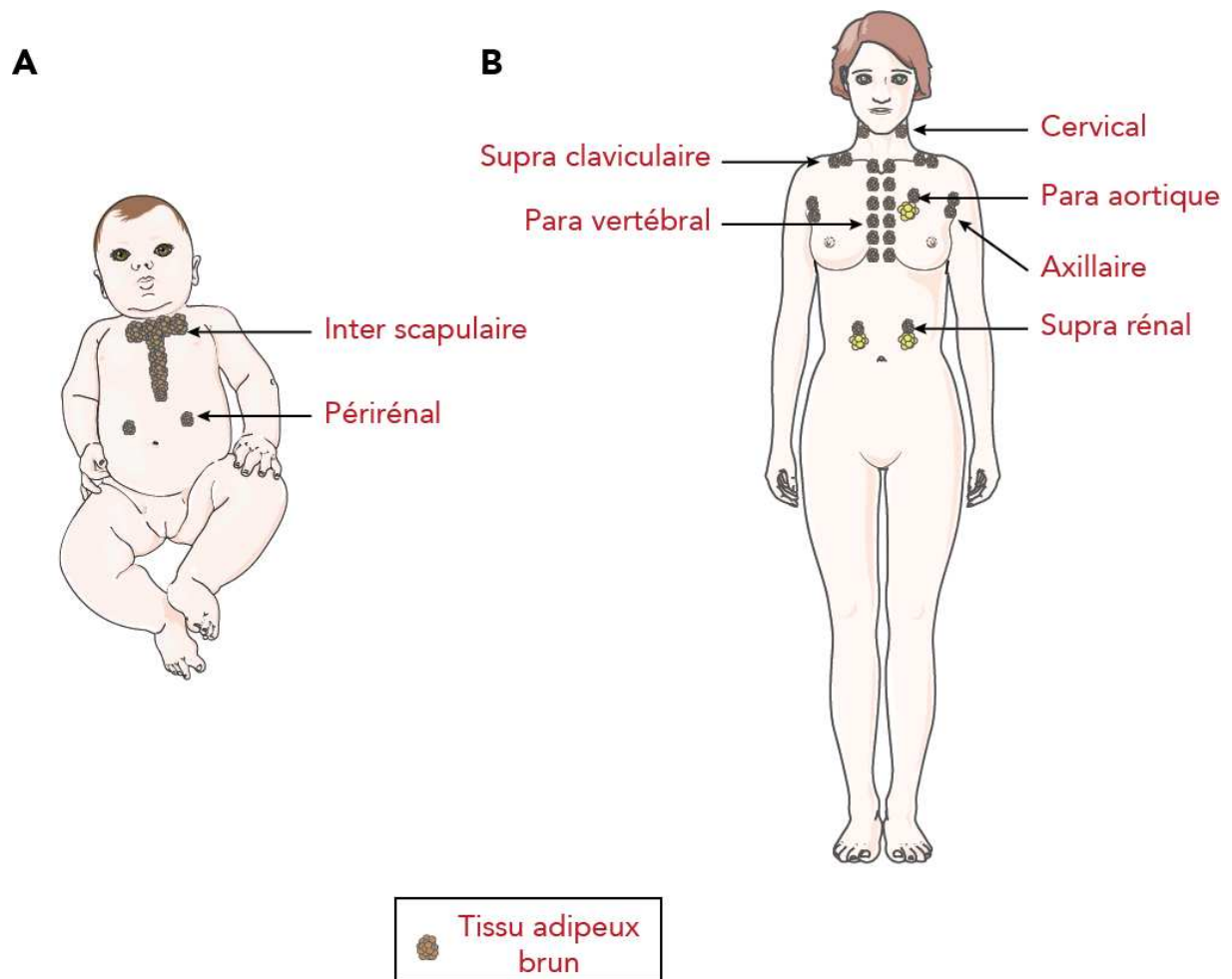
transporteur fatty acid translocase CD36 (FAT CD36). La libération des AG par la lipolyse est finement régulée par la voie de la ré-estérification et potentiellement par leur  $\beta$ -oxydation dans la mitochondrie, qui limitent la sortie des AG. Le processus de ré-estérification nécessite la synthèse de novo de glycérol-3P (G3P). La principale source de G3P en période de jeûne se fait à partir de substrats non glucidiques (pyruvate, acides aminés, lactate) via une voie physiologique appelée la glycéronéogenèse dont l'enzyme clé est la phosphoénolpyruvate carboxykinase cytosolique (PEPCK-C).

## 2. Le tissu adipeux brun

Le TA brun, uniquement présent chez les mammifères, est très développé chez les nouveau-nés et les mammifères hibernants. Chez les mammifères de grande taille comme l'Homme, le volume de ce tissu diminue avec l'âge. Sa fonction principale est la **thermogénèse dite non frissonnante** par opposition à la thermogénèse avec frisson produite par le muscle. Cette fonction thermogénique protège de l'hypothermie et pourrait jouer un rôle pour limiter l'obésité (Cannon et Nedergaard, 2004). Longtemps considéré comme absent chez l'Homme adulte, le développement de nouvelles techniques d'imagerie fonctionnelle au cours des années 2000 a permis de mettre en évidence la présence de dépôts de TA thermogénique fonctionnels (Nedergaard *et al.*, 2007). Le volume et l'activité du TA brun chez l'Homme, évaluées dans plusieurs études, sont inversement corrélés à l'IMC et décroissent avec l'âge (Cypess *et al.*, 2009, Saito *et al.*, 2009, van Marken Lichtenbelt *et al.*, 2009).

### ***Localisation du tissu adipeux brun***

Chez l'Homme, il a été longtemps considéré que le TA brun présent chez le nouveau-né (dans la région interscapulaire, supra- et péri-rénale) régressait totalement après l'enfance et était donc inexistant à l'âge adulte. L'observation des images obtenues par PET-scan (tomographie par émission de positons) suite à l'injection d'un analogue non-hydrolysable du glucose le  $^{18}\text{F}$ -FDG (fluorodésoxyglucose) et après exposition au froid a permis de visualiser chez l'adulte des zones d'activité métabolique élevée correspondant à du TA brun fonctionnel. Le dépôt le plus important est situé en supra-claviculaire tandis que les autres dépôts sont repartis dans plusieurs zones : para-vertébrale, cervicale, axillaire et autour de plusieurs organes tels que le cœur, les reins, ou encore le pancréas (Cypess *et al.*, 2009, van Marken Lichtenbelt *et al.*, 2009, Virtanen *et al.*, 2009, Nedergaard *et al.*, 2007) (figure 11).

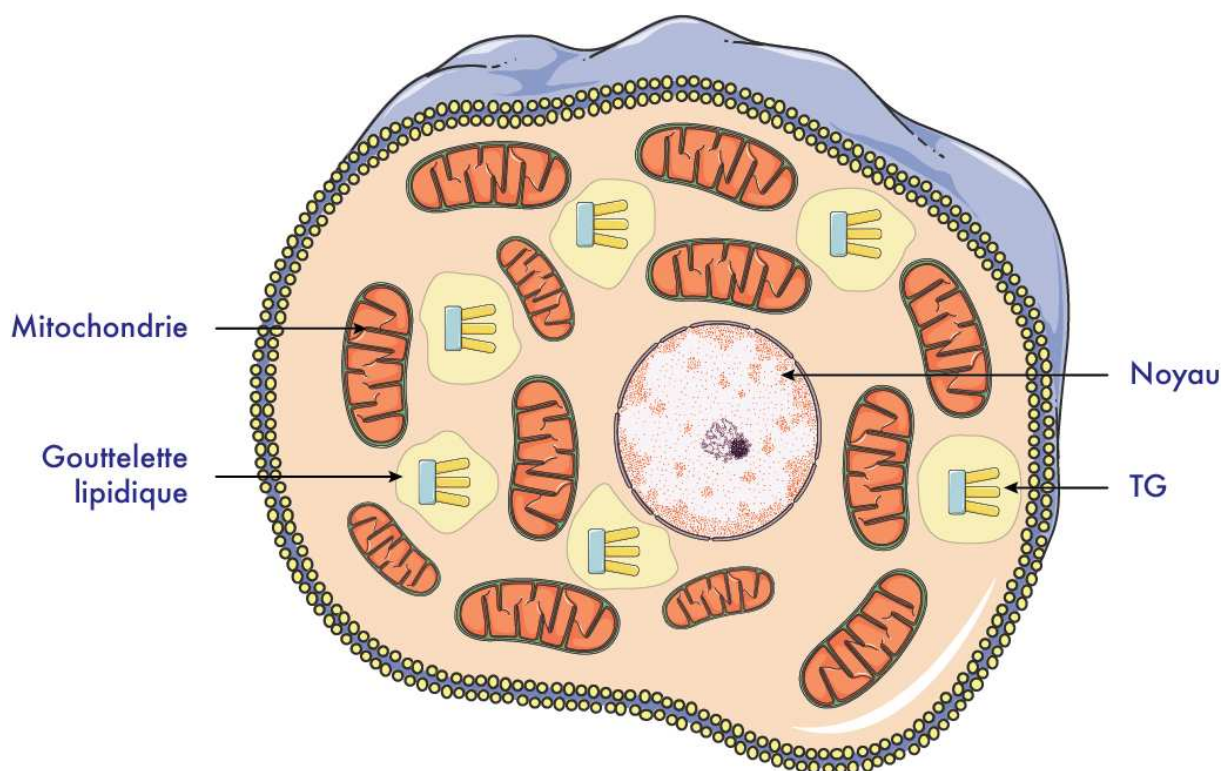


**Figure 11 : Localisation du tissu adipeux brun chez l'homme (adapté de Schoettl *et al.*, 2018)**  
*Répartition anatomique du tissu adipeux brun chez le nouveau-né (A) et l'Homme (B).*

### ***Morphologie de l'adipocyte brun***

Les adipocytes du TA brun ont un diamètre compris entre 25 et 50  $\mu\text{m}$ . Ce sont des cellules multiloculaires qui contiennent plusieurs GL au sein desquelles se déroulent la lipolyse et la lipogénèse. A l'intérieur du cytoplasme, on retrouve également de très nombreuses mitochondries striées qui doivent leur forme aux multiples repliements de leur membrane interne (figure 12). Cette morphologie mitochondriale est à mettre en lien avec les fortes capacités de respiration et d'oxydation des substrats énergétiques nécessaires pour l'activité thermogénique du tissu. Elle est également responsable de la couleur brune caractéristique du tissu. La vascularisation et l'innervation des adipocytes bruns sont importantes.





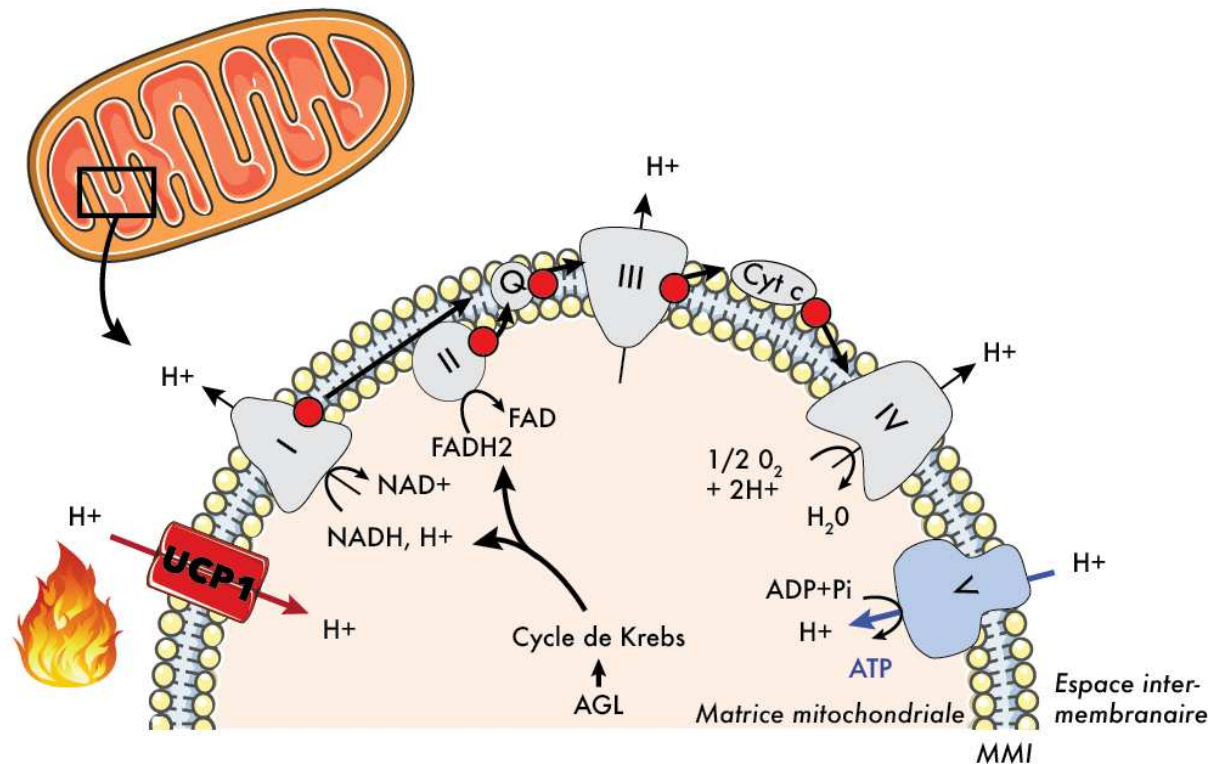
**Figure 12 : Morphologie d'un adipocyte du tissu adipeux brun (d'après Giralt et Villarroya, 2013)**

### ***Rôle métabolique du tissu adipeux brun***

La thermogénèse obligatoire ou de repos, à une température ambiante de thermoneutralité et en absence d'exercice, correspond au métabolisme de base et à un ensemble de réactions métaboliques libérant de la chaleur et permettant le maintien de la température de l'organisme aux environs de 37°C. En dehors de ces conditions, il existe des situations particulières induisant une **thermogénèse** dite facultative, régulatrice ou **adaptative**, par exemple la situation de l'exposition au froid (pour un mammifère non hibernant). Dans une telle situation, de la chaleur doit être produite. Cette **production de chaleur** peut se faire par des exercices musculaires volontaires, par des tremblements involontaires (frissons thermiques) ou encore par la production chimique de chaleur appelée **thermogénèse non frissonnante** de l'adipocyte brun.

Le TA brun est richement vascularisé et innervé, et les adipocytes bruns ou thermogéniques sont riches en mitochondries. La thermogénèse de l'adipocyte brun peut être induite par des facteurs endocrines tels les BMPs (*bone morphogenetic protein*), le VEGF-A (*vascular endothelial growth factor A*), le FGF21 (*fibroblast growth factor 21*), des myokines (pour revue Carobbio *et al.*, 2019) ou par un stimulus  $\beta$ -adrénergique. Chaque adipocyte est en effet innervé

par le système nerveux sympathique qui permet la régulation de son métabolisme. La noradrénaline se fixant sur les récepteurs  $\beta_3$ -adrénergiques favorise la lipolyse adipocytaire permettant de fournir des AGL (Frontini *et al.*, 2013). Ceux-ci sont  $\beta$ -oxydés dans la mitochondrie formant de l'acétyl-CoA qui entre dans le cycle de Krebs. Les co-enzymes réduits (NADH et FADH<sub>2</sub>) produits par le cycle de Krebs sont ré-oxydés dans la chaîne respiratoire mitochondriale, permettant par couplage chimio-osmotique la production d'énergie sous la forme d'ATP ou de chaleur. Les acides gras issus de la lipolyse adipocytaire sont un substrat pour la production de chaleur dans l'adipocyte brun. Ils permettent en effet l'augmentation de l'expression de la protéine découplante UCP1 (*uncoupling protein 1*) aussi appelée thermogénine et spécifique de l'adipocyte brun (Cannon et Nedergaard, 2004). Dans les mitochondries, les complexes de la chaîne respiratoire permettent l'oxydation des co-enzymes réduits issus de l'oxydation des acides gras, générant ainsi un transport d'électrons au sein de la membrane mitochondriale interne, et un gradient de protons de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale. Ce gradient transmembranaire de protons permet, dans la majorité des cellules, d'apporter l'énergie nécessaire pour générer de l'ATP à partir de l'ADP (adénosine diphosphate) grâce à l'enzyme transmembranaire ATP synthase. Ce mécanisme de couplage entre les oxydo-réductions de la chaîne respiratoire et la synthèse d'ATP s'appelle la phosphorylation oxydative. La présence de la protéine UCP1 au sein de la membrane interne de la mitochondrie entraîne une fuite de protons vers la matrice mitochondriale (figure 13), qui réalise un découplage entre la respiration mitochondriale (qui est activée) et la synthèse d'ATP (qui est inhibée). L'énergie libérée par la dissipation du gradient de protons généré par la chaîne respiratoire permet de produire de la chaleur au détriment de la production d'ATP (Betz et Enerback, 2018, Kuhn *et al.*, 2012).

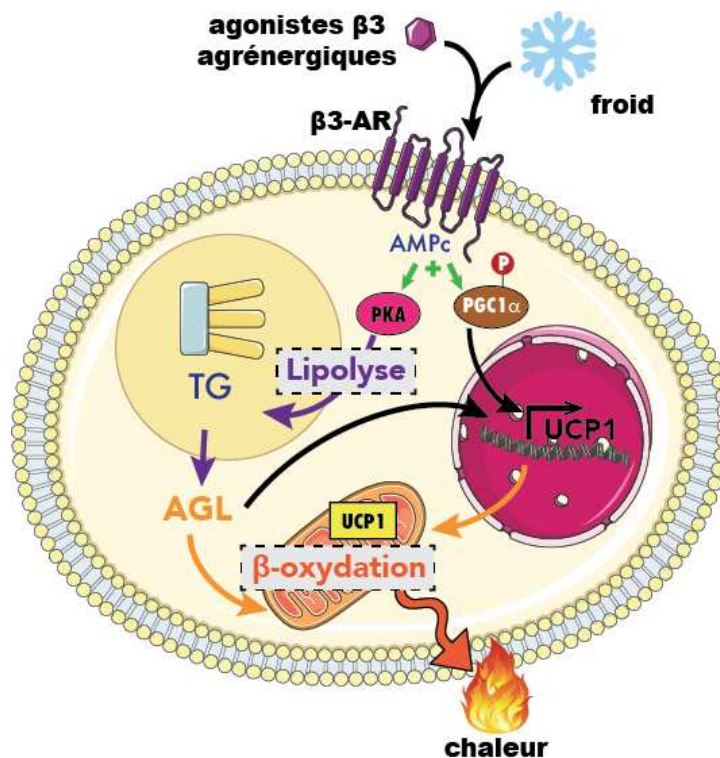


**Figure 13 : Chaîne respiratoire mitochondriale (CRM) et rôle découplant de la protéine UCP1 (d'après Betz et Enerback, 2018)**

*UCP1* permet la production de chaleur en dissipant le gradient transmembranaire de protons issu du fonctionnement de la chaîne respiratoire. I à IV : complexes d'oxydo-réduction de la CRM, I : NADH déshydrogénase, II : succinate déshydrogénase, Q : coenzyme Q, III : coenzyme Q-cytochrome c oxydoréductase, Cyt c : cytochrome c, IV : cytochrome c oxydase, V : ATP synthase, UCP1 : uncoupling protein 1, NADH : nicotinamide adénine dinucléotide réduit; NAD<sup>+</sup>, nicotinamide adénine dinucléotide oxydé, FADH<sub>2</sub>/FAD : flavine adenine dinucléotide réduit/oxydé, ATP : adénosine triphosphate, ADP : adénosine diphosphate, Pi : phosphate inorganique ; H<sup>+</sup> : proton, MMI : membrane mitochondriale interne.

Il est indispensable pour l'adipocyte brun de maintenir un niveau de TG stockés adéquat pour maintenir ce métabolisme oxydatif. La ré-estérification des AG y participe. Contrairement au TA blanc, qui a une fonction de stockage, le TA brun favorise la dépense énergétique par production de chaleur lors de la thermogénèse adaptative. L'activation du système nerveux sympathique en réponse au froid ou à tout autre stimulus  $\beta$ -adrénergique induit l'expression d'UCP1. En effet, le stimulus  $\beta$ -adrénergique déclenche l'augmentation de l'AMPC dans la cellule qui active la PKA. Cette activation stimule *in fine* l'expression d'UCP1 par l'activation de PGC-1 $\alpha$  (*peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator-1 $\alpha$* ). PGC1 $\alpha$  se lie à des facteurs de transcription PPAR $\alpha$  ou  $\gamma$  (*peroxisome proliferator activated receptor*) et augmente l'expression des gènes de la mitochondriogenèse ainsi que des complexes de la chaîne respiratoire, et d'UCP1 (Peirce *et al.*, 2014, Harms et Seale, 2013). D'autre part, les AG libérés lors de la lipolyse adipocytaire brune sont non seulement des substrats pour l'oxydation

mais activent directement la synthèse d'UCP1. Outre le système nerveux sympathique, les hormones thyroïdiennes (T3, T4), les thiazolidinediones et l'acide rétinoïque jouent également un rôle dans l'induction d'UCP1 (figure 14).



**Figure 14 : Schéma général de la thermogénèse adaptative dans l'adipocyte brun (d'après Peirce *et al.*, 2014)**

*β3-AR* : récepteur β3-adrénergique, *AMPC* : adénosine monophosphate cyclique, *PKA* : protéine kinase A, *TG* : triglycéride, *AG* : acide gras, *PGC1α* : peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator-1α, *UCP1* : uncoupling protein 1.

L'importance d'UCP1 dans la thermogénèse a été démontrée grâce au modèle murin d'inactivation d'UCP1, lequel est incapable de maintenir sa température corporelle à 37°C lors d'une exposition au froid et présente une obésité lorsqu'il est maintenu à neutralité thermique (Feldmann *et al.*, 2009, Enerback *et al.*, 1997). Chez l'Homme, l'exposition au froid sur une longue période (19°C pendant 5 à 8 h et sans frisson) peut activer le TA brun. L'activation du TA brun est corrélée à une augmentation de la dépense énergétique au repos, à de meilleures capacités d'utilisation du glucose et à une meilleure sensibilité à l'insuline, même après le retour à la thermoneutralité (Chondronikola *et al.*, 2014). L'ensemble de ces résultats indique donc d'une part l'importance de la voie β-adrénergique et d'UCP1 dans l'activité thermogénique du TA brun et d'autre part, l'implication de la thermogénèse adaptative dans l'homéostasie énergétique et la régulation du poids corporel.

### 3. Le tissu adipeux beige

Il y a quelques années un nouvel adipocyte ayant des caractéristiques mixtes entre l'adipocyte blanc et brun a été mis en évidence. Selon les auteurs, on l'appelle adipocyte *brite* pour *brown in white* ou **beige**.

#### *Localisation et morphologie du tissu adipeux beige*

Alors qu'il était autrefois admis que les adipocytes bruns et blancs occupaient des sites anatomiques différents, plusieurs études ont identifié, chez la souris, la présence d'adipocytes exprimant **UCP1** dans les dépôts adipeux blancs sous-cutanés. Certaines conditions comme l'exposition au froid ou le traitement par des agonistes  $\beta$ -adrénergiques ou des thiazolidinediones, conditionnent le nombre de ces adipocytes (Petrovic *et al.*, 2010, Guerra *et al.*, 1998, Cousin *et al.*, 1992). Ces adipocytes beiges sont retrouvés dispersés au sein d'adipocytes blancs n'exprimant pas UCP1 (Frontini et Cinti, 2010). Ils possèdent les **caractéristiques morphologiques** des adipocytes bruns (**multiloculaires**, nombreuses **mitochondries**) et expriment notamment des marqueurs bruns dont UCP1, **PRDM16** et **PGC1 $\alpha$** , mais uniquement de façon inductible. Les adipocytes beiges induits par une exposition au froid vont exprimer un profil semblable aux adipocytes blancs après retour à la thermoneutralité (Harms et Seale, 2013).

Selon les travaux de Spiegelman et coll. en 2012, ces adipocytes beiges sont à distinguer des adipocytes bruns (Wu *et al.*, 2012). Les adipocytes beiges dériveraient des mêmes précurseurs que leurs homologues blancs et n'exprimeraient pas Myf5 (figure 2). Le phénomène de brunissement n'est pas général à tous les dépôts adipeux blancs. En effet, il est plus important dans le TA viscéral que dans le TA sous-cutané chez l'Homme, soit l'inverse de ce qui est retrouvé chez la souris (Bartelt et Heeren, 2014, Zuriaga *et al.*, 2017). A ce jour, l'origine des adipocytes beiges reste controversée. Les travaux du Pr JP Giacobino tendent à démontrer que ces adipocytes constitueraient une population cellulaire à part entière qui ne dériverait pas des précurseurs mésenchymateux comme les adipocytes blancs (Lehr *et al.*, 2009). Il a également été suggéré que les adipocytes beiges pourraient avoir une origine commune à celle des muscles lisses (Long *et al.*, 2014). Les travaux de Cinti et coll., quant à eux, tendent à démontrer qu'il existerait des processus de transdifférenciation permettant dans certaines conditions la conversion d'adipocytes blancs en adipocytes beiges et inversement (Cinti, 2012). Finalement, certaines études montrent l'existence de progéniteurs bipotents capables de donner naissance à la fois aux adipocytes blancs et aux adipocytes beiges (Lee *et al.*, 2012). L'origine ou très



probablement les origines de ces adipocytes beiges restent encore une source de controverses à ce jour.

### ***Potentiel thérapeutique du tissu adipeux beige***

Chez l'homme adulte, l'activation métabolique ou le recrutement des adipocytes à fort potentiel oxydatif représente une perspective thérapeutique qui suscite un regain d'intérêt certain depuis la mise en évidence de TA brun chez l'Homme mais aussi de *clusters* d'adipocytes beiges inductibles dans le TA blanc. En effet, augmenter la dépense énergétique a depuis toujours été considéré comme une stratégie de choix pour traiter les maladies métaboliques. Appuyant cette idée, une étude a démontré que des patients sains (mais présentant initialement une faible activité du TA brun) exposés de manière répétitive au froid, augmentent leur activité thermogénique. Ce brunissement de leur TA est corrélé à une diminution de leur masse adipeuse, une meilleure homéostasie du glucose et une sensibilité à l'insuline (Ramage *et al.*, 2016, Cypess *et al.*, 2015, Hanssen *et al.*, 2015, Chondronikola *et al.*, 2014, Yoneshiro *et al.*, 2013, Yoneshiro *et al.*, 2012, pour revue Emont *et al.*, 2019).

## **C. Fonction sécrétoire du tissu adipeux**

La découverte de la leptine en 1994 par Friedman et coll. (Zhang *et al.*, 1994) a permis de faire passer le TA du rang de simple tissu de stockage à celui de véritable organe endocrine. Depuis, de nombreuses autres substances sécrétées par le TA ont été identifiées parmi lesquelles l'adiponectine, les interleukines (IL)-6 et -1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor- $\alpha$* ), MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*), la résistine, l'apeline, le FGF21 (*fibroblast growth factor 21*) et la neuroréguline (Nrg)-4 (Scheja et Heeren, 2019, Feve *et al.*, 2016, Stern *et al.*, 2016). Ces protéines sont regroupées sous le terme générique d'adipokines et ont des actions autocrines-paracrines ou endocrines par voie systémique (Proenca *et al.*, 2014). Elles permettent les interactions entre le TA et les autres organes du corps et leurs effets sont dits « pléiotropes » car ils concernent un large spectre de fonctions physiologiques. Outre ces **adipokines**, le TA sécrète également des médiateurs lipidiques possédant également des actions autocrines-paracrines ou endocrines. Certaines adipokines sont synthétisées exclusivement par les adipocytes ou par les cellules de la FSV et d'autres sont synthétisées par les deux à la fois (figure 15).

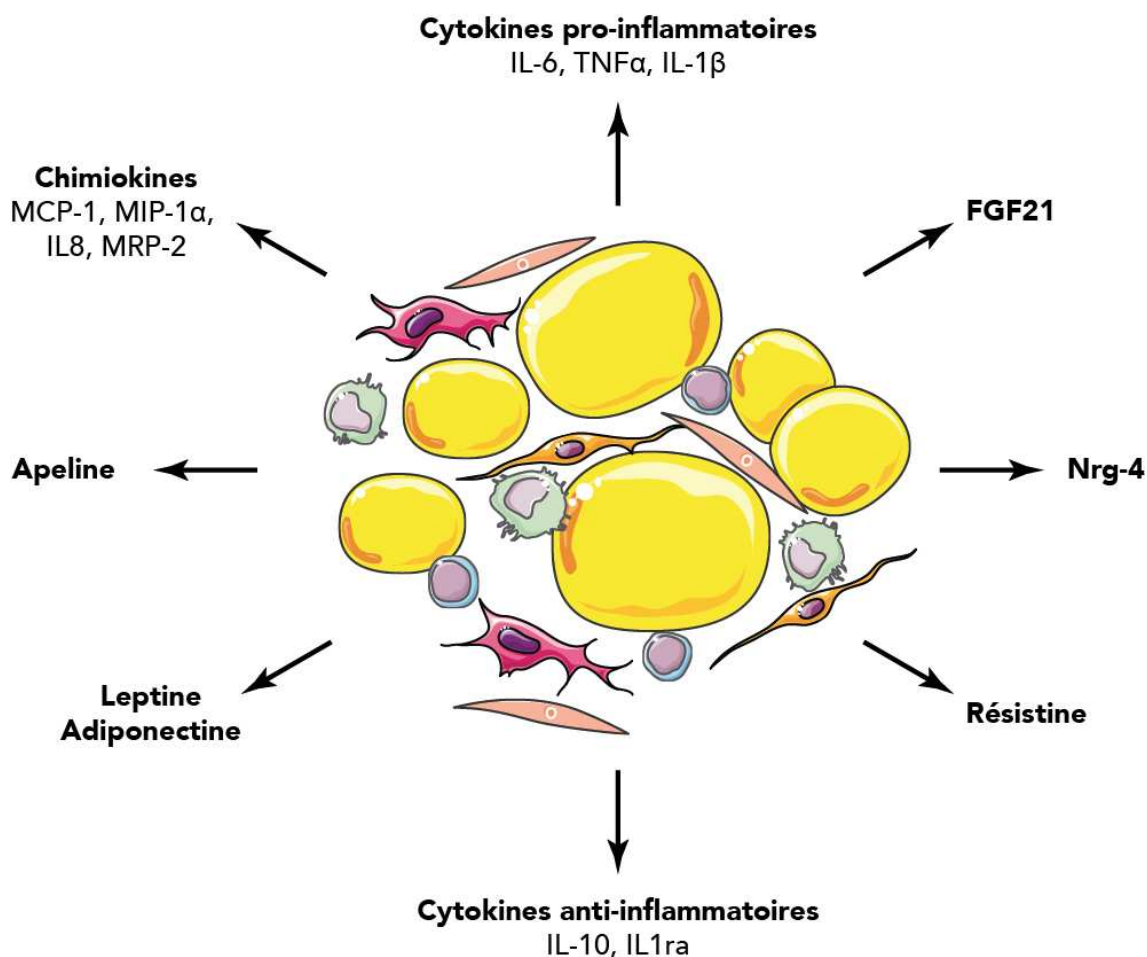


Figure 15 : Principales adipokines secrétées par le tissu adipeux

## 1. La leptine

Première adipokine identifiée, la **leptine** (du grec, leptos, mince), produit du gène *LEP*, est une protéine de 16 kDa, extrêmement conservée chez les vertébrés, exprimée de façon prédominante (mais pas exclusive) par les adipocytes du TA sous-cutané. Cette cytokine est exportée dans le sang, va se fixer à son récepteur et induire ainsi l'activation de plusieurs voies de signalisation (Jak2/STAT3 ou *signal transducer and activator of transcription 3*, MAPK, PI3K, AMPK ou *AMP-activated protein kinase*). La leptine est produite **proportionnellement** au **degré d'adiposité**. Chez l'homme comme chez les rongeurs, la synthèse de la leptine est stimulée par la suralimentation, l'insuline et les glucocorticoïdes tandis que le jeûne, l'AMPc et les agonistes adrénergiques inhibent sa synthèse (Mizuno *et al.*, 1996, Sliker *et al.*, 1996). Les fonctions physiologiques de la leptine sont nombreuses. Elle exerce des effets centraux au niveau de l'hypothalamus sur la régulation de la **satiété** mais aussi périphériques, en particulier sur le **métabolisme glucido-lipidique** en agissant sur les îlots  $\beta$ -pancréatiques, le TA, le muscle et le foie (pour revue Scheja et Heeren, 2019, Friedman, 2016). La leptine intervient également

dans la régulation de la sécrétion des hormones hypophysaires, surrénaliennes, sexuelles et de l'hormone de croissance (Mantzoros *et al.*, 2011). Enfin, la leptine est capable de moduler la réponse du système immunitaire notamment en augmentant la phagocytose et la production de cytokines pro-inflammatoires (Loffreda *et al.*, 1998). L'absence de leptine fonctionnelle ou de son récepteur LEPR entraîne une obésité extrême et les complications associées, en rapport avec une hyperphagie majeure, respectivement chez les modèles murins ob/ob et db/db (Chen *et al.*, 1996, Zhang *et al.*, 1994). Dans les syndromes lipodystrophiques, la leptinémie est diminuée de façon proportionnelle à la sévérité de la lipoatrophie et le déficit en leptine contribue aux complications de ces maladies (Haque *et al.*, 2002).

## 2. L'adiponectine

L'**adiponectine** est une protéine de 28 kDa chez l'Homme et 30 kDa chez la souris (Nakano *et al.*, 1996, Scherer *et al.*, 1995, pour revue Scheja et Heeren, 2019, Fang et Judd, 2018, Stern *et al.*, 2016). Dans le plasma, l'adiponectine s'associe en oligomères (monomères d'adiponectine organisés en une structure plus complexe grâce à des ponts disulfures) essentiels pour leur liaison à leurs récepteurs membranaires (AdipoR1 et AdipoR2, respectivement exprimés dans le muscle et le foie en majorité). Cette forme de haut poids moléculaire est considérée comme la forme biologiquement active. Bien qu'elle soit principalement **produite** et **sécrétée** par le **tissu adipeux**, il a été montré qu'elle est faiblement exprimée dans d'autres types cellulaires tels que les ostéoblastes (Berner *et al.*, 2004), les cardiomyocytes (Pineiro *et al.*, 2005), le tissu foetal (Camino *et al.*, 2008) ou encore le muscle squelettique (Fiaschi *et al.*, 2014).

Chez l'Homme et en conditions physiologiques, les concentrations circulantes d'adiponectine sont importantes, de l'ordre de 5 à 30 mg/L ce qui représente 0,01% des protéines plasmatiques alors que celles de la leptine ne sont que de 2 à 8 µg/L. D'autre part, comme pour la leptine, les taux circulants d'adiponectine répondent à un dimorphisme sexuel avec des concentrations sériques plus élevées chez la femme que chez l'homme (Cnop *et al.*, 2003). L'adiponectine est une **hormone insulino-sensibilisatrice**, en particulier au niveau du foie et du muscle squelettique. Par l'intermédiaire de sa principale cible l'AMPK (*AMP-activated protein kinase*), elle favorise l'utilisation des lipides en augmentant l'oxydation des acides gras au niveau de ces deux organes, stimule le transport du glucose dans le muscle et diminue la néoglucogenèse hépatique (Tomas *et al.*, 2002, Yamauchi *et al.*, 2002). Aussi, l'adiponectine augmenterait la sécrétion de l'insuline par les cellules β pancréatiques en conditions



d'hyperglycémie, toujours *via* l'activation de l'AMPK (Gu *et al.*, 2006) et préviendrait la perte de masse des îlots pancréatiques *via* un effet anti-lipotoxique (Ye *et al.*, 2015). Les **effets** biologiques **bénéfiques** de l'adiponectine ne sont pas restreints au métabolisme. En effet, l'adiponectine possède des propriétés anti-inflammatoires (passant notamment par des effets anti-TNF- $\alpha$  (Ouedraogo *et al.*, 2006), anti-athérogènes et cardio-protecteurs (Goldstein *et al.*, 2009)).

La concentration plasmatique en adiponectine est positivement corrélée à la sensibilité à l'insuline mais inversement proportionnelle à la masse grasse (en particulier la masse viscérale) (Staiger *et al.*, 2003, Arita *et al.*, 1999). De manière intéressante, chez les individus obèses dits « métaboliquement sains » ou *metabolically healthy obese* (MHO), l'adiponectinémie est inchangée (Matsuzawa, 2006) voire augmentée par rapport aux individus minces (Aguilar-Salinas *et al.*, 2008). L'expansion préférentielle du TA sous-cutané chez ces individus pourrait expliquer ce phénotype. En effet, le développement de ce dépôt est associé à un risque cardiovasculaire moindre notamment grâce à la sécrétion d'adipokines anti-inflammatoires plus importante avec en chef de file l'adiponectine (Kusminski *et al.*, 2016, Wormser *et al.*, 2011). L'adiponectine circulante est retrouvée diminuée dans les syndromes lipodystrophiques (Haque *et al.*, 2002).

### 3. Une des *brown* adipokines ou batokines : **Fibroblaste Growth Factor-21 (FGF21)**

L'étude des fonctions sécrétrices du TA brun s'est fait plus tardivement que l'étude de sa fonction thermogénique. Elle met en évidence que le TA brun ne sécrète qu'en très faibles quantités les adipokines classiquement sécrétées par le TA blanc. C'est le cas par exemple de la leptine et de l'adiponectine (Cannon et Nedergaard, 2004). Plusieurs substances bioactives sécrétées par les adipocytes bruns, les **adipokines** du **TA brun** ou **batokines**, ont été identifiées au cours de ces dernières années (Villarroya *et al.*, 2017, Giralt *et al.*, 2015, Villarroya *et al.*, 2013). Ces batokines sont impliquées dans la différenciation et/ou l'activation thermogénique par voie autocrine ou paracrine. C'est le cas du facteur **FGF21** (*fibroblast growth factor 21*).

En 2000, Nishimura et coll. ont découvert, chez l'Homme et la souris, le 21<sup>ème</sup> membre de la famille des facteurs de croissance fibroblastiques qui en compte 23 à l'heure actuelle (Nishimura *et al.*, 2000). C'est une protéine de 23 kDa exprimée préférentiellement dans le **foie** mais aussi dans le pancréas, les testicules, l'intestin, le cerveau, les muscles squelettiques, le TA blanc et brun (Petryszak *et al.*, 2016, Fon Tacer *et al.*, 2010, Izumiya *et al.*, 2008, Zhang *et*

*al.*, 2008, Wente *et al.*, 2006). Le FGF21 se lie et active son récepteur membranaire de type tyrosine kinase (FGFR). Chez les Mammifères, sept isoformes du récepteur ont été décrites. L'activation du récepteur par FGF21 est dépendante du co-facteur  $\beta$ -Klotho (KLB). FGF21 se lie préférentiellement aux complexes FGFR1c/KLB et FGFR3c/KLB (Suzuki *et al.*, 2008). L'activation de ces complexes conduit à des cascades de signalisation intracellulaire dont la phosphorylation du substrat  $2\alpha$  de FGFR qui active ensuite la voie ERK 1 et 2 (Fisher *et al.*, 2010). FGF21 présente peu d'affinité pour le complexe FGFR4/KLB et n'induit pas de phosphorylation de ERK (Yang *et al.*, 2012).

Le FGF21 est considéré comme sécrété principalement par le foie (Markan *et al.*, 2014). Néanmoins, l'activation du TA brun (par exposition au froid par exemple) conduit à une augmentation de la sécrétion de FGF21 par les adipocytes bruns (Chartoumpekis *et al.*, 2011). FGF21 est exprimé par les TA bruns et beiges (Di Franco *et al.*, 2016, Hondares *et al.*, 2014) alors que son expression est négligeable dans le TA blanc. Le FGF21 adipocytaire brun possède surtout un rôle endocrine en plus de ses actions autocrines. L'administration d'un analogue de FGF21, le LY2405319, a permis d'améliorer la glycémie, le bilan lipidique et la stéato-hépatite non alcoolique (NASH) dans des modèles murins d'obésité et d'insulino-résistance, et a montré des résultats encourageants sur la dyslipidémie métabolique (hypertriglycéridémie, HDL-cholestérol bas) et la NASH associées à l'obésité et au diabète chez l'Homme (Struik *et al.*, 2019, Gaich *et al.*, 2013). L'administration de FGF21 recombinante à des modèles murins de diabète et d'obésité génétique ou induite par un régime gras, augmente aussi la dépense énergétique, et diminue la masse adipeuse ainsi que la masse corporelle (Coskun *et al.*, 2008, Kharitononkov *et al.*, 2005). La production hépatique de FGF21 est stimulée par les ligands de PPAR $\alpha$  et par le glucose (Inagaki *et al.*, 2007). FGF21 est impliqué dans la **régulation nutritionnelle**. Il stimule la  $\beta$ -oxydation des acides gras et bloque la lipogenèse *de novo* hépatique en réponse au jeûne ou sous régime cétonique. Néanmoins *in vivo*, les effets directs du FGF21 sont controversés puisque FGFR4, qui est la principale isoforme du récepteur exprimée au niveau hépatique, n'induit pas de signalisation cellulaire.

Le FGF21 a des effets systémiques pléiotropes. Son rôle sur le **métabolisme glucido-lipidique adipocytaire** passerait par une augmentation de l'entrée de glucose par le transporteur GLUT1 et une augmentation de la lipolyse dans les adipocytes. Le FGF21 serait impliqué dans l'activation d'adipocytes beiges dans le TA blanc en augmentant PGC1 $\alpha$  (Fisher *et al.*, 2012). En outre, FGF21 **protège** du **stress oxydant** cellulaire chez l'Homme (Zhu *et al.*, 2014) et exerce des **propriétés anti-inflammatoires**. En effet, dans des macrophages murins stimulés par du LPS (lipopolysaccharide), endotoxine bactérienne, on observe une diminution

de l'expression des cytokines pro-inflammatoires (TFN- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 et IFN- $\gamma$ ) et une inactivation de la voie pro-inflammatoire NF- $\kappa$ B sous l'effet de FGF21 (Yu *et al.*, 2016). Enfin, plusieurs études menées dans des modèles animaux et *in vitro* dans des modèles cellulaires, ont montré que le FGF21 aurait un rôle **cardio-protecteur** vis-à-vis de l'athérosclérose, d'une part grâce à ses effets sur le métabolisme lipidique, et d'autre part en augmentant la production d'adiponectine par le TA (Lin *et al.*, 2015).

## D. Le processus de différenciation adipocytaire ou adipogenèse : de la cellule souche à l'adipocyte mature

Chez les Mammifères, le tissu adipeux, comme les muscles et les os, dérive du feuillet mésodermique. La formation d'adipocytes matures à partir de précurseurs mésenchymateux pluripotents se réalise en deux étapes : la **détermination** de ces précurseurs en préadipocytes puis la **différenciation** des préadipocytes en adipocytes ou **adipogenèse** (figure 2). Ces processus cellulaires et moléculaires sont étudiés *in vitro* grâce à des modèles cellulaires essentiellement murins. Néanmoins, ces études permettent d'identifier les gènes et facteurs impliqués (figure 16).

### 1. La détermination

Les précurseurs mésenchymateux pluripotents peuvent selon l'environnement se différencier en adipocytes, en ostéoblastes, en chondrocytes ou encore en myocytes (Rodeheffer *et al.*, 2008). La détermination adipocytaire consiste en une perte de plasticité des cellules souches qui se transforment en progéniteurs capables de se différencier en adipocytes. La détermination de ces précurseurs vers le lignage adipocytaire fait intervenir différents signaux des facteurs extracellulaires tels que les membres de la famille des BMPs (*bone morphogenetic protein*) (Kang *et al.*, 2009), le TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) (Zamani et Brown, 2011), le FGF1 et FGF2 (*fibroblast growth factor 1/2*) (Kakudo *et al.*, 2007, Hutley *et al.*, 2004) ou encore l'activine A (Zaragosi *et al.*, 2010). Par ailleurs, de nombreuses études montrent que les voies Wnt/ $\beta$ -caténine et Hedgehog inhibent l'orientation des précurseurs mésenchymateux vers le lignage adipogénique au profit de la voie ostéogénique (Rosen et MacDougald, 2006). Par contre, la voie de l'IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*) / insuline potentialise le recrutement adipogénique (Hu *et al.*, 2015).

L'analyse des marqueurs de surface par cytométrie en flux a permis de caractériser une sous-population de précurseurs adipocytaires dans la FSV capable de se différencier en adipocytes de manière beaucoup plus efficace *in vitro* (Lin-, Sca1+, CD34+, CD24+, a7-, PDGFR $\alpha$ +). Néanmoins, ces cellules présentent une faible capacité adipogénique *in vivo* ce qui démontre l'importance du microenvironnement cellulaire dans cette phase de détermination (Joe *et al.*, 2010, Rodeheffer *et al.*, 2008, Tang *et al.*, 2008).

On considère aujourd'hui que selon le dépôt adipeux, les adipocytes blancs peuvent être issus de différents progéniteurs, ce qui pourrait expliquer par ailleurs l'atrophie ou l'expansion sélective de certains TA observées au cours des lipodystrophies. Par exemple, des études menées chez l'Homme montrent qu'il existe des différences dans les profils d'expression de divers gènes au cours de la détermination (*Shox2*, *En1*, *Tbx15*, *Hoxa5*, *Hoxc8* et *Hoxc9*) entre les préadipocytes isolés du TA sous-cutané et ceux du TA viscéral (Yamamoto *et al.*, 2010). De plus, la notion d'hétérogénéité des progéniteurs au sein d'un même dépôt adipeux est de plus en plus documentée. En effet, l'analyse du transcriptome des cellules de la FSV après tri par cytométrie en flux (*single-cell*) a permis de montrer l'existence de différents progéniteurs dans les TA de souris (Merrick *et al.*, 2019, Burl *et al.*, 2018). En parallèle, le suivi par fluorescence des lignages de préadipocytes isolés de différents tissus adipeux blancs de souris confirme la présence de différents progéniteurs au sein d'un même dépôt adipeux (Lee *et al.*, 2019). Chez l'Homme, les résultats sont plus contrastés. Des études tendent à montrer que différentes sous-populations de progéniteurs coexisteraient également dans les TA humains et il semblerait que ces sous-populations présentent des caractéristiques métaboliques propres, notamment au niveau des capacités adipogéniques ou encore sécrétoires (Merrick *et al.*, 2019, Raajendiran *et al.*, 2019, Gao *et al.*, 2017).

## 2. La différenciation adipocytaire

La différenciation adipocytaire proprement dite ou adipogenèse représente le passage du préadipocyte (type fibroblastique) à l'adipocyte mature. Plusieurs lignées préadipocytaires unipotentes (3T3-L1, 3T3-F442A, Ob17, etc.) ont largement aidé à la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués au cours de la différenciation adipocytaire. *In vitro*, l'adipogenèse se décompose en événements précoces et en événements tardifs définis notamment par les différentes séquences d'expression de facteurs de transcription dont certains sont liés à l'environnement, en particulier hormonal et nutritionnel, et agissent seuls ou de manière coopérative.

Les évènements précoces concernent le remodelage de la MEC et du cytosquelette (en particulier le réseau d'actine), ce qui provoque l'arrondissement des cellules. Ces deux processus permettent aux préadipocytes de réaliser une étape d'expansion clonale, sous le contrôle de l'IGF-1. A la suite de ces évènements précoces, les préadipocytes sont dits « engagés dans la différenciation adipocytaire ». En anglais, on parle encore de *commitment* des préadipocytes.

Les évènements tardifs, quant à eux, impliquent la maturation des jeunes adipocytes en adipocytes matures et fonctionnels possédant toute la machinerie nécessaire au transport des acides gras et du glucose, à la synthèse des lipides, à l'action de l'insuline et à la sécrétion de protéines spécifiques. L'apparition progressive de vacuoles lipidiques et le stockage des lipides entraîne alors une augmentation du volume des cellules.

### 3. Les principaux facteurs de transcription

Les changements morphologiques majeurs qui accompagnent la différenciation adipocytaire sont la conséquence de variation d'expression d'un très grand nombre de gènes. Cette reprogrammation majeure est sous le contrôle de facteurs de transcription pro- ou anti-adipogéniques. Les principaux facteurs adipogéniques sont le facteur PPAR $\gamma$ , les C/EBPs (*CCAAT/enhancer binding proteins*) et le facteur ADD1/SREBP-1c (*adipocyte determination and differentiation factor 1/sterol regulatory element binding protein-1c*).

#### ***La famille des PPARs***

Le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  appartient à la super famille des récepteurs nucléaires. L'isoforme  $\gamma_2$  est quasiment exclusivement exprimée dans les adipocytes et PPAR $\gamma$  est le facteur de transcription clé de l'adipogenèse (Escher *et al.*, 2001). Une fois activé par la liaison à ses ligands, PPAR $\gamma$  se lie à un partenaire d'hétérodimérisation : le récepteur de l'acide 9-cis rétinoïque appelé RXR. Les hétérodimères PPAR $\gamma$ /RXR reconnaissent spécifiquement des éléments de réponse PPRE (*PPAR responsive element*) situés dans les régions promotrices de gènes cibles. PPAR $\gamma$  transactive de nombreux gènes du métabolisme lipidique, de la fonction sécrétoire et de la sensibilité à l'insuline de l'adipocyte tels que aP2/FABP4, ADIPOQ (adiponectine), PLIN1, LPL ou encore ACSL (Rosen *et al.*, 2000). Plusieurs ligands capables d'activer le PPAR $\gamma$  majorent le taux de conversion adipocytaire et l'amplitude de la différenciation. C'est notamment le cas des thiazolidinediones qui sont ou ont été utilisées dans le traitement du diabète et de l'insulino-résistance. De plus, la 15-déoxy- $\delta$ -prostaglandine et

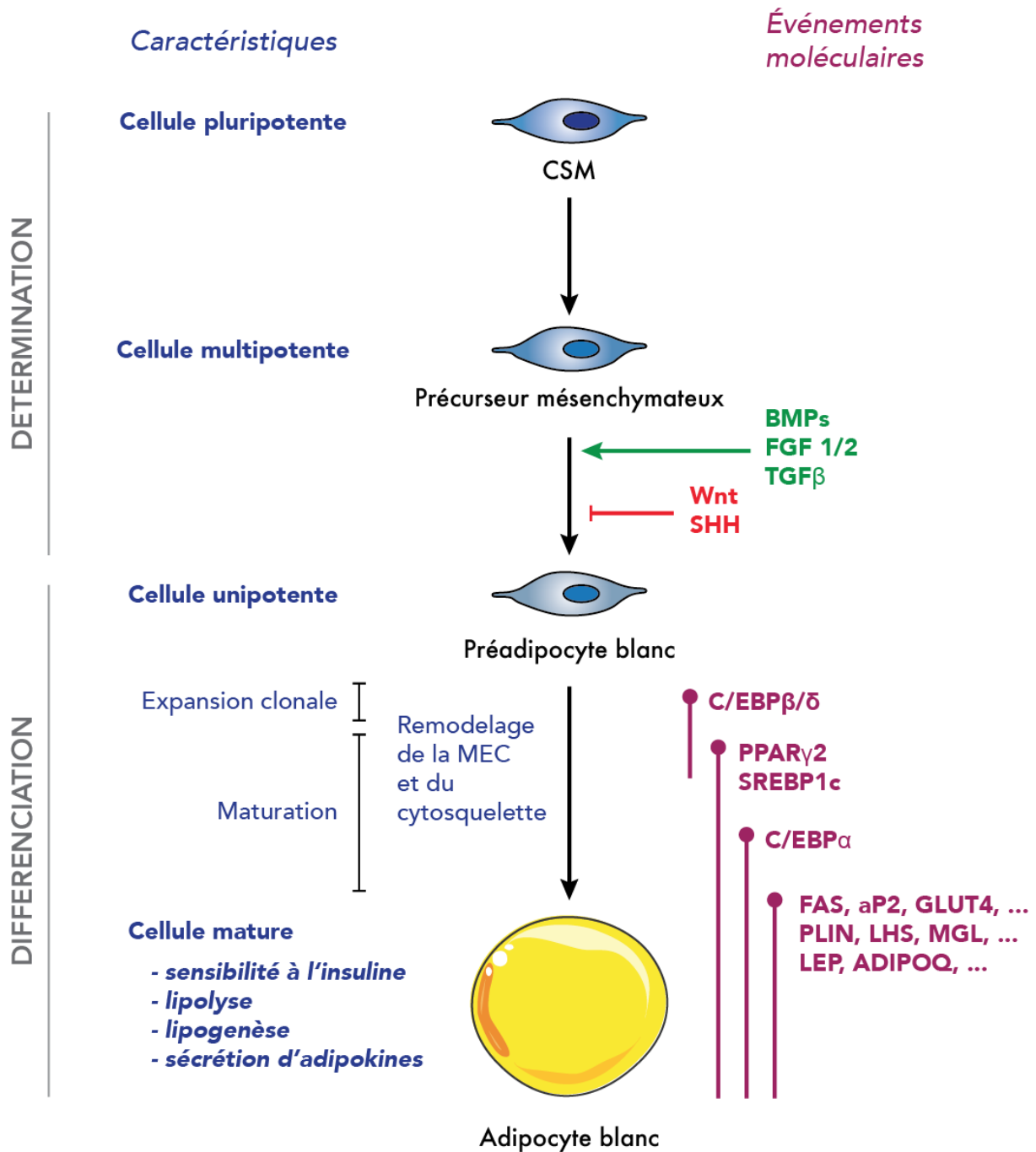
l'acide lysophosphatidique (LPA) sont décrits comme des activateurs de PPAR $\gamma$  (McIntyre *et al.*, 2003, Brun *et al.*, 1996). Toutefois, leur affinité pour le PPAR $\gamma$  est beaucoup plus faible que celle habituellement décrite pour les récepteurs nucléaires avec leurs ligands physiologiques. A l'heure actuelle, le ligand endogène de PPAR $\gamma$  n'est pas clairement identifié.

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

Les facteurs C/EBPs appartiennent à la famille des facteurs de transcription à motifs basiques et glissières de leucines (bHLH, *basic helix loop helix*). Le domaine basique permet à ces facteurs de se lier à l'ADN alors que le motif en glissières de leucines leur permet de s'homodimériser ou de s'hétéro-dimériser. Trois isoformes de C/EBPs  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\delta$  possèdent un rôle inducteur dans l'adipogenèse (Rosen *et al.*, 2000, Rosen et Spiegelman, 2000). Les protéines C/EBP $\beta$  et  $\delta$  sont induites de manière précoce et transitoire au cours de l'adipogenèse, et jouent un rôle clé dans l'enclenchement de la maturation terminale. L'induction de C/EBP $\alpha$  se fait plus tardivement et permet de transactiver différents gènes marqueurs de la différenciation adipocytaire tels qu'aP2, PPAR $\gamma$  et la leptine mais également d'induire sa propre expression (Rosen et Spiegelman, 2000, Rosen *et al.*, 2000).

### ***La protéine ADD1/SREBP-1c***

La protéine ADD1/SREBP-1c appartient à la famille des facteurs de transcription à motif hélice-boucle-hélice (bHLH-LZ, *basic helix-loop-helix leucine zipper*). Son expression, son activation (par clivage protéolytique de sa forme précurseur au niveau des membranes du RE) et sa translocation nucléaire sont régulées par l'insuline (Eberle *et al.*, 2004, Brown et Goldstein, 1997). ADD1/SREBP-1c induit l'expression génique de PPAR $\gamma$  et l'active via la production de ligands endogènes (Fajas *et al.*, 1999, Kim et Spiegelman, 1996). Par ailleurs, il a été montré qu'ADD1/SREBP-1c est directement impliqué dans la régulation de gènes du métabolisme lipidique (Eberle *et al.*, 2004).



**Figure 16 : La différenciation adipocytaire, événements cellulaires et moléculaires**  
*CSM : cellule souche mésenchymateuse, MEC : matrice extracellulaire, SHH : sonic hedgehog. En vert les facteurs stimulant et en rouge les facteurs inhibant l'engagement adipocytaire. En violet les principaux facteurs de transcription et protéines impliqués dans la différenciation et la maturation de l'adipocyte blanc.*

Bien que les TA blanc et brun aient des rôles physiologiques différents, de nombreux facteurs de transcription sont communs aux adipocytes bruns et blancs. Les adipocytes blancs et bruns requièrent PPAR $\gamma$  pour leur développement et leur fonction. C/EBP $\alpha/\beta/\delta$  sont également impliqués dans les différenciations adipocytaires brune et blanche.

L'activation du programme thermogénique des adipocytes bruns et beiges nécessite néanmoins des facteurs spécifiques dont PGC1 $\alpha$  qui induit l'expression de la protéine découplante UCP1 et les enzymes clés de la chaîne respiratoire mitochondriale. Un autre facteur spécifique de l'adipogenèse brune est PRDM16. PRDM16 est suffisant et nécessaire pour induire un phénotype brun *in vitro* dans des cultures cellulaires mais également suffisant pour induire un brunissement du TA viscéral sous stimulation  $\beta$ -adrénergique (Seale *et al.*, 2007).

Les adipocytes beiges expriment des marqueurs spécifiques tels que CD137, la protéine transmembranaire 26 (TMEM26), PRDM16, DIO2 (Deiodinase 2) ou CITED1 (*Cbp/p300 interacting transactivator with Glu/Asp rich carboxy-terminal domain 1*) (Wu *et al.*, 2012). CITED1 initialement connu sous le nom de MSG1 (*melanocyte-specific gene 1*) est décrit comme étant un co-activateur transcriptionnel du facteur de transcription CBP/p300 (Shioda *et al.*, 1996). Chez l'homme il aurait plusieurs rôles. CITED1 stimulerait la signalisation des récepteurs aux oestrogènes, régulerait la voie de signalisation TGF- $\beta$ , inhiberait la minéralisation ostéoblastique et aurait un rôle dans la pigmentation des mélanocytes. On le retrouve principalement exprimé au niveau des testicules et dans une moindre mesure dans des tissus endocrines.

Adipocyte	Blanc	Beige	Brun
<b>Localisation</b>	Sous-cutané ou viscéral	Au sein du TA blanc viscéral	Dépôts spécifiques
<b>Morphologie</b>	GL <b>unique</b> Mitochondries : +	GL multiples Mitochondries : ++	GL multiples Mitochondries : +++
<b>Lignage</b>	SMA, PDGFR $\alpha/\beta$	SMA, PDGFR $\alpha/\beta$	<b>Myf5, Pax7, En1</b>
<b>Marqueurs enrichis</b>	LEP, PLIN1, ADIPOQ	UCP1, PRDM16, PGC1 $\alpha$ , <b>CITED1, CD137, TMEM26</b>	UCP1, PGC1 $\alpha$ , PRDM16
<b>Maintien</b>	Constitutif	<b>Activable/transitoire</b>	Constitutif

**Tableau 1 : Présentation synthétique des caractéristiques cellulaires et des marqueurs moléculaires des adipocytes blancs, beiges et bruns chez l'Homme**  
*Les particularités différentielles sont indiquées en bleu.*



## E. La cellule souche adipocytaire adulte humaine ou *Adipose-derived Stem Cell (ASC)* : un nouveau modèle d'étude physiopathologique

Les cultures primaires de préadipocytes et, *a fortiori*, d'adipocytes humains sont assez peu utilisées *in vitro* bien qu'elles aient l'avantage de pouvoir provenir des différentes localisations et différents dépôts du TA d'un donneur. La limitation majeure à leur utilisation revient au fait que leur accès et disponibilité sont restreints, et qu'elles ne se divisent pas en culture (pour les adipocytes). Par ailleurs les préadipocytes ont déjà subi les étapes précoces de la différenciation adipocytaire, qu'il ne sera donc pas possible d'étudier *in vitro*. Une alternative a été l'utilisation de lignées cellulaires murines établies permettant la culture, le maintien et la différenciation de cellules pré-adipocytaires indifférenciées. Les lignées cellulaires murines blanches 3T3L1, 3T3F442A et brune T37i ont été très largement utilisées. Elles ont permis une meilleure compréhension des mécanismes physiologiques mais aussi physiopathologiques de l'adipocyte depuis des décennies. Elles ont l'avantage d'être faciles d'entretien et peu coûteuses. Néanmoins elles ont l'inconvénient d'être d'origine murine. Leurs capacités thermogéniques, l'expression génique de marqueurs spécifiques et leurs réponses à des stimuli pharmacologiques sont différentes de celles des cellules humaines (Zuriaga *et al.*, 2017, Arch, 2002).

Deux principales lignées cellulaires préadipocytaires blanches d'origine humaine ont été utilisées par la communauté scientifique. D'une part les cellules LiSa-2, issues d'un liposarcome, sont capables de se différencier en adipocyte, bien qu'il existe des différences d'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des acides gras avec des adipocytes isolés (van Beek *et al.*, 2008, Wabitsch *et al.*, 2000). D'autre part les cellules SGBS, isolées de la FSV du TA sous-cutané d'un enfant atteint du syndrome Simpson-Golabi-Behemil, ont la capacité de se différencier *in vitro* avec un cocktail classique comprenant un agoniste de PPAR $\gamma$ . Les profils d'expression génique de ces cellules différenciées sont comparables à ceux des adipocytes matures humains. Cependant ces cellules sont issues d'un patient sans diagnostic précis chez lequel aucun variant pathologique n'a été retrouvé (Wabitsch *et al.*, 2001) et elles arboreraient un phénotype brun plutôt que blanc (Yeo *et al.*, 2017).

L'équipe de KE Pinnick et F Karpe a développé récemment un autre modèle cellulaire humain : des lignées pré-adipocytaires de TA sous-cutané abdominal et glutéal immortalisées. Ces cellules se différencient en adipocytes fonctionnels montrant les mêmes propriétés que leur TA d'origine. Cependant ces lignées ont été obtenues par transduction lentivirale. Ces

lentivirus, dérivés du VIH, sont intégratifs et peuvent être la cause de mutagenèse insertionnelle à proximité ou à l'intérieur d'un oncogène ou d'un gène suppresseur de tumeur (Todorcevic *et al.*, 2017).

Depuis 2006, les équipes de S Yamanaka et J Gurdon ont révolutionné le champ de la médecine régénérative avec le développement des cellules souches humaines induites à la pluripotence ou hiPSCs obtenues à partir de cellules somatiques différenciées comme des fibroblastes cutanés. Ces cellules sont pluripotentes et peuvent se différencier dans tous les types cellulaires (excepté les annexes et le placenta). Au laboratoire nous avons mis au point un protocole de différenciation adipocytaire beige en 2D, sans surexpression de facteur de transcription ni utilisation d'agoniste de PPAR $\gamma$ , ce qui permet de respecter les différentes étapes physiologiques de la différenciation (Guénantin *et al.*, 2017 - annexe 1). Cependant les hiPSCs ne sont pas aussi faciles d'entretien que les lignées de références et leur entretien et leur différenciation est très coûteux.

En 2001, PA Zuk et coll. ont isolé et caractérisé les cellules souches adultes du TA (ASC) (Zuk *et al.*, 2001). Les ASC sont une composante de la FSV du TA facilement accessible suite à une liposuction, une lipoplastie ou une lipectomie. Elles représenteraient de 1 à 10% de la FSV (Jurgens *et al.*, 2008). Elles sont d'origine mésenchymateuse et peuvent se différencier dans plusieurs lignages cellulaires dont les ostéocytes, les chondrocytes et les adipocytes. Elles sont caractérisées par leur adhérence au plastique et expriment ou non différents marqueurs de surface. L'analyse croisée des données publiées a montré que ces ASC sont *a minima* positives pour CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 et HLA-I, et négatives pour CD11b, CD14, CD19, CD31, CD34, CD45 et HLA-DR qui sont des marqueurs hématopoïétiques. Les principaux avantages liés à l'utilisation de ces cellules sont leur multipotence et leur forte capacité d'expansion/renouvellement. Quelques études montrent qu'il est possible de les transfecter à l'état indifférencié (Lee *et al.*, 2018, Hoseini *et al.*, 2017). Elles représentent un modèle précieux qui permet l'étude des événements très précoces de la détermination adipogénique (pour revue Sadie-Van Gijzen, 2019).

En résumé, l'**adipocyte blanc** présente deux **fonctions métaboliques** principales, le **stockage** des lipides et la mobilisation des lipides *via* le processus de **lipolyse**. L'**adipocyte brun** participe à la **thermogénèse** non frissonnante par découplage de la phosphorylation oxydative mitochondriale (*via* UCP1). L'**adipocyte beige** est un adipocyte intermédiaire résidant dans le TA blanc et capable, une fois **activé**, de réaliser la **thermogénèse** (figure 17). Ces activités

métaboliques, dans lesquelles la **gouttelette lipidique unique** de l'adipocyte **blanc** et **multiloculaire** de l'adipocyte **brun** et **beige** joue un rôle majeur, sont étroitement régulées par des signaux neuro-humoraux. De plus, grâce à une **capacité sécrétoire** aussi multiple que variée, le TA joue un **rôle endocrine** qui lui permet d'assurer une communication avec de nombreux organes et tissus mais aussi un rôle paracrine et autocrine permettant une communication locale entre les différents types cellulaires qui le composent. Enfin, le TA est une **source** importante de **cellules souches adultes** qui jouent un rôle physiologique dans la régénération et la plasticité tissulaire et représentent des modèles d'étude expérimentaux d'intérêt.

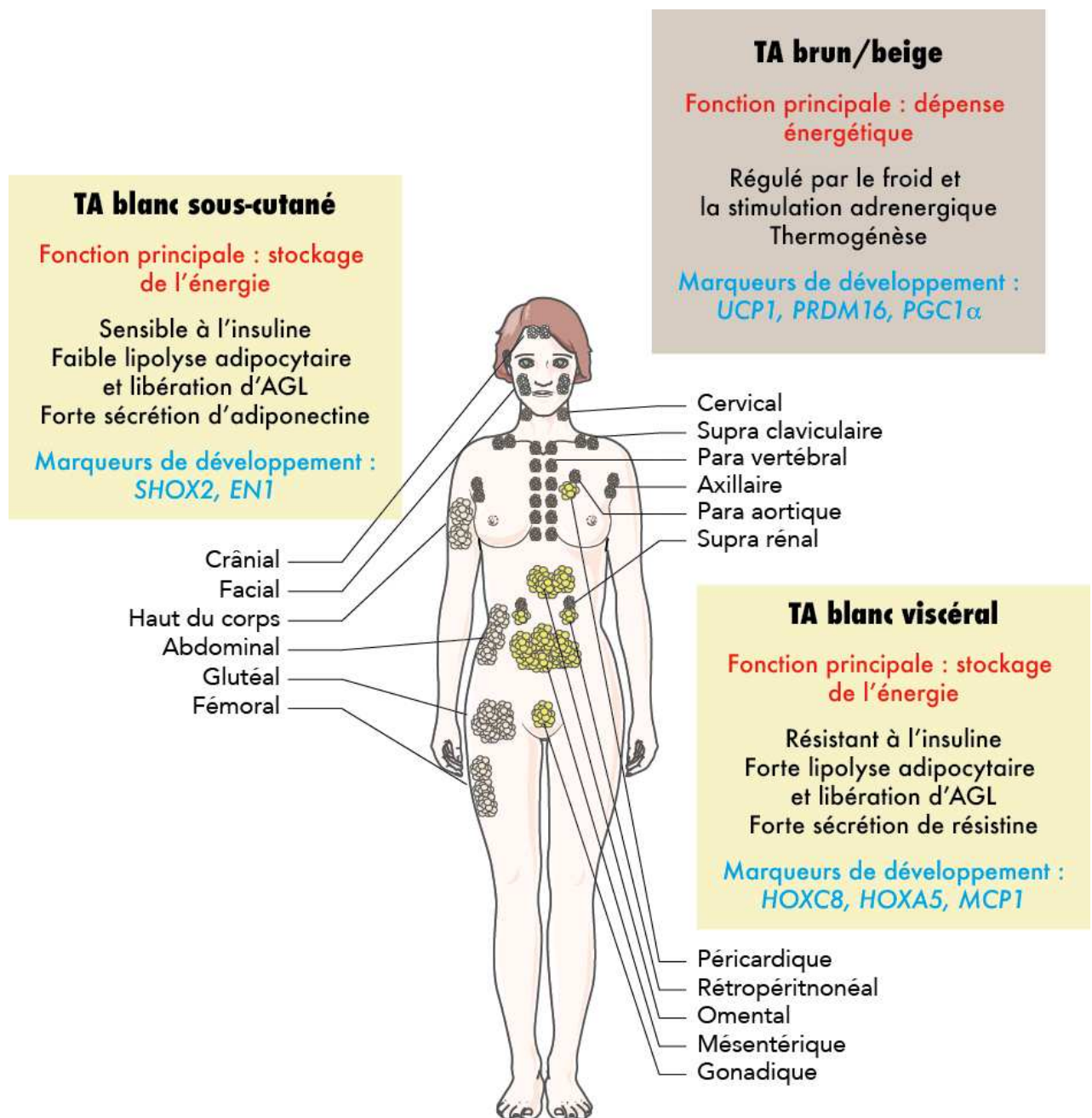


Figure 17 : Hétérogénéité régionale et fonctionnelle du tissu adipeux (d'après Kahn *et al.*, 2019)

# Chapitre II : Les syndromes lipodystrophiques et les lipomatoses : éléments de physiopathologie

Les syndromes lipodystrophiques se traduisent par des atteintes généralisées ou partielles du TA associées à des troubles du métabolisme glucido-lipidique, notamment une résistance à l'insuline sévère. Le défaut de stockage du TA conduit à des troubles métaboliques par les mécanismes de lipotoxicité. Au cours de ce deuxième chapitre, j'apporterai des éléments sur la physiopathologie des syndromes lipodystrophiques et de la lipomatose de Launois-Bensaude.

## A. Les syndromes lipodystrophiques

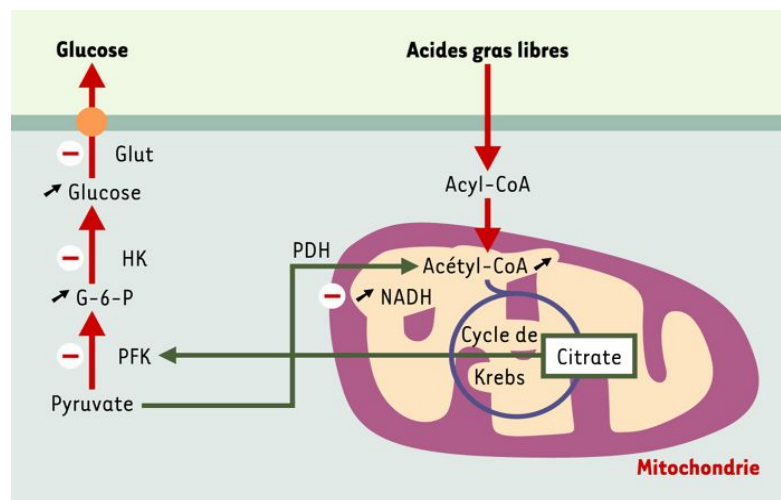
Les syndromes lipodystrophiques sont un groupe de pathologies hétérogènes et rares caractérisées par une absence ou un défaut de développement de TA. Elles peuvent être d'origine génétique ou acquise consécutivement à un traitement pharmacologique ou une atteinte auto-immune, généralisées ou partielles. La dysfonction du TA conduit à des troubles métaboliques associés à une insulino-résistance sévère, une hypertriglycéridémie et une stéatose hépatique. En France, la prévalence des syndromes lipodystrophiques est estimée entre 1/1 000 000 à 1/100 000 selon qu'il s'agit d'une forme généralisée ou partielle (pour revue Sollier *et al.*, in press, Hussain *et al.*, 2019, Mann et Savage, 2019, Akinci *et al.*, 2018).

### *Insulino-résistance et lipotoxicité*

La **résistance à l'insuline** est une anomalie métabolique fréquente qui correspond à une **diminution** de la **réponse** biologique des **tissus cibles** de l'insuline en réponse à des concentrations physiologiques de l'hormone. Dans un premier temps, le pancréas compense la résistance à l'insuline par une hypersécrétion d'insuline, qui permet, temporairement, le maintien de l'homéostasie glucidique. A terme, un défaut de sécrétion d'insuline survient, ce qui se traduit par une augmentation de la glycémie et le développement d'un diabète de type 2. L'insulino-résistance est causée par des facteurs génétiques et environnementaux (sédentarité, mauvaise alimentation...). Néanmoins, bien que l'insuline exerce des fonctions pléiotropes sur les métabolismes glucidique, lipidique, protéique, mais aussi sur la prolifération cellulaire, on restreint en pratique clinique la définition de la résistance à l'insuline à « un état dans lequel des quantités d'insuline supérieures à la normale sont nécessaires pour maintenir l'homéostasie

glucidique ». Ainsi, c'est l'inadéquation entre la glycémie et l'insulinémie qui permet de mettre en évidence chez les patients une insulino-résistance au plan biologique, bien que l'évaluation quantitative de la sensibilité à l'insuline nécessite des explorations métaboliques plus précises, comme le clamp euglycémique hyperinsulinémique.

La résistance à l'insuline des syndromes lipodystrophiques est associée à un stockage ectopique de lipides dans les tissus non adipeux, c'est-à-dire en particulier dans le foie et le muscle, à l'origine du phénomène de lipotoxicité. Il y a bientôt soixante ans, afin d'expliquer le mécanisme d'insulino-résistance musculaire en réponse à l'augmentation de la quantité de lipides musculaires, Randle et coll. postulaient que l'oxydation accrue des acides gras produisait une augmentation du citrate mitochondrial qui passait alors dans le cytosol où il entraînait une inhibition de la phosphofructokinase (enzyme clé de la glycolyse) (figure 18), conduisant à une augmentation de glucose-6-phosphate (Randle *et al.*, 1963). L'accumulation de glucose-6-phosphate provoquait une inhibition de l'hexokinase, conduisant à une augmentation de la concentration intracellulaire en glucose et à l'inhibition de son transport vers l'intérieur de la cellule (figure 18).



**Figure 18 : Le cycle de Randle (Girard, 2003)**

Des hypothèses alternatives ont été évoquées pour expliquer les mécanismes moléculaires de l'insulino-résistance. En effet, il a été montré que les concentrations de glucose-6-phosphate et de glucose sont en réalité diminuées dans le muscle exposé à des concentrations élevées d'acides gras.

Une nouvelle proposition a alors été faite par Schulman et coll., qui suggère que l'excès d'acides gras perturbe les mécanismes de la transmission du signal insulinique (Shulman, 2000) (figure 19).

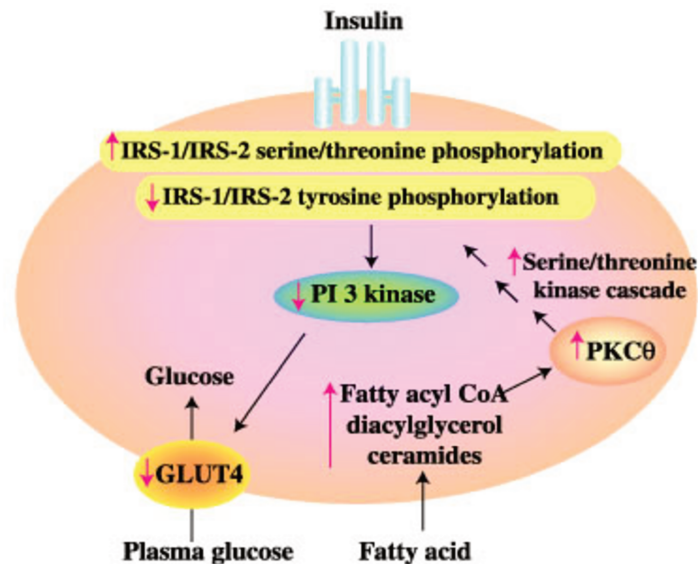


Figure 19 : Hypothèse alternative au cycle de Randle (Shulman, 2000)

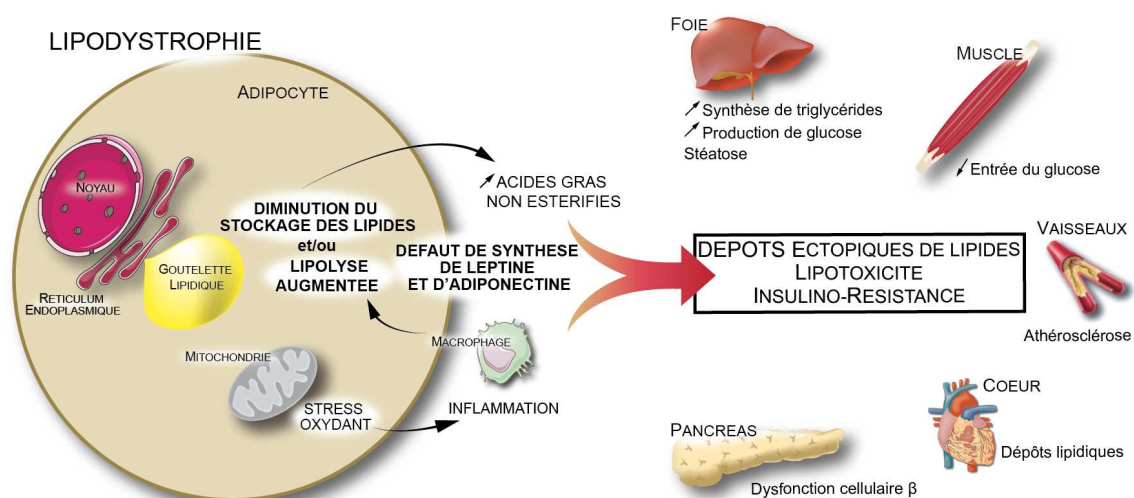
Selon cette hypothèse, l'augmentation des AG dans le muscle conduirait à l'accumulation de certains de leurs métabolites, tels que l'acyl-CoA et le DAG. Ceux-ci activent une protéine kinase C, une sérine/thréonine kinase activée par le DAG, qui phosphoryle le substrat majeur du récepteur de l'insuline (IRS1) sur des résidus sérine-thréonine, et inhibe ainsi sa capacité de recrutement et d'activation de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) (Samuel *et al.*, 2010). La voie de transduction du signal insulinique est donc inhibée, ce qui conduit à une réduction du transport de glucose. Le même type de mécanisme existe dans le foie, qui conduit à une inhibition de la synthèse de glycogène ; la résistance à l'insuline entraîne aussi une inactivation (phosphorylation) des enzymes clés (*phosphofructo-2 kinase et pyruvate kinase*) de la glycolyse, avec pour corollaire une activation de la néoglucogenèse. Cette hypothèse a été étayée par des études réalisées chez des souris dépourvues de TA, les souris A-ZIP/F (Moitra *et al.*, 1998). Celles-ci présentent une accumulation de triglycérides dans ces tissus et sont très insulino-résistantes en raison d'un défaut de signalisation insulinique dans les muscles et dans le foie (Kim *et al.*, 2000). La transplantation de TA chez ces souris corrige toutes ces anomalies, ce qui suggère que l'insulino-résistance observée dans les lipodystrophies, a pour origine un stockage ectopique des lipides dans les tissus non adipeux que sont le foie et les muscles, provoquant des dysfonctions cellulaires pouvant aller jusqu'à la mort cellulaire.

Le déséquilibre de la lipogenèse *de novo*, la lipolyse et la  $\beta$ -oxydation dans les situations pathologiques de lipodystrophies résulte en une libération excessive d'AGL circulants. Le surplus d'AGL est stocké dans le foie, les muscles, le cœur et le pancréas. La capacité du TA à métaboliser ces lipides est limitée, ce qui conduit à une **accumulation ectopique des lipides** favorisant la **lipotoxicité**. Les taux élevés d'AGL stimulent la synthèse de triglycérides



hépatiques, l'insulino-résistance hépatique, l'inflammation et la fibrose qui aboutissent à une stéatose hépatique. Au niveau du muscle squelettique, l'accumulation de lipides diminue la translocation de GLUT4 à la membrane plasmique en réponse à la stimulation par l'insuline conduisant au développement de l'insulino-résistance. Les lipides peuvent s'accumuler de manière ectopique dans le pancréas et induire une dysfonction des cellules  $\beta$ -pancréatiques avec diminution de la sécrétion d'insuline qui est l'une des principales causes d'apparition du diabète de type 2. Les dépôts lipidiques s'accumulent également autour du cœur au niveau péricardique ou intramyocardique. Ces dépôts sont associés à des dysfonctions des cardiomyocytes et au développement de l'athérosclérose.

L'étude des **syndromes lipodystrophiques** permet de montrer l'importance des **lipides ectopiques** dans la **résistance à l'insuline** systémique en s'affranchissant du rôle de l'obésité. En effet, dans ces maladies rares, c'est le déficit de TA corporel qui est associé à une insulino-résistance majeure, avec stéatose hépatique et hypertriglycéridémie sévères. Différentes altérations primitives du TA, dont certaines affectent directement la formation et/ou la structure de la gouttelette adipo-cytaire, en sont responsables, conduisant à une diminution majeure de la capacité adipo-cytaire à stocker l'excédent énergétique sous forme de triglycérides et à sécréter l'adiponectine et la leptine (figure 20).



**Figure 20 : Syndromes lipodystrophiques et conséquences métaboliques (adapté de Vigouroux, 2018)**

## 1. Les lipodystrophies acquises : généralisées et partielles

La lipodystrophie **généralisée** d'apparition secondaire ou **syndrome de Lawrence** se caractérise par une **disparition progressive** du TA, plus ou moins rapide souvent au moment de l'adolescence ou à la fin de l'enfance et avec une nette prédominance féminine (x3) et faisant souvent suite à une panniculite (inflammation du TA sous-cutané) (Garg, 2004, Misra *et al.*, 2004). Biologiquement, les anomalies métaboliques sévères observées (insulino-résistance, diabète, dyslipidémie) induisent des complications vasculaires, pancréatiques et hépatiques précoces. Les taux circulants de leptine et d'adiponectine sont très bas (Misra *et al.*, 2004, Haque *et al.*, 2002). L'étiologie de ce syndrome n'est pas connue mais une origine auto-immune a été avancée car ces patients ont très souvent des signes d'auto-immunité associés (anticorps anti-nucléaire, anti-muscle lisse ou anti-mitochondrie par exemple (Misra *et al.*, 2004). La prévalence est très faible.

Le syndrome de **Barraquer-Simons** est une lipodystrophie **partielle** acquise. Il se caractérise par une perte graduelle du TA sous-cutané dans la partie supérieure du corps (visage, membres supérieurs, thorax) conférant une lipoatrophie sévère, tandis que le TA s'accumule au niveau de la partie inférieure du corps (hanches, fesses, cuisses). Bien que ce syndrome ait été décrit depuis plus de cent ans, la **physiopathologie** de la maladie reste **inconnue**. La plupart des cas sont sporadiques. Les femmes sont plus affectées que les hommes (4:1). Néanmoins, son association à certaines maladies auto-immunes telles que la maladie cœliaque, la dermatomyosite, et le lupus érythémateux systémique (Garg, 2004, Misra *et al.*, 2004) et la présence élevée d'auto-anticorps *C3 Nephritic Factor* laissent suspecter une possible origine auto-immune.

L'infection par le **virus de l'immunodéficience humaine** (VIH) et le traitement par certaines **molécules antirétrovirales** est associé à un risque d'apparition progressive d'une **lipoatrophie faciale** et/ou une **lipohypertrophie viscérale** (Duran *et al.*, 2001). Les anti-protéases et les inhibiteurs nucléosidiques (deux des classes des molécules antirétrovirales) sont associés à un risque accru de lipodystrophies avec un effet direct sur le TA (Heath *et al.*, 2002, Martinez *et al.*, 2001) et sur les cellules endothéliales (Afonso *et al.*, 2017, Auclair *et al.*, 2014). Au cours d'un précédent travail au laboratoire, j'ai pu montrer *in vitro* que le Darunavir seul (inhibiteur de protéase) n'a que peu d'effet sur les fonctions adipocytaires, et altère très modestement la



différenciation adipocytaire et la fonction mitochondriale lorsqu'il est associé au Ritonavir (Capel *et al.*, 2012 - annexe 2).

## 2. Les lipodystrophies génétiques : généralisées ou CGL et partielles ou FPLD

Les **lipodystrophies congénitales généralisées** (CGL) ou syndrome de Berardinelli-Seip sont des maladies autosomiques récessives caractérisées par une lipoatrophie généralisée avec une **absence quasi totale de TA** dans les régions sous-cutanées, viscérales et la moelle osseuse, et par une musculature très développée dès la naissance ou peu après. Les concentrations sériques de **leptine** et d'**adiponectine** sont très **basses** proportionnellement à la quantité de TA des patients mais sont abaissées différemment selon l'origine génétique de la CGL (Antuna-Puente *et al.*, 2010, Agarwal *et al.*, 2003). La prévalence dans la population mondiale a été estimée entre 1/10 000 000 (Patni et Garg, 2015, Garg, 2004) et 3/100 000 (de Azevedo Medeiros *et al.*, 2017). Quatre sous types génétiques distincts de CGL ont été décrits mais les bases génétiques de ces syndromes restent inconnues pour certains patients. Les patients atteints de CGL ont des caractéristiques acromégaloïdes avec une mandibule élargie, des mains et pieds avec une musculature apparente, des veines proéminentes et une croissance accélérée. Ces patients sont hyperphagiques, ont une hépatomégalie et/ou une splénomégalie. Une **cardiomyopathie** hypertrophique et un retard mental modéré ont été rapportés chez certains patients. Ces patients développent des troubles du métabolisme avec une **insulino-résistance extrême** (qui se manifeste cliniquement par des lésions cutanées appelées *acanthosis nigricans*), une **stéatose hépatique** et une **hypertriglycéridémie** à la naissance ou durant l'enfance. L'insulino-résistance se complique d'un **diabète**, généralement à la puberté. L'installation du diabète, associé à la dyslipidémie favorise le développement précoce de **l'athérosclérose**. De plus l'atteinte hépatique peut évoluer vers la cirrhose (pour revue Hussain *et al.*, 2019, Mann et Savage, 2019, Lightbourne et Brown, 2017).

### **CGL de type 1 (AGPAT2)**

En 2002, Agarwal et coll. ont montré que le CGL de type 1 était dû à des variants du gène codant la protéine **AGPAT2** (*1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase 2*) impliquée dans le métabolisme de la **synthèse des triglycérides** (figure 7) (Agarwal *et al.*, 2002). Cette enzyme, surtout exprimée dans le TA, est localisée au niveau du RE et catalyse l'acylation de l'acide

lysophosphatidique (LPA) en acide phosphatidique (PA) dans la voie de synthèse des triglycérides.

### ***CGL de type 2 (BSCL2 - Seipine)***

En 2001, Magré et coll. ont identifié le premier variant pathogène du gène **BSCL2** (*Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy 2*) codant la **seipine** (Magré *et al.*, 2001). La seipine est une protéine transmembranaire du RE impliquée dans **l'assemblage de la gouttelette lipidique** (GL) par fusion des GL naissantes et dans la différenciation adipocytaire. Elle participerait au trafic lipidique et pourrait jouer un rôle dans la synthèse des TG en interagissant avec AGPAT2 (Salo *et al.*, 2016, Dollet *et al.*, 2014, Szymanski *et al.*, 2007).

### ***CGL de type 3 (CAVI)***

Un seul patient (décrit par notre laboratoire) a été rapporté dans la littérature portant un variant pathogène du gène **CAVI** codant pour la protéine **cavéoline-1** (Kim *et al.*, 2008). Cette protéine très conservée au cours de l'évolution entre dans la composition des invaginations de la membrane plasmique connues sous le nom de cavéoles. Les cavéoles sont abondantes dans les membranes plasmiques adipocytaires et contribuent à l'internalisation des acides gras. La cavéoline est également présente dans la paroi de la gouttelette lipidique adipocytaire.

### ***CGL de type 4 (CAVIN1/PRTF)***

Les CGL de type 4 sont causés par des variants pathogènes du gène **CAVIN1** (*caveolae associated protein 1*) ou **PRTF** (*polymerase I ans transcript release factor*) (Salle-Teyssieres *et al.*, 2016, Hayashi *et al.*, 2009). La protéine **Cavin-1** est un facteur essentiel de la biogénèse des cavéoles et co-localise avec la cavéoline-1 dans l'adipocyte.

Contrairement aux lipodystrophies congénitales généralisées, les **lipodystrophies partielles familiales (FPLD)** n'affectent pas l'intégralité du TA et sont plus volontiers d'apparition pubertaire. La FPLD est caractérisée par un **perte de TA** au niveau des **extrémités** (surtout dans la partie inférieure du corps) avec une préservation du TA au niveau de du visage, du cou et/ou une lipohypertrophie intra-abdominale. Les patients présentent une **insulino-résistance sévère** (acanthosis nigricans) et une **hypertrophie musculaire**. Le diabète et les **complications cardio-métaboliques** apparaissent à l'âge adulte (épisodes de pancréatite consécutifs à une **hypertriglycéridémie, stéatose hépatique** évolutive, pathologies cardio-vasculaires). Six

sous-types génétiques distincts de FPLD ont été décrits mais les bases génétiques des syndromes de lipodystrophies partielles familiales restent inconnues pour de nombreux patients. La FPLD est à transmission autosomique dominante chez la plupart des patients même si de rares cas de transmission autosomique récessive ont été décrits.

### ***Lipodystrophie partielle familiale de type 1 (FPLD1)***

La **FPLD1**, aussi connue comme le syndrome de **Kobberling** est de cause génétique inconnue (Herbst *et al.*, 2003). Il est possible que cette pathologie soit d'origine oligo- ou multigénique. Elle pourrait représenter une forme sévère de syndrome métabolique commun avec répartition très androïde du TA.

### ***Lipodystrophie partielle familiale de type 2 (FPLD2)***

La **FPLD2** ou syndrome de Dunnigan, découvert par Cao et coll., est causée par des variants pathogènes du gène *LMNA*, codant pour les lamines nucléaires A et C (Cao et Hegele, 2000). Les lamines A/C sont des protéines **nucléaires** qui forment, en association avec les lamines B, un réseau protéique qui tapisse la face interne de l'enveloppe nucléaire : **la lamina**. Les variants les plus fréquemment retrouvés affectent le résidu arginine en position 482 (p.Arg482Gln, p.Arg482Trp, p.Arg482Leu). Ces patients, décrits au laboratoire, considérés comme FPLD2 typique, présentent un **phénotype sévère** (Bidault *et al.*, 2013, Bereziat *et al.*, 2011) alors que les patients FPLD2 porteurs d'autres variants pathogènes à des positions différentes, sont considérés comme atypiques et peuvent avoir un phénotype modéré (pour revue Vigouroux *et al.*, 2018).

### ***Lipodystrophie partielle familiale de type 3 (FPLD3)***

La lipodystrophie partielle familiale due à des variants pathogènes de  $PPAR\gamma$ , aussi appelée **FPLD3** (*familial partial lipodystrophy of Dunnigan type 3*), se caractérise par une **diminution du TA sous-cutané des membres** (bras et jambes) et des fesses et une **lipohypertrophie abdominale**. Les patients porteurs atteints de FPLD3 ont des **complications métaboliques majeures**, en particulier une **insulino-résistance très sévère** avec une apparition précoce du diabète de type 2 et une dyslipidémie marquée notamment une hypertriglycémie. On retrouve également souvent chez ces patients une **hypertension artérielle** et une stéatose hépatique (Auclair *et al.*, 2013). Les femmes affectées présentent souvent un syndrome des ovaires polykystiques. Jusqu'à présent, une quinzaine de mutations différentes, toutes

inactivatrices, ont été reportées tout au long du gène *PPARG* chez les patients. PPAR $\gamma$  est très exprimé dans le TA et a un rôle essentiel dans l'adipogénèse. Il n'est donc pas étonnant que des mutations dans ce gène inhibent la différenciation adipocytaire. Néanmoins, les raisons pour lesquelles la perte de TA est uniquement périphérique restent largement incomprises.

#### ***Lipodystrophie partielle familiale de type 4, 5, 6 (FPLD4 à 6)***

La **FPLD4** est la conséquence d'une inactivation de la **périlipine-1**, protéine de la GL codée par *PLIN1* (Gandotra *et al.*, 2011a). La périlipine exerce une **action duelle**. Sous sa forme non-phosphorylée, elle **inhibe la lipolyse adipocytaire basale** en séquestrant la protéine CGI-58 (co-activateur de l'ATGL, lipase intervenant dans la première étape d'hydrolyse des triglycérides en diglycérides et acides gras). La périlipine permet donc de **protéger la gouttelette lipidique** de la lipolyse en conditions basales. En **conditions lipolytiques**, la périlipine phosphorylée libère CGI-58 et permet aux enzymes lipolytiques de se relocaliser à proximité de la gouttelette et de **favoriser la lipolyse**.

La **FPLD5** a été rapporté chez un seul patient et est causée par une mutation dans *CIDEA* (Rubio-Cabezas *et al.*, 2009). Tout comme *PLIN1*, la protéine *CIDEA* participe à la structure et à la fonction de la GL.

Des variants de la **lipase hormono-sensible**, codée par le gène *LIPE* sont la cause de la lipodystrophie partielle familiale de type 6 ou **FPLD6** (Zolotov *et al.*, 2017, Albert *et al.*, 2014, Farhan *et al.*, 2014). Je consacrerai un chapitre particulier (chapitre IV) à cette protéine puisqu'une partie de mon travail de thèse consistait à étudier les effets d'un nouveau variant de *LIPE*.

## B. La lipomatose de Launois-Bensaude

### 1. Généralités

La **lipomatose de Launois-Bensaude** (LLB) ou *multiple symmetric lipomatosis* en anglais (MSL) a été décrite pour la première fois en 1846 (Brodie, 1846). C'est une maladie rare caractérisée cliniquement par le développement au niveau du TA sous-cutané de **masses adipeuses** siégeant préférentiellement dans la **partie supérieure du corps**. Ces masses adipeuses non encapsulées (pseudo-lipomes) sont surtout localisées au niveau du cou et à la racine des membres (Enzi *et al.*, 2015). La prévalence de la maladie a été évaluée à 1/25000, atteignant plus fréquemment les hommes (sex ratio 6/1) avec un début vers l'âge de 40 ans en association ou non avec une obésité (Enzi *et al.*, 2015, Enzi *et al.*, 2002). La plupart des cas rapportés sont d'origine méditerranéenne.

Cliniquement, ce syndrome a été classé en deux types. Dans la LLB de type 1, les patients ont généralement un IMC bas et présentent une accumulation symétrique des lipomes, plus particulièrement dans le TA sous-cutané de la région du cou (bosse de bison), des épaules et dans le dos, en association avec une lipoatrophie des extrémités. Au contraire dans la LLB de type 2, les patients sont plutôt en surpoids et les lipomes sont plus diffus. Les patients peuvent développer une dysphagie, une dysphonie et un syndrome de l'apnée du sommeil. Lorsque les lipomes sont conséquents, les patients peuvent avoir des difficultés pour respirer nécessitant une prise en charge chirurgicale. Biologiquement, les LLB de type 1 et 2 sont associées à une **hypertriglycémie** et une **insulino-résistance**. Une **neuropathie périphérique** est une composante de la maladie retrouvée chez de nombreux patients.

### 2. Les différentes étiologies de la maladie

Sur le plan clinique, les différentes formes de lipomatose de Launois-Bensaude semblent similaires d'après les descriptions de la littérature. Historiquement, elles ont d'abord été décrites chez des patients ayant une consommation excessive d'alcool (Enzi *et al.*, 2002). L'apparition des lipomes serait en lien avec un défaut de la signalisation  $\beta$ -adrénergique et avec les propriétés lipogénique et anti-lipolytique de l'alcool. C'est l'étiologie la plus fréquente de la LLB.

Néanmoins, de rares cas de lipomatose sans contexte d'éthylisme en association avec le syndrome MERRF (*myoclonic epilepsy with ragged red fiber*) ont été rapportés, laissant à penser

à un caractère héréditaire. Le syndrome MERRF provoque, à des degrés divers, plusieurs signes cliniques tels qu'une myopathie, une ataxie cérébelleuse, une démence, une neuropathie périphérique et des lipomes. C'est en 1990 que le variant pathogénique le plus fréquent, m.8344A>G du gène mitochondrial *MT-TK* codant le tARN<sup>Lys</sup> a été identifié (Shoffner JM, 1990). Trois autres variants de ce même gène ont été associés au syndrome MERRF (m.8356T>C, m.8363G>A et m.8361G>A).

Plus récemment, d'autres formes génétiques de la pathologie liés à des variants du gène *MFN2* ont été mise en évidence. Concernant le gène *LIPE*, de rares cas ont associé des variants de *LIPE* à des présentations cliniques de lipodystrophie partielle avec ou sans lipomatose. L'implication de ces deux gènes dans la lipomatose de Launois-Bensaude font l'objet de mes travaux de recherche et seront développés dans la suite du manuscrit.

# Chapitre III : La mitofusine 2, une protéine clé de la fusion mitochondriale

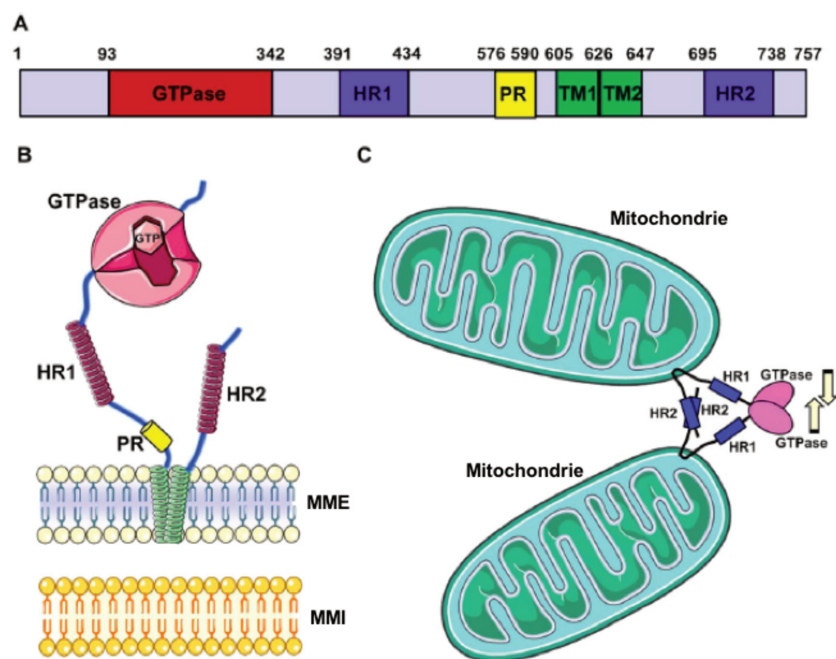
## A. Structure et rôle au sein de la mitochondrie

Les **mitochondries** sont organisées en un **réseau tubulaire dynamique** en constant remodelage. En fait ces organelles sont mobiles et peuvent soit se **diviser** et former des **entités individuelles** par le processus de **fission**, soit fusionner par le processus de **fusion** et former un **réseau continu**. De nombreuses études suggèrent que les mitochondries sont connectées aux organelles fonctionnelles pour pouvoir changer rapidement en fonction des conditions cellulaires. Un réseau continu **fusionné** est associé à une grande **production d'ATP**, probablement dû aux échanges optimisés de métabolites et d'ADN mitochondrial (ADNmt) dans leur matrice mitochondriale. C'est le cas par exemple lors du jeûne, lorsque le besoin en ATP devient critique pour la cellule (Rambold *et al.*, 2011). Au contraire, la **fragmentation** est associée à une **réduction** de la **respiration mitochondriale**.

La **fusion** est un processus unique dans la cellule qui implique deux membranes : la **membrane mitochondriale externe** (MME) et la membrane mitochondriale **interne** (MMI), qui doivent être ré-arrangées de manière coordonnée pour maintenir l'intégrité des mitochondries. La fusion des mitochondries est médiée par des homo- ou hétéro-dimères de MFN2 et/ou MFN1. En effet, *in vitro*, des cellules déficientes en MFN1 ou MFN2 ont une fragmentation du réseau mitochondrial. Cependant le réseau est un peu différent selon qu'il s'agit d'une déficience en MFN1 ou en MFN2. Alors que le MFN1-KO induit une fragmentation mitochondriale sévère avec la formation de petites sphères uniformes, les cellules MFN2-KO ont un réseau moins fragmenté avec une mixité de mitochondries sphéroïdes et ovales de taille très variable, parfois même plus large que dans la condition contrôle (Chen *et al.*, 2003, pour revue Wai et Langer, 2016 et Filadi *et al.*, 2015).

Chez l'Homme, le gène **MFN2** est situé sur le chromosome 1 (19 exons) et code pour la **mitofusine 2** (MFN2), une protéine de 80 kDa impliquée dans la **fusion mitochondriale**. Chez les mammifères, les mitofusines MFN1 et MFN2 sont des protéines homologues (~ 80% d'homologie) qui appartiennent à la famille des GTPases transmembranaires mitochondriales. Les mitofusines ont été caractérisées en premier lieu chez la drosophile *Drosophila melanogaster* sous le nom de *fuzzy onions* (Fzo) (Hales et Fuller, 1997). Chez les eucaryotes,

cette famille a des orthologues de la levure aux Hommes avec des propriétés structurales conservées entre les différentes espèces (Mozdy et Shaw, 2003). MFN2 est une protéine ubiquitaire de 757 acides aminés codée par l'ADN nucléaire et localisée à la MME. Elle est composée de plusieurs domaines comme indiqué sur la figure 21. MFN2 possède un grand domaine GTPase cytosolique situé en N-terminal, suivi par un *spacer*, un domaine HR1 (*heptad-repeat 1*) en hélice, un autre *spacer*, puis deux domaines transmembranaires (TM), un dernier *spacer* et enfin un second domaine HR2 C-terminal. Entre les domaines HR1 et TM, MFN2 possède un domaine riche en prolines (PR) probablement responsable des interactions protéines-protéines spécifiques. Le domaine GTPase contient deux poches pour la liaison du GTP (guanosine triphosphate).



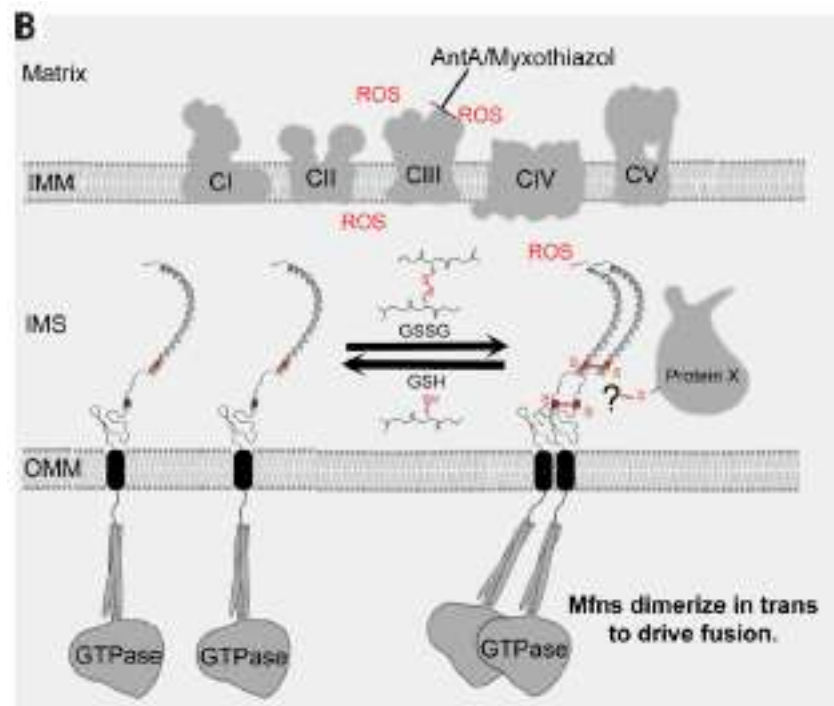
**Figure 21 : Représentation schématique, topologie classique et dimérisation de MFN2 (d'après Filadi *et al.*, 2018)**

(A) Représentation schématique linéaire de la structure de MFN2. Le large domaine GTPase N-ter (en rouge) est suivi du domaine HR1 (en bleu), du domaine PR (en jaune), des deux domaines TM (en vert) et du domaine HR2 C-ter (en bleu). (B) Représentation schématique de la topologie de MFN2 avec les deux domaines TM (hélices vertes) traversant la MME et les domaines cytosoliques indiqués. Le domaine GTPase a deux sites de liaison au GTP. (C) Schéma de la fusion de deux mitochondries médiées par les interactions des domaines HR2 de deux protéines MFN2 opposées. MFN2 : mitofusine 2, HR : heptad-repeat, PR : prolin-rich, TM : transmembranaire, MME : membrane mitochondriale externe, GTP : guanosine triphosphate, MMI : membrane mitochondriale interne.

Une étude a montré que la fusion mitochondriale est activée en cas de stress cellulaire *via* l'oxydation des ponts dissulfures du glutathion (GSSG) provoquant l'oligomérisation de MFN2 (Shutt *et al.*, 2012). Or les cystéines responsables de cette oligomérisation dynamique sont situées dans le domaine C-terminal exposé dans la région cytosolique, et le cytosol est considéré



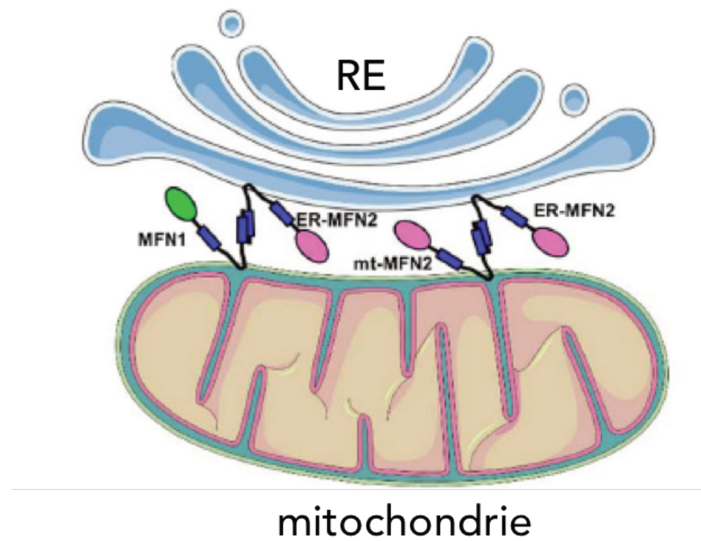
comme un environnement réducteur. Il est donc difficile d'expliquer la dynamique GSSG/GSH avec la topologie classiquement admise (figure 21). Mattie et coll. ont revisité la topologie de MFN2 en validant les prédictions bioinformatiques par des expériences biochimiques et fonctionnelles. MFN2 existerait sous deux topologies : celle avec les domaines N- et C-terminaux cytosoliques (topologie classique) et une nouvelle avec le domaine N-terminal cytosolique, un seul domaine TM et le domaine C-terminal, contenant HR2, au niveau mitochondrial (figure 22) (Mattie *et al.*, 2018).



**Figure 22 : Topologie et modèle de fusion mitochondriale selon Mattie *et al.*, 2018**

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites dans l'espace intermembranaire (IMS) activent la fusion mitochondriale en présence de GSH par la formation de GSSG. En présence de GSSG, MFN2 forme des oligomères via des ponts dissulfures (S-S). L'identité des protéines auxquelles MFN2 est conjuguée restent à élucider. Cependant, MFN2 forme des oligomères avec elle-même ou avec une protéine de l'IMS (protéine X). La formation des ponts S-S pourrait conduire à des changements de conformation induisant l'attachement des mitochondries ou des changements de l'activité GTPase. MFN2 est recyclée par un processus dynamique d'oxydo-réduction du couple GSSG/GSH. GSSG/GSH : glutathion oxydé/réduit

MFN2 serait également un élément clé dans l'établissement des contacts mitochondries - RE, même si les fonctions exactes de ces interactions demeurent le sujet d'intenses débats (figure 23). Néanmoins, une petite fraction de MFN2 a été observé au niveau du RE, au niveau des membranes mitochondriales associées au RE (MAM, *mitochondria-associated membranes*) (Giorgi *et al.*, 2015). De nombreux processus dont la formation des autophagosomes seraient régulés par ces MAM faisant intervenir MFN2 (Hamasaki *et al.*, 2013, Sugiura *et al.*, 2013).



**Figure 23 : Représentation schématique des interactions entre la mitochondrie et le réticulum endoplasmique (adapté de Filadi *et al.*, 2018)**

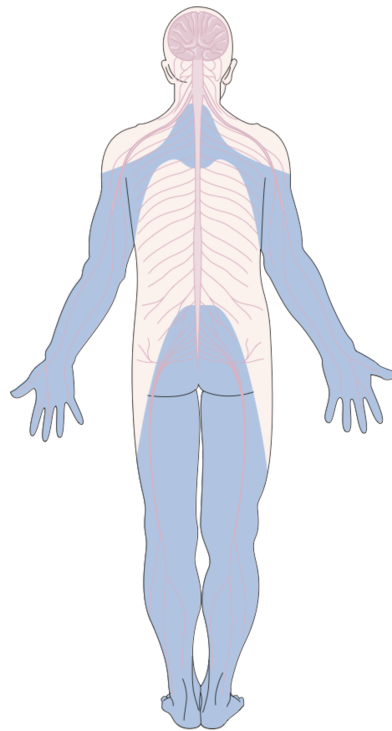
*La mitofusine 2 (MFN2) interagit avec elle-même ou avec MFN1 par dimérisation du domaine HR2 pour juxtaposer le RE à la mitochondrie. mt : mitochondrial, RE/ER : réticulum endoplasmique*

Les protéines régulant la dynamique mitochondriale sont souvent impliquées dans le processus de **contrôle qualité des mitochondries** autrement appelé **mitophagie**. La mitophagie fait intervenir deux médiateurs importants que sont la kinase mitochondriale PINK1 (*PTEN-induced putative kinase 1*) et la ligase parkine (*E3 ubiquitin-protein ligase*). La PINK1 s'accumule à la surface de la MME des mitochondries dépolarisées alors que la parkine ubiquitine les protéines à dégrader au niveau cytosolique. Lors de la mitophagie, par exemple durant une dépolarisation de la membrane mitochondriale induite par le FCCP (*4-trifluoromethoxy-phenylhydrazon*), la parkine ubiquitine les mitofusines et les conduit à la dégradation en induisant leur fragmentation, ce qui favorise leur élimination. Des études ont montré que dans les cellules déficientes en MFN2, la mitophagie n'est plus possible du fait de l'impossibilité de la parkine à être transloquée à la mitochondrie (Gegg *et al.*, 2010, Tanaka *et al.*, 2010). MFN2 est donc essentielle au processus de mitophagie.

## **B. Les variants pathogènes de MFN2 et leur retentissement pathologique**

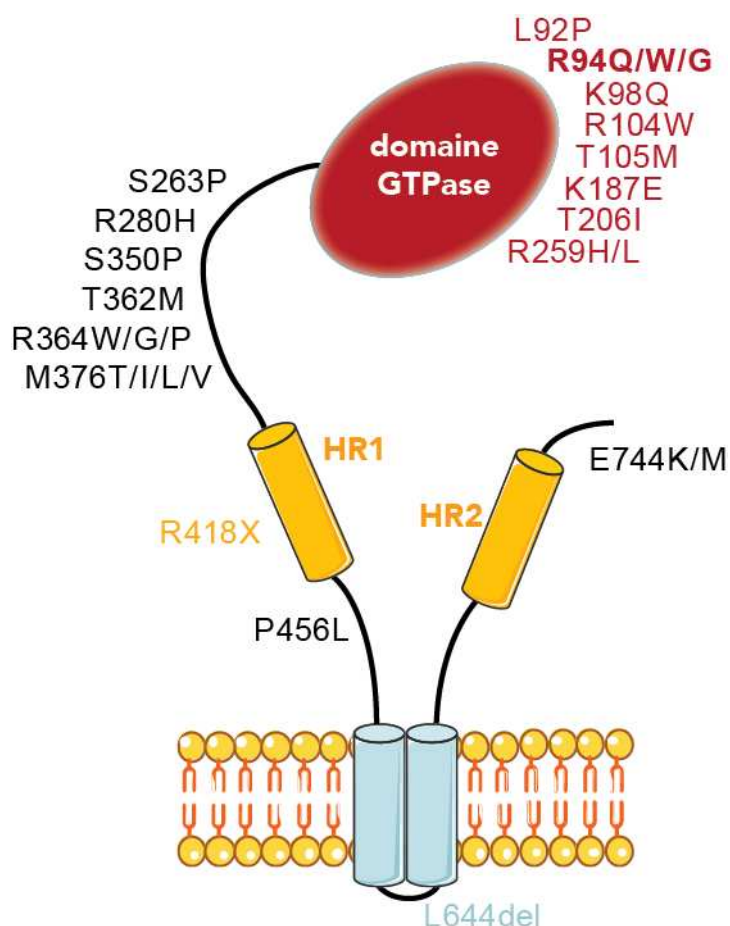
Etant donné le rôle crucial des mitochondries dans la physiologie et la bio-énergétique cellulaire, les dysfonctions mitochondriales sont la cause de nombreuses pathologies. Les neuropathies sensitives et motrices de **Charcot-Marie-Tooth** (CMT) sont les plus fréquentes

des maladies neurologiques (Braathen, 2012). Ce sont des maladies génétiques neuromusculaires évolutives qui atteignent les nerfs périphériques provoquant souvent une amyotrophie des mollets, des avant-bras et des mains. Il existe plusieurs formes de CMT qui se différencient par le gène en cause, le mode de transmission, et les caractéristiques cliniques. En particulier, **MFN2** est connu pour être impliqué dans la **CMT de type 2A (CMT2A)** ou neuropathie axonale touchant le système nerveux périphérique (figure 24) (Zuchner *et al.*, 2006, Zuchner *et al.*, 2004).



**Figure 24 : Atteinte des neurones périphériques au cours de la CMT2A (en bleu)**

Parmi les différents types cellulaires, les neurones sont particulièrement sensibles au défaut de MFN2. Pour être opérationnel, ces cellules ont besoin de mitochondries fonctionnelles localisées dans les dendrites et terminaux synaptiques pour répondre au besoin en ATP. A ce jour plus d'une centaine de variants du gène *MFN2* responsables de CMT2A de transmission dominante a été rapportée. La plupart de ces mutations sont de type faux-sens, et sont localisées dans des régions critiques de la protéine, en particulier à proximité ou au sein même du domaine GTPase et dans les motifs en hélice (figure 25). L'acide aminé retrouvé le plus fréquemment muté est l'arginine en position 94 et deux variants de ce codon (responsables des variations protéiques p.Arg94Trp et p.Arg94Gln) sont rapportés chez de nombreux patients indépendants (Zuchner et Vance, 2006). Il existe également de rares formes autosomiques récessives, plus sévère et de début plus précoce.



**Figure 25 : Représentation schématique des variants les plus communs de MFN2 liés à CMT2A (d'après Filadi *et al.*, 2018)**

Ce schéma représente la protéine MFN2 et illustre les variants pathogènes de MFN2 associés à la neuropathie de type CMT2A. Les couleurs se réfèrent au domaine affecté : en rouge le domaine GTPase, en jaune les domaines HR1/2, en bleu le domaine transmembranaire, en noir les liaisons entre les domaines. En gras le variant le plus fréquemment retrouvé impliquant l'arginine (R) en position 94.

L'étude des liens entre MFN2 et CMT2A est sujet à d'intenses recherches et plusieurs mécanismes physiopathologiques ont été proposés. Le défaut de fusion mitochondriale pourrait participer à la pathogenèse de la neuropathie CMT2A en perturbant le maintien et la distribution de l'ADNmt (Chen *et al.*, 2007). Comme l'ADNmt code pour plusieurs protéines de la chaîne respiratoire, la déplétion en ADNmt conduit à une altération de la phosphorylation oxydative et donc à un déficit en ATP qui entraîne, du fait de la dépendance énergétique importante des tissus nerveux vis-à-vis de l'ATP, des atteintes neurodégénératives. Un autre mécanisme perturbé est le transport mitochondrial, qui est anormal en présence d'une protéine MFN2 déficiente. Les mitochondries se déplacent en effet le long des neurones pour se localiser préférentiellement aux synapses où elles peuvent subvenir aux besoins énergétiques nécessaires pour la mobilisation des neurotransmetteurs. La distance parcourue, du corps cellulaire du neurone à la synapse, peut être très importante, de l'ordre d'un mètre pour certains moto-neurones. La dynamique mitochondriale contribue au déplacement des mitochondries en

permettant leur déformation. En conséquence, les axones les plus longs sont ceux les plus touchés dans la CMT2A, ce qui se traduit par une neuropathie périphérique.

Les **altérations** d'expression de **MFN2** pourraient être impliquées dans la **maladie d'Alzheimer**, la maladie de **Parkinson**, certaines **cardiomyopathies** et les situations **dysmétaboliques** (obésité/diabète/insulino-résistance). L'intolérance au glucose associée à l'insulino-résistance est en effet caractérisée par une diminution de l'oxydation du glucose, de la respiration mitochondriale et une dysfonction mitochondriale (Diaz *et al.*, 2015, Misko *et al.*, 2012, Petersen *et al.*, 2004, Patti *et al.*, 2003). L'expression de MFN2 est diminuée chez les patients diabétique de type 2 et cette réduction est proportionnelle à la sensibilité à l'insuline (Liu *et al.*, 2014, Bach *et al.*, 2005). La perte de MFN2 provoque une dysfonction mitochondriale, une augmentation de la production des ROS, l'activation de la voie JNK et induit la formation d'intermédiaires lipidiques cytosoliques conduisant à une insulino-résistance dans les muscles squelettique et le foie. Ces défauts sont les conséquences d'un stress du RE induit par les dysfonctions de MFN2 (Sebastian *et al.*, 2012).

Récemment, un nouveau variant de **MFN2** à l'état homozygote a été décrit dans deux publications comme responsable de la **lipomatose de Launois-Bensaude** (Rocha *et al.*, 2017, Sawyer *et al.*, 2015). Il s'agit d'un variant localisé dans l'exon 17 qui induit la transition d'une cytosine de l'ADN en thymine (c.2119C>T) et se traduit par la présence d'un variant faux-sens **p.Arg707Trp** au niveau de la protéine.

En 2015, Sawyer et coll. ont décrit **trois patients** âgés d'une cinquantaine d'années, issus de deux familles indépendantes (deux frères et une femme non apparentée) avec des parents consanguins d'origine irlandaise et australienne respectivement. Les trois patients ont des **lipomes volumineux** dans la partie supérieure du corps et une **lipoatrophie** majeure des membres inférieurs ainsi qu'une **neuropathie périphérique** modérée à sévère en fonction des patients. Ils sont tous les trois porteurs du variant **p.Arg707Trp** à l'état homozygote.

En 2017, Rocha et coll. montrent l'implication de ce même variant à l'état homozygote ou hétérozygote composite (en association avec le variant p.Arg343del pour l'un des patients) chez **quatre autres patients** issus de trois familles indépendantes. Ces patients, plus jeunes que dans l'étude précédente, (3 femmes de 17, 18 et 37 ans et un homme de 16 ans) sont d'origine européenne et présentent des **masses lipomateuses** dans le haut du corps avec une **lipoatrophie** du TA sous-cutané des membres inférieurs, ainsi qu'une **neuropathie périphérique** pour deux d'entre eux. L'investigation clinique a révélé une insulino-résistance modérée à sévère, des taux

de triglycérides plasmatiques élevés chez deux patients. Tous les patients ont des taux de leptine et d'adiponectine sériques très diminués. L'analyse du tissu lipomateux de trois des quatre patients montre une expression inchangée de la protéine MFN2 mais un effondrement de l'expression des gènes de la leptine et de l'adiponectine en accord avec le déficit de ces adipokines mesuré au niveau plasmatique. Une augmentation de l'expression génique de CITED1 (marqueur d'adipocyte beige) est retrouvée dans les masses pseudo-lipomateuses des 3 patients. L'analyse histologique du TA lipomateux montre des adipocytes uniloculaires entourés de nombreuses et grosses mitochondries, pour partie fragmentées, n'exprimant pas le marqueur thermogénique UCP1. Aucune de ces observations n'a été retrouvée dans l'étude des fibroblastes cutanés issus de trois des patients.

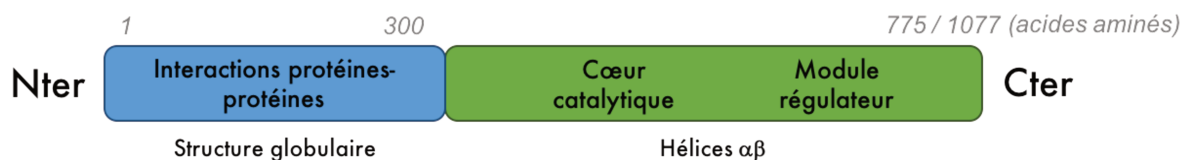
Toutes ces données sont en faveur d'un **lien causal** entre la **lipomatose de Launois-Bensaude** et le génotype **p.Arg707Trp** homozygote de **MFN2**, ou le génotype hétérozygote composite associant p.Arg707Trp à un autre variant allélique du même gène. La maladie lipomateuse pourrait être liée à une dysfonction mitochondriale au niveau du TA.

Chez la souris, la délétion de *Mfn1* ou *Mfn2* est létale au cours de la gestation, révélant ainsi le rôle essentiel des mitofusines pour le développement embryonnaire (Chen *et al.*, 2003). Des modèles murins transgéniques, pour certains conditionnels, ont été générés en ciblant surtout l'étude du système nerveux périphérique impliqué dans la CMT2A. Une des dernières études montre l'importance du ratio MFN1/MFN2 dans le système nerveux. Chez la souris conditionnelle *Mfn2R94Q*, l'augmentation de l'expression de MFN1 dans les neurones rétablit un phénotype normal des souris. Moduler la quantité de MFN1 pourrait être une stratégie thérapeutique pour traiter la neuropathie associée aux variants pathogènes de MFN2 (Zhou *et al.*, 2019). Le rétablissement des interactions MFN2 - RE ou la diminution du stress du RE, par des traitements pharmacologiques, améliore la morphologie des mitochondries et prévient la dégénérescence axonale dans des cultures primaires et *in vivo* (Bernard-Marissal *et al.*, 2019).

# Chapitre IV : La Lipase Hormono-Sensible

## A. Structure et rôle au sein de l'adipocyte

Chez l'Homme, le gène *LIPE* est situé sur le chromosome 19 (Levitt *et al.*, 1995) et code la **lipase hormono-sensible** (LHS) de 88 kDa, enzyme clé impliquée dans la **lipolyse adipocytaire**. Par homologie de séquence avec une bactérie de l'antarctique (*Moraxella* TA144), la LHS serait composée d'un domaine N-terminal globulaire et d'un domaine C-terminal en hélices  $\alpha/\beta$  contenant le site catalytique ainsi qu'un module régulateur riche en résidus sérines sensibles aux phosphorylations (figure 26). Il a été montré chez le rat que la LHS existait sous forme d'un dimère fonctionnel composé de deux sous-unités monomériques. Son activité d'hydrolyse est quarante fois supérieure à celle des monomères, sans pour autant avoir de différence d'affinité pour les substrats.



**Figure 26 : Représentation schématique de la lipase hormono-sensible humaine (d'après Albert *et al.*, 2014)**

En bleu le domaine N-terminal d'environ 300 acides aminés, en vert le domaine C-terminal comprenant le cœur catalytique et le module régulateur (résidus sérines phosphorylables) de l'enzyme. La protéine contient 775 ou 1077 acides aminés selon qu'il s'agisse de la forme courte ou longue.

La LHS est cytosolique et exprimée principalement dans le TA blanc et brun, ainsi que dans les surrénales, les gonades, les îlots pancréatiques, le cœur et les muscles squelettiques (Large *et al.*, 2004). La protéine LHS existe sous deux formes : une **forme longue** exprimée dans les tissus stéroïdogéniques tels que les **testicules** où elle agit sur les esters du cholestérol pour en libérer ce dernier afin de produire des hormones stéroïdiennes et **une forme courte** exprimée dans les **tissus adipeux**. Le premier exon du gène *LIPE* qui en compte dix, est spécifique de la forme testiculaire. Dans le TA, la protéine LHS de 775 acides aminés, correspond à la traduction des exons deux à dix.

Au cours de la lipolyse adipocytaire les triglycérides de la GL sont hydrolysés en diglycérides par l'adipose triglycéride lipase puis la LHS hydrolyse les diglycérides en monoglycérides et enfin la monoglycéride lipase hydrolyse les monoglycérides en glycérol (figure 9). La LHS a une spécificité de substrat plus large que les autres enzymes de la voie lipolytique. Elle peut



hydrolyser les triglycérides, les monoglycérides et les esters de cholestérols. Les triglycérides hydrolysés libèrent dans le sang des AGL, transportés par la sérum albumine, qui peuvent être utilisés par les cellules des tissus demandeurs. La lipase est dite **hormono-sensible** dans la mesure où elle est stimulée lors du jeûne ou de l'exercice physique par diverses hormones telles que les **catécholamines** (l'adrénaline notamment) et, pour une moindre mesure, par l'hormone corticotrope (ACTH) pour favoriser la libération dans le sang des acides gras stockés dans les lipides des tissus adipeux. L'**insuline** a au contraire un effet **anti-lipolytique**. La LHS peut être activée selon deux mécanismes. D'une part, elle est activée par la protéine kinase A en réponse à la présence d'AMPc (voie adrénergique). D'autre part, la périlipine-1 phosphorylée entraîne la relocalisation de la LHS à la surface de la GL, où elle pourra exercer son action catalytique.

## B. Les variants pathogènes de *LIPE* et leur retentissement fonctionnel

A ce jour, trois études sont en faveur de l'implication de différents variants du gène *LIPE* (RefSeq NM\_005357) dans un phénotype de lipodystrophie, de lipomatose, ou d'hypertriglycéridémie familiale (Zolotov *et al.*, 2017, Albert *et al.*, 2014, Farhan *et al.*, 2014).

Actuellement, neuf patients porteurs de trois variants différents présumés pathogènes du gène *LIPE* ont été décrits. La localisation des trois variants est représentée sur la figure 27.

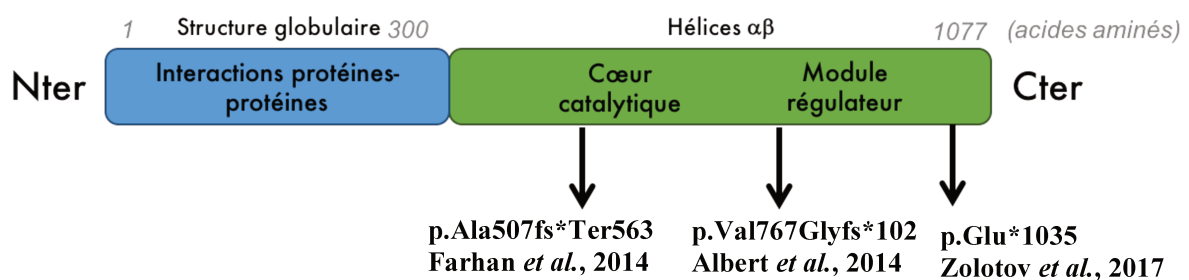


Figure 27 : Localisation des trois variants pathogènes de *LIPE* publiés à ce jour

En 2014, au cours d'une étude sur les déterminants génétiques de l'hypertriglycéridémie, l'équipe d'Albert et coll. identifie chez plusieurs membres d'une même famille une délétion de 19 paires de bases dans l'exon 9 du gène *LIPE* (c.2300\_2318del) provoquant un décalage du cadre de lecture. La prédiction de la conséquence au niveau protéique est le remplacement de la valine (Val) en position 767 par une glycine (Gly) suivi par un décalage de cadre de lecture (**p.Val767Glyfs\*102**). Quatre frères et sœurs (trois femmes et un homme) d'une famille Amish de 42 à 56 ans au moment du diagnostic, sont porteurs de ce variant à l'état homozygote



(génotype DD). Comparativement aux six autres membres de la fratrie ne portant pas, ou portant ce variant à l'état hétérozygote (génotype ID ou II), les patients de génotype DD présentent une **triglycéridémie**, une **glycémie à jeun**, une **valeur** de l'index **HOMA-IR** d'**insulino-résistance** et un **pourcentage de graisses hépatiques plus élevés** et des taux de **HDL-cholestérol plus faibles**. L'imagerie est en faveur d'une redistribution modérée de la masse grasse chez les sujets de génotype DD (diminution de la masse grasse sous-cutanée des mollets et augmentation du TA viscéral), sans que des lipomes ne soient décrits. L'analyse par Western-blot montre que la protéine **LHS** n'est **pas détectable** dans le TA blanc sous-cutané abdominal des patients *LIPE* p.Val767Glyfs\*102 homozygotes. Ce variant provoque donc un défaut de synthèse de la LHS. Les adipocytes de ce tissu sont plus petits et ont un contenu en diglycérides augmenté par rapport aux sujets sains. Dans les homogénats de TA sous-cutané des patients homozygotes *LIPE* p.Val767Glyfs\*102, la lipolyse basale et stimulée par l'isoprotérénol est diminuée. L'effet anti-lipolytique de l'insuline est diminué. Parallèlement, les quantités protéiques du récepteur à l'insuline et de son substrat IRS1 sont abaissées. De plus, l'analyse histologique et l'étude de l'expression génique du TA montre qu'il est inflammatoire (augmentation de l'infiltration macrophagique, de l'expression du gène *IL6* et de la production d'IL6) et qu'il présente un défaut de différenciation adipocytaire (expression du gène *PPARG* non modifiée par rapport au TA des sujets de génotype ID ou II, mais expression des gènes *RXRA*, *SREBP1A*, *SREBP1C*, *CEBPA*, *CEBPB* diminuée). L'expression des gènes impliqués dans la synthèse des acides gras (*FASN*, *SCD*), la synthèse des TG (*DGAT1*, *GPAM*, *ACSL1*), la lipolyse (*PLIN1*) et le transport du glucose (*GLUT4*) sont fortement diminués. L'expression génique et protéique de l'enzyme qui catalyse la première étape de la lipolyse (*ATGL*) est également diminuée dans le TA des sujets de génotype DD. A l'état homozygote, ce variant p.V767Gfs\*102 de *LIPE* résulte donc en un syndrome métabolique avec **hypertriglycéridémie**, **insulino-résistance**, **hyperglycémie**, **répartition androïde du TA** et **stockage hépatique des graisses**, associés à une absence complète de la protéine LHS et une lipolyse adipocytaire altérée. Les études des équipes d'Albert et de Ström (Albert *et al.*, 2014, Strom *et al.*, 2009) soulignent l'importance de la lipolyse pour la régulation de la transcription génique par les récepteurs nucléaires (Zechner et Langin, 2014).

La même année Farhan et coll. identifient un autre variant **p.Ala507fsTer563** de *LIPE*, ayant pour effet de coder une protéine deux fois plus courte que la LHS originale. Dans cette étude, deux patients (une femme et un homme), initialement décrits par Carboni et coll. (Carboni *et al.*, 2014), sont issus d'une fratrie d'origine italienne et consanguine. Tous les deux présentent

à la quarantaine, une **redistribution** du **TA avec accumulation** de celui-ci **au niveau du cou, de l'abdomen, des bras, du dos, et/ou des régions axillaires et pubiennes**, un **diabète** et une **dyslipidémie** (hypertriglycémie et HDL cholestérol bas), une **stéatose hépatique**, ainsi qu'une **faiblesse musculaire** associés au variant pathogène présent à l'état homozygote.

En 2017, Zolotov et coll. investiguent une famille arabo-israélienne de parents consanguins, dont certains membres ont une redistribution du TA avec notamment une lipohypertrophie au niveau cervical et du tronc et une lipoatrophie partielle des jambes suggérant un phénotype de lipomatose de Launois-Bensaude. A ce phénotype sont associés un déficit musculaire, une amyotrophie des membres inférieurs et des pieds creux. L'analyse génétique a permis de mettre en évidence le variant pathogène c.3103G>T de *LIPE* à l'état homozygote qui prédit la synthèse d'une protéine plus courte (p.Glu1035\*) chez trois membres de la fratrie (une femme et deux hommes). Ces trois patients ont une hypertriglycémie modérée à sévère. L'un d'eux est diabétique, un autre a une stéatose hépatique. Les parents présentent des complications cardio-métaboliques. Cette étude confirme l'association entre défaut de la LHS et une myopathie progressive et suggère une association avec la lipomatose de Launois-Bensaude et/ou un phénotype lipodystrophique partiel.

Plusieurs modèles murins invalidés pour la LHS (HSL-KO) ont été décrits dans la littérature. Zimmermann et coll. ont décrit une réduction du taux de TA blanc chez des souris HSL-KO, une diminution de la synthèse des triglycérides liée à une baisse d'activité de certaines enzymes de la lipogénèse. La synthèse d'acide gras *de novo* est également diminuée dans l'adipocyte, due à la diminution de l'entrée et l'incorporation du glucose (Zimmermann *et al.*, 2003). Néanmoins, le phénotype murin d'inactivation du gène n'est pas superposable au phénotype des patients porteurs des variants pathogènes homozygotes de *LIPE*. Les souris déficientes en LHS ne sont ni diabétiques, ni dyslipidémiques, ne présentent pas de stéatose hépatique, et sont infertiles (Zechner et Langin, 2014). D'autres auteurs ont décrit une augmentation de la masse du TA brun chez les souris déficientes en LHS (Osuga *et al.*, 2000).

Grâce à des modèles d'inactivation spécifique de la LHS dans le TA et le foie, l'équipe de Xia et coll. ont mis en évidence l'importance de cette enzyme dans le TA pour le maintien de l'homéostasie glucidique. L'inactivation spécifiquement adipocytaire de LHS entraîne en effet une atrophie et une inflammation du TA, une résistance systémique à l'insuline, une stéatose hépatique et une diminution de la sécrétion de la leptine et de l'adiponectine. En revanche, le

KO de LHS au niveau hépatique n'entraîne ni d'altération métabolique ni stéatose hépatique (Xia *et al.*, 2017, Bluher, 2005).

### ***Objectifs***

Les travaux de notre groupe au laboratoire explorent la physiopathologie des syndromes lipodystrophiques d'origine génétique. Le laboratoire est en étroite relation avec les services de génétique et d'endocrinologie de l'hôpital Saint-Antoine et a un recrutement important de patients lipodystrophiques du fait de son implication dans le centre de référence Maladies Rares PRISIS (Pathologies de la Résistance à l'Insuline et de l'Insulino-Sensibilité, coordonné par le Pr Corinne Vigouroux). Grâce à ce recrutement, nous avons pu rechercher les mutations de *LIPE* et de *MFN2* chez les patients dont le phénotype pouvait correspondre à un syndrome de Launois-Bensaude.

Mes travaux de thèse ont permis, d'une part de préciser les caractéristiques clinico-biologique des patients porteurs de variants pathogènes dans ces gènes, et d'autre part, d'étudier le retentissement des variants sur le tissu adipeux obtenu lors de l'exérèse chirurgicale de lipomes. Ces études tissulaires à la fois morphologiques (microscopie optique et électronique) et fonctionnelles (immuno-histochimie, expression génique et protéique) ont été complétées par l'étude des cellules souches adipocytaires adultes du TA, pour laquelle j'ai pu analyser la différenciation et les fonctions *in vitro*, ce qui nous permet de faire émerger de nouvelles pistes physiopathologiques dans ces maladies.

# Résultats

---

## Chapitre I : La lipomatose de Launois-Bensaude due aux variants pathogènes de *MFN2* – spectre clinique et impact sur le tissu adipeux

**Emilie Capel\***, Camille Vatie\*, Pascale Cervera, Tanya Stojkovic, Emmanuel Disse, Martine Auclair, Marie-Christine Verpont, Hélène Mosbah, Pierre Gourdy, Sara Barraud, Anne-Ségolène Cottureau, Anne Miquel, Stephan Züchner, Amélie Bonnefond, Philippe Froguel, Sophie Christin-Maitre, Brigitte Delemer, Bruno Fève, Martine Laville, Juliette Robert, Florence Tenenbaum, Olivier Lascols, Corinne Vigouroux and Isabelle Jéru

\*co-auteurs

Journal of Clinical Lipidology, accepté pour publication le 17 juillet 2018 ; Volume 12 n°6, pages 1420-1435 - doi: 10.1016

### A. Contexte et objectifs de l'étude

La lipomatose de Launois-Bensaude ou LLB est le plus souvent une maladie sporadique associée à une consommation excessive d'alcool. Pour autant certains patients non alcooliques présentent les mêmes symptômes. L'étude de quelques familles a suggéré l'implication d'une composante génétique dans la LLB en lien avec des dysfonctions mitochondriales (Coin *et al.*, 2000). Depuis, plusieurs études ont montré chez de rares patients l'implication de variants pathogènes de l'ADN mitochondrial dont le variant m.8344A>G de la tRNAlysine en association avec le syndrome MERRF (*myoclonic epilepsy, ragged-red muscle fiber*) avec myopathie proximale et, de façon inconstante, épilepsie et diabète (Chong *et al.*, 2003). De par l'analyse de leur cohorte de 72 patients italiens atteints de LLB et de la littérature, en 2015 G. Enzi et coll. ont fait l'hypothèse d'un lien entre lipome et TA brun. En effet l'analyse histologique de lipomes de patients atteints de lipomatose de Launois-Bensaude associé à un alcoolisme, a montré la présence d'adipocytes multiloculaires à l'image des adipocytes du TA brun ou beige (Enzi *et al.*, 2015). De plus, Enzo Nisoli et coll. ont montré l'expression d'UCP1 dans des précurseurs adipocytaires issus de patients atteints de LLB. Néanmoins l'expression

d'UCP1 n'est pas induite par la noradrénaline (inducteur de la voie d'activation  $\beta$ -adrénergique) (Nisoli *et al.*, 2002). Les auteurs proposent que les lipomes proviendraient d'un TA brun dysfonctionnel qui stockerait le surplus de lipides.

En 2015, Sarah L. Sawyer et coll. ont mis en évidence l'implication d'un nouveau gène dans la lipomatose de Launois-Bensaude chez trois patients : le gène *MFN2*, codant la mitofusine 2, dont certains variants avaient précédemment été associés à la neuropathie de Charcot-Marie-Tooth (Sawyer *et al.*, 2015). Les trois patients décrits (deux frères et une femme non apparentée) sont issus de deux familles indépendantes avec parents consanguins d'origine irlandaise et australienne respectivement. Ils présentent des masses lipomateuses volumineuses dans la partie supérieure du corps et une neuropathie périphérique de sévérité variable rapportée à une maladie de Charcot-Marie-Tooth. L'étude génétique a permis d'identifier le variant c.2119C>T (p.Arg707Trp) de *MFN2* à l'état homozygote chez ces trois patients.

L'étude *in vitro* dans les fibroblastes des patients a montré une morphologie mitochondriale normale. L'étude fonctionnelle dans des cellules U2OS (lignée cellulaire d'ostéosarcome) déplétées en MFN1 et MFN2 endogène (par ARN interférence) a permis d'évaluer la fusion mitochondriale de la protéine MFN2 porteuse du variant p.Arg707Trp de *MFN2* en comparaison avec la protéine non mutée. Dans les cellules exprimant la forme mutante de la protéine, la capacité des mitochondries à fusionner est réduite et la formation des oligomères MFN2/MFN2 est altérée, ce qui ne semble pas être le cas des hétérodimères MFN1/MFN2. Chez la souris, MFN1 n'est quasiment pas exprimée dans le TA brun. Ces données suggèrent que dans la lipomatose de Launois-Bensaude liée à *MFN2*, le variant p.Arg707Trp conduirait à des dysfonctions du TA brun.

En 2017, Nuno Rocha et coll. ont décrit quatre nouveaux patients issus de trois familles indépendantes porteurs du même variant de *MFN2* à l'état homozygote ou hétérozygote composite (en association avec le variant p.Arg343del pour un des quatre patients) (Rocha *et al.*, 2017). Ces patients (3 femmes et 1 homme) d'origine européenne présentent des masses lipomateuses dans le haut du corps combiné à une lipoatrophie du TA sous-cutané des membres inférieurs, ainsi qu'une neuropathie périphérique pour deux d'entre eux. L'investigation clinique a révélé une insulino-résistance modérée à sévère, des taux de triglycérides plasmatiques plus ou moins élevés en fonction des patients. Invariablement tous les patients ont des taux de leptine et d'adiponectine sériques très diminués. L'analyse du tissu lipomateux de

trois des quatre patients montre une expression inchangée de MFN2 mais un effondrement de l'expression des gènes de la leptine et de l'adiponectine en accord avec le déficit de ces adipokines mesuré au niveau plasmatique. Une augmentation de l'expression génique de CITED1 (marqueur d'adipocyte beige) est retrouvée dans les masses pseudo-lipomateuses des 3 patients. L'analyse histologique du TA lipomateux montre des adipocytes uniloculaires entourés de nombreuses et grosses mitochondries, pour partie fragmentées, n'exprimant pas le marqueur thermogénique UCP1.

L'analyse transcriptomique du tissu adipeux lipomateux révèle une augmentation marquée de l'expression des gènes de la voie de la phosphorylation oxydative mitochondriale codés par l'ADN nucléaire, et une diminution de l'expression des gènes codés par l'ADN mitochondrial. Pour autant l'expression des protéines de la chaîne respiratoire codées par l'ADN nucléaire est diminuée en Western-blot. Cette augmentation des transcrits mitochondriaux codés par l'ADN nucléaire pourrait être une réponse compensatoire aux dysfonctions mitochondriales. Aucune de ces observations n'a été retrouvée dans l'étude des fibroblastes cutanés issus de certains patients.

Toutes ces données sont en faveur d'un lien causal entre le variant p.Arg707Trp de *MFN2*, homozygote ou associé à un autre variant allélique du même gène, et la lipomatose de Launois-Bensaude. La maladie serait liée à une dysfonction mitochondriale observée uniquement au niveau du TA.

Récemment le gène codant la *calcyphosine-like (CAPSL)* a été suggéré comme impliqué dans la LLB (Lindner *et al.*, 2019). Cette protéine de la famille de la calmoduline, capable de lier le calcium, pourrait intervenir dans l'adipogenèse. Même si son implication dans une forme familiale monogénique de MSL n'a pas pu être formellement prouvée, la diminution de l'expression de CAPSL dans le TA pourrait contribuer au développement de la maladie, en perturbant l'adipogenèse et l'autophagie adipocytaire.

Sur le plan anatomique, les lipomes sont situés à proximité de territoires thermogéniques chez l'adulte (van Marken Lichtenbelt *et al.*, 2009). Les résultats de la littérature montrent l'expression de certains marqueurs thermogéniques comme CITED1 (Rocha *et al.*, 2017) et UCP1 (Vila *et al.*, 2000) dans le tissu lipomateux de cause génétique différente. Enfin il est clairement établi que la mitochondrie a un rôle important lors de l'adipogenèse (De Pauw *et al.*, 2009), d'autant plus dans l'adipocyte brun où la mitochondrie, *via* UCP1, est le siège de la

thermogenèse sans frisson (Chouchani *et al.*, 2019). Nous faisons l'hypothèse que ces lipomes liés à *MFN2* pourraient provenir de dysfonctions du TA brun ou beige d'origine mitochondriale.

Nous avons séquencé *MFN2* chez 66 patients issus du recrutement hospitalier évocateurs de lipomatose de Launois-Bensaude, c'est-à-dire présentant une ou plusieurs masses lipomateuses avec une distribution corporelle de masse grasse altérée. Dans un premier temps les patients porteurs du génotype *MFN2* p.Arg707Trp ont été étudiés sur le plan clinique et métabolique. Dans un second temps nous avons caractérisé les lipomes de ces patients par des analyses moléculaires, histo- et immuno-morphologiques, et de microscopie électronique. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication originale en juillet 2018 dans le *Journal of Clinical Lipidology*.

## B. Résultats

Nous avons diagnostiqué six nouveaux patients porteurs du génotype *MFN2* p.Arg707Trp à l'état homozygote. Il s'agit de cinq femmes et d'un homme, issus de cinq familles indépendantes d'origine française pour P1 & P3 et portugaise pour les patients P2, P4, P5 & P6.

La chronologie d'apparition des symptômes chez ces six patients est variable. Néanmoins tous les patients présentent un syndrome lipodystrophique caractérisé par des lipomes multiples dans la partie supérieure du corps et par une lipoatrophie des membres inférieurs ou généralisée associée à des lésions osseuses chez plusieurs patients. Malgré le volume parfois important des lipomes, nous avons mesuré une diminution du pourcentage total de la masse grasse mesurée par absorptiométrie biphotonique (DEXA) (6.8 à 18.9% de masse grasse totale). Ces patients présentent des troubles métaboliques avec notamment des taux sériques très diminués de leptine et d'adiponectine ( $0.98 \pm 0.28$  µg/L et  $1.03 \pm 0.43$  mg/L respectivement), une hypertriglycéridémie modérée ( $2.53 \pm 1$  mmol/L), une insulino-résistance et/ou un diabète ainsi qu'une stéatose hépatique. La neuropathie de Charcot-Marie-Tooth ou CMT2A associée à la lipomatose de Launois-Bensaude est de gravité variable suivant les patients.

J'ai pu analyser le TA pseudo-lipomateux de deux des six patients (P1 & P4) en comparaison à du TA sous-cutané contrôle de sujets non obèses (n=3). Ces pseudo-lipomes sont non encapsulés, non fibrotiques et hypervascularisés comme le montrent les immunomarquages positifs pour l'actine musculaire lisse et pour CD34, un marqueur des cellules endothéliales et

des progéniteurs hématopoïétiques. Chez les deux patientes, j'ai observé un tissu lipomateux composé majoritairement d'adipocytes uniloculaires avec la présence de quelques adipocytes multiloculaires à proximité des vaisseaux/capillaires. L'immunomarquage pour UCP1 est négatif alors que celui pour CITED1 et FGF21 (marqueurs thermogéniques) est très positif. Comme montré dans l'étude de Rocha et coll., nous remarquons par l'analyse en microscopie électronique que le cytoplasme des adipocytes est rempli de nombreuses et volumineuses mitochondries présentant des altérations morphologiques (Rocha *et al.*, 2017).

Les analyses géniques et protéiques des lipomes issus des patientes P1, P4 et/ou P5 mettent en évidence une diminution marquée de la leptine et l'adiponectine, en accord avec les dosages plasmatiques, ainsi qu'une augmentation des marqueurs thermogéniques CITED1 et FGF21. Ce résultat moléculaire est en adéquation avec le taux très augmenté (x9.5) de FGF21 dans le sérum de cinq des six patients testés ( $385 \pm 181$  ng/L) en comparaison à des sérums contrôles ( $40 \pm 23$  ng/L).

Enfin nous avons observé chez les patients P1, P2, P4 & P5, en mesurant l'incorporation du  $^{18}\text{F}$ -FDG au cours d'un TEP-scan, une activité métabolique importante dans les tissus adipeux lipomateux mais aussi dans les zones lipoatrophiques.



## MFN2-associated lipomatosis: Clinical spectrum and impact on adipose tissue



Emilie Capel, MSc<sup>1</sup>, Camille Vatieer, MD, PhD<sup>1</sup>, Pascale Cervera, MD, PhD,  
Tanya Stojkovic, MD, Emmanuel Disse, MD, PhD, Anne-Ségolène Cottereau, MD,  
Martine Auclair, Marie-Christine Verpont, MSc, Hélène Mosbah, MD,  
Pierre Gourdy, MD, PhD, Sara Barraud, MD, Anne Miquel, MD,  
Stephan Züchner, MD, PhD, Amélie Bonnefond, PhD, Philippe Froguel, MD, PhD,  
Sophie Christin-Maitre, MD, PhD, Brigitte Delemer, MD, PhD, Bruno Fève, MD, PhD,  
Martine Laville, MD, PhD, Juliette Robert, MSc, Florence Tenenbaum, MD,  
Olivier Lascols, PhD, Corinne Vigouroux, MD, PhD<sup>\*.2</sup>, Isabelle Jéru, PharmD, PhD<sup>2</sup>

*Sorbonne Université, Inserm UMR\_S 938, Centre de Recherche Saint-Antoine, Institut Hospitalo-Universitaire de Cardio-métabolisme et Nutrition (ICAN), Paris, France (Drs Capel, Vatieer, Cervera, Auclair, Fève, Robert, Lascols, Vigouroux, and Jéru); Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Saint-Antoine, Centre National de Référence des Pathologies Rares de l'Insulino-Sécrétion et de l'Insulino-Sensibilité (PRISIS), Service d'Endocrinologie, Diabétologie et Endocrinologie de la Reproduction, Paris, France (Drs Vatieer, Christin-Maitre, Fève, and Vigouroux); Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Saint-Antoine, Service d'Anatomie Pathologique, Paris, France (Dr Cervera); Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Centre National de Référence des maladies neuromusculaires, Paris, France (Dr Stojkovic); Hospices Civils de Lyon, Université Lyon 1, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Service d'Endocrinologie, Diabétologie et Nutrition, Lyon, France (Drs Disse and Laville); Sorbonne Université, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Tenon, Service de Médecine Nucléaire, Sorbonne Université, Paris, France (Dr Cottereau); Sorbonne Université, Inserm UMR\_S1155, LUMIC, Plate-forme d'Imagerie et de Cytométrie de Tenon, Paris, France (Dr Verpont); Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Service de Diabétologie, Paris, France (Dr Mosbah); Centre Hospitalo-Universitaire de Toulouse, Service de Diabétologie, Maladies Métaboliques et Nutrition, Université de Toulouse Paul Sabatier, Toulouse, France (Dr Gourdy); Centre Hospitalo-Universitaire de Reims, Service d'Endocrinologie, Diabétologie et Nutrition, Reims, France (Drs Barraud and Delemer); Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Saint-Antoine, Service de Radiologie, Paris, France (Dr Miquel); University of Miami, Miller School of Medicine, John P. Hussman Institute for Human Genomics, Miami, FL, USA (Dr Züchner); Institut Pasteur de Lille, Université de Lille, CNRS UMR 8199, Lille, France (Drs Bonnefond and Froguel); Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Cochin, Département de Médecine Nucléaire, Paris, France (Dr Tenenbaum); and Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Saint-Antoine, Laboratoire Commun de Biologie et Génétique Moléculaires, Paris, France (Drs Lascols, Vigouroux, and Jéru)*

<sup>1</sup> Equally contributing to this paper. <sup>2</sup> Equally contributing to this paper and corresponding authors: [corinne.vigouroux@inserm.fr](mailto:corinne.vigouroux@inserm.fr), [isabelle.jeru@aphp.fr](mailto:isabelle.jeru@aphp.fr), Faculté de Médecine Sorbonne Université Site Saint-Antoine, Inserm UMR\_S938, Equipe Lipodystrophies génétiques et acquises, 27 rue Chaligny, 75571 Paris Cédex 12, France.

\* Corresponding author. Prof. Corinne Vigouroux, Faculté de Médecine Sorbonne, Université Site Saint-Antoine, Faculté de médecine Paris 6, 27 rue Chaligny, Cédex 12, 75571 Paris, France.

E-mail address: [corinne.vigouroux@inserm.fr](mailto:corinne.vigouroux@inserm.fr)

Submitted February 20, 2018. Accepted for publication July 17, 2018.

**KEYWORDS:**

Mitofusin 2;  
Genetics;  
Lipomatosis;  
Neuropathy;  
Lipodystrophy;  
Dyslipidemia;  
Insulin resistance;  
Mitochondria;  
Leptin;  
Thermogenic markers

**BACKGROUND:** Multiple symmetric lipomatosis (MSL) is characterized by upper-body lipomatous masses frequently associated with metabolic and neurological signs. *MFN2* pathogenic variants were recently implicated in a very rare autosomal recessive form of MSL. *MFN2* encodes mitofusin-2, a mitochondrial fusion protein previously involved in Charcot-Marie-Tooth neuropathy.

**OBJECTIVE:** To investigate the clinical, metabolic, tissular, and molecular characteristics of *MFN2*-associated MSL.

**METHODS:** We sequenced *MFN2* in 66 patients referred for altered fat distribution with one or several lipomas or lipoma-like regions and performed clinical and metabolic investigations in patients with positive genetic testing. Lipomatous tissues were studied in 3 patients.

**RESULTS:** Six patients from 5 families carried a homozygous p.Arg707Trp pathogenic variant, representing the largest reported series of *MFN2*-associated MSL. Patients presented both lipomatous masses and a lipodystrophic syndrome (lipoatrophy, low leptinemia and adiponectinemia, hypertriglyceridemia, insulin resistance and/or diabetes). Charcot-Marie-Tooth neuropathy was of highly variable clinical severity. Lipomatous tissue mainly contained hyperplastic unilocular adipocytes, with few multilocular cells. It displayed numerous mitochondrial alterations (increased number and size, structural defects). As compared to control subcutaneous fat, mRNA and protein expression of leptin and adiponectin was strikingly decreased, whereas the CITED1 and fibroblast growth factor 21 (FGF21) thermogenic markers were strongly overexpressed. Consistently, serum FGF21 was markedly increased, and <sup>18</sup>F-FDG-PET-scan revealed increased fat metabolic activity.

**CONCLUSION:** *MFN2*-related MSL is a novel mitochondrial lipodystrophic syndrome involving both lipomatous masses and lipoatrophy. Its complex neurological and metabolic phenotype justifies careful clinical evaluation and multidisciplinary care. Low leptinemia and adiponectinemia, high serum FGF21, and increased <sup>18</sup>F-FDG body fat uptake may be disease markers.

© 2018 National Lipid Association. All rights reserved.

## Introduction

Multiple symmetric lipomatosis (MSL, MIM 151800) or Launois-Bensaude lipomatosis is a rare disorder characterized by the development of unencapsulated masses of adipose tissue, especially in the neck and upper trunk.<sup>1,2</sup> In most patients, it is associated with high alcohol intake,<sup>2,3</sup> though several familial forms have been reported. The first genetic form to be identified was the Myoclonus Epilepsy and Ragged Red Fibers syndrome (MERRF), usually due to pathogenic variants in the mitochondrial *MT-TK* gene.<sup>4</sup> More recently, rare patients with biallelic *MFN2* pathogenic variants have been shown to display an autosomal recessive form of MSL, associated or not with axonal neuropathy and metabolic complications.<sup>5,6</sup> Among them, the metabolic phenotype of only 4 patients, all adolescents, has been studied, with characterization of surgical biopsies of adipose tissue masses in 3 cases.<sup>5</sup>

The *MFN2* gene, located in the nuclear genome, is ubiquitously expressed. It encodes mitofusin-2, a mitochondrial outer membrane protein of the dynamin-related GTPase family, involved in mitochondrial fusion and in endoplasmic reticulum-mitochondria interactions.<sup>7,8</sup> This protein could also regulate a number of functions including whole-body energy metabolism and aging.<sup>9-13</sup> A high number of *MFN2* variants, located all along the gene, have been shown to be responsible for the autosomal-dominant and axonal form of Charcot-Marie-Tooth (CMT2A).<sup>14,15</sup> Notably, all patients with MSL due to *MFN2* carry the same pathogenic variant, p.Arg707Trp, in the homozygous or compound heterozygous state. The rare patients carrying biallelic *MFN2* pathogenic

variants other than p.Arg707Trp have never been reported to display lipomatosis,<sup>14,16-21</sup> but present with early-onset and usually severe CMT2A. Individuals carrying only one *MFN2* p.Arg707Trp mutated allele were not reported to develop MSL but can present mild signs of CMT.<sup>18</sup>

Adipose tissue is critical for whole-body metabolic homeostasis and fat distribution is closely linked to cardiometabolic risk.<sup>22,23</sup> Anatomically distinct adipose tissues vary in embryological origins, gene expression profiles, and adipokine secretion patterns. In the case of MSL, the mechanisms by which the p.Arg707Trp variant, in the homozygous or compound heterozygous state, leads to localized adipose tissue overgrowth, remains largely unknown. Previous reports before the identification of *MFN2* as a disease-causing gene suggested that adipose tissue masses observed in MSL could originate in brown fat.<sup>24,25</sup> This idea was strengthened by the primary localization of lipomatous regions in the supraclavicular and interscapular regions, known to contain thermogenic adipose tissue.<sup>26</sup> The recent report by Rocha et al describing *MFN2*-associated MSL revealed that affected adipose tissue displays uncoupling protein 1 [UCP1]-negative unilocular adipocytes with enlarged and disorganized mitochondria, reduced levels of mtDNA, increased expression of genes involved in mitochondrial oxidative stress, and a strong decrease in leptin and adiponectin expression.<sup>5</sup>

Here, we take advantage of our national recruitment of patients as an expert center of lipodystrophic diseases to study the clinical, metabolic, tissular, and molecular characteristics of 6 patients, representing the largest series of *MFN2*-associated MSL reported to date.

## Material and methods

### Patients

This study includes 6 patients from 5 independent families. Two patients were referred to our French Reference Center for Rare Disorders of Insulin Secretion and Insulin Sensitivity and clinical files of all patients were reviewed in this center. Informed written consent was obtained from each individual. This study was approved by the Comité de Protection des Personnes Ile-de-France 5 (Paris, France).

### MFN2 screening

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes using standard procedures. *MFN2* was screened by Sanger sequencing. To this purpose, all *MFN2* coding exons and their flanking intronic sequences were amplified by PCR (polymerase chain reaction). Purified PCR products were sequenced with the Big Dye Terminator sequencing kit (Applied Biosystems) and run on an automated sequencer (ABI 3730xl). Sequences were analyzed with SeqScape v2.7 (Applied Biosystems). Primer sequences are available on request.

### Leptin, adiponectin, and fibroblast growth factor 21 (FGF21) measurements

Leptin and FGF21 (Quantikine; R&D Systems—Bio-Techne, Lille, France), as well as total adiponectin (Bühlman, Basel, Switzerland), were measured by ELISA according to manufacturers' recommendations. All measurements were performed in duplicates. The intraseries coefficients of variation were <3.5%, <3.5%, and <5% for leptin, FGF21, and adiponectin dosages, respectively; the interseries coefficients of variation were <5.5%, <5.2%, and <7% for the same measurements.

### Histology

Conventional light microscopy was performed on 10% zinc-formol-fixed paraffin-embedded 5- $\mu$ m tissue sections, stained with hematoxylin-eosin. Adipocyte size was determined with a semiautomatic image analysis system (ImageJ, custom macro) in 3 randomly chosen regions. For immunohistochemical studies, tissue sections were probed with antibodies directed against alpha smooth muscle actin (1/300 dilution; M085, Dako, Trappes, France), CD34 (prediluted; PA0212, Leica, Nanterre, France), CD68 (prediluted; PA0273, Leica), CD163 (1/50; NCL-CD163, Leica), UCP1 (1/300; Abcam ab23841, Cambridge, UK), CITED1 (1/100; Novus H0000443S-M03, Bio-Techne, Lille, France), and FGF21 (1/300; Abcam ab171941, Cambridge, UK).

### Electron microscopy

Ultrastructural analysis was performed on fat samples fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer pH 7.4 at 4°C. Fragments were then postfixed in 1% osmium tetroxide, dehydrated using graded alcohol series, and embedded in epoxy resin. Semifine sections (0.5  $\mu$ m) were stained with toluidine blue. Ultrastructure sections (60 nm) were contrasted with uranyl acetate and lead citrate and examined using an electron microscope (JEOL 1010, Tokyo, Japan) with an OSIS mega View III camera.

### mRNA assays

Total RNA was extracted from fat samples stored in liquid nitrogen using the RNeasy lipid tissue mini-kit according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Courtaboeuf, France). cDNA was synthesized from 1  $\mu$ g mRNA (High capacity cDNA reverse transcription kit, Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France). Real-time quantitative PCR was performed with a LightCycler 480 using the SYBR Green I Master mix (Roche Diagnostics, Meylan, France). Data were normalized to the expression of the *PPIA* (peptidylprolyl isomerase A) housekeeping gene. The list of primers used is available on request.

### Western blot analysis

Frozen fat tissue (300 mg) was solubilized in 500  $\mu$ l 2.5X Laemmli buffer containing 150 mM dithiothreitol. Lysates were subjected to SDS-PAGE, blotted onto nitrocellulose membranes, and probed with antibodies directed against MFN2 (1/1000; Abcam, ab50838, Cambridge, UK), SREBP-1 (1/500; SC-366, Santa Cruz Biotechnology, TX, USA), PPAR $\gamma$  (1/500; SC-7196), adiponectin (1/1000; MAI-054, Affinity BioReagents, Golden United States), CITED1 (1/1000; Novus H0000443S-M03, Bio-Techne, Lille, France), FGF21 (1/1000; Abcam ab171941), PGC-1 $\alpha$  (1/500; SC-5816), and tubulin (T5168, Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France). Tubulin was used as a loading control.

### <sup>18</sup>F-FDG-PET scan

<sup>18</sup>F-fluoro-2-deoxy-D-glucose (FDG) positron emission tomography (PET) with computed tomography (CT) was performed according to the EANM guidelines.<sup>27</sup> Patients fasted for at least 4.5 hours. A Gemini Dual PET/CT camera (Philips) with time of flight technology was used for imaging. Low-dose CT (120 kVp, 30–50 mAs) was acquired first, followed by PET acquisition 60–70 minutes after a weight-adjusted dose of 2.5 MBq/kilogram <sup>18</sup>F-FDG injection, covering a complete whole-body field of view, from the skull to the feet. Standardized uptakes values (SUVs) were calculated for the regions of interest. FDG uptake in the liver was taken as a reference.

**Table 1** General characteristics of patients

Characteristics	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6
Sex	F	M	F	F	F	F
Age at last investigation	76 y	31 y	67 y	53 y	55 y	45 y
Origin	France	Portugal	France	Portugal	Portugal	Portugal
Consanguinity	Not established but endogamy	Not known	Not known	Parents are first cousins	Not known	Not known
Weight (kg)	48	69	66	73	53.6	77
Height (m)	1.60	1.74	1.59	1.63	1.46	1.56
Body mass index (kg.m <sup>-2</sup> )	18.7	22.8	26.1	27.5	25.1	31.6
Genotype at the <i>MFN2</i> locus	p.Arg707Trp homozygous	p.Arg707Trp homozygous	p.Arg707Trp homozygous	p.Arg707Trp homozygous	p.Arg707Trp homozygous	p.Arg707Trp homozygous

**Results**

**General characteristics of the studied patients**

Sixty-six patients were referred to our unit for altered fat distribution and presented with one or several lipomas or lipomatous-like regions. *LMNA*-related familial partial lipodystrophy, which is occasionally associated with lipomas,<sup>28</sup> was ruled out by genetic testing. In all patients, we sequenced the exons and intron-exon boundaries of the *MFN2* gene. Six patients from 5 independent families harbored biallelic pathogenic variants. The group of patients with a positive genetic diagnosis included 5 women and 1 man, ranging in age from 31 to 76 years old (mean: 54.5 ± 6.5 years). Patients P1 to P4 corresponded to sporadic cases of MSL, when P5 and P6 are siblings. P2, P4, P5, and P6 originated from Portugal, and P1 and P3 from France (Table 1).

**Molecular basis of the disease**

All patients carried the recurrent *MFN2* c.2119 C > T pathogenic variant (p.Arg707Trp; reference mRNA: NM\_014874.3) in the homozygous state. None of them was found to carry any additional pathogenic or likely pathogenic variant in the complete coding sequence of *MFN2* or in its

flanking intronic sequences. The frequency of the p.Arg707Trp variant in the general population, estimated at 2.10<sup>-4</sup> (gnomAD browser), is low. In this regard, patient P4 was born from consanguineous parents. Consanguinity was not established in other families, although it was very likely in the family of P1 (Table 1). The p.Arg707Trp variant is located in the protein carboxy-terminal coiled coil heptad-repeat domain HR2, which is believed to be critical for homotypic interactions of mitofusin-2 and outer mitochondrial membrane fusion.<sup>29</sup>

**Clinical and biological presentation of patients**

**Natural history of the disease**

There is a great heterogeneity in the chronology of the onset of disease manifestations in the different patients of the series and in the severity of these manifestations, leading some clinical features to be overlooked in certain individuals (Table 2). In patients P1 and P4, neurological signs occurred first during childhood, followed by the development of lipomatous masses at the age of 25 and 30 years, respectively. Metabolic complications were diagnosed several dozen years later, after the diagnosis of *MFN2*-associated MSL. P2 was first diagnosed with acanthosis nigricans, hyperglycemia, and severe insulin resistance at the age of 10 years, then with adipose overgrowth at the age of 11 years, whereas

**Table 2** Natural history of the disease

Characteristics	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6
Age at first lipoma-like fat masses	30 y	11 y	35 y	25 y	6 y	2 y
Age at diagnosis of hyperglycemia, insulin resistance, or liver steatosis	76 y (not investigated before <i>MFN2</i> testing)	10 y	adulthood	53 y (not investigated before <i>MFN2</i> testing)	55 y	adulthood
Age at first neurological signs	childhood	26 y	65 y	childhood	54 y	adulthood
Age at genetic diagnosis	76 y	31 y	67 y	53 y	55 y	45 y

**Table 3** Clinical and biological features of patients

Characteristics	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6
<b>Metabolic characteristics</b>						
Areas of fat accumulation	Nape and upper back, proximal upper limbs	Back, thighs	Thorax, proximal upper limbs, tongue	Head, chin, nape, proximal upper limbs, thorax, abdomen	Chin, neck, proximal upper and lower limbs, thorax, abdomen	Chin, neck, proximal upper and lower limbs, thorax, abdomen
Lipoatrophy	Generalized	Generalized	Lower limbs, forearms, hands	Lower limbs, forearms	Lower limbs, forearms	Lower limbs, forearms
Body mass index (kg.m <sup>-2</sup> )	18.7	22.8	26.1	27.5	25.1	31.6
% of total body fat mass	6.8	8.2	nd	18.9	34.0*	nd
Leptin (µg.L <sup>-1</sup> )	0.80	1.40	0.62	1.10	1.60	nd
Aciponectin (mg.L <sup>-1</sup> )	0.62	nd	1.00	1.31	1.00	nd
Triglycerides (mmol.L <sup>-1</sup> )	3.60	2.95	2.10	2.99	0.97	3.35
HDL-cholesterol (mmol.L <sup>-1</sup> )	0.70	0.67	1.39	1.24	0.90	0.52
LDL-cholesterol (mmol.L <sup>-1</sup> )	1.02	2.32	1.64	4.07	5.09	1.53
Total cholesterol (mmol.L <sup>-1</sup> )	3.35	4.33	3.98	6.70	6.43	3.56
Fasting glucose (mmol.L <sup>-1</sup> )	4.8	4.4	5.3	5.7	5.0	6.5
2h-OGTT glucose (mmol.L <sup>-1</sup> )	9.0	6.4	7.0	12.1	nd	nd
Fasting insulin (pmol.L <sup>-1</sup> )	98	313	nd	56	72	nd
2h-OGTT insulin (pmol.L <sup>-1</sup> )	1320	1312	> 1500	636	nd	nd
M-value	9.2	nd	nd	6.2	16.2	nd
Insulin resistance and/or diabetes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Fasting hyperglycemia
Glycated hemoglobin (%)	5.9	5.5	5.2	5.9	4.7	nd
Glycated hemoglobin (mmol.mol <sup>-1</sup> )	41.0	37.0	33.0	41.0	27.9	nd
Treatment	No	Metformin	No	No	No	Fibrate
Hepatic steatosis	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	nd
<b>Neurological presentation</b>						
Clinical manifestations	Pes cavus, tendon retraction, lower limb pain, amyotrophy, feet and hand paresthesia, Achilles areflexia	Lower limb pain, flat feet with calcaneal valgus	Pes cavus, lower limb paresthesia and amyotrophy, calf muscle fasciculations, Achilles areflexia	Pes cavus, hand paresthesia, quadricipital weakness, Achilles areflexia	Lower limb weakness and pain	Lower limb weakness and pain

	Axonal sensorimotor (mainly motor) polyneuropathy	Axonal mainly motor polyneuropathy	Four limbs-axonal sensorimotor polyneuropathy	Four limbs-axonal sensorimotor polyneuropathy	Sensorimotor neuropathy
Electromyogram abnormalities	Orthopedic shoes, surgical treatment	Thermoformed soles	No	No	No
Treatment	Deafness, breast cancer	Precocious puberty, severe acne, constipation/diarrhea, hypothyroidism	Hypothyroidism	Thyroid and breast cancers	Deafness
Other signs					

Body fat mass was evaluated by dual-energy X-ray absorptiometry except for patient 5 (\*, by impedancemetry). Insulin-stimulated glucose disposal rate (M-value), measured during an euglycemic hyperinsulinemic clamp after 100 minutes-infusion of 80 mU.m<sup>-2</sup>.min<sup>-1</sup> insulin as previously described,<sup>26</sup> is expressed in mg.kg<sup>-1</sup> of fat free mass.min<sup>-1</sup>. Insulin resistance was defined by acanthosis nigricans, and/or fasting insulinemia > 70 pmol.L<sup>-1</sup>, and/or 2h-OGTT insulinemia > 800 pmol.L<sup>-1</sup>, and/or M-value < 10. Hepatic steatosis was assessed by echography and/or CT. OGTT, 75 g oral glucose tolerance test; nd, not determined.

mild neurological signs appeared in adulthood. In patient P3, all clinical signs started during adulthood, neurological signs appearing last. In patients P5 and P6, lipomatous masses appeared first in childhood, followed by metabolic alterations and paucisymptomatic neuropathy during adulthood (Table 2).

**Lipomatosis and lipoatrophy**

All patients presented with multiple lipoma-like adipose masses. Although adipose overgrowth affected the posterior part of the neck and/or thorax in all patients, other lipomatous masses developed in various localizations depending on the cases: scalp (P4), chin (P4, P5, P6), tongue (P3), anterior chest (P3, P4, P5), back (P2), shoulders and arms (P1, P3, P4, P5, P6), thighs (P2, P4, P5, P6), and/or abdomen (P4, P5, P6). Lipomatous masses also strikingly varied in size: P1, aged 76, developed two fat masses in the left arm and nape, with a larger diameter of 4 and 6 cm, respectively. P2, P5, and P6 had giant dorsocervical lipomatous masses that required surgery removal procedures. None of the patients had adipose overgrowth in the forearms nor lower legs (Table 3, Fig. 1). The lipomatous masses were unencapsulated and frequently difficult to delineate as observed in magnetic resonance imaging (MRI) showing a similar signal intensity in the regions of adipose tissue accumulation and in the adjacent subcutaneous adipose tissue (Fig. 2 and data not shown). Apart from lipomatous areas, patients presented with a marked subcutaneous lipoatrophy which affected the four limbs in P1 and P2, or lower limbs and forearms in others (Table 3, Fig. 1). Visceral adipose tissue was also hardly detectable on abdominal CT or MRI (performed in patients P1, P2, P4, P5, data not shown). Consistently, and despite the presence of localized adipose overgrowth, the percentage of total body fat mass was either decreased (in P1, P2, P4, as assessed by dual-energy X-ray absorptiometry) or found to be normal (in P5, as measured by impedancemetry). In addition, the serum leptin level, which is a relevant biomarker of the white adipose tissue mass, was extremely low with respect to the patients' body mass index (BMI) (mean concentration: 0.98 ± 0.28 µg.L<sup>-1</sup>, patients P1 to P5) (Table 3).

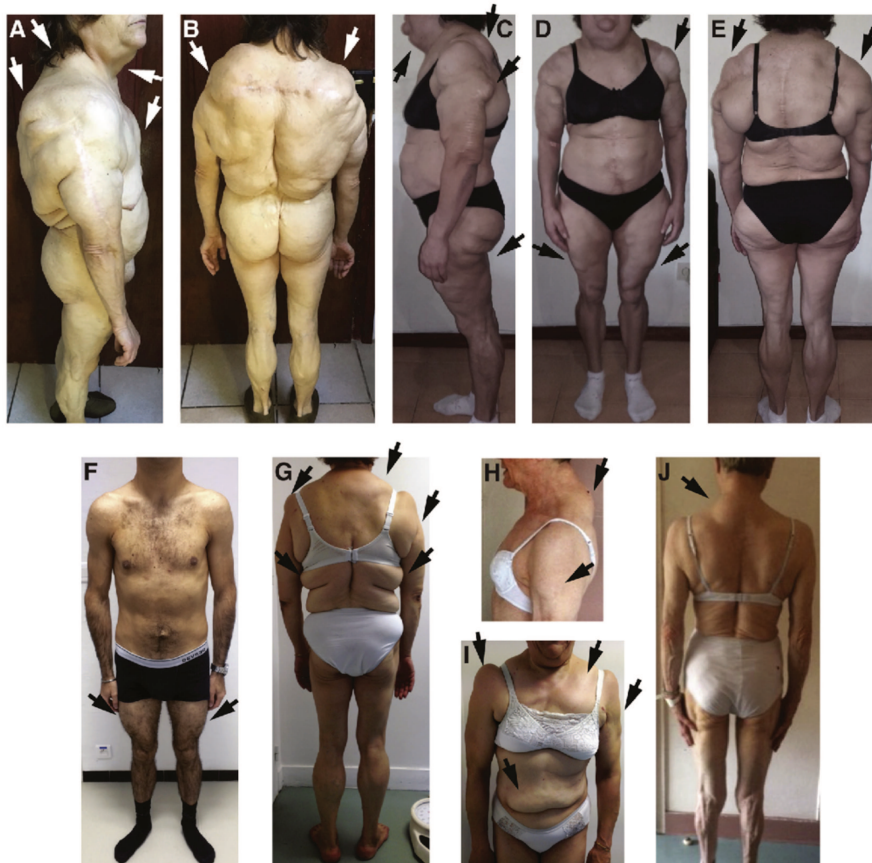
**Metabolic presentation**

Most patients had low high-density lipoprotein-cholesterol (mean: 0.90 ± 0.34 mmol.L<sup>-1</sup>) and high serum triglycerides (mean: 2.66 ± 0.97 mmol.L<sup>-1</sup>). Insulin resistance is a common feature of the disease, as shown by the presence of acanthosis nigricans, increased fasting or 120 minutes-oral glucose tolerance test (OGTT) insulinemia, and/or M-value measured during hyperinsulinemic euglycemic clamps. In accordance, adiponectin levels were low (1.03 ± 0.43 mg.L<sup>-1</sup>), and liver steatosis was diagnosed in all investigated patients. Diabetes diagnosed in patient P4 was successfully treated by diet. Metformin treatment was initiated at the age of 19 years in patient P2 for hyperglycemia with severe insulin resistance (Table 3).

**Neurological manifestations**

Neurological manifestations were observed in all patients. Patients experienced different features: pes cavus or flat feet





**Figure 1** Clinical presentation of patients. Lipomatous masses affecting dorso-cervical, proximal limbs, and/or thoraco-abdominal regions (arrows), contrasting with lipoatrophy in other subcutaneous areas in patients P5 (A and B), P6 (C–E), P2 (F), P4 (G and I), and P1 (H and J). Surgical removal of giant lipomatous masses of the back (in P2) and of the neck, shoulders, and/or abdomen (in P5 and P6) was previously performed.

with calcaneal valgus, lower limb pain, distal weakness of the upper and/or lower limbs, wasting of distal muscles especially in the lower limbs, absent Achilles reflexes associated in some patients with brisk patellar reflexes, distal paresthesia. Achilles tendon contractures together with arthropathic feet were observed in patient P1. In all investigated patients, electromyography confirmed the diagnosis by showing an axonal sensorimotor polyneuropathy (Table 3).

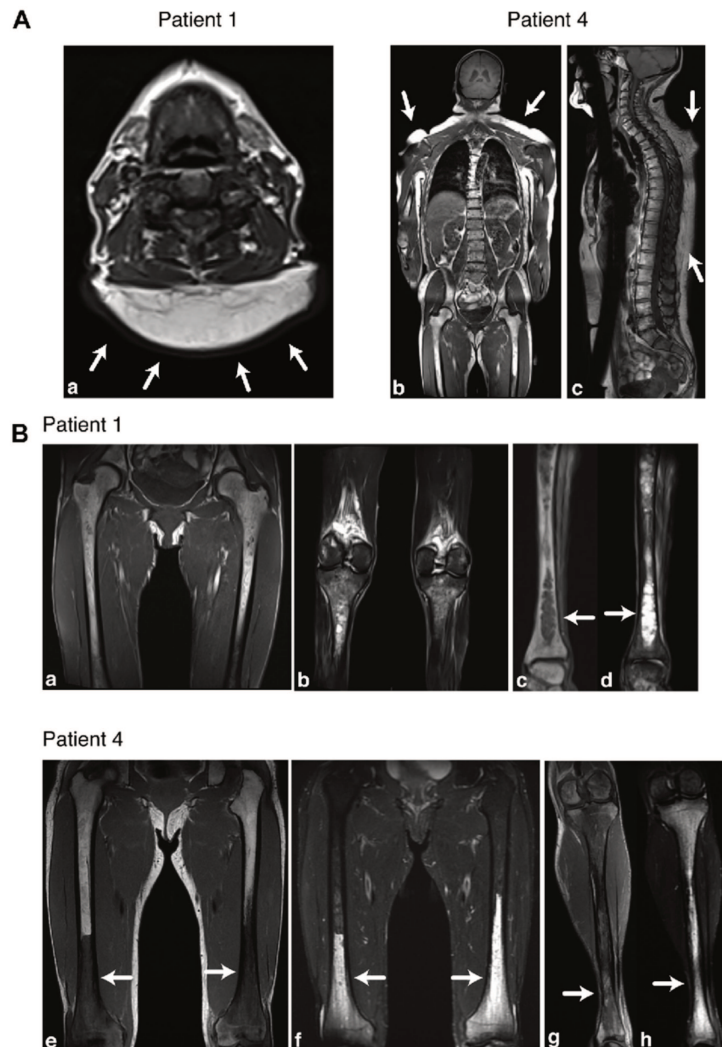
#### Bone abnormalities

We and others previously reported that patients with congenital generalized lipodystrophy present specific bone alterations, including focal sclerotic and osteolytic lesions, and fat bone marrow alterations evocative of serous transformation.<sup>31</sup> Therefore, we performed skeletal radiographs and whole-body MRI in 3 patients of the series (P1, P4, and P5). Bone imaging revealed centromedullary cystic lesions of tibial, peroneal and femoral

epiphysis, metaphysis and diaphysis regions. The bone marrow MRI signal was similar to fluid as revealed by short tau inversion recovery (STIR) sequence analysis (Fig. 2 and data not shown).

#### Other manifestations

Several patients presented with additional clinical features observed in other mitochondrial disorders: deafness (P1, P5), precocious puberty, recurrent constipation with occasional episodes of diarrhea (P2), and/or hypothyroidism (P2, P3) (Table 3). Considering that mitochondrial diseases are often associated with cardiac manifestations,<sup>32</sup> patients P1, P2, P4, P5, and P6 underwent cardiac investigations by means of electrocardiogram, heart ultrasound imaging, and Holter monitoring. Apart from a mild aortic valvular regurgitation in patient P6, none of them was found to present any cardiac sign. No patient reported any current or past history of alcohol abuse.



**Figure 2** MRI characteristics of lipomatous masses and bone alterations in patients with *MFN2*-associated MSL. (A) Lipomatous masses. Patient 1: Axial T1-weighted image of the neck (a) shows an unencapsulated subcutaneous posterior lipomatous mass (white arrows). Patient 4: Coronal (b) and sagittal (c) T1-weighted images of the head and trunk reveal unencapsulated subcutaneous adipose overgrowth in the shoulders and the back (white arrows). (B) Bone alterations. Patient 1: Coronal T1-weighted images of the thighs and proximal legs (a and b) show normal bone signal and subcutaneous lipoatrophy. Coronal T1-weighted and short tau inversion recovery (STIR) images of distal legs (c and d) reveal intramedullary cystic lesions with low T1 (c) and high STIR (d) signals, evocative of serous transformation of bone marrow fat (arrows). Patient 4: The distal part of femurs (e and f) and tibias (g and h) presents abnormal bone marrow lesions characterized by hypointensity on T1-weighted images (e and g) and hyperintensity in STIR sequences (f and h) (arrows). Note the loss of subcutaneous fat in the legs. Abbreviations: MRI, magnetic resonance imaging; MSL, multiple symmetric lipomatosis.

**Characteristics of lipomatous tissue**

**Histological features of adipose masses**

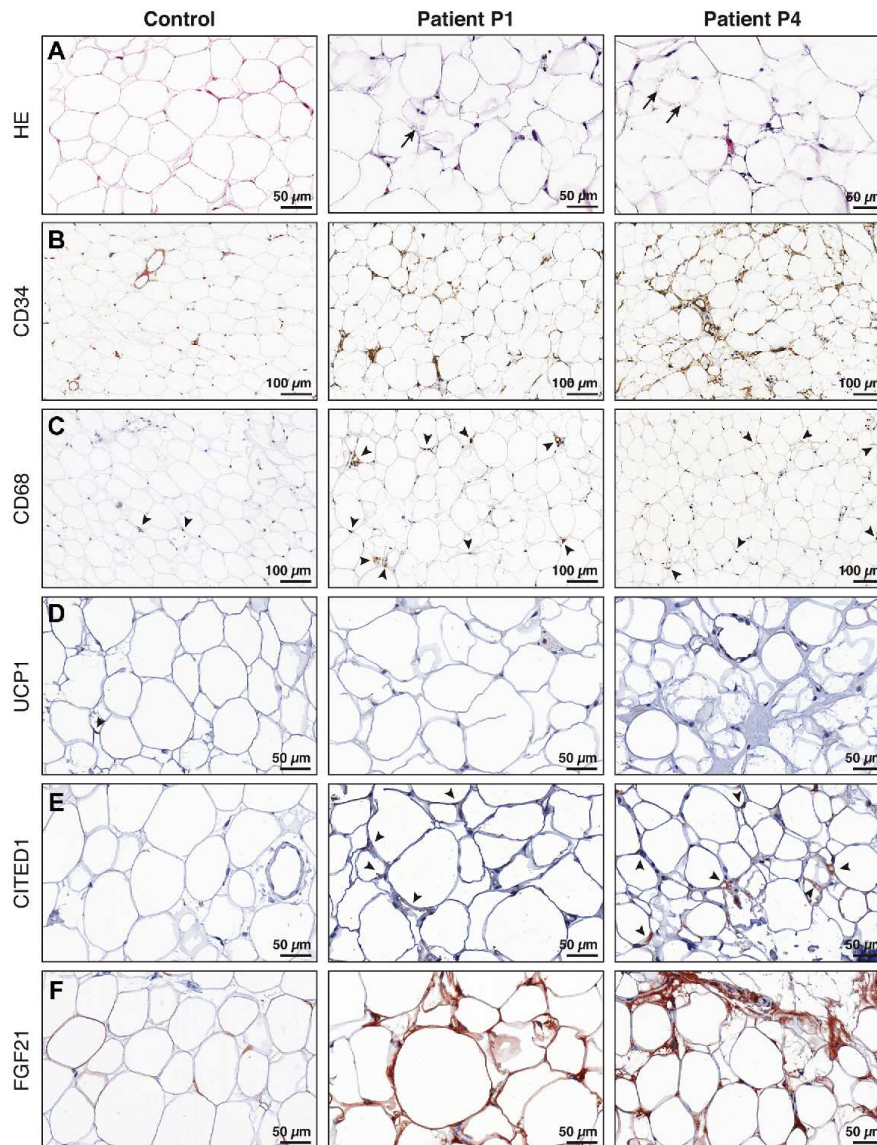
We performed histological studies of lipomatous tissue biopsies obtained from 2 female patients undergoing surgery of lipoma-like masses of left arm (patient P1) or

of periumbilical abdominal region (patient P4). They were compared to subcutaneous abdominal fat samples previously obtained from plastic surgery in 3 healthy, nonobese (BMI: 20.4, 21.2, and 25.6), nondiabetic women.<sup>33</sup> In the two patients, lipomatous masses were not circumscribed nor enclosed in fibrous capsules. The histological



appearance of adipose tissue was rather that of white fat with prevailing unilocular normal sized adipocytes (Fig. 3A and data not shown). Nevertheless, we also observed multilocular adipocytes in about 1/50 cells for

P1 and 1/20 cells for P4 (Fig. 3A). Such multilocular adipocytes were absent in controls. In patients, adipose tissue was highly vascularized, with a high number of small blood vessels. This was confirmed by staining with antibodies



**Figure 3** Histological and immunohistological features of lipomatous regions from patients with *MEN2*-associated MSL. The different panel (A to F) correspond to specific stainings, as indicated, obtained for subcutaneous white adipose tissue from one representative control and for lipomatous samples from two patients (P1 and P4). In lipomatous tissue from patients P1 and P4, as compared to control adipose tissue, we observed multilocular adipocytes (hematoxylin-eosin staining, panel A, arrows), an increase in the number of blood vessels stained by the vascular-endothelium tissue marker CD34 (panel B), the presence of inflammatory infiltrates (CD68 staining, panel C, arrowheads), a weak expression of UCP1 similar to control (panel D) and a major increase in CITED1 (panel E, arrowheads) and FGF21 (panel F) stainings. Abbreviations: HE, hematoxylin-eosin; MSL, multiple symmetric lipomatosis.

directed against smooth muscular actin (data not shown) and against CD34, a marker of early hematopoietic and vascular-endothelium tissue (Fig. 3B). Multilocular adipocytes were preferentially localized in the vicinity of vessels in patients. In contrast to controls, inflammatory infiltrates positive for the CD68 and CD163 markers of monocyte and macrophage lineages were also observed (Fig. 3C and data not shown), with a small number of lipogranuloma in P1 and P4. We did not observe any significant fibrotic regions in patient or control samples. The UCP1 brown fat marker seemed to be weakly expressed both in patients and in controls (Fig. 3D). In contrast, the staining of the CITED1 (Cbp/p300 interacting transactivator with Glu/Asp rich carboxy-terminal domain 1) and FGF21 thermogenic markers was markedly increased in lipomatous tissues (Fig. 3E and F), with a very high expression of FGF21.

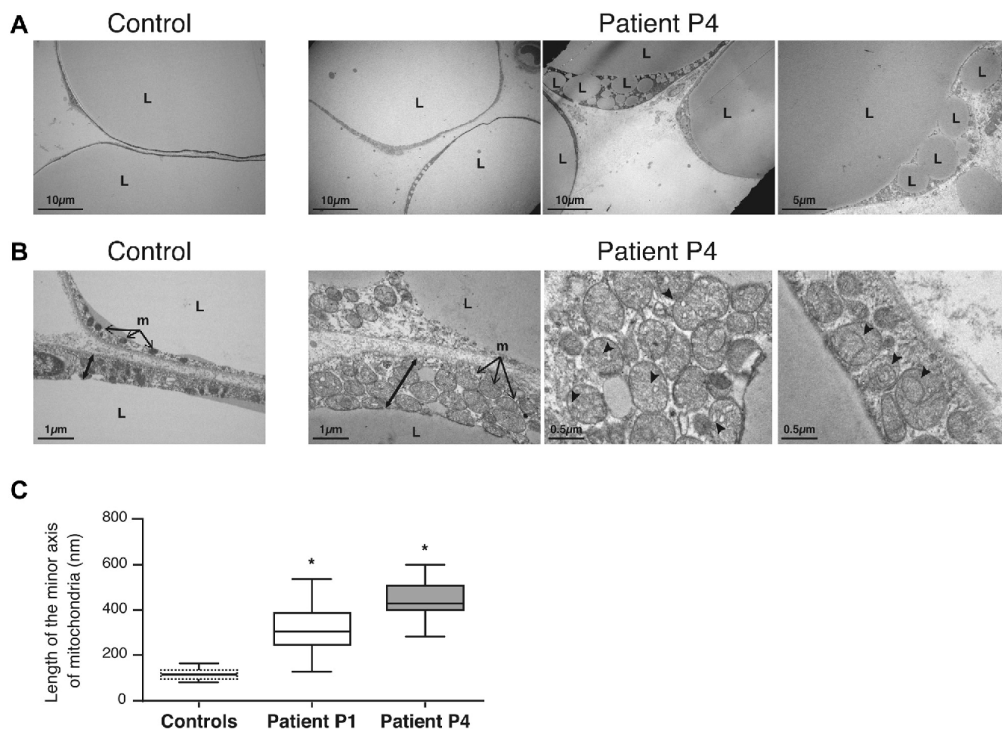
**Ultrastructural morphology of adipocytes**

Electron microscopy was performed in lipomatous samples obtained in patients P1 and P4, and in the same

controls as for histological studies. Consistent with previous results, we observed that patients' lipomatous tissues were mainly composed of unilocular adipocytes, although some of them displayed numerous additional peripheral lipid droplets (Fig. 4A). Adipocytes from patients were characterized by an enlargement of the cytoplasmic rim, which was packed with a very high number of mitochondria (Fig. 4B). The mean length of the minor axis of mitochondria measured in patients was threefold higher than that of mitochondria in normal white adipocytes (Fig. 4C). A number of ultrastructural abnormalities were also observed, such as disorganized cristae or double membrane structures engulfed in mitochondria (Fig. 4B).

**Transcript and protein profiles in lipoma-like regions from patients**

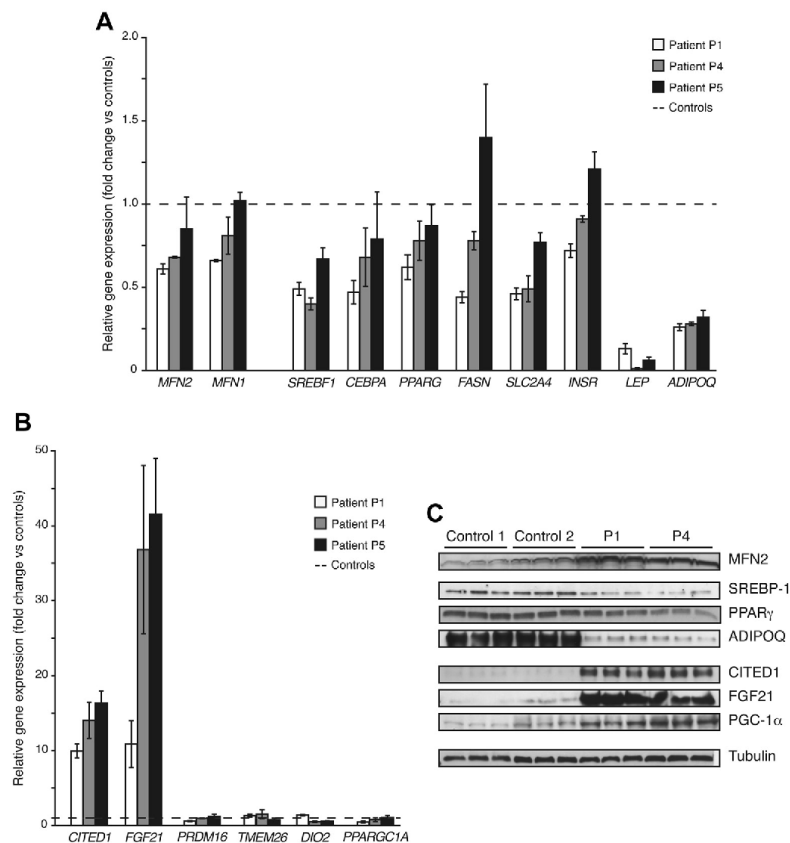
Gene expression was evaluated in subcutaneous lipomatous tissue from patients P1 (adipose overgrowth region of left arm), P4 and P5 (periumbilical lipoma-like regions) and in the same subcutaneous abdominal fat control samples as



**Figure 4** Ultrastructural characteristics of lipomatous masses from patients with *MFN2*-associated MSL. Images obtained by transmission electron microscopy (TEM) are presented for one representative control (subcutaneous white adipose tissue) and for one representative patient (P4) (lipomatous sample). (A) General view of adipocytes. (B) Focus on the cytoplasmic rim and ultrastructural characteristics of mitochondria. Double arrows indicate the thickness of the cytoplasmic rim. Disorganized cristae and double membrane bound structures suggestive of mitophagy are pointed by black arrowheads. (C) Statistical comparison of the length of the minor axis of mitochondria in each patient vs controls using a nonparametric unpaired Mann-Whitney test (\*: *P* values < .0001). Abbreviations: L, lipid droplet; m, mitochondria; MSL, multiple symmetric lipomatosis.

for histological studies (Fig. 5A and B). Protein expression studies were performed in lipomatous samples from P1 and P4 patients (Fig. 5C). *MFN2* expression was found to be similar in patients and controls. Several adipogenic markers showed a slight decrease in mRNA and/or protein expression in patients' fat masses as compared to adipose tissue from controls, including sterol regulatory element binding transcription factor 1 (*SREBF1*), CCAAT/enhancer binding protein alpha (*CEBPA*), and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (*PPARG*). Most importantly, leptin (*LEP*) and adiponectin (*ADIPOQ*) were markedly underexpressed in lipomatous samples from patients, consistent with the low serum concentrations measured in the patients' sera (Fig. 5A, Table 3). Notably, the relative expression of thermogenic markers was strongly lower than that of white

adipocyte markers, both in controls and in patients (data not shown). Among them, *UCP1* expression was below the detection threshold. Several other thermogenic markers displayed low expression levels in subcutaneous adipose tissues from controls and in lipoma-like masses from patients: PR/SET domain 16 (*PRDM16*), transmembrane protein 26 (*TMEM26*), iodothyronine deiodinase 2 (*DIO2*), PPARG co-activator 1 alpha (*PPARGC1A*) (Fig. 5B). However, we observed a marked overexpression of *CITED1* and *FGF21*, which exhibited a more than 10-fold expression increase as compared to controls, both at the transcript and at the protein levels (Fig. 5B and C). These latter data are consistent with our previous results of immunohistological studies and suggest that certain thermogenic markers could play a role in the pathogenic process.



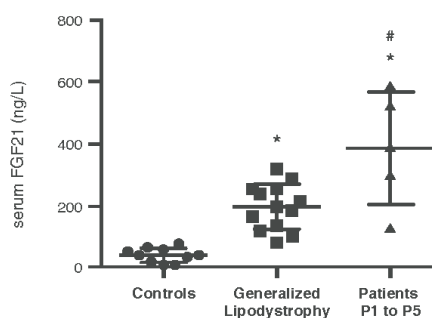
**Figure 5** Gene and protein expression in lipomatous masses from patients with *MFN2*-associated MSL. (A) Gene expression of adipocytes markers. RT-qPCR analysis was performed in lipomatous tissues from 3 patients and compared to gene expression in subcutaneous adipose tissues from 2 controls. Means of 2 independent experiments  $\pm$  standard deviations (SD) are presented as fold changes relative to controls. (B) Gene expression of thermogenic markers. The same experiment was performed as in (A). (C) Protein expression of several adipocyte and thermogenic markers assessed by Western blotting. The 3 lanes presented for each individual corresponds to 3 independent adipose tissue protein extractions. Abbreviations: MSL, multiple symmetric lipomatosis; RT-qPCR, real-time quantitative PCR.

### Measurement of FGF21 in the serum of patients

The major increase in *FGF21* expression at the transcript and protein levels led us to measure this adipokine in the serum of patients with *MFN2*-associated MSL (P1 to P5). We observed very high levels of serum FGF21 in these patients as compared to healthy normal-weighted controls ( $n = 10$ ). We also found elevated levels of serum FGF21 in patients with other forms of acquired or genetically determined generalized lipodystrophic syndromes ( $n = 13$ ), as previously described,<sup>34</sup> but FGF21 levels in patients with *MFN2*-associated MSL were significantly higher (Fig. 6). Therefore, in combination to the decreased serum levels of leptin and adiponectin, high FGF21 serum levels may be a valuable biomarker of *MFN2*-associated MSL.

### Metabolic activity of adipose tissue in patients

The identification of positive thermogenic markers in lipomatous masses led us to perform <sup>18</sup>F-FDG positron-emission tomography and CT (<sup>18</sup>F-FDG PET-CT) to evaluate the presence of adipose tissue with increased metabolic activity<sup>35</sup> in patients P1, P2, P4, and P5. Consistent with our histological and MRI observations (Figs. 2 and 3), the patients' lipomatous masses were not clearly delineated from adjacent adipose tissue on <sup>18</sup>F-FDG PET scans. Most importantly, we observed an increased <sup>18</sup>F-FDG uptake in adipose tissue, mostly located in lipomatous depots but also in subcutaneous lipoatrophic regions (Table 4). This latter point was clearly evidenced in patient P4, who displayed some remaining subcutaneous lower limb fat (Fig. 7 and data not shown).



**Figure 6** FGF21 serum measurements. FGF21 was measured in the sera of 10 healthy individuals (mean  $\pm$  SD:  $40 \pm 23$  ng.L<sup>-1</sup>), 13 patients with generalized lipodystrophy (mean  $\pm$  SD:  $193 \pm 74$  ng.L<sup>-1</sup>), and 5 patients with *MFN2*-associated MSL (mean  $\pm$  SD:  $385 \pm 181$  ng.L<sup>-1</sup>). Statistical comparisons between groups were made using nonparametric unpaired Mann-Whitney tests. \*:  $P < .001$  vs the control group; #:  $P < .05$  vs the generalized lipodystrophy group. Abbreviations: FGF21, fibroblast growth factor 21; MSL, multiple symmetric lipomatosis; SD, standard deviation.

### Discussion

As a French Reference Center for lipodystrophic diseases, we screened *MFN2* in all patients of our cohort referred for altered fat distribution and presenting with one or several lipomas or lipoma-like regions, of any size or location ( $n = 66$ ). In this regard, the 6 patients with positive genetic testing represent the largest series of *MFN2*-associated MSL reported to date, which completes the data obtained previously by Sawyer S. et al. (3 patients)<sup>6</sup> and Rocha N. et al. (4 patients).<sup>5</sup> Multiple lipomata with facial lipodystrophy, without further description, were also mentioned in a patient with CMT2A and biallelic *MFN2* pathogenic variants.<sup>17</sup> In our series, 83% of patients (5/6) are women, an observation which might argue for a sex ratio imbalance. Nevertheless, in the 8 patients reported to date in the literature, 4 are women and 4 are men, so that this hypothesis could not be confirmed. If we consider all of the 14 patients with *MFN2*-associated MSL reported so far, including our data set and previously published cases, 12 patients carry the c.2119C>T (p.Arg707Trp) pathogenic variant in the homozygous state and 2 patients carry it in the heterozygous state together with another *MFN2* molecular defect. Considering that these patients originate from different countries (Ireland, United-Kingdom, Portugal, Australia, France), the p.Arg707Trp disease-causing variant is likely to lie in a mutation hotspot. Consistently, this variant affects a CpG dinucleotide, and methylcytosines of CpG sequences are known to spontaneously deaminate to thymine leading to recurrent mutational events. Our data also underline the crucial role of this particular variant in the development of the adipose and metabolic disease because its presence is required for the development of *MFN2*-associated MSL in all reported cases. Indeed, the numerous other pathogenic variants reported in *MFN2* are associated with a phenotype restricted to neurological manifestations. Notably, a compound heterozygous genotype including the same variant (p.Arg707Trp/p.Gly108Arg) was identified in three siblings with CMT2A.<sup>16</sup> None of them was reported to present with lipomatous depots or lipodystrophy, but these features might not have been searched for or reported in this cohort study of patients with CMT2A.

*MFN2* is the first gene encoding a mitochondrial protein found to be responsible for a lipodystrophic syndrome. Indeed, one of the hallmarks of *MFN2*-associated MSL underlined by our study is the severe lipoatrophy, affecting subcutaneous and visceral adipose tissue, which contrasts with the presence of several lipomatous masses, potentially reaching a major volume. Leptin levels are severely decreased in patients with respect to their BMI, similarly to levels observed in generalized lipoatrophies.<sup>41</sup> Together with the decreased serum levels of adiponectin, this suggests that the whole adipose tissue, including lipomatous masses, displays severe endocrine defects. In accordance, and consistently with previous findings,<sup>5,6</sup> patients with *MFN2*-associated MSL present with hypertriglyceridemia, insulin resistance, and liver steatosis, which are typical lipodystrophy-related

**Table 4**  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake of subcutaneous adipose tissue assessed by PET-scan in patients with *MFN2*-associated MSL as compared to controls

Characteristics	Age	Gender	BMI	SUV max subcutaneous fat	SUV mean subcutaneous fat	SUV max liver	SUV mean liver
Patients with <i>MFN2</i> -associated MSL							
P1	76	F	18.7	1.7	0.9	1.6	1.2
P2	31	M	22.8	4.8	2.8	4.0	2.3
P4	53	F	27.5	2.2	1.3	1.9	1.4
P5	55	F	25.1	1.49	na	1.65	na
Control values							
Control subject from this study (depicted in Fig. 7)	58	F	26.7	0.4	0.2	2.4	1.9
Data from Chin BB et al, 2009 <sup>36</sup>	57.9 ± 13.6	F, n = 23/M, n = 27	25.7	na	0.25 ± 0.1	na	2.5 ± 0.6
Data from Heusch et al, 2013 <sup>37</sup>	57 ± 13	F, n = 10/M, n = 15	na	0.43 ± 0.24	0.28 ± 0.12	3.14 ± 0.56	2.55 ± 0.44
Data from Christen T et al, 2010 <sup>38</sup> :							
Lean subjects	66.0 ± 14.8	F, n = 14/M, n = 12	21.7 ± 0.6	na	0.30 ± 0.09	na	na
Obese subjects	61.4 ± 10.4	F, n = 15/M, n = 16	36.4 ± 3.5	na	0.33 ± 0.08	na	na
Data from Oliveira et al, 2015 <sup>39</sup> :							
Metabolically healthy lean individuals	49.6 ± 18.9	F, n = 29/M, n = 31	23.0 ± 2.6	na	0.26 ± 0.1	na	na
Metabolically healthy obese subjects	50.1 ± 14.3	F, n = 14/M, n = 6	30.7 ± 5.2	na	0.24 ± 0.06	na	na
Metabolically abnormal obese subjects	57.5 ± 15.5	F, n = 29/M, n = 32	32.1 ± 4.5	na	0.24 ± 0.07	na	na
Data from Monteiro et al, 2017 <sup>40</sup> :							
Nonobese subjects	60.1 ± 14.6	F, n = 52/M, n = 80	24.1 ± 3.1	0.6 (0.3)	0.28 (0.2)	na	2.1 (0.7)
Obese subjects	65.8 ± 10.2	F, n = 13/M, n = 11	33.7 ± 2.7	0.7 (0.3)	0.26 (0.09)	na	2.4 (0.4)

na, not available.

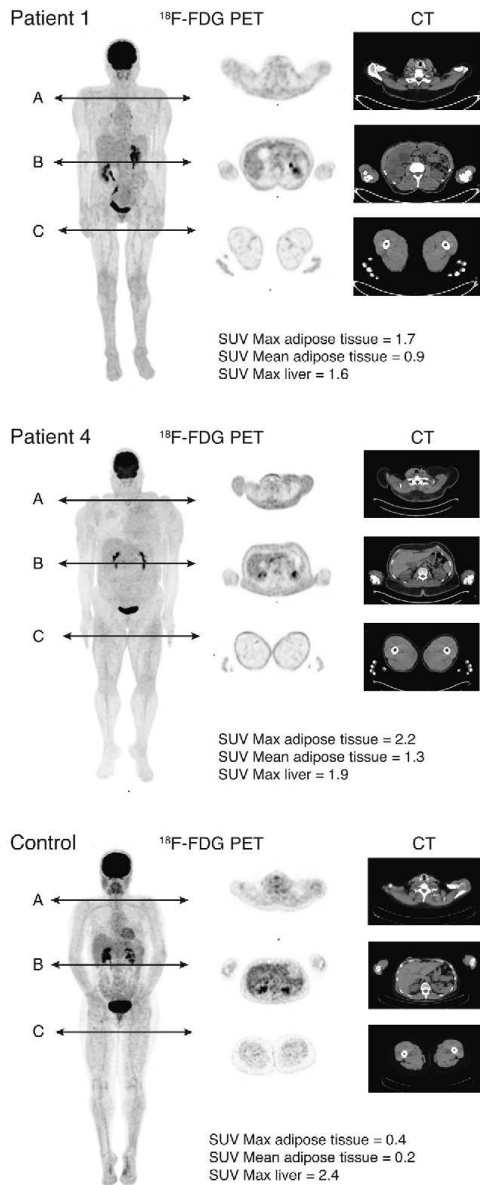
Mean and maximal standardized uptake values of adipose tissue were measured as described in Methods, with SUVmax of the liver as a reference. Individual data assessed during this study in patients P1, P2, P4, and P5 and in a control subject are presented, as well as previously published data obtained using similar protocols of  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET-scans, expressed as mean ± SD or median (IQR).<sup>36-40</sup>

metabolic complications. In addition, the bone osteolytic lesions, similar to those observed in generalized lipodystrophies, suggest a serous transformation of the bone marrow associated with the total absence of medullar fat.<sup>31,42</sup>

In the present study, we also had the opportunity to report the natural history of the disease in 6 adult patients and thereby showed that all of them, by the age of 65 years at the

latest, eventually developed both lipodystrophic and neurological manifestations. However, chronological appearance of symptoms and clinical severity are very heterogeneous among patients, with independent disease course of lipodystrophy and neuropathy. Although lipomatous masses were easily diagnosed in all patients, neurological signs could go unnoticed for several years in several of them.





**Figure 7**  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET scan in patients with *MFN2*-associated MSL. Maximum intensity projection images and axial slices from a  $^{18}\text{F}$ -FDG positron emission tomography (PET) with axial computed tomography (CT) slices at the indicated anatomical levels (A–C) in patients P1 (top) and P4 (middle). Mean and maximal standardized uptake values (SUV) of adipose tissue were measured in regions of increased metabolic activity. The SUVmax of the liver was measured as a control reference. Images from patients were compared to those obtained in a female subject (age 58, BMI 26.7) investigated 30 years after complete surgical

*MFN2*-associated MSL can be considered for differential diagnosis with several disorders. First, it shares a number of characteristics with the less rare form of MSL consecutive to alcoholism and further studies are needed to decipher the specific features that differentiate these clinical phenotypes. The diagnosis of *MFN2*-associated MSL might also be discussed in the patients with MERRF syndrome, who develop multiple lipomatosis (~30% of cases).<sup>43</sup> An axonal sensory polyneuropathy can be associated with MERRF.<sup>44</sup> However, the diversity of clinical signs is wider in MERRF, in which myopathy, cardiomyopathy, and ocular manifestations are frequently encountered. In our series, none of the patients was reported to present any of these comorbidities. Nevertheless, some of them present with other symptoms of mitochondriopathy (deafness, intestinal pseudo-obstruction). Larger phenotypic studies would be required to establish whether the *MFN2* p.Arg707Trp molecular defect is responsible for these features.

The p.Arg707Trp homozygous genotype is associated with a marked increase in the number of mitochondria in lipomatous regions from patients. Moreover, mitochondria exhibit major alterations such as oversize and disorganized morphology. These data are consistent with those obtained by Rocha et al., who showed highly dysfunctional mitochondria in *MFN2*-associated MSL.<sup>5</sup> Recently, another gene called *OPA3*, encoding a protein of the inner mitochondrial membrane, has been implicated in a syndrome associating lipodystrophy, neuropathy, and ocular manifestations.<sup>45</sup> This paves the way to the identification of other genes involved in mitochondrial dynamics in the molecular etiology of adipose tissue and/or metabolic disorders.

The majority of adipocytes from lipomatous regions of patients with *MFN2*-associated MSL have the morphological characteristics of normal-sized white adipose cells, consistent with a previous report.<sup>5</sup> We also observed a few multilocular adipocytes, mainly localized near adipose vessels and containing a high number of small lipid droplets in their periphery. The presence of inflammatory features in lipoma-like tissues (macrophage infiltration, some lipogranulomas) could be reminiscent of what is classically observed in obese patients. However, reduced angiogenesis and fibrosis are also important drivers of adipose tissue dysfunction in obesity.<sup>46</sup> In contrast, we did not detect any fibrotic region, and we observed an increased vascularization in lipomatous tissues of patients with *MFN2*-associated MSL. The gene expression profile of patients' lipomatous depots also displays atypical features with characteristics of both white and brite/brown adipose tissues. Despite a normal expression of a number of mature adipocyte markers, leptin and adiponectin expression is markedly decreased. Simultaneously, 2 thermogenic factors were

resection of pheochromocytoma (bottom). Note the increased uptake of  $^{18}\text{F}$ -FDG in the lipomatous adipose tissue of patients P1 (section A) and P4 (A and B), but also in some subcutaneous lipotrophic regions (B, C in P1; C in P4). Abbreviations: MSL, multiple symmetric lipomatosis.

found to be overexpressed (FGF21, CITED1), when the expression of others, including UCP1, remains very low. Further studies are required to establish whether these characteristics are due to altered biological properties of white adipocytes, to the whitening of brite adipocytes, and/or to the cellular heterogeneity in the overgrown adipose tissue. The appearance of positive thermogenic markers is supported by the result of  $^{18}\text{F}$ -FDG PET-CT scans, showing a spontaneous increased uptake of glucose, mostly in lipomatous regions but also in lipoatrophic adipose tissue, at least in some patients with *MFN2*-associated MSL. Such an increase in FDG uptake has never been reported in normal weight, overweight, or obese subjects<sup>36–40</sup> (Table 4, Fig. 7). However, the level of this uptake is far lower than what is observed in brown activated adipose tissue<sup>47,48</sup> or in hibernoma.<sup>49</sup> These data suggest that, in *MFN2*-associated MSL, adipose tissue could display some thermogenic properties, even if it does not present all the morphologic characteristics of brown adipose tissue.  $^{18}\text{F}$ -FDG PET-CT imaging after activation of adipose tissue by cold exposure could provide further pathophysiological information.

Although FGF21 is an endocrine factor widely expressed in metabolically active organs,<sup>50</sup> its increase in the serum of patients with *MFN2*-associated MSL is likely to originate, at least in part, from adipose tissue, as suggested by our transcriptional and protein expression studies. However, we cannot rule out the possibility that dysfunctional adipose tissue from patients with *MFN2*-associated MSL could also alter the production of FGF21 by the liver. In that setting, it has been recently shown in mice that exosomal miRNAs produced by brown adipose tissue regulate FGF21 production by the liver.<sup>51</sup> FGF21 promotes thermogenesis, glucose uptake, and metabolite oxidation.<sup>52,53</sup> It has also been shown to protect against hyperglycemia and hyperlipidemia. In this regard, it is tempting to speculate that increased FGF21 could play a compensatory role to limit *MFN2*-associated metabolic complications. Indeed, in our series of patients, metabolic abnormalities are relatively moderate, contrasting both with the severe upper-body adipose tissue overgrowth and lower-body lipoatrophy. Altogether our data suggest that very low serum levels of adiponectin and leptin combined with a high level of FGF21 could constitute a useful set of disease biomarkers in *MFN2*-associated MSL.

*MFN2*-associated MSL affects multiple organs with potentially severe complications, and strongly impairs the patients' quality of life. It is mandatory that both neurologists and endocrinologists should be aware of the different disease characteristics. In addition, systematic skeletal radiographs should be performed in *MFN2*-associated MSL to detect and monitor bone lesions, inform patients, and avoid misdiagnosis of these lesions. This multidisciplinary care approach should ensure early diagnosis, allow the rapid initiation of physiotherapy, dietary, and lifestyle preventive measures, as well as proper therapeutic management.

## Acknowledgments

We thank the patients who took part in this study. We acknowledge Eric Fernandez, Sophie Grison, Marjorie Jodar, and Laure Muller, who contributed to the genetic analyses of *MFN2*. We thank Dr Soraya Fellahi and Dr Jean-Philippe Bastard for adiponectin and leptin measurements. We also thank Fatiha Merabtene (Plateforme d'histomorphologie Saint-Antoine–UMS30 Lumic, Sorbonne Université) and Romain Morichon (Plateforme CISA–UMS30 Lumic) for their help in immunohistochemical staining and data interpretation, and Dr Florent Hives for providing PET-scan images from one of the patients.

Conflict of interest statement: The authors have no conflict of interest to disclose.

Authors' contributions: All the authors contributed to the data collection. C.Va., T.S., E.D., H.M., P.G., S.B., S.C.M., B.D., B.F., M.L., F.T., and C.Vi contributed to patient care. S.Z., A.B., P.F., O.L. C.Vi., and I.J. were involved in genetic analyses. A-S.C. and A.M. performed imaging studies. E.C., C.Va., P.C., M.A., M-C.V., J.R., C.Vi., and I.J. participated in adipose tissue in vitro characterization. All the authors reviewed and approved the final article.

Funding: This work was supported by Institute of Cardiometabolism and Nutrition, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Sorbonne Université, and AFERO (Association Française d'Etude et de Recherche sur l'Obésité).

## References

1. Brodie B. Lectures illustrative of various subjects in pathology and surgery. London: Longham; 1846. p. 275–276.
2. Enzi G, Busetto L, Ceschin E, et al. Multiple symmetric lipomatosis: clinical aspects and outcome in a long-term longitudinal study. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2002;26(2):253–261.
3. Enzi G. Multiple symmetric lipomatosis: an updated clinical report. *Medicine (Baltimore)*. 1984;63(1):56–64.
4. Chong PS, Vucic S, Hedley-Whyte ET, et al. Multiple symmetric lipomatosis (Madelung's Disease) caused by the MERRF (A8344G) mutation: a report of two cases and review of the literature. *J Clin Neuromuscul Dis*. 2003;5(1):1–7.
5. Rocha N, Bulger DA, Frontini A, et al. Human biallelic *MFN2* mutations induce mitochondrial dysfunction, upper body adipose hyperplasia, and suppression of leptin expression. *Elife*. 2017;6:e23813.
6. Sawyer SL, Cheuk-Him Ng A, Innes AM, et al. Homozygous mutations in *MFN2* cause multiple symmetric lipomatosis associated with neuropathy. *Hum Mol Genet*. 2015;24(18):5109–5114.
7. Naon D, Zaninello M, Giacomello M, et al. Critical reappraisal confirms that Mitofusin 2 is an endoplasmic reticulum-mitochondria tether. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(40):11249–11254.
8. Santel A, Fuller MT. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci*. 2001;114(Pt 5):867–874.
9. Boutant M, Kulkarni SS, Joffraud M, et al. Mfn2 is critical for brown adipose tissue thermogenic function. *EMBO J*. 2017;36(11):1543–1558.
10. de Brito OM, Scorrano L. Mitofusin 2: a mitochondria-shaping protein with signaling roles beyond fusion. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10(3):621–633.
11. Sebastian D, Hernández-Alvarez MI, Segalés J, et al. Mitofusin 2 (*Mfn2*) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with

- insulin signaling and is essential for normal glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(14):5523–5528.
12. Shinjo S, Jiang S, Nameta M, et al. Disruption of the mitochondria-associated ER membrane (MAM) plays a central role in palmitic acid-induced insulin resistance. *Exp Cell Res*. 2017;359(1):86–93.
  13. Zorzano A, Hernández-Alvarez MI, Sebastián D, et al. Mitofusin 2 as a driver that controls energy metabolism and insulin signaling. *Antioxid Redox Signal*. 2015;22(12):1020–1031.
  14. Bombelli F, Stojkovic T, Dubourg O, et al. Charcot-Marie-Tooth disease type 2A: from typical to rare phenotypic and genotypic features. *JAMA Neurol*. 2014;71(8):1036–1042.
  15. Zuchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, et al. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet*. 2004;36(5):449–451.
  16. Calvo J, Funalot B, Ouvrier RA, et al. Genotype-phenotype correlations in Charcot-Marie-Tooth disease type 2 caused by mitofusin 2 mutations. *Arch Neurol*. 2009;66(12):1511–1516.
  17. Carr AS, Polke JM, Wilson J, et al. MFN2 deletion of exons 7 and 8: founder mutation in the UK population. *J Peripher Nerv Syst*. 2015;20(2):67–71.
  18. Nicholson GA, Magdelaine C, Zhu D, et al. Severe early-onset axonal neuropathy with homozygous and compound heterozygous MFN2 mutations. *Neurology*. 2008;70(19):1678–1681.
  19. Piscosquito G, Saveri P, Magri S, et al. Mutational mechanisms in MFN2-related neuropathy: compound heterozygosity for recessive and semidominant mutations. *J Peripher Nerv Syst*. 2015;20(4):380–386.
  20. Polke JM, Laurá M, Pareyson D, et al. Recessive axonal Charcot-Marie-Tooth disease due to compound heterozygous mitofusin 2 mutations. *Neurology*. 2011;77(2):168–173.
  21. Vallat JM, Ouvrier RA, Pollard JD, et al. Histopathological findings in hereditary motor and sensory neuropathy of axonal type with onset in early childhood associated with mitofusin 2 mutations. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2008;67(11):1097–1102.
  22. Karpe F, Pinnick KE. Biology of upper-body and lower-body adipose tissue-link to whole-body phenotypes. *Nat Rev Endocrinol*. 2015;11(2):90–100.
  23. Tchkonja T, Thomou T, Zhu Y, et al. Mechanisms and metabolic implications of regional differences among fat depots. *Cell Metab*. 2013;17(5):644–656.
  24. Enzi G, Busetto L, Sergi G, et al. Multiple symmetric lipomatosis: a rare disease and its possible links to brown adipose tissue. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2015;25(4):347–353.
  25. Zancanaro C, Sbarbati A, Morroni M, et al. Multiple symmetric lipomatosis. Ultrastructural investigation of the tissue and preadipocytes in primary culture. *Lab Invest*. 1990;63(2):253–258.
  26. Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;293(2):E444–E452.
  27. Boellaard R, O'Doherty MJ, Weber WA, et al. FDG PET and PET/CT: EANM procedure guidelines for tumour PET imaging: version 1.0. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2010;37(1):181–200.
  28. Araújo-Vilar D, Victoria B, González-Méndez B, et al. Histological and molecular features of lipomatous and nonlipomatous adipose tissue in familial partial lipodystrophy caused by LMNA mutations. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012;76(6):816–824.
  29. Koshiba T, Detmer SA, Kaiser JT, Chen H, McCaffery JM, Chan DC. Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science*. 2004;305(5685):858–862.
  30. Vatić C, Fetita S, Boudou P, et al. One-year metreleptin improves insulin secretion in patients with diabetes linked to genetic lipodystrophic syndromes. *Diabetes Obes Metab*. 2016;18(7):693–697.
  31. Teboul-Core S, Rey-Jouvin C, Miquel A, et al. Bone imaging findings in genetic and acquired lipodystrophic syndromes: an imaging study of 24 cases. *Skeletal Radiol*. 2016;45(11):1495–1506.
  32. Wahbi K, Bougouin W, Béhin A, et al. Long-term cardiac prognosis and risk stratification in 260 adults presenting with mitochondrial diseases. *Eur Heart J*. 2015;36(42):2886–2893.
  33. Gandotra S, Le Dour C, Bottomley W, et al. Perilipin deficiency and autosomal dominant partial lipodystrophy. *N Engl J Med*. 2011;364(8):740–748.
  34. Miehle K, Ebert T, Kralisch S, et al. Serum concentrations of fibroblast growth factor 21 are elevated in patients with congenital or acquired lipodystrophy. *Cytokine*. 2016;83:239–244.
  35. Cypess AM, Lehman S, Williams G, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med*. 2009;360(15):1509–1517.
  36. Chin BB, Green ED, Turkington TG, et al. Increasing uptake time in FDG-PET: standardized uptake values in normal tissues at 1 versus 3 h. *Mol Imaging Biol*. 2009;11(2):118–122.
  37. Heusch P, Buchbender C, Beiderwollen K, et al. Standardized uptake values for [<sup>18</sup>F] FDG in normal organ tissues: comparison of whole-body PET/CT and PET/MRI. *Eur J Radiol*. 2013;82(5):870–876.
  38. Christen T, Sheikine Y, Rocha VZ, et al. Increased glucose uptake in visceral versus subcutaneous adipose tissue revealed by PET imaging. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2010;3(8):843–851.
  39. Oliveira AL, Azevedo DC, Bredella MA, et al. Visceral and subcutaneous adipose tissue FDG uptake by PET/CT in metabolically healthy obese subjects. *Obesity (Silver Spring)*. 2015;23(2):286–289.
  40. Monteiro AM, Ferreira G, Duarte H. Metabolic activity in the visceral and subcutaneous adipose tissues by FDG-PET/CT in obese patients. *Acta Med Port*. 2017;30(11):813–817.
  41. Haque WA, Shimomura I, Matsuzawa Y, et al. Serum adiponectin and leptin levels in patients with lipodystrophies. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(5):2395.
  42. Fleckenstein JL, Garg A, Bonte FJ, et al. The skeleton in congenital, generalized lipodystrophy: evaluation using whole-body radiographic surveys, magnetic resonance imaging and technetium-99m bone scintigraphy. *Skeletal Radiol*. 1992;21(6):381–386.
  43. Mancuso M, Orsucci D, Angelini C, et al. Phenotypic heterogeneity of the 8344A>G mtDNA “MERRF” mutation. *Neurology*. 2013;80(22):2049–2054.
  44. Luigietti M, Sauchelli D, Primiano G, et al. Peripheral neuropathy is a common manifestation of mitochondrial diseases: a single-centre experience. *Eur J Neurol*. 2016;23(6):1020–1027.
  45. Bourne SC, Townsend KN, Shyr C, et al. Optic atrophy, cataracts, lipodystrophy/lipoatrophy, and peripheral neuropathy caused by a de novo OPA3 mutation. *Cold Spring Harb Mol Case Stud*. 2017;3(1):a001156.
  46. Crewe C, An YA, Scherer PE. The ominous triad of adipose tissue dysfunction: inflammation, fibrosis, and impaired angiogenesis. *J Clin Invest*. 2017;127(1):74–82.
  47. Cypess AM, Haft CR, Laughlin MR, et al. Brown fat in humans: consensus points and experimental guidelines. *Cell Metab*. 2014;20(3):408–415.
  48. Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med*. 2009;360(15):1518–1525.
  49. Nishida J, Ehara S, Shiraishi H, et al. Clinical findings of hibernoma of the buttock and thigh: rare involvements and extremely high uptake of FDG-PET. *Med Sci Monit*. 2009;15(7):CS117–CS122.
  50. Woo YC, Xu A, Wang Y, Lam KS, et al. Fibroblast growth factor 21 as an emerging metabolic regulator: clinical perspectives. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2013;78(4):489–496.
  51. Thomou T, Mori MA, Dreyfuss JM, et al. Adipose-derived circulating mRNAs regulate gene expression in other tissues. *Nature*. 2017;542(7642):450–455.
  52. Hanssen MJ, Broeders E, Samms RJ, et al. Serum FGF21 levels are associated with brown adipose tissue activity in humans. *Sci Rep*. 2015;5:10275.
  53. Villarroya F, Cereijo R, Villarroya J, et al. Brown adipose tissue as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol*. 2017;13(1):26–35.



## C. Conclusion

Nos résultats sont en accord et complètent ceux des équipes de Sawyer et coll. (3 patients, Sawyer *et al.*, 2015) et Rocha et coll. (4 patients, Rocha *et al.*, 2017). Nous avons décrit ici la plus grande série de patients (6 patients) porteurs du variant pathogénique p.Arg707Trp de *MFN2* à l'état homozygote associé à la lipomatose de Launois-Bensaude. Notre étude permet de confirmer qu'il s'agit bien d'une nouvelle forme de syndrome lipodystrophique lié à des atteintes mitochondriales. Le spectre clinique de cette mitochondriopathie est complexe. Les patients développent des lipomes multiples, une lipoatrophie sous-cutanée associée à une insulino-résistance, une hypertriglycémie, une leptinémie et adiponectinémie basse et des taux de FGF21 sériques élevés.

Ces lipomes présentent des caractéristiques dites « beiges » avec la présence d'adipocytes ayant une morphologie de type « adipocyte blanc » uniloculaire et une petite proportion d'adipocytes multiloculaires bien visibles en microscopie électronique. Ces pseudo-lipomes surexpriment deux marqueurs thermogéniques : CITED1 et FGF21, sans surexpression d'UCP1. Les marqueurs d'adipocytes matures leptine (LEP) et adiponectine (ADIPOQ) sont peu exprimés en regard du TA sous-cutané contrôle.

De façon originale, nous observons une augmentation d'incorporation du glucose marqué lors de l'examen d'imagerie fonctionnelle par le  $^{18}\text{F}$ -FDG couplée à un scanner ( $^{18}\text{F}$ -FDG PET-CT). Cette augmentation du signal (exprimée en SUV) est enregistrée dans les zones lipomateuses mais aussi dans les zones de lipoatrophie du TA. Bien que les valeurs de SUV soient bien en deçà de ce qui est mesuré dans le TA brun (Nishida *et al.*, 2009, Virtanen *et al.*, 2009), c'est une nouvelle donnée qui va dans le sens de la présence de tissu adipeux thermogénique chez ces patients.

Toutes ces données suggèrent qu'un faible taux de leptine et d'adiponectine combiné à un fort taux de FGF21 pourraient constituer un panel de biomarqueurs utiles pour diagnostiquer la lipomatose de Launois-Bensaude associée à *MFN2*.

## Chapitre II : La lipomatose de Launois-Bensaude due aux variants pathogènes de *LIPE* – spectre clinique et impact sur le tissu adipeux

J'ai travaillé sur cette thématique au laboratoire avec Camille Sollier (Master 2 NuMÉSï - Nutrition Métabolisme et Signalisation 2019) et Martine Auclair (Ingénieur d'Études).

### A. Contexte et objectifs de l'étude

Le Pr Éric Renard (Centre Hospitalo-Universitaire de Montpellier) a adressé au laboratoire de génétique moléculaire de l'hôpital Saint-Antoine, les prélèvements d'une patiente suspecte de syndrome de Launois-Bensaude pour exploration génétique. L'histoire familiale de la patiente est compatible avec une cause génétique autosomale récessive de la maladie (parents cousins germains asymptomatiques). La récente découverte du nouveau syndrome lipodystrophique lié au variant *MFN2* p.Arg707Trp et les symptômes cliniques de cette patiente laissaient à penser que ce gène pourrait être impliqué (Capel *et al.*, 2018) mais le séquençage de *MFN2* n'a pas montré de variant pathogène. Néanmoins, le séquençage d'un panel de 23 gènes impliqués dans les syndromes d'insulino-résistance extrême et/ou de lipodystrophies génétiques a permis de mettre en évidence un variant du gène *LIPE* à l'état homozygote. Il s'agit de la délétion d'une base nucléotidique dans la séquence codante du gène (c.2828del), qui conduit à un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon stop précoce (p.Glu943Glyfs\*22).

Trois articles récents sont en faveur de l'implication de différents variants du gène *LIPE*, codant pour la lipase hormono-sensible qui est une protéine clé de la lipolyse, dans un phénotype de lipodystrophie ou lipomatose, ou dans des hypertriglycémies familiales (Zolotov *et al.*, 2017, Albert *et al.*, 2014, Farhan *et al.*, 2014). Il n'y a que peu de cas rapporté à ce jour : 9 patients porteurs de 3 variants différents (tableau 2).

Génotype (référence)	Sujets atteints	Localisation des pseudo-lipomes	Troubles métaboliques	Autres signes cliniques
c.2300_2318del p.Val767Glyfs*102 Homozygote (Albert <i>et al.</i> , 2014)	4 sujets d'une fratrie Amish (42 à 56 ans, 3 femmes et 1 homme)	Aucun lipome décrit	Hypertriglycémie, diabète chez tous les patients	
c.ins1519CG p.Ala507fs*563 Homozygote (Farhan <i>et al.</i> , 2014)	2 membres d'une fratrie d'une famille consanguine (49 et 50 ans, 1 femme et 1 homme)	Abdomen, région axillaire, nuque, dos et bras	Diabète, hypertriglycémie et HDL-cholestérol bas chez tous les patients	Faiblesse musculaire proximale chez l'un des 2 patients
c.3103G>T p.Glu1035* Homozygote (Zolotov <i>et al.</i> , 2017)	3 membres d'une fratrie consanguine (23 à 41 ans, 1 femme et 2 hommes)	Face, cou, nuque, tronc, région inguinale et pubis	Diabète chez un patient, hypertriglycémie et HDL-cholestérol bas chez tous les patients	Myopathie distale symétrique des membres inférieurs, atrophie musculaire

**Tableau 2 : Caractéristiques cliniques des sujets rapportés dans la littérature**

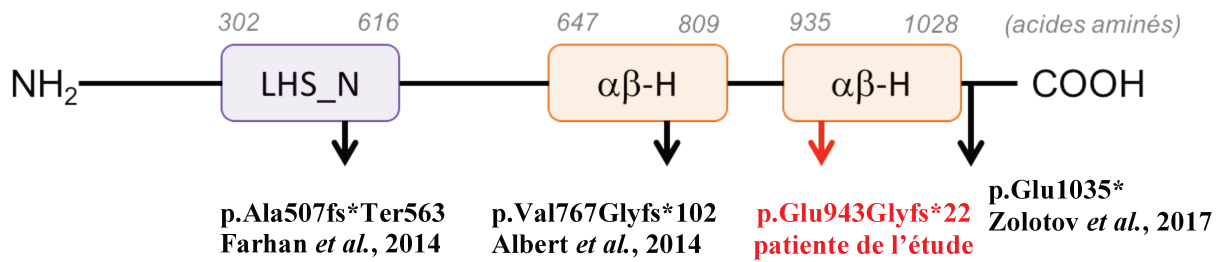
Nous faisons l'hypothèse que le variant du gène *LIPE* est responsable du syndrome lipodystrophique associé à la lipomatose chez cette patiente. En miroir de ce qui a été fait chez les patients porteurs du variant p.Arg707Trp de *MFN2*, nous réalisons une description clinico-biologique de la patiente et l'étude d'un prélèvement obtenu lors de l'exérèse chirurgicale d'un pseudo-lipome axillaire. Les méthodes utilisées sont celles décrites dans l'article Capel *et al.*, 2018. Il s'agit d'un travail en collaboration avec le Pr Renard et le Dr Aguilhon (endocrinologues à Montpellier), le Dr Cervera (anatomo-pathologiste à l'hôpital Saint-Antoine) et avec l'aide des plateformes d'histomorphologie LUMIC UMS\_30 (Saint-Antoine) et d'Imagerie et de Cytométrie LUMIC UMR\_S1155 (Tenon).

## B. Résultats

### *Identification du variant pathogène de LIPE*

La patiente porte le génotype *LIPE* c.2828del à l'état homozygote qui conduit à un décalage du cadre de lecture dans la séquence codante (NM\_005357.4) et à la synthèse d'une protéine tronquée (p.Glu943Glyfs\*22). Ce nouveau variant n'est pas présent dans les bases de données qui répertorient les variants de la population générale (*genome aggregation database*,

*gnomAD*). La localisation des variants déjà décrits dans la littérature et de ce nouveau variant de *LIPE* sont rapportées sur le schéma de la lipase hormono-sensible (LHS/HSL) (figure 28).



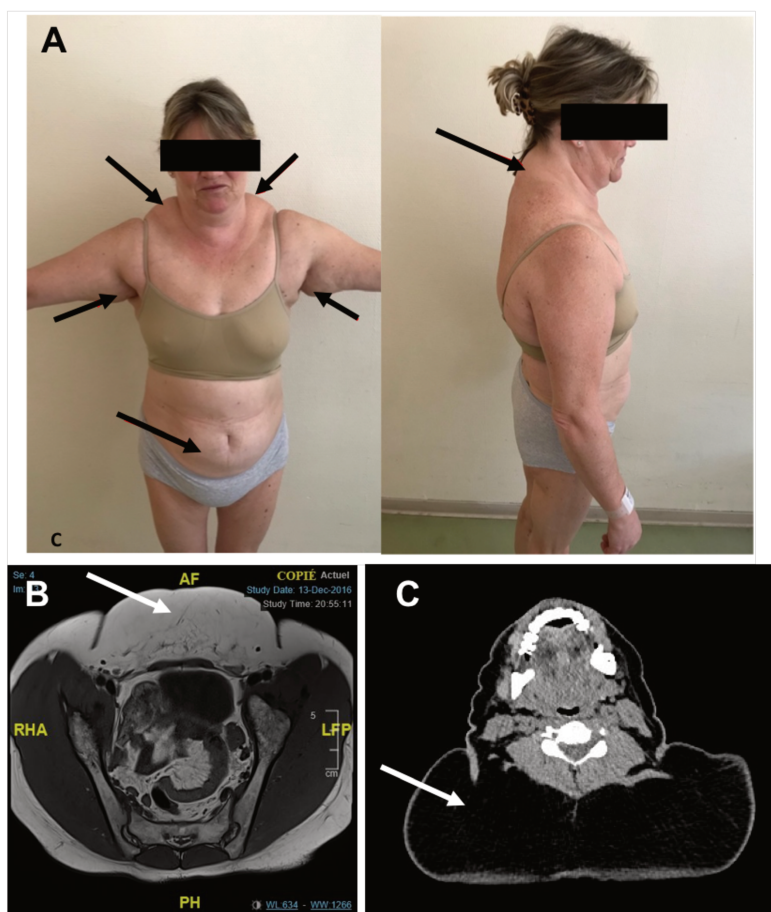
**Figure 28 : Représentation schématique de la localisation des mutations du gène *LIPE* (adapté de Farhan *et al.*, 2014)**

Les flèches indiquent les positions des variants de *LIPE* décrits dans la littérature et celui de la patiente étudiée dans notre laboratoire (en rouge). *LHS\_N* : domaine de l'activité enzymatique de type lipase (violet),  $\alpha\beta$ -H : domaine hydrolase (orange).

Pour faciliter la lecture, la patiente ayant le variant pathogène décrit ci-dessus c.2828del p.Glu943Glyfs\*22 sera désignée par LLB-*LIPE* et les patientes porteuses du génotype *MFN2* p.Arg707Trp par LLB-*MFN2*, pour lipomatose de Launois-Bensaude liée à *LIPE* ou *MFN2*.

### ***Description clinique et biologique de la patiente LLB-LIPE***

La patiente LLB-*LIPE*, âgée de 54 ans, présente des masses adipeuses multiples avec une redistribution corporelle du TA sans obésité. Les pseudo-lipomes sont localisés au niveau de la nuque, des épaules, à la racine des bras, de l'abdomen et dans la région pubienne. Il n'y a pas de pseudo-lipome au niveau des avant-bras et des jambes, qui sont au contraire lipoatrophiques (figure 29A). Les masses de TA sont volumineuses et non délimitées précisément, comme observé sur les examens d'imagerie (figure 29B et C).



**Figure 29 : Photographies et imagerie IRM de la patiente LLB-LIPE**

(A) Photographies de face et de profil de la patiente LLB-LIPE. Les masses lipomateuses sont présentes au niveau de la nuque, des épaules, à la racine des bras, au niveau de l'abdomen (flèches noires). (B) IRM abdominale en coupe axiale au niveau pelvien montrant un lipome pubien (flèche blanche). (C) Scanner cervical en coupe axiale révélant un lipome volumineux au niveau de la nuque (flèche blanche).

Malgré la présence de masses lipomateuses importantes et du fait de la lipoatrophie du TA sous-cutanée des jambes et des avant-bras, le pourcentage total de masse grasse mesuré par DEXA est normal à 28.9% pour un IMC à 25kg/m<sup>2</sup>. Le taux sérique de leptine de 19.6 µg/L correspond à une valeur normale en regard de l'IMC de la patiente LLB-LIPE.

Le bilan lipidique de la patiente montre une hypertriglycémie à 2.98 mmol/L sans altération des taux de cholestérol (total à 4.53 mmol/L, HDL-cholestérol à 1.06 mmol/L et LDL-cholestérol à 2.12 mmol/L). La glycémie à jeun de 6.52 mmol/L est plus élevée que la normale. La patiente LLB-LIPE a un taux d'adiponectine bas à 1.04 µg/L. Ces anomalies glucido-lipidiques s'accompagnent d'une insulino-résistance et d'une stéatose hépatique. À ces complications métaboliques s'ajoute une hypertension artérielle (tableau 2).

L'analyse d'imagerie fonctionnelle ( $^{18}\text{F}$ -FDG TEP-scan) ne montre pas d'augmentation d'incorporation du glucose marqué, ni dans les zones lipomateuses, ni dans les régions lipoatrophiques. L'électro-neuro-myogramme est sans anomalie.

De façon intéressante le taux de FGF21 mesuré par ELISA dans le sérum de la patiente est très augmenté (x9) par rapport aux contrôles (LLB-LIPE : 365.6 ng/L, n=1 ; contrôles : 40 ng/L, n=10) (tableau 3).

<b>Caractéristiques ...</b>	<b>LLB-LIPE</b>
<b>Anthropométriques :</b>	
Sexe	F
Age lors de la dernière investigation	54 ans
Origine	Française
Consanguinité	Parents cousins germains
<b>Métaboliques, [références] :</b>	
Poids (kg)	60
Taille (m)	1.55
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	25
% total de masse grasse	28.9 [30-35]
Leptine (µg/L)	19.6 [15-26]
Adiponectine (mg/L)	1.04 [5-12]
FGF21 (ng/L)	365.6 [40]
Triglycérides (mmol/L)	2.98 [<1.6]
HDL-cholestérol (mmol/L)	1.06 [1.0-1.7]
LDL-cholestérol (mmol/L)	2.12 [<3.87]
Cholestérol total (mmol/L)	4.53 [<5.1]
Glycémie à jeun (mmol/L)	6.52 [6.1]
Insulino-résistance et/ou diabète	Oui : insuliniémie 133 mU/L sous HGPO
Stéatose hépatique	Oui
Hypertension artérielle	Oui
$^{18}\text{F}$ -FDG TEP-scan	Pas d'hyperactivité métabolique dans les zones lipomateuses et lipoatrophiques
Traitement médicamenteux	Metformine + anti-hypertenseurs
<b>Neurologiques :</b>	
Electromyogramme	Sans anomalie

**Tableau 3 : Caractéristiques cliniques et biologiques de la patiente LLB-LIPE**  
*Les valeurs normales sont indiquées entre crochets.*

### ***Caractéristiques du tissu lipomateux***

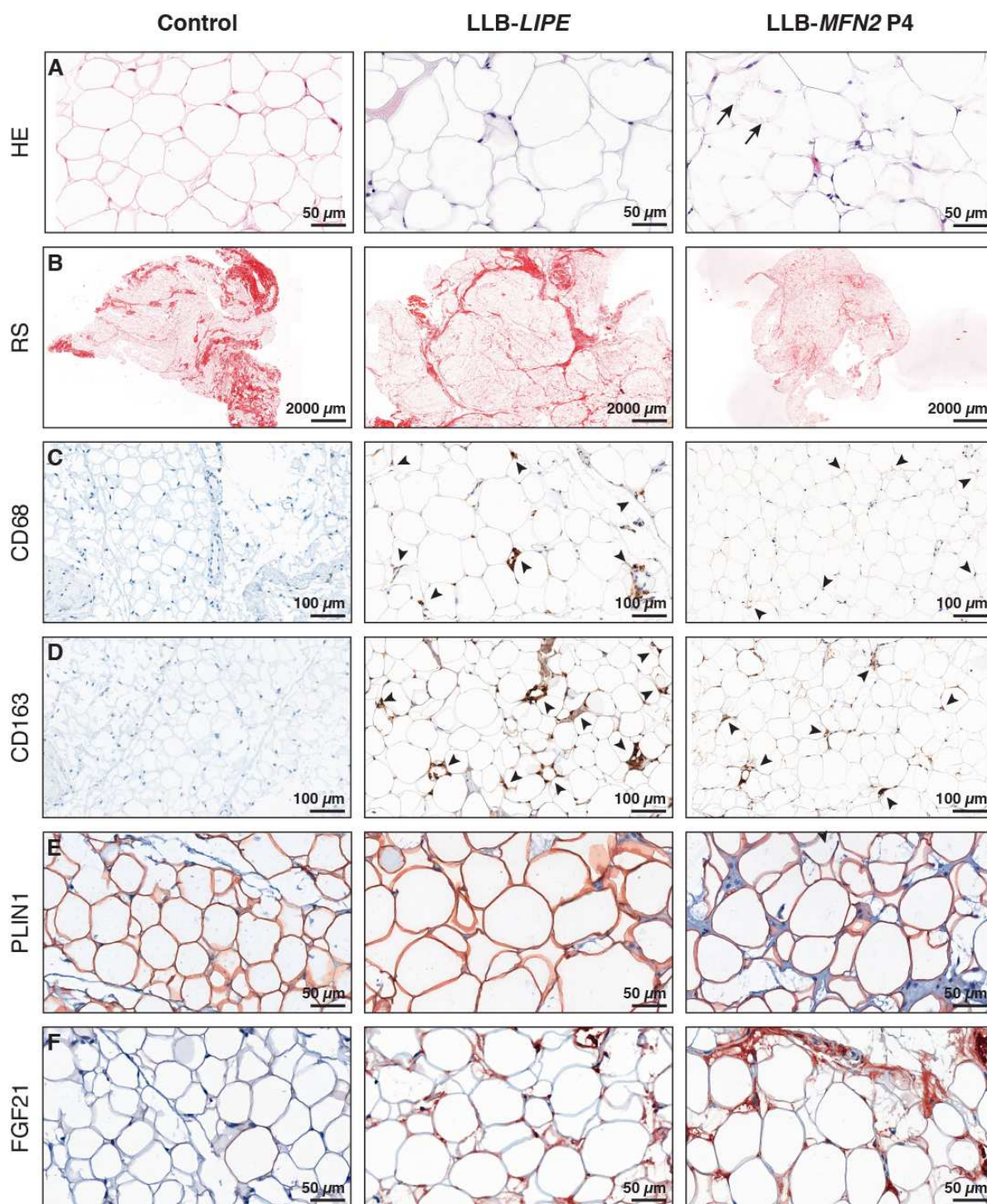
Le tissu lipomateux de la patiente LLB-LIPE a été obtenu après une lipectomie chirurgicale axillaire. Nous avons comparé la morphologie et l'histologie de ce tissu avec les tissus contrôles précédemment décrits, obtenus après une chirurgie plastique de trois sujets sains féminins non

obèses (IMC de 20.4, 21.2 et 25.6) et celui de la patiente LLB-*MFN2* P4 (Capel *et al.*, 2018). Les adipocytes du TA LLB-*LIPE* sont de type « blanc » uniloculaires. Il existe néanmoins une hétérogénéité de taille de ces adipocytes comme cela est décrit pour LLB-*MFN2* (figure 30A, au milieu et à droite). Le tissu lipomateux de la patiente *LIPE* présente une organisation architecturale différente de la structure du TA contrôle visible sur la coloration en rouge Sirius (marqueur du collagène), avec la présence de nombreux nodules qui pourraient correspondre à une régénération tissulaire, sans qu'il existe véritablement de structure évocatrice de lipomes bien organisés (figure 30B). En accord, le marqueur *high-mobility group AT-hook 2* (HMG2A) caractéristique des lipomes communs est négatif dans le tissu LLB-*LIPE* (résultat non montré).

Contrairement au contrôle, le tissu lipomateux de la patiente *LIPE* est très infiltré par des monocytes et macrophages (marquage CD68 et CD163 positifs, figure 30C et D) avec un nombre plus important de lipogranulomes. Le marquage de la périlipine-1 (PLIN1) est similaire dans les tissus adipeux LLB-*LIPE*, LLB-*MFN2* et témoins (figure 30E).

L'expression du marqueur thermogénique FGF21 est augmentée en immunohistochimie dans le tissu lipomateux issu de la patiente LLB-*LIPE* (figure 30F). Ces anomalies (désorganisation des lobules, taille hétérogène des adipocytes, expression augmentée de FGF21) sont similaires à celles observées dans le tissu pseudo-lipomateux des patients LLB-*MFN2* (Capel *et al.*, 2018).





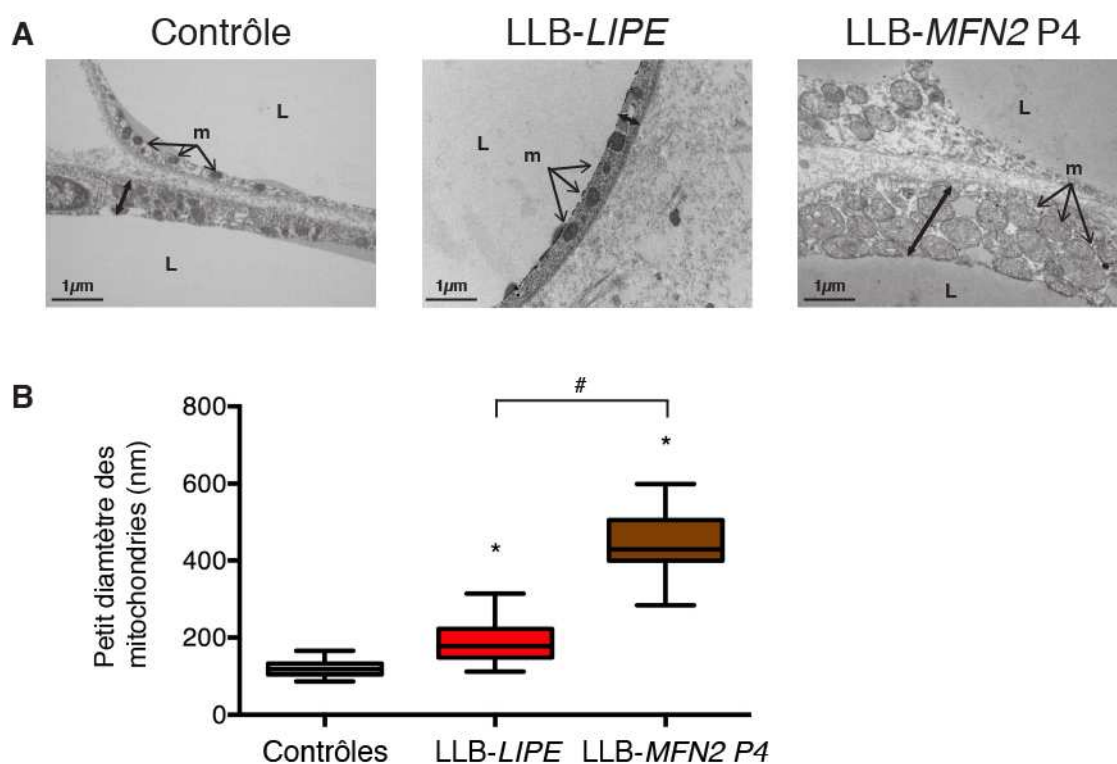
**Figure 30 : Histologie et immunohistologie du tissu adipeux des régions lipomateuses des patientes LLB-LIPE et LLB-MFN2 P4 (Capel et al., 2018)**

Les différents panels (A à F) correspondent aux marquages spécifiques indiqués à gauche, de TA blanc sous-cutané d'un contrôle représentatif et des patientes LLB-LIPE et -MFN2 P4. Dans le tissu lipomateux des patientes LIPE et MFN2, nous observons des adipocytes uniloculaires. Des adipocytes multiloculaires sont présents uniquement chez LLB-MFN2 P4 (marquage hématoxyline-éosine, panel A, flèches). La coloration du collagène au rouge Sirius détourne les nombreux lobules chez LLB-LIPE comparé au contrôle (panel B). Les pseudo-lipomes des patientes LLB-LIPE et LLB-MFN2 sont caractérisés par un infiltrat inflammatoire (marquages CD68 et CD163, panel C et D, pointes de flèches), une expression de la périlipine-1 (PLIN1) similaire au contrôle (panel E) et une augmentation modérée ou importante du marquage FGF21 (panel F, LLB-LIPE et -MFN2 respectivement). Abréviations : HE, hématoxyline-éosine ; RS, rouge Sirius ; PLIN1, périlipine-1.



## Ultrastructure et morphologie des adipocytes

L'analyse par microscopie électronique a été réalisée sur le TA de la patiente *LIPE* et dans les contrôles également utilisés pour l'étude histologique. Contrairement aux résultats publiés dans les tissus lipomateux des patientes *LLB-MFN2*, nous observons uniquement des adipocytes uniloculaires entourés d'un fin cytoplasme similaire aux adipocytes contrôles (figure 31A). Les mitochondries de la patiente *LLB-LIPE* ne présentent pas d'anomalie de structure et sont en nombre équivalent aux contrôles. Leur diamètre moyen ( $187 \pm 13 \mu\text{m}$ ) est supérieur à celui des contrôles ( $121 \pm 5 \mu\text{m}$ ), mais significativement inférieur à celui des mitochondries de la patiente *LLB-MFN2 P4*, de volume très augmenté ( $441 \pm 26 \mu\text{m}$ ) (figure 31B).



**Figure 31 : Ultrastructure des masses lipomateuses des patientes *LLB-LIPE* et *LLB-MFN2 P4***  
Les images obtenues en microscopie à transmission électronique sont représentatives d'un des contrôles (TA blanc sous-cutané), de la patiente *LLB-LIPE* et *LLB-MFN2 P4*. (A) Focus sur l'anneau cytoplasmique entourant l'adipocyte et l'ultrastructure des mitochondries. L'épaisseur du cytoplasme est représentée par la flèche à double sens. (B) Analyse statistique de la taille moyenne des mitochondries dans leur plus petite largeur, test statistique non paramétrique non apparié de Mann-Whitney (\* :  $P < 0.0001$  versus contrôles, # :  $P < 0.0001$  pour la comparaison entre *LLB-LIPE* et *LLB-MFN2*). Abréviations : L, gouttelette lipidique ; m, mitochondrie.

### ***Profil protéique du tissu adipeux des régions lipomateuses***

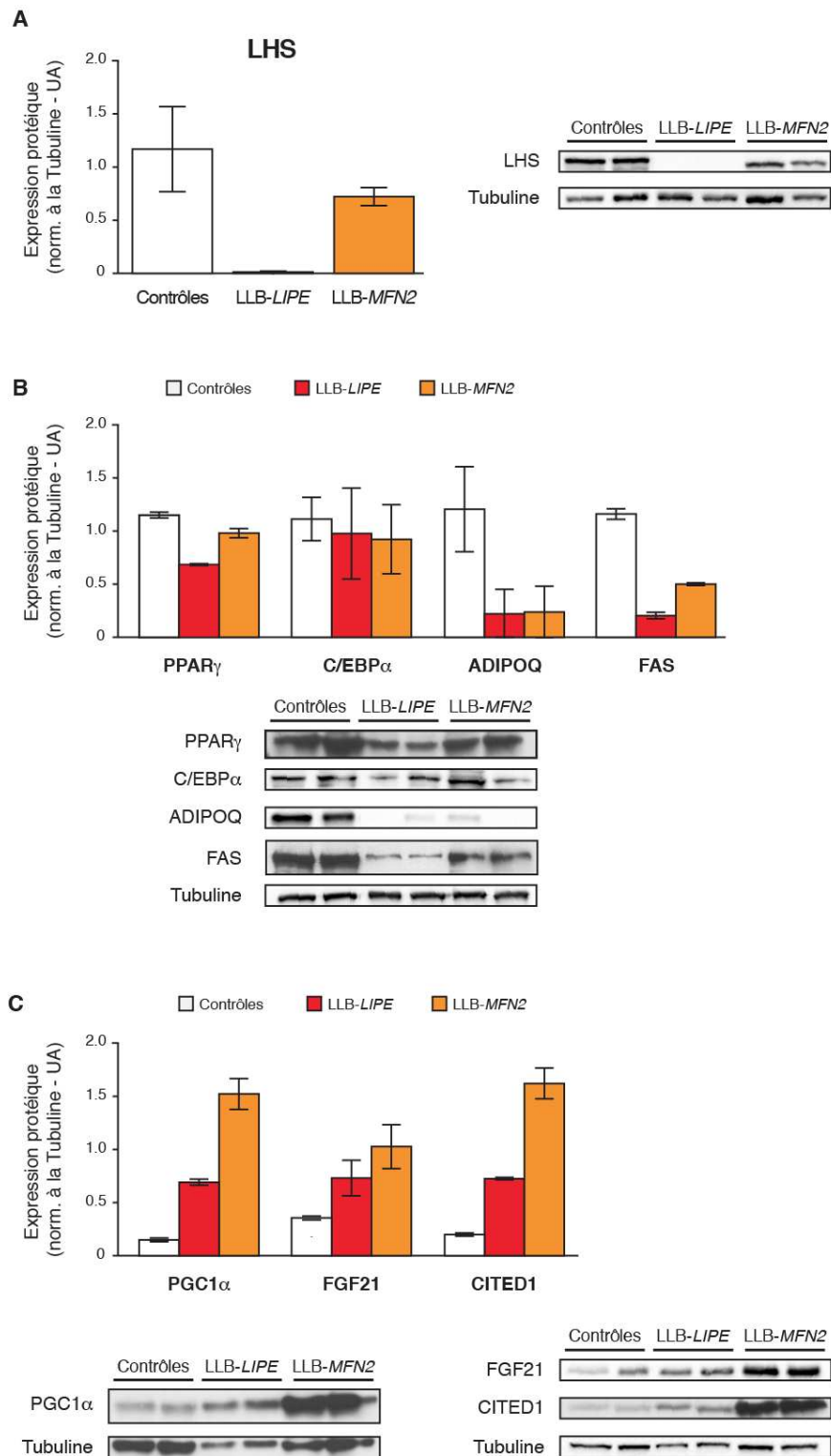
Nous avons évalué l'expression protéique des pseudo-lipomes chez les patientes LLB-*LIPE* (région axillaire) et -*MFN2* (patiente P1 - région du bras gauche et P4 - région péri-ombilicale) en comparaison à deux des trois tissus adipeux sous-cutanés contrôles de l'analyse histologique. Les résultats pour la patiente LLB-*LIPE* correspondent à un réplica biologique c'est-à-dire deux échantillons différents du même lipome en regard des deux patientes LLB-*MFN2* P1 et P4 respectivement.

Le génotype p.Glu943Glyfs\*22 de *LIPE* entraîne une expression de la lipase hormono-sensible (LHS) indétectable dans le tissu lipomateux et diminuée d'environ 35% dans celui des patientes LLB-*MFN2* par rapport aux contrôles (figure 32A).

Les marqueurs d'adipogenèse PPAR $\gamma$  et C/EBP $\alpha$  sont un peu moins exprimés comparé aux contrôles. Le marqueur d'adipocyte mature adiponectine (ADIPOQ) et la *fatty acid synthase* (FAS) sont fortement diminués chez les patientes LLB-*LIPE* et LLB-*MFN2* comme précédemment observé (Capel *et al.*, 2018) en regard des tissus adipeux contrôles (figure 32B). Ce défaut d'expression est en accord avec les taux d'adiponectine sérique bas mesurés chez ces patientes.

La patiente LLB-*LIPE* présentant un phénotype clinique similaire aux patientes LLB-*MFN2*, nous avons étudié l'expression de marqueurs de la biogenèse mitochondriale avec PGC1 $\alpha$  et de marqueurs thermogéniques dont FGF21 et CITED1 retrouvés fortement augmentés dans le tissu pseudo-lipomateux des patientes LLB-*MFN2* (Capel *et al.*, 2018). La protéine PGC1 $\alpha$  est respectivement 4 et 10 fois plus exprimée dans le tissu lipomateux des patientes *LIPE* et *MFN2* en regard des tissus contrôles. Ces données sont en accord avec les observations faites en microscopie électronique à savoir une augmentation de taille et/ou du nombre de mitochondries dans les tissus adipeux pathologiques beaucoup plus marquée dans le cas des variants *MFN2*. Nous mesurons une expression protéique de FGF21 augmentée d'un facteur 2 dans le tissu lipomateux de la patiente LLB-*LIPE* et 3 pour les patientes LLB-*MFN2* (figure 32C). Ces résultats sont corrélés aux taux de FGF21 sériques dosés par ELISA à savoir 365 ng/L pour la patiente LLB-*LIPE*,  $410 \pm 157$  ng/L pour les patientes LLB-*MFN2* (n=2, P1 & P4) et  $40 \pm 23$  ng/L pour les sérums contrôles (n=10). L'expression protéique de CITED1 est augmentée d'environ 3 fois par rapport aux tissus contrôles chez la patiente LLB-*LIPE*, un

niveau d'expression intermédiaire à celui des patientes LLB-*MFN2*, nettement plus élevé (x8) (figure 32C).



**Figure 32 : Expression protéique des marqueurs d'intérêt dans les masses lipomateuses des patientes LLB-LIPE et LLB-MFN2 P1 & P4**

L'analyse par Western-blot a été réalisée dans 2 zones distinctes du tissu lipomateux de la patiente LLB-LIPE (réplicat biologique), les 2 patientes LLB-MFN2 (P1 et P4 respectivement) en comparaison à du TA sous-cutané de 2 contrôles. Les résultats sont représentés comme la moyenne des 2 pistes  $\pm$  l'écart type (SD). Immunoblots et quantification de l'expression protéique de LHS (A), des marqueurs

d'adipogenèse *PPAR $\gamma$* , *C/EBP $\alpha$* , *ADIPOQ* et *FAS* (B), d'un marqueur de la biogenèse mitochondriale *PGC1 $\alpha$*  et des marqueurs thermogéniques *FGF21* et *CITED1* (C) et de la tubuline (témoin de charge). UA : unité arbitraire.

## C. Conclusion

Par cette étude, nous avons analysé les conséquences cliniques, histologiques et protéiques du génotype homozygote p.Glu943Glyfs\*22 du gène *LIPE* codant pour la lipase hormono-sensible. Nous avons également comparé ses différentes caractéristiques à celles observées chez les patients atteints de LLB-*MFN2*. Les principales similitudes cliniques (en bleu) et divergences (en rouge pour *LIPE* et orange pour *MFN2*) entre ces 2 génotypes responsables de la lipomatose de Launois-Bensaude sont reprises dans le tableau ci-dessous.

Génotype	p.Glu943Glyfs*22 de <i>LIPE</i>	p.Arg707Trp de <i>MFN2</i>
Clinique	pseudo-lipomes aux racines des membres et à la partie supérieure du tronc lipoatrophie associée en distalité des membres troubles métaboliques (hypertriglycémie, insulino-résistance, stéatose hépatique)	
	électro-neuro-myogramme normal <sup>18</sup> F-FDG PET scan normal	neuropathie périphérique pseudo-lipomes hypermétaboliques en <sup>18</sup> F-FDG PET scan
Biologique	adiponectinémie basse, FGF21 augmenté	
	leptinémie normale	leptinémie basse

**Tableau 4 : Synthèse des caractéristiques cliniques et biologiques des patientes étudiées atteintes de lipomatose de Launois-Bensaude**

Sur le plan clinique, la patiente ayant une LLB-*LIPE* présente donc un phénotype clinique similaire à celui des patients LLB-*MFN2* précédemment décrits au laboratoire (Capel *et al.*, 2018) : une lipomatose (pseudo-lipomes) de la partie supérieure du corps, une lipoatrophie distale des membres et des troubles métaboliques associés aux lipodystrophies. Nos résultats concernant la patiente ayant le génotype p.Glu943Glyfs\*22 de *LIPE* sont également concordants avec ceux observés pour les patients au génotype p.Val767Glyfs\*102 de *LIPE* publiés par Albert et coll. Les 4 patients homozygotes pour ce variant présentent des troubles métaboliques : dyslipidémie, stéatose hépatique, résistance à l'insuline et diabète. Aucun lipome ni zone de lipoatrophie n'a été décrit chez ces patients. Leurs taux de leptine plasmatique sont comparables aux sujets hétérozygotes et non mutés ; et leurs taux d'adiponectine

plasmatique sont significativement plus bas comme observé chez notre patiente ayant le variant p.Glu943Glyfs\*22 (Albert *et al.*, 2014).

Sur le plan de l'étiologie moléculaire, le variant p.Glu943Glyfs\*22 de *LIPE* n'avait jamais été rapporté chez l'Homme. La pathogénicité de ce variant est confirmée à l'état homozygote car il entraîne un défaut d'expression du gène *LIPE* responsable d'une absence complète de la lipase hormono-sensible dans le TA, comme pour le variant p.Val767Glyfs\*102 de *LIPE* (Albert *et al.*, 2014).

Chez la patiente LLB-*LIPE* comme chez les patients LLB-*MFN2*, le tissu pseudo-lipomateux est caractérisé morphologiquement par une désorganisation des lobules adipeux avec des adipocytes de taille hétérogène sans particularité d'anomalies de nombre et de la structure des mitochondries.

Dans notre étude, l'expression protéique de PPAR $\gamma$  et de CEBP $\alpha$  est modérément diminuée dans le tissu lipomateux de la patiente LLB-*LIPE*. L'analyse du TA des patients ayant le génotype homozygote p.Val767Glyfs\*102 de *LIPE* avait mis en évidence une diminution de l'expression des gènes cibles de PPAR $\gamma$  comme C/EBP $\alpha$  et SREBP1c mais sans diminution d'expression de PPAR $\gamma$  (Albert *et al.*, 2014). Les différents variants de *LIPE* pourraient donc altérer la différenciation adipocytaire à divers niveaux.

Chez la patiente ayant une LLB-*LIPE* étudiée au laboratoire, deux marqueurs thermogéniques sont augmentés dans le TA : CITED1 et FGF21. Néanmoins les masses lipomateuses captent normalement le glucose en  $^{18}\text{F}$ -FDG TEP-scan, ce qui n'est pas en faveur d'une activité thermogénique majeure de ce tissu.

Une des principales limites de notre travail est l'étude du TA provenant d'une seule patiente présentant un variant de *LIPE*. Ces résultats préliminaires devront donc être confirmés par l'exploration d'autres patients présentant une LLB secondaire à un variant de *LIPE*.

# Chapitre III : Modélisation de la physiopathologie de lipomatose de Launois-Bensaude – utilisation des cellules souches adipocytaires (ASC) issues des patientes LLB-MFN2 et LLB-LIPE

J'ai travaillé sur cette thématique au laboratoire avec Martine Auclair (Ingénieur d'Études), Camille Sollier (Master 2 NuMéSi - Nutrition Métabolisme et Signalisation 2019) et Juliette Robert (Master 2 NuMéSi 2017). Il s'agit d'un travail collaboratif avec l'aide au laboratoire de Jennifer Gorwood et Matthieu Mantecon (UMR\_S938 équipe Fève) pour l'isolement des ASC, de Romain Morichon de la plateforme d'imagerie CISA LUMIC UMS\_30 (Saint-Antoine) pour l'acquisition et la quantification des images de *Red Oil* et avec Laura Braud et Roberto Motterlini (Inserm U955, équipe 12, Faculté de médecine - Université Paris Est Créteil) pour les études sur la respiration mitochondriale.

## A. Contexte et objectifs de l'étude

Les syndromes lipodystrophiques sont des pathologies complexes pour lesquels les explorations sont limitées d'une part par la rareté des patients et d'autre part par la difficulté à mettre en place des modèles cellulaires adaptés. Les lignées murines sont difficilement transfectables et le modèle murin présente plusieurs limites à l'étude des pathologies adipocytaires avec des différences dans le métabolisme lipidique, la distribution du TA et la structure adipocytaire (Bluher, 2005). À ce jour, il n'existe pas de lignée adipocytaire humaine permettant de récapituler, sans surexpression du gène d'intérêt, la physiopathologie des lipodystrophies et plus particulièrement de la lipomatose de Launois-Bensaude. Les cellules souches adultes, qui participent à la réparation et au maintien de l'intégrité des tissus, ont la capacité de se multiplier à l'état indifférencié par auto-renouvellement et sont multipotentes (Ferrari *et al.*, 1998, Johnstone *et al.*, 1998, Hauner *et al.*, 1987, Grigoriadis *et al.*, 1988). Les CSM de la moelle osseuse peuvent ainsi se différencier dans plusieurs lignages cellulaires dont les ostéocytes, les chondrocytes et les adipocytes (Pittenger *et al.*, 1999). L'intérêt des cellules souches adipocytaires humaines ou ASC (*adipose-derived stem cell*) est en pleine expansion depuis leur découverte dans la fraction stroma-vasculaire du TA (Zuk *et al.*, 2001), aussi bien au niveau physiopathologique (Kahn *et al.*, 2019) que dans des perspectives de médecine

régénérative (Qi *et al.*, 2019). Nous faisons l'hypothèse que les ASC issues des patientes pourraient être un bon modèle cellulaire pour l'étude et la caractérisation de la dysfonction adipocytaire associée aux variants *LIPE* et *MFN2*.

Les résultats présentés ci-après sont des données préliminaires. Des expériences complémentaires sont en cours.

## B. Matériel et méthodes

### ***Isolement et culture des cellules souches adipocytaires ou ASC***

Les ASC issues des patientes LLB-*MFN2* P1 & P4 et LLB-*LIPE* ont été isolées dans les 24 h suivant l'exérèse des lipomes. Les ASC contrôles sont issues de tissus adipeux sous-cutanés de femmes non diabétiques (IMC < 25 kg/m<sup>2</sup>) d'âge moyen de 40.5 ± 14.2 ans ayant eu recours à une chirurgie plastique. Tous les sujets inclus dans cette étude ont donné leur consentement libre et éclairé permettant l'utilisation de leur TA à des fins de recherche.

Les ASC ont été extraites du TA par digestion à la collagénase comme décrit par Zhu *et al.*, 2013. Brièvement le tissu a été digéré de façon enzymatique à la collagénase 0.2%. Après centrifugation, la FSV a été filtrée (100 µm), rincée etensemencée. Les cellules ont été cultivées en  $\alpha$ MEM (*minimum Eagle's medium*, Gibco, ThermoFisher) supplémenté par 10% de SVF (sérum de veau fœtal - PAN Biotech, Dominique Dutscher), 2 mmol/L de glutamine (Gibco), 1% de pénicilline-streptomycine (10 000 UI/mL, Gibco) et 145 nmol/L de *basic fibroblast growth factor* (PeproTech). À pré-confluence, les cellules adhérentes ont été trypsinées etensemencées à 10<sup>4</sup> cellules/cm<sup>2</sup>.

### ***Différenciation adipocytaire blanche et beige des ASC***

La différenciation adipocytaire dite « blanche » des ASC a été induite 2 jours post confluence par l'ajout d'un milieu pro-adipogénique (DMEM 4.5g/L de glucose, *Dulbecco Modified Eagle's Medium*, Gibco, ThermoFisher) supplémenté par 10% SVF, 1 µmol/L de rosiglitazone (Enzo Life Science), 1 µmol/L de dexaméthasone, 500 µmol/L d'IBMX (3-isobutyl-1-méthylxanthine), 1 µmol/L d'insuline (Sigma-Aldrich) pendant 7 jours, puis maintenues en DMEM additionné d'1 µmol/L d'insuline pendant 7 jours. La différenciation adipocytaire dite « beige » diffère uniquement par l'ajout supplémentaire pendant les 7 premiers jours de culture de 50 µmol/L d'indométacine et 2 nmol/L de triiodothyronine ou T3 (Sigma), puis maintenues

pendant 7 jours en DMEM additionné d'1  $\mu\text{mol/L}$  d'insuline, 2  $\text{nmol/L}$  de T3 et 1  $\mu\text{mol/L}$  de rosiglitazone. Les milieux de culture ont été changé tous les 3-4 jours.

La différenciation adipocytaire a été évaluée à J14 par l'accumulation de lipides cellulaires (comme décrit précédemment par Guénant *et al.*, 2017 - annexe 1). Brièvement, les cellules cultivées en plaque 12 puits ont été fixées par du formol 10% tamponné et colorées avec de l'*Oil Red O* (0.6% dans de l'isopropanol 60%) pendant 2 h à température ambiante. Les noyaux ont été marqués par le 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI). La coloration rouge du *Red Oil* a été quantifiée en microscopie à fluorescence (Olympus IX83, logiciel cellSens Dimension). Ensuite les cellules ont été solubilisées dans du SDS 10% et l'intensité de coloration du *Red Oil* a été quantifiée à 520 nm (Spectrafluor Plus, Tecan).

### ***Expression génique***

Les ARN totaux cellulaires ont été extraits à J14 avec le kit *NucleoSpin RNA* (Macharey-Nagel) selon les recommandations du fabricant. L'ADNc a été synthétisé à partir de 0.5 à 1  $\mu\text{g}$  d'ARN (*High capacity cDNA reverse transcription kit*, Life Technologies). La PCR quantitative a été réalisée sur un Light Cycler 480 en utilisant du *Light Cycler 480 SYBR Green I Master mix* (Roche Diagnostics). L'ARNm de HPRT (*hypoxanthine phosphoribosyltransferase*) a été utilisé pour la normalisation. Les mesures d'expression géniques relatives sont réalisées selon la méthode des  $\Delta\Delta\text{Ct}$  en prenant en compte l'efficacité réelle des PCR.

### ***Expression protéique***

Les protéines totales ont été lysées en Laemmli (Biorad) à J0 et J14. Les lysats ont été soumis à un SDS-PAGE et transférés sur membrane de nitrocellulose. Les protéines spécifiques ont été détectées en utilisant des anticorps dirigés contre MFN2 (1/1000, Abcam, ab50838), HSL (1/100, Cell Signaling Technology, #4107), C/EBP $\alpha$  (1/100, Proteintech, #18311-1-AP), SREBP1c (1/500, Santa Cruz, SC-366), PPAR $\gamma$  (1/500, Santa Cruz, SC-7273), ADIPOQ (1/1000, Invitrogen, #MA1-054), FAS (1/1000, Cell Signaling Technology, #3180), PLIN1 (1/1000, Abcam, ab3526), ATGL (1/1000, Cell Signaling Technology, #2138), PGC1 $\alpha$  (1/1000, Proteintech, #20658-1-AP), FGF21 (1/1000, abcam, ab171941), UCP1 (1/1000, Sigma Aldrich, U6382) et tubuline (1/5000, Sigma-Aldrich, T5168). La tubuline a été utilisée comme contrôle de charge protéique. Les complexes immuns ont été détectés par chemiluminescence et quantifiés sur le logiciel ImageJ (NIH).



### ***Sensibilité à l'insuline***

L'effet de l'insuline sur la phosphorylation de la sous-unité beta du récepteur à l'insuline (IR $\beta$ ) et de son substrat IRS1, sur la protéine kinase B (Akt/PKB) et sur l'activation de l'*extracellular-regulated kinase* (ERK) a été déterminée à J14 par analyse en Western-blot sur des lysats cellulaires totaux à partir de cellules déplétées en SVF et stimulées pendant 8 min avec de l'insuline (100 nmol/L) en utilisant des anticorps dirigés contre IR $\beta$  (1/1000, Cell Signaling Technology, #3025), IRS1 (1/1000, Upstate, #07-247), Akt (1/500, sc-8312, Santa Cruz Biotechnology), p-Akt (1/500, sc-7985-R), ERK et p-ERK (1/1000, Cell Signaling Technology, #9102 et #9101), ainsi que contre les tyrosines phosphorylées ( $\alpha$ PY, 1/500, Santa-Cruz Biotechnology, sc-7020).

### ***Transport du glucose***

Le transport du glucose a été mesuré à J14 comme décrit précédemment dans Capel *et al.*, 2012 (annexe 2). Brièvement, les cellules ont été incubées préalablement 24 h dans un milieu DMEM sans SVF et sans glucose, avec 0.5% d'albumine bovine. Les cellules ont été reprises dans un tampon *Krebs Ringer Phosphate Pyruvate* avec 2% d'albumine et stimulées par de l'insuline (100 nmol/L) pendant 20 min avec ou sans cytochalasine B (5  $\mu$ mol/L) qui est un inhibiteur des transporteurs de glucose, permettant de mesurer le transport non spécifique. Un mélange contenant du 2-deoxy-D-[1-<sup>14</sup>C] glucose (capable d'être phosphorylé en intracellulaire sans intégrer la glycolyse) a été ensuite ajouté pendant 8 min. Les cellules ont été lavées avec du PBS, lysées (SDS 0.05%) et l'incorporation de <sup>14</sup>C a été mesurée (compteur  $\beta$ , HIDEX). Les résultats ont été rapportés à la quantité protéique mesurée en spectrométrie (*Bradford protein assay*, Biorad).

### ***Lipolyse adipocytaire***

La lipolyse a été évaluée à J14 par la libération de glycérol dans le milieu de culture (DMEM sans SVF supplémenté à 0.5% d'albumine bovine), en utilisant le *free glycerol reagent kit* (F6428, Sigma-Aldrich). Nous avons comparé la libération de glycérol à l'état basal et suite à une stimulation pendant 4 h par la forskoline (10  $\mu$ mol/L), qui active la lipolyse en stimulant l'adénylate cyclase. La coloration a été mesurée en spectrométrie à 540 nm et les résultats sont exprimés en nmol/L de glycérol sécrété par mg de protéine cellulaire.

### ***Fonctions mitochondriales et stress oxydant***

Le colorant cationique JC-1 (*tetrachloro-tetra-ethyl-benzimidazolyl-carbocyanine iodide*) permet d'évaluer le potentiel de membrane mitochondrial et la sonde *MitoTracker Red* (Invitrogen) est un reflet de la masse mitochondriale. Les cellules, cultivées en plaque 48 puits, ont été incubées à J0 et J14 de différenciation avec du JC-1 (1  $\mu\text{mol/L}$ ) ou du *mitotracker* (1.9  $\mu\text{mol/L}$ ) dans du DMEM supplémenté avec 4.5 g/L de glucose pendant 2 h à 37°C. La quantification a été réalisée sur un spectromètre à 595 et 530 nm (JC-1 agrégats et monomères, respectivement) ou 630 nm (MitoTracker). La production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) a été évaluée par l'oxydation du *5-6-chloromethyl-2,7-dichlorodihydro-fluorescein diacetate* (CM-H2DCFDA) (Invitrogen). Les résultats ont été normalisés au contenu en ADN (DAPI).

### ***Respiration mitochondriale***

La consommation d'oxygène (OCR, *Oxygen Consumption Rate*) des ASC a été évaluée à l'aide d'un analyseur de flux extracellulaire *Seahorse XF24* (Seahorse Bioscience). Les cellules ont étéensemencées à la densité de  $2.10^4$  cellules par puits et soumises au protocole de différenciation adipocytaire blanc ou beige. À J14 le milieu a été remplacé par du milieu DMEM sans SVF et sans bicarbonate supplémenté par 4.5 g/L de D-glucose et 2 mmol/L de glutamine. Après une incubation d'1h dans un incubateur sans  $\text{CO}_2$  à 37°C, l'OCR basal a été mesurée pendant 30 min. Plusieurs paramètres tels que la respiration liée à l'ATP, la respiration maximale, la fuite de protons et la respiration non-mitochondriale ont été évalués à l'aide du test *Mito Stress*. Ce test a été réalisé par l'ajout séquentiel de 1  $\mu\text{g/mL}$  oligomycine (*inhibiteur de l'ATP synthase*), 0.7  $\mu\text{mol/L}$  *carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazon* (FCCP, agent découplant) et 1  $\mu\text{mol/L}$  roténone/antimycine A (inhibiteurs des complexes I et III de la chaîne respiratoire, respectivement). Les valeurs ont été normalisées à la masse mitochondriale (Mitotracker/DAPI).

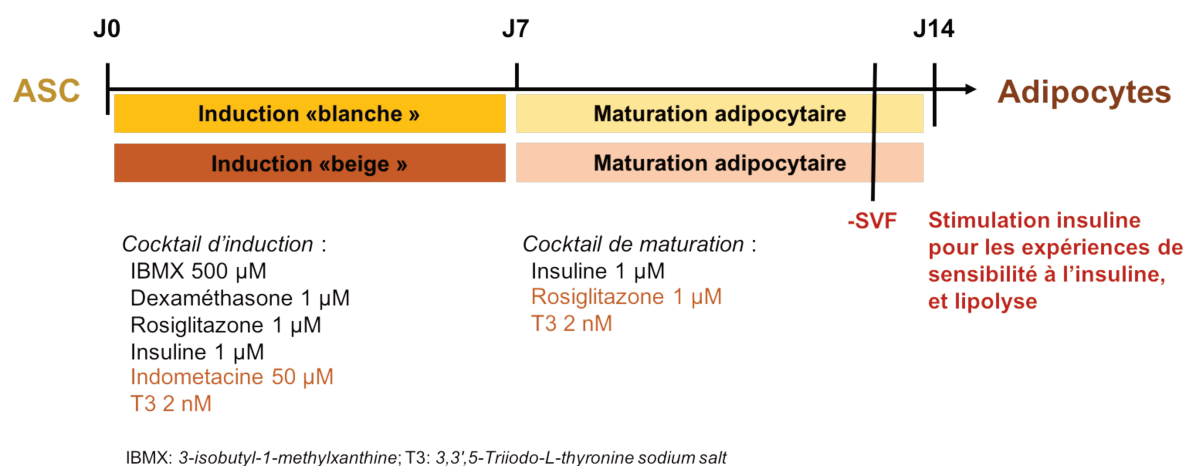
### ***Analyses statistiques***

Les données sont exprimées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type à la moyenne (SEM, *standard error mean*). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel *GraphPad Prism 6* en utilisant un test non paramétrique non apparié de Student. Le test a été considéré significatif si la valeur de *P* est inférieure à 0.05.

## C. Résultats

### 1. Mise au point et validation d'un protocole de différenciation beige

L'analyse des données de la littérature à partir d'ASC m'ont permis de mettre au point un nouveau protocole de différenciation adipocytaire beige à partir d'ASC humaines (Chen *et al.*, 2016, Carey *et al.*, 2014, Elsen *et al.*, 2014). Ce protocole consiste en deux phases successives : une phase d'induction et une phase de maturation adipocytaire, de 7 jours chacune (figure 33). L'utilisation d'indométacine connue pour activer PPAR $\gamma$  (Lehmann *et al.*, 1997) et la triiodothyronine ou T3 ayant une action sur la stimulation adrénérgique d'UCP1 (Hernandez et Obregon, 2000) permettent d'orienter la différenciation vers un phénotype adipocytaire beige dès la phase d'induction. La phase de maturation adipocytaire diffère également du protocole de différenciation adipocytaire blanche par l'utilisation de T3 et de rosiglitazone qui favorisent l'activation des fonctions thermogéniques des adipocytes (Fayyad *et al.*, 2019). À la suite de la lipectomie réalisée chez les patientes LLB-MFN2 P1 et P4 et LLB-LIPE, j'ai pu isoler les ASC des lipomes et les soumettre à ces deux protocoles de différenciation adipocytaire.



**Figure 33 : Schéma simplifié des deux protocoles de différenciation adipocytaire *in vitro***

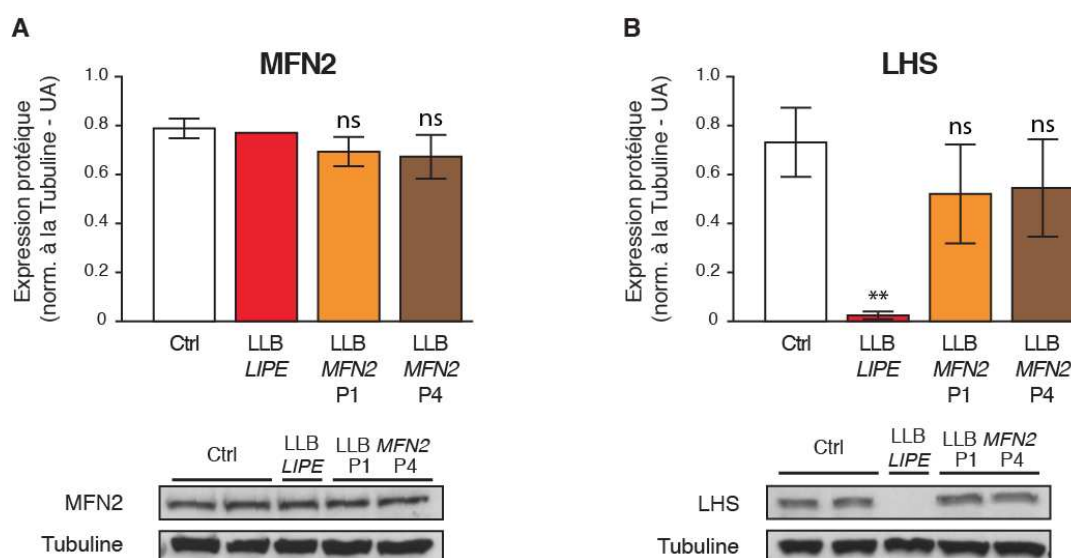
Les ASC confluentes sont soumises à un protocole de différenciation adipocytaire blanc ou beige permettant d'obtenir en 14 jours des adipocytes matures. Ces protocoles consistent en deux phases successives de 7 jours : une phase d'induction puis une phase de maturation adipocytaire. Les cocktails d'induction sont indiqués sous chaque phase, les molécules en marron sont ajoutées dans le protocole de différenciation beige. Pour l'évaluation de la sensibilité à l'insuline, du transport du glucose et de la lipolyse, les cellules sont privées SVF à J13 et stimulées par l'insuline à J14.

Dans les ASC contrôles après 14 jours de différenciation adipocytaire beige, ce protocole induit l'expression génique des marqueurs beiges *CITED1*, *UCP1* et *PPARGC1A* de 5 à 80 fois suivant les gènes (données non montrées).

## 2. Impact des variants de *LLB-MFN2* et *-LIPE* sur la différenciation adipocytaire blanche des *ASC in vitro*

### *Expression protéique de MFN2 et LHS dans les ASC soumises à la différenciation adipocytaire blanche*

L'expression protéique de MFN2 n'est pas significativement modifiée dans les ASC des trois patientes LLB en comparaison avec les ASC contrôles soumises à 14 jours de différenciation adipocytaire blanche (figure 34A). L'expression de la LHS est quant à elle effondrée uniquement dans les ASC LLB-*LIPE* (figure 34B). Le génotype p.Glu943Glyfs\*22 de *LIPE* abolit donc l'expression de la lipase hormono-sensible dans les adipocytes *in vitro*. Ces résultats sont en accord avec l'expression protéique de LHS retrouvée dans le tissu lipomateux des patientes LLB-*MFN2* et *-LIPE* décrits précédemment.



**Figure 34 : Expression protéique de MFN2 et LHS dans les ASC des patientes LLB-*LIPE* et -*MFN2* à J14 de différenciation adipocytaire blanche**

*Immunoblots et quantification de l'expression protéique de MFN2 (A) et LHS (B) dans les lysats protéiques totaux extraits des ASC à J14 de différenciation adipocytaire blanche. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  SEM (n=4, sauf pour le point MFN2 / LLB-*LIPE* où n=1). \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  en comparaison avec les ASC contrôles (n=2 à 3 par expérience). MFN2 : mitofusine 2, LHS : lipase hormono-sensible, Ctrl : contrôles, UA : unité arbitraire, ns : non significatif.*

### *Différenciation adipocytaire blanche dans les ASC porteuses des variants LLB-MFN2 et -LIPE*

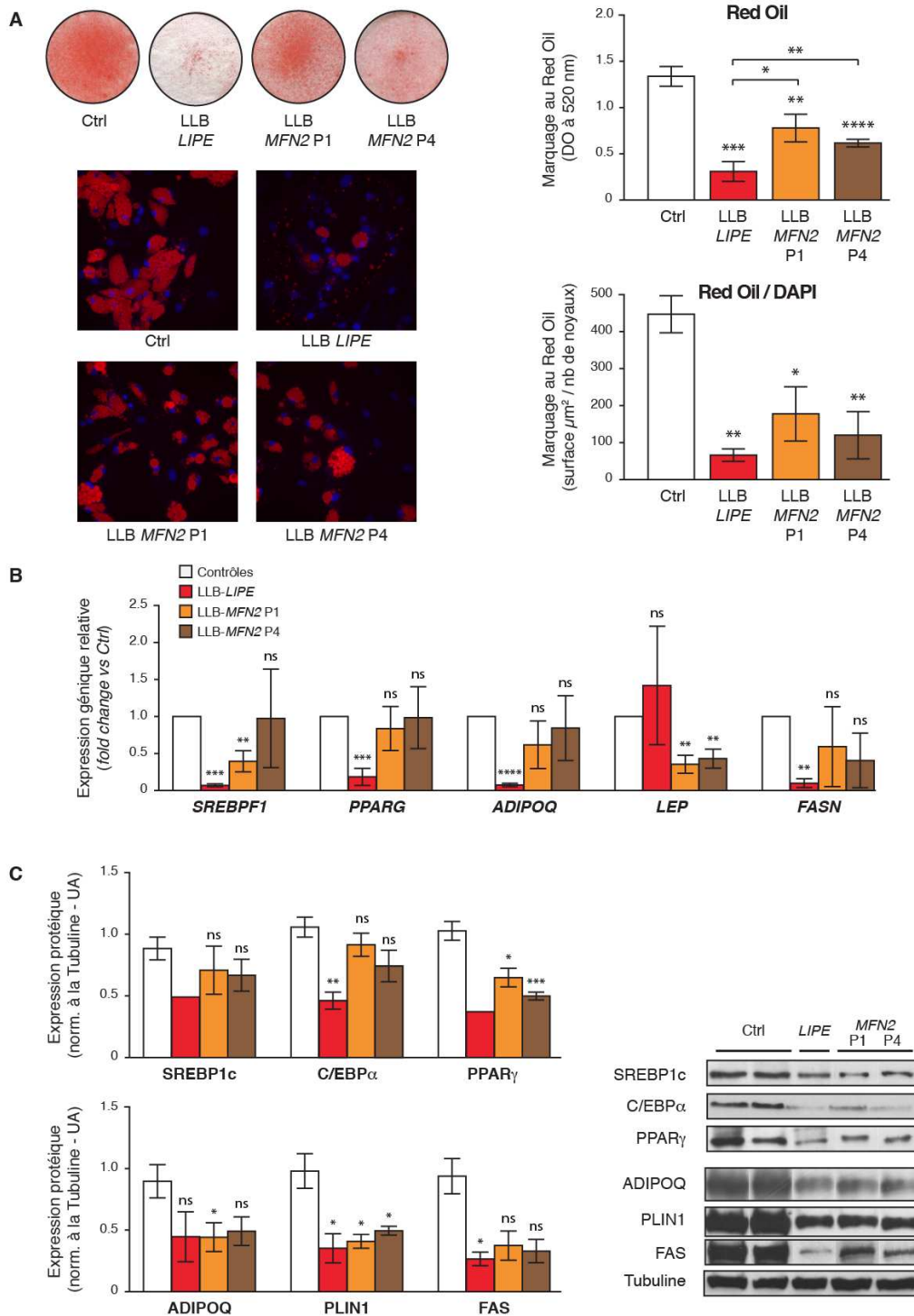
À J14 de différenciation adipocytaire blanche, la coloration au *Red Oil* des GL des ASC issues des patientes LLB-*LIPE* et *-MFN2* est significativement diminuée par rapport à celles des ASC contrôles. Ceci montre que les mutations *MFN2* p.Arg707Trp et *LIPE* p.Glu943Glyfs\*22

altèrent la capacité des adipocytes à stocker les lipides intracellulaires au cours de la différenciation, et ceci de façon plus marquée chez ces dernières (figure 35A). On note néanmoins une hétérogénéité du marquage au *Red Oil* dans les cellules issues de patients.

Après 14 jours de différenciation des ASC LLB-*LIPE*, l'expression des transcrits et/ou des protéines des marqueurs d'adipogenèse SREBP1c, PPAR $\gamma$  et C/EBP $\alpha$  est significativement diminuée. Plusieurs marqueurs de l'adipocyte mature, dont l'adiponectine, (ADIPOQ), la périlipine-1 (PLIN1), et la synthèse des acides gras (*FASN/FAS*), sont significativement réprimés (figure 35B et C).

Concernant les ASC LLB-*MFN2*, seuls les marqueurs protéiques PLIN1 et PPAR $\gamma$  sont significativement diminués dans les cellules des deux patientes. Ainsi, l'expression protéique de PPAR $\gamma$  est diminuée d'au moins 50% dans les ASC issues des patientes LLB-*LIPE* et LLB-*MFN2* par rapport aux contrôles. Les protéines d'adipocyte mature telles la périlipine-1 (PLIN1) et la FAS sont diminuées d'au moins 60% dans les ASC LLB en comparaison aux ASC contrôles (figure 35B et C). Ces résultats sont en accord avec le défaut d'adipogenèse observé par la coloration au *Red Oil* (figure 35A). Concernant la leptine (LEP), seules les ASC issues des patientes LLB-*MFN2* présentent un défaut d'expression génique par rapport aux ASC contrôles (figure 35B). Ces résultats sont en accord avec la leptinémie basse chez les deux patientes LLB-*MFN2* mais normale chez la patiente LLB-*LIPE*.

D'autres expériences en cours permettront d'augmenter la puissance statistique de ces résultats.



**Figure 35 : Effets des variants géniques de LLB-*LIPE* et -*MFN2* sur la différenciation adipocytaire blanche des ASC à J14 post-induction**

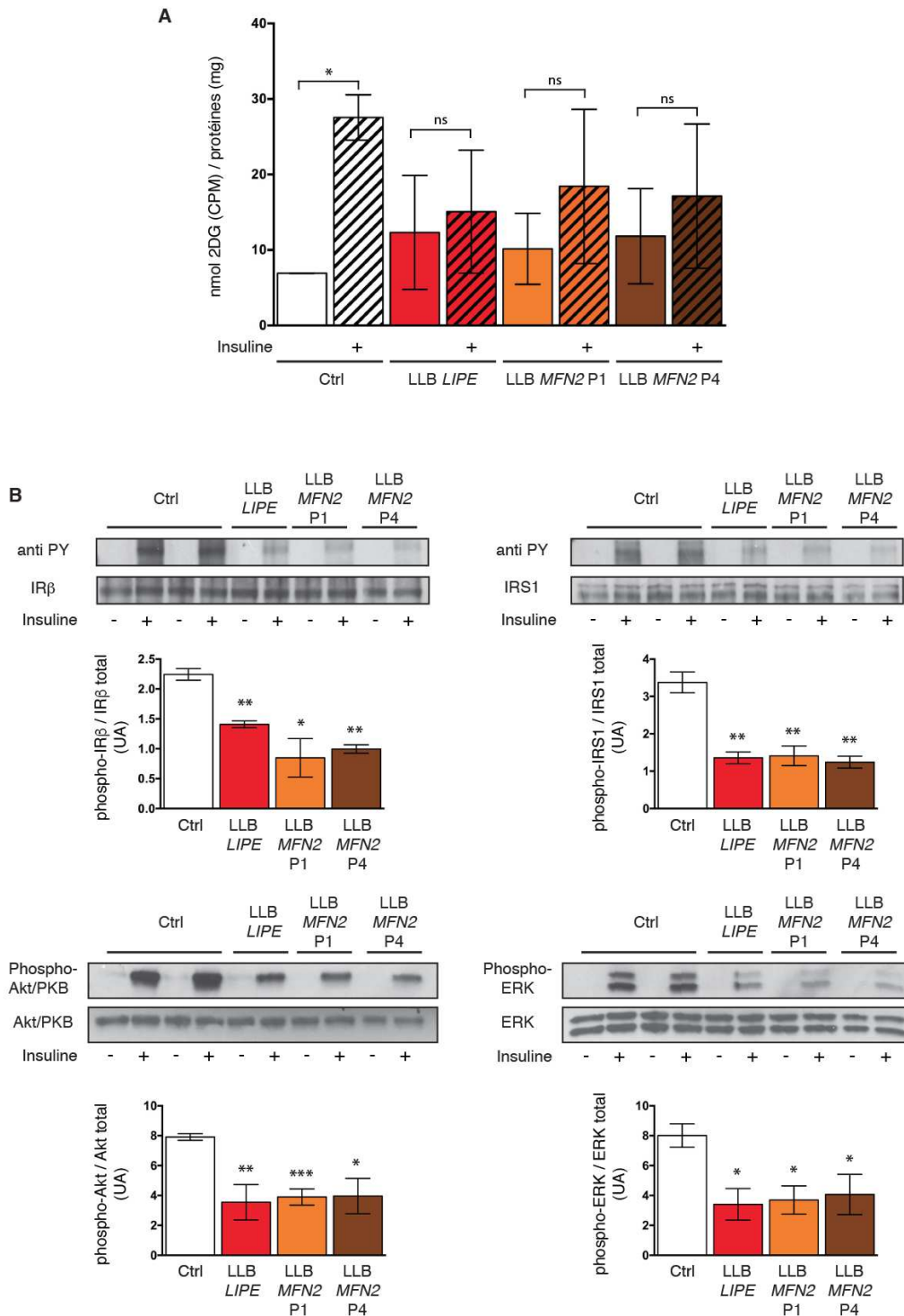
Les ASC ont été différenciées en adipocytes blancs selon le protocole décrit dans les méthodes. La différenciation adipocytaire a été évaluée par la coloration au Red Oil par densitométrie optique et en fluorescence. (A) Photos représentatives et quantifications du Red Oil. ( $n=3$  à 6) (B) Expression génique relative des marqueurs mesurée par RT-qPCR (normalisation à *HPRT*,  $n=2$  à 4). (C) Immunoblots représentatifs et quantification de l'expression protéique de marqueurs adipocytaires et de la tubuline (témoin de charge) de lysats protéiques totaux ( $n=1$  à 3). Les résultats sont représentés comme la moyenne des expériences  $\pm$  SEM. \*  $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , \*\*\*\* $P<0.0001$  en comparaison avec les ASC contrôles ( $n=2$  à 3 par expérience). *ADIPOQ* : adiponectine, *PLIN* : périlipine-1, *FAS* : fatty acid synthase, *Ctrl* : contrôles, *UA* : unité arbitraire, *ns* : non significatif.

### ***Diminution de la sensibilité à l'insuline dans les ASC porteuses des variants LLB-MFN2 et -LIPE***

Nous avons évalué la capacité des ASC à J14 de différenciation adipocytaire blanche à activer les intermédiaires de signalisation sous l'effet de l'insuline. En réponse à la liaison de l'insuline à son récepteur, celui-ci est phosphorylé sur des résidus tyrosine spécifiques, ce qui lève l'inhibition de son activité tyrosine kinase. Le récepteur de l'insuline phosphoryle alors des protéines de signalisation, en particulier celles de la famille des *insulin receptor substrate* (IRS), qui servent ensuite de signaux à d'autres protéines impliquées dans les deux principales voies de signalisation de l'insuline.

La voie PI3K - PKB/Akt est responsable de la plupart des actions métaboliques de l'insuline. La voie MAPK *via* ERK régule l'expression de certains gènes et coopère avec la voie PI3K pour la croissance et la différenciation cellulaire (figure 7). L'insuline stimule l'entrée du glucose dans l'adipocyte *via* le transporteur du glucose GLUT 4 et sa transformation en glycérol-3-phosphate, ce qui permettra l'estérification des acides gras et leur stockage sous forme de TG (figure 8).

L'insuline stimule significativement l'entrée de glucose radiomarqué dans les cellules ASC contrôles ce qui n'est pas le cas dans les ASC des patientes LLB porteuses des variants *LIPE* et *MFN2* (figure 36A). L'effet de l'insuline sur la phosphorylation d'IR $\beta$ , IRS1, Akt/PKB et ERK est significativement diminué dans les ASC issues des patientes LLB-*LIPE* et LLB-*MFN2* en comparaison aux contrôles (figure 36B). Les ASC LLB-*LIPE* et -*MFN2* présentent donc un défaut de la signalisation qui atteint à la fois la voie mitogénique et la voie métabolique stimulées par l'insuline. Le défaut d'adipogenèse de ces cellules est donc associé à une insulino-résistance.



**Figure 36 : Effets des variants géniques de LLB-LIPE et -MFN2 sur la signalisation insulinique des ASC à J14 post-induction**

Les ASC ont été différenciées en adipocytes blancs selon le protocole décrit dans les méthodes. (A) Les cellules déprivées en SVF et en glucose ont été stimulées par de l'insuline (100 nmol/L) pendant 20 min puis du glucose radiomarqué a été ajouté pendant 8 min. Le transport du glucose a été évalué par la quantité de radioactivité intracellulaire rapportée au contenu protéique ( $n=2$ ). Comparaison statistique des résultats obtenus en condition stimulée vs basale dans les ASC contrôles (Ctrl) ou issues des patients comme indiqué : \*  $P<0.05$ , ns : non significatif. (B) Les cellules déprivées en SVF ont été stimulées avec de l'insuline (100 nmol/L) pendant 8 min. La phosphorylation du récepteur à l'insuline (IR $\beta$ ), de son substrat (IRS1), a été évaluée par le marquage anti-PhosphoTyr (PY) et celle de la protéine kinase B (Akt/PKB) et de la MAPK ERK (extracellular-regulated kinase) par des anticorps spécifiques (Western blot sur lysat cellulaire total) ( $n=3$  à 4). Les résultats sont représentés comme la moyenne des

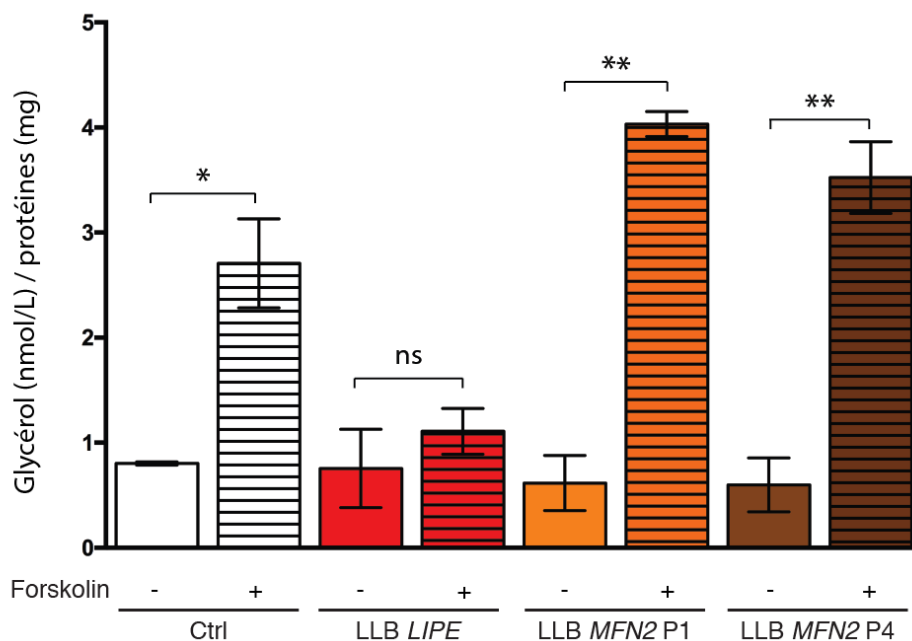


expériences  $\pm$  SEM. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  en comparaison avec les ASC contrôles ( $n=2$ ). Ctrl : contrôles, UA : unité arbitraire.

### **Altération de la fonction lipolytique dans les ASC porteuses des variants LLB-LIPE**

Au cours de la lipolyse adipocytaire, les TG stockés dans la GL sont hydrolysés en acides gras et glycérol. Pour évaluer l'intensité de la lipolyse adipocytaire dans les ASC, nous avons mesuré la quantité de glycérol cellulaire libéré dans le milieu de culture.

Après 14 jours de différenciation adipocytaire blanche, la quantité de glycérol dans le milieu de culture des ASC LLB-LIPE et -MFN2 à l'état basal n'est pas différente des ASC contrôles. Nous avons ensuite stimulé les ASC avec de la forskoline, qui est un agent lipolytique activant l'adénylate cyclase et augmentant ainsi le taux d'AMPc intracellulaire, ce qui active la LHS par phosphorylation (*via* la protéine kinase A) (figure 9). Après 4 h de stimulation par la forskoline, les ASC contrôles secrètent 3 fois plus de glycérol qu'à l'état basal. En réponse à la forskoline, la quantité de glycérol libéré dans le milieu de culture des ASC LLB-LIPE, n'est pas significativement augmentée par rapport à la condition basale. Les ASC issues de la patiente LLB-LIPE présentent donc une fonction lipolytique altérée. Ce résultat montre que le défaut d'expression de la LHS dans les ASC porteuses du génotype p.Glu943Glyfs\*22 de LIPE se traduit comme attendu par une lipolyse inefficace. Cet effet n'est pas retrouvé dans les ASC LLB-MFN2, qui activent correctement leur lipolyse dans les mêmes conditions (figure 37).



**Figure 37 : Effets des variants pathogènes de LIPE et MFN2 sur la fonction lipolytique des ASC à J14 post-induction de la différenciation adipocytaire blanche**

Les ASC ont été différenciées en adipocytes blancs selon le protocole décrit dans les méthodes. Les cellules déprivées en SVF ont été stimulées par de la forskoline (10  $\mu$ mol/L) pendant 4 h. La lipolyse a

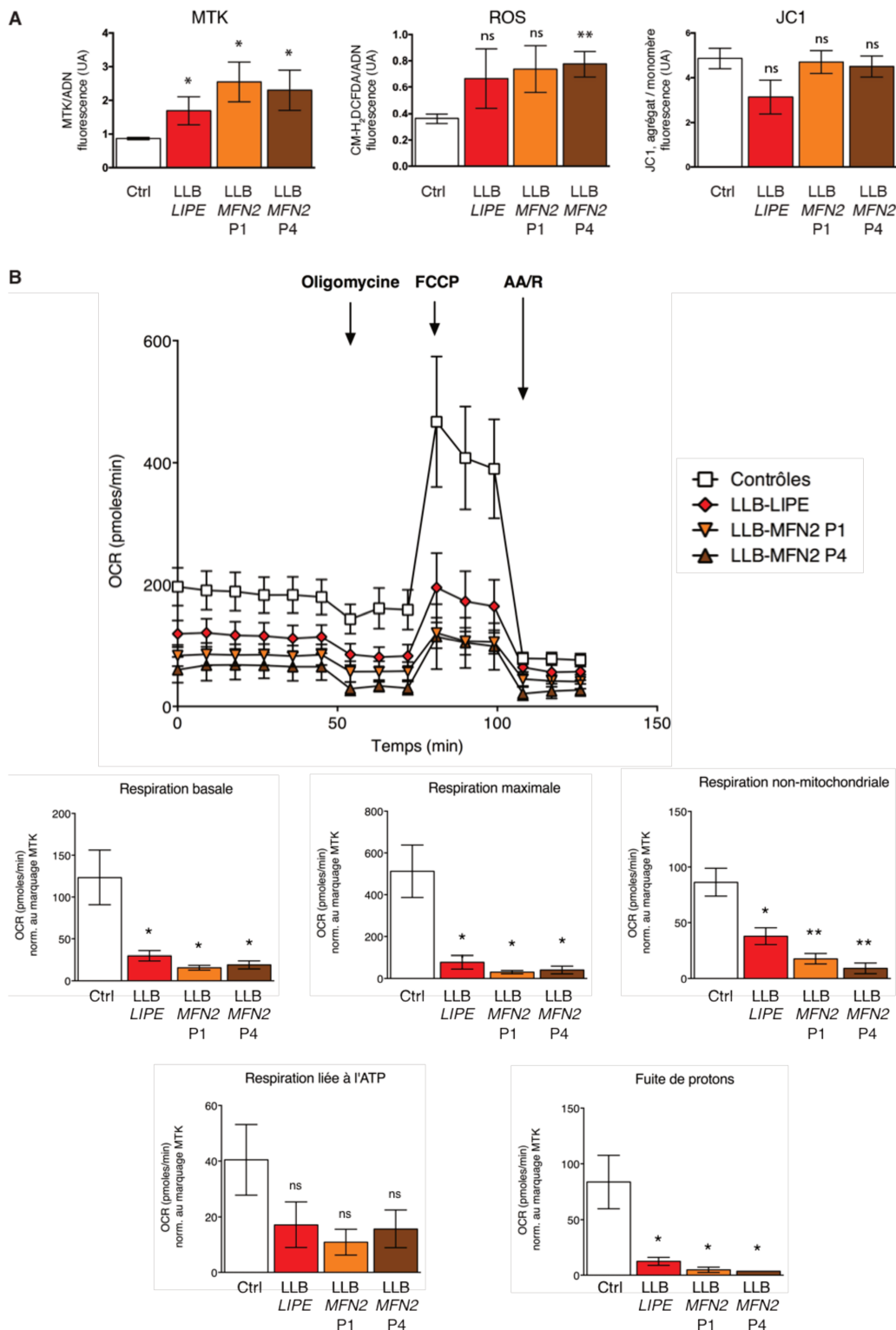
été évaluée par la quantité de glycérol secrété rapportée au contenu protéique. Les résultats représentent la moyenne des expériences  $\pm$  SEM. Comparaison statistique des résultats obtenus en condition stimulée vs basale dans les ASC contrôles (Ctrl) ou issues des patients comme indiqué : \*  $P < 0.05$  (n=2), \*\*  $P < 0.01$  (n=2 ou 3), ns : non significatif.

### ***Dysfonctions mitochondriales dans les ASC porteuses des variants LLB-LIPE et MFN2***

Dans les ASC à 14 jours de différenciation, la masse mitochondriale mesurée par la sonde fluorescente *mitotracker* est significativement augmentée dans les ASC issues de patients par rapport aux ASC contrôles (figure 38A panel de gauche). Nous observons une tendance à l'augmentation du stress oxydant (ROS) dans les ASC LLB-LIPE et -MFN2 par rapport aux ASC contrôles (figure 38A panel du milieu). Le potentiel de membrane mitochondrial, mesuré par le rapport d'agrégats de JC-1 sur les monomères de JC-1 est similaire dans les ASC contrôles ou issues de patients à J14 de la différenciation adipocytaire (figure 38A panel de droite).

Après 14 jours de différenciation adipocytaire blanche *in vitro*, la respiration mitochondriale des ASC des patientes LLB et contrôles a été évaluée sur le *Seahorse* par le test *MitoStress*. Suite à l'ajout séquentiel des inhibiteurs du complexe V, I & III de la chaîne respiratoire mitochondriale (oligomycine, roténone et antimycine A - R/AA respectivement) et d'un agent découplant (FCCP), la consommation d'oxygène (OCR) par les cellules est mesurée. Globalement les ASC LLB-LIPE et -MFN2 ont une consommation d'oxygène diminuée comparativement aux ASC contrôles (figure 38B panel du haut). Les valeurs d'OCR ont été rapportées à la masse mitochondriale mesurée par le *mitotracker*. La mesure d'OCR suite à l'ajout de AA/R permet d'évaluer la respiration non mitochondriale. La différence entre les valeurs moyennes d'OCR à l'état basal et liée à la respiration non mitochondriale permet de calculer la respiration basale. Ces paramètres sont diminués très significativement dans les ASC issues des patientes LLB-LIPE, et LLB-MFN2 de façon plus marquée. La respiration maximale correspond à la différence entre la valeur moyenne d'OCR après ajout de FCCP et liée à la respiration non mitochondriale. Ce paramètre est significativement diminué dans les ASC porteuses du variant LIPE et plus fortement du variant MFN2. La fuite de protons est calculée par la différence des valeurs d'OCR entre le taux suite à l'ajout d'oligomycine et d'AA/R. Nous observons une diminution importante de ce paramètre dans les ASC LLB-LIPE et -MFN2 en comparaison aux ASC contrôles (figure 38B panel du bas).

L'ensemble de ces données suggèrent que les ASC soumises à la différenciation adipocytaire blanche porteuses des variants *LIPE* et *MFN2* présentent des dysfonctions mitochondriales avec un phénotype plus marqué pour ces dernières. Ces données sont en accord avec l'analyse en microscopie électronique du tissu lipomateux des patientes LLB-*MFN2*, ainsi que la mesure de la masse mitochondriale évaluée par le *mitotracker*, en faveur d'une augmentation du nombre et/ou de la taille des mitochondries dans les cellules porteuses des mutations responsables de LLB.



**Figure 38 : Effets des variants géniques de LLB-LIPE et -MFN2 sur les fonctions mitochondriales des ASC**

Les ASC ont été différenciées en adipocytes blancs selon le protocole décrit dans les méthodes. (A) À J14 post-induction la masse mitochondriale a été estimée par la sonde fluorescente rouge mitotracker (MTK) et la production de ROS a été mesurée par l'oxydation du CM-H<sub>2</sub>DCFDA, un dérivé du H<sub>2</sub>DCFDA. Les résultats ont été normalisés au contenu en ADN. Le potentiel de membrane mitochondrial a été évalué par le rapport de JC1 (colorant fluorescent) agrégat/monomère (n=2 à 6). (B) Un test MitoStress a été réalisé à J14 post-induction. La consommation d'oxygène (OCR) est enregistrée à l'état basal puis suite à l'ajout séquentiel d'oligomycine, de FCCP et d'antimycine A/ roténone (AA/R). La respiration liée à l'ATP a été calculée par la différence des valeurs

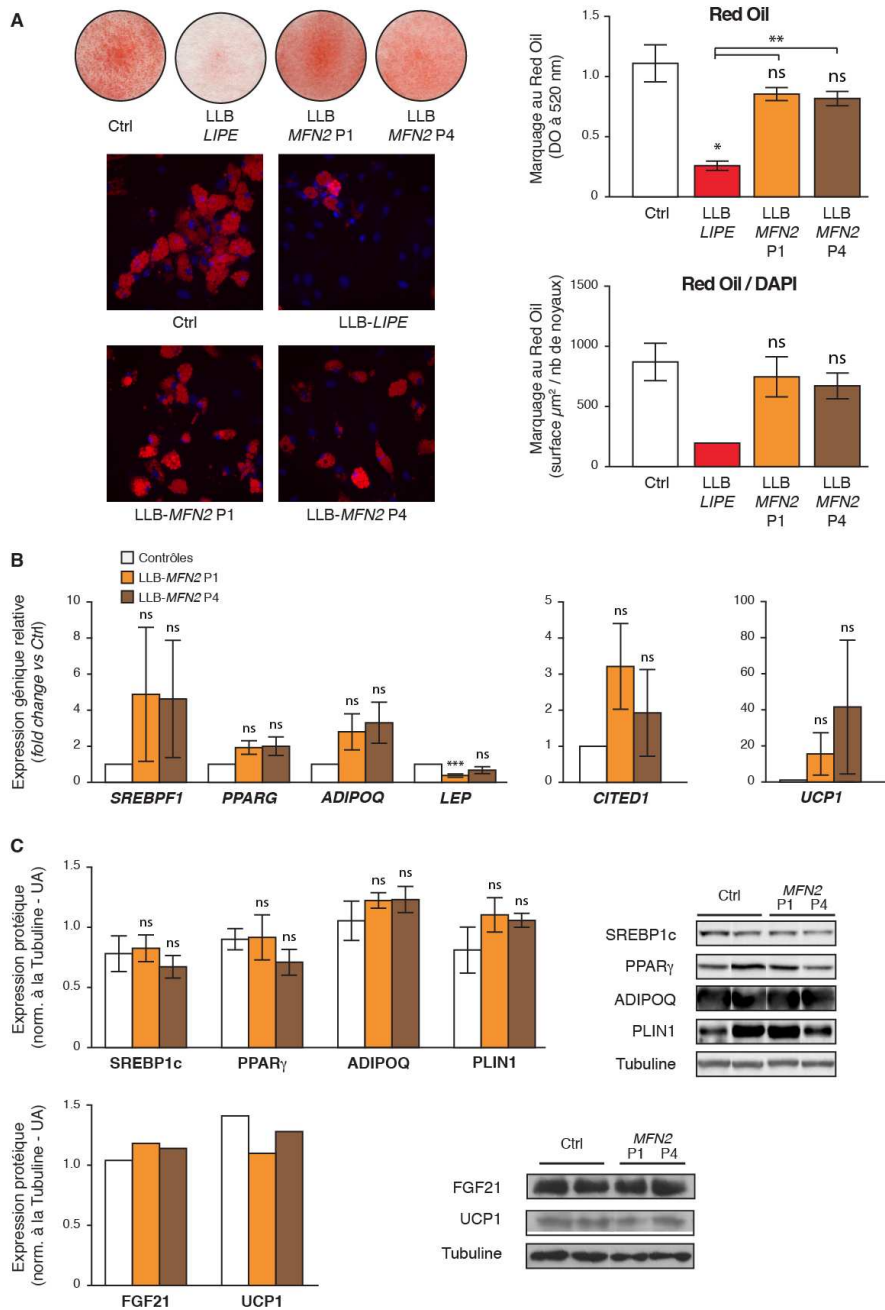
*d'OCR entre le taux basal et suite à l'ajout d'oligomycine. La fuite de protons a été calculée par la différence des valeurs d'OCR entre le taux suite à l'ajout d'oligomycine et d'AA/R. Les résultats ont été normalisés à la masse mitochondriale (MTK) (n=2 à 4). Les résultats sont représentés comme la moyenne des expériences ± SEM. \* P<0.05, \*\*P<0.01 en comparaison avec les ASC contrôles (n=2). Ctrl : contrôles, UA : unité arbitraire, ns : non significatif.*

### **3. Impact des variants de LLB-MFN2 et -LIPE sur la différenciation adipocytaire beige des ASC *in vitro***

Les ASC issues des patientes LLB-MFN2, soumises à la différenciation adipocytaire beige, ont une quantité de lipides intracellulaires comparable aux ASC contrôles. En revanche, dans les mêmes conditions, la coloration au *Red Oil* des GL des ASC issues de la patiente LLB-LIPE est significativement diminuée par rapport aux ASC contrôles (figure 39A).

Dans les ASC LLB-MFN2, après différenciation adipocytaire beige, l'expression génique et protéique des marqueurs de différenciation et de maturation adipocytaire tels SREBP1c, PPAR $\gamma$ , adiponectine (ADIPOQ) et périlipine-1 (PLIN1) n'est pas significativement différente de celle des cellules contrôles (figure 39B et C). L'expression génique de la leptine est néanmoins diminuée de 30 à 50% dans les ASC issues des patientes P4 et P1 respectivement, par rapport aux contrôles. Des études complémentaires sont en cours pour conclure quant à l'augmentation ou non de l'expression des marqueurs thermogéniques (UCP1, CITED1) dans les ASC des patients LLB-MFN2 en comparaison aux contrôles.

L'ensemble de ces résultats montrent que le protocole de différenciation adipocytaire beige que nous avons mis au point est efficace. Ces données montrent également clairement que les ASC LLB-MFN2 soumises à une différenciation adipocytaire beige sont capable de se différencier, ce qui ne semble pas être le cas des ASC LLB-LIPE, d'après les résultats de la coloration au *Red Oil*. Les études géniques et protéiques complémentaires permettront de préciser ces données.



**Figure 39 : Effets des variants pathogènes de *LIPE* et de *MFN2* sur la différenciation adipocytaire beige des ASC à J14 post-induction**

Les ASC ont été différenciées en adipocytes beiges selon le protocole décrit dans les méthodes. La différenciation adipocytaire a été évaluée par la coloration au Red Oil par densitométrie optique et en fluorescence. (A) Photos représentatives et quantifications du marquage par le Red Oil ( $n=2$  à 5). ns : non significatif et \* :  $P<0.05$  en comparaison avec les ASC contrôles ( $n=2$ ). Le marquage au Red Oil est significativement différent dans les ASC LLB-LIPE comparées aux ASC LLB-MFN2 (\*\*  $p<0.01$ ) (B) Expression génique relative des marqueurs adipocytaires blancs SREBP1, PPARG, ADIPOQ & LEP et des marqueurs beiges CITED1 & UCP1 mesurée par RT-qPCR (normalisation à HPRT,  $n=2$  à 3) et \*\*\* $P<0.001$  en comparaison avec les ASC contrôles. (C) Immunoblots représentatifs et quantification de l'expression protéique de marqueurs adipocytaires blancs SREBP1c, PPAR $\gamma$ , ADIPOQ & PLIN1, des marqueurs beiges FGF21 & UCP1 et de la tubuline (témoin de charge) de lysats protéiques totaux ( $n=1$  à 3). Les résultats représentent la moyenne des expériences  $\pm$  SEM. Deux ASC contrôles ont été utilisés dans chaque expérience. ADIPOQ : adiponectine, LEP : leptine, PLIN1 : périlipine-1, Ctrl : contrôles, UA : unité arbitraire, ns : non significatif.

## D. Conclusion

La lipomatose de Launois-Bensaude est une pathologie rare et singulière puisqu'il s'agit d'un syndrome lipodystrophique caractérisé à la fois par la présence de TA pseudo-lipomateux, prédominant dans la partie supérieure du corps, et par une lipoatrophie touchant le TA non lipomateux. En cas d'exérèse chirurgicale, il est possible d'isoler les cellules souches adipocytaires adultes des pseudo-lipomes. Ces ASC pourraient représenter un outil performant pour l'étude de la physiopathologie de la maladie du variant d'intérêt compte tenu de leur capacité d'auto-renouvellement et de différenciation en plusieurs lignages dont les adipocytes.

Au cours de cette étude j'ai mis au point un protocole de différenciation adipocytaire beige efficace avec l'expression de marqueurs beiges/bruns comme CITED1, PGC1 $\alpha$ , FGF21 et UCP1.

Les principales similitudes phénotypiques des ASC (en **bleu**) et divergences (en **rouge** pour *LIPE* et **orange** pour *MFN2*) conférées par les variants des gènes *LIPE* ou *MFN2* responsables de la lipomatose de Launois-Bensaude sont reprises dans le tableau ci-dessous.

<i>Génotype</i>	<b>p.Glu943Glyfs*22 de <i>LIPE</i></b>	<b>p.Arg707Trp de <i>MFN2</i></b>
<i>Protéine pathogénique</i>	<b>défaut</b> d'expression de LHS expression <b>normale</b> de MFN2	expression <b>normale</b> de LHS expression <b>normale</b> de MFN2
<i>Différenciation adipocytaire blanche des ASC</i>	<b>défaut</b> de <b>différenciation</b> adipocytaire blanche avec <b>défaut</b> de <b>signalisation</b> par l'insuline (voies mitogénique et métabolique) <b>dysfonctions mitochondriales</b> ( $\uparrow$ masse et $\downarrow$ respiration mitochondriales) plus marquées dans les ASC LLB- <i>MFN2</i>	
	<b>altération</b> de la lipolyse adipocytaire	lipolyse <b>fonctionnelle</b>
<i>Différenciation adipocytaire beige des ASC</i>	<b>défaut</b> de différenciation adipocytaire beige (coloration au <i>Red Oil</i> )	<b>capacité</b> à se différencier avec l'expression de marqueurs beiges

**Tableau 5 : Synthèse des caractéristiques phénotypiques *in vitro* des ASC des patientes étudiées atteintes de lipomatose de Launois-Bensaude**



Le génotype p.Glu943Glyfs\*22 de *LIPE* entraîne une expression quasi nulle de la lipase hormono-sensible dans les adipocytes *in vitro*, comme c'est également le cas dans le tissu lipomateux.

Les ASC soumises à la différenciation adipocytaire blanche, issues des patientes porteuses du génotype p.Glu943Glyfs\*22 de *LIPE* et du génotype p.Arg707Trp de *MFN2* montrent un défaut de différenciation. Au niveau cellulaire, le défaut d'adipogenèse s'accompagne d'une diminution de la sensibilité à l'insuline, et de dysfonctions mitochondriales prédominant dans les cellules porteuses du variant pathogène de *MFN2*. Seul le génotype p.Glu943Glyfs\*22 de *LIPE* entraîne une altération de la fonction lipolytique adipocytaire.

Les ASC de la patiente *LIPE* soumises à la différenciation adipocytaire beige se distinguent de celles des deux patientes *MFN2*. En effet, seules les ASC LLB-*LIPE* présentent un défaut de différenciation adipocytaire beige. Ces résultats doivent être complétés par des études au niveau génique et protéique.

Le génotype p.Arg707Trp de *MFN2* n'altère pas la différenciation beige/brune des adipocytes. En accord, nous avons observé dans le tissu lipomateux des patientes *MFN2* P1 et P4, des adipocytes multiloculaires et une surexpression marquée des marqueurs adipocytaires beiges CITED et FGF21, en faveur d'un phénotype adipeux beige partiel à l'état basal (Capel *et al.*, 2018).

Les cellules souches adipocytaires adultes ou ASC présentes dans le TA constituent donc un bon modèle cellulaire pour l'étude de la physiopathologie de la lipomatose de Launois-Bensaude *in vitro*.

# Discussion générale / Perspectives

---

Les travaux que j'ai pu mener au cours de ma thèse s'inscrivent dans une des thématiques du laboratoire qui vise à identifier et comprendre les mécanismes physiopathologiques en jeu dans les lipodystrophies génétiques. Ces travaux de recherche sont le reflet d'une recherche translationnelle allant de la clinique aux tests cellulaires *in vitro* avec le modèle des ASC, en passant par l'étude des tissus et de la différenciation et des fonctions adipocytaires des ASC isolés des pseudo-lipomes des patients.

Les syndromes lipodystrophiques génétiques constituent un groupe hétérogène de maladies rares, caractérisées par un défaut généralisé ou partiel du TA, plus ou moins associé à une hypertrophie de ce TA dans d'autres dépôts. Ces anomalies de répartition du TA sont à l'origine des complications métaboliques comme l'insulino-résistance, le diabète, l'hypertriglycéridémie et la stéatose hépatique.

## ***Elargissement du spectre des syndromes lipodystrophiques***

La lipomatose de Launois-Bensaude due aux variants pathogènes de *MFN2* constitue un nouveau sous-type de lipodystrophie partielle. En effet, nous avons mis en évidence qu'en plus de leurs masses lipomateuses, les patients présentent la plupart des symptômes cliniques associés aux lipodystrophies partielles familiales (Vatier *et al.*, 2019, Guillin-Amarelle *et al.*, 2018, Akinci *et al.*, 2017). En effet, les onze patients homozygotes décrits à ce jour (Capel *et al.*, 2018, Rocha *et al.*, 2017 et Sawyer *et al.*, 2015) ont tous une lipoatrophie des extrémités des membres, des troubles métaboliques tels la résistance à l'insuline, une adiponectinémie basse, une hypertriglycéridémie ainsi qu'une stéatose hépatique révélant le stockage ectopique des graisses. Les patients ont une redistribution du TA dans la partie haute du corps caractérisée par la présence, parfois discrète, ou, le plus souvent, cliniquement évidente, de pseudo-lipomes à la racine des membres, au niveau cervical (bosse de bison), sus-claviculaire et au niveau du tronc. La présence d'une leptinémie basse malgré la présence des masses lipomateuses, est en faveur d'une atteinte généralisée du TA, non pas limitée aux zones lipomateuses.

Cette atteinte adipocytaire est caractérisée dans notre étude par un défaut de différenciation adipocytaire blanche observé en qPCR et/ou Western-blot dans les homogénats des pseudo-lipomes et dans les ASC isolées des lipomes. Nous avons montré une diminution de

l'expression génique et protéique des facteurs adipogéniques précoces tels SREBP-1c, PPAR $\gamma$  et C/EBP $\alpha$  ainsi que des marqueurs tardifs *FASN*, *PLIN1*, *ADIPOQ* et *LEP*. On note néanmoins une hétérogénéité du marquage des lipides au *Red Oil* dans les ASC issues des patients. Ce résultat peut être corrélé à l'hétérogénéité de taille des adipocytes des lipomes observée en histologie. En accord avec l'insulino-résistance clinique, les ASC issues des patientes ont une altération du transport du glucose et des voies métabolique et mitogénique stimulées par l'insuline. Le variant pathogène de *MFN2* entraîne donc un retentissement adipocytaire majeur qui rappelle celui que l'on observe dans les syndromes lipodystrophiques d'autres origines génétiques. Les autres formes monogéniques de lipodystrophies affectent en effet la formation et/ou la structure de la GL et conduisent à une diminution profonde de la capacité adipocytaire à stocker l'excédent énergétique sous forme de triglycérides et à sécréter l'adiponectine et la leptine (Sollier *et al.*, in press, Vigouroux *et al.*, 2018, Salle-Teyssieres *et al.*, 2016, Gandotra *et al.*, 2011b, Gandotra *et al.*, 2011a).

L'équipe d'Albert et coll. a identifié et décrit pour la première fois un variant du gène *LIPF* associé au développement d'un syndrome métabolique dans une famille (Albert *et al.*, 2014). L'étude des déterminants génétiques de l'hypertriglycéridémie des 2 738 sujets de la cohorte Amish (ACDRP) a été le point de départ de leur étude. Par ce point d'entrée, ils ont trouvé une femme (cas index) homozygote pour le variant p.Val767Glyfs\*102, ce génotype ayant également été identifié chez trois autres membres de la fratrie (deux femmes et un homme). Ce génotype était associé à la présence de troubles métaboliques associé à l'insulino-résistance. Cette étude ne fait néanmoins aucunement référence à la présence de lipomes chez ces patients.

Pour autant, dans notre étude nous avons mis en évidence un nouveau variant de *LIPF* associé à un phénotype de lipomatose de Launois-Bensaude. Notre patiente présente de nombreux symptômes similaires à ceux de la lipomatose de Launois-Bensaude liée à *MFN2* que nous venions de rapporter, à savoir, d'une part des masses pseudo-lipomateuses de la partie supérieure du corps, et d'autre part des troubles métaboliques (insulino-résistance, hypertriglycéridémie, stéatose hépatique), avec une adiponectinémie basse et un taux de FGF21 sérique très augmenté (Capel *et al.*, 2018). En dehors de l'étude initiale d'Albert, des variants pathogènes du gène de la lipase hormono-sensible ont été décrits dans deux autres familles avec des anomalies de distribution corporelle du TA et des troubles métaboliques (Zolotov *et al.*, 2017, Carboni *et al.*, 2014, Farhan *et al.*, 2014), ce qui a justifié de décrire ce syndrome comme une forme de FPLD (FPLD6, Brown *et al.*, 2016). Ceci souligne les difficultés du diagnostic

clinique différentiel entre FPLD et syndrome de Launois-Bensaude. La différence entre masses lipomateuses non encapsulées et zones d'accumulation de masse grasse est en effet d'interprétation clinique délicate.

Certaines caractéristiques cliniques permettent de distinguer les patients LLB-*MFN2* et LLB-*LIPE*. Les patients porteurs du variant p.Arg707Trp de *MFN2* développent une neuropathie périphérique en lien avec l'atteinte mitochondriale. Le phénotype neurologique peut être au premier plan de la présentation clinique chez certains patients, comme nous l'avons décrit. Chez la patiente atteinte de LLB-*LIPE* l'examen neurologique n'a rien révélé de particulier. Une attention toute particulière doit être portée par les cliniciens pour poser le bon diagnostic en confrontant les examens cliniques, biologiques et génétiques.

### ***Amélioration de la connaissance des bases moléculaires et cellulaires du syndrome LLB***

Sur le plan moléculaire, le variant p.Arg707Trp de *MFN2* à l'état homozygote ou hétérozygote composite (Rocha *et al.*, 2017, Carr *et al.*, 2015) est responsable d'une lipomatose associée à une neuropathie. Or les autres variants pathogènes de *MFN2* décrits à ce jour, qu'ils soient monoalléliques ou bi-alléliques, sont uniquement responsables d'une neuropathie, sans phénotype lipomateux associé. Le variant p.Arg707Trp de *MFN2* a donc probablement une spécificité particulière. Il se situe dans le domaine HR2 de *MFN2* (figure 21) qui est directement impliqué dans le processus de fusion et permet le rapprochement et la fusion des MME de deux mitochondries à proximité. Nos résultats montrent une expression conservée de la protéine *MFN2*, aussi bien dans les homogénats de tissu lipomateux que dans les adipocytes différenciés issus d'ASC. Ce variant faux-sens conduit au changement d'une arginine, un acide aminé basique chargé négativement, en tryptophane, neutre électriquement, apolaire et hydrophobe. L'arginine crée des liaisons électrovalentes avec des acides aminés chargés négativement (comme l'acide aspartique ou glutamique) qui contribuent à la structure tertiaire et quaternaire de la protéine. Le tryptophane, quant à lui, est un acide aminé aromatique qui est capable d'interagir avec d'autres acides aminés hydrophobes comme la leucine, l'isoleucine, la phénylalanine. Ce changement dans la séquence protéique primaire de la mitofusine 2 induit certainement un changement de la structure tertiaire et/ou quaternaire de *MFN2* qui modifie la fonctionnalité de la protéine. Bien que le processus de fusion soit théoriquement altéré, nous observons en microscopie électronique dans les adipocytes du tissu lipomateux, des mitochondries plus volumineuses et plus nombreuses. Ceci est à mettre en relation avec l'augmentation de la biogenèse mitochondriale observée dans les tissus lipomateux des patients (expression de PGC1 $\alpha$  augmentée) qui pourrait être interprété comme un mécanisme de

compensation pour la cellule, lui permettant de maintenir un niveau de production d'ATP suffisant. La mitofusine 2 est également un acteur important de la mitophagie, du fait des interactions qu'elle favorise entre le RE et les mitochondries. Si MFN2 n'est plus fonctionnelle, il est possible de penser qu'*in fine* la dégradation des mitochondries est perturbée et donc qu'elles soient plus nombreuses. Dans la littérature, il n'y a que peu d'études fonctionnelles de MFN2 et/ou MFN1 (protéines spécifiques des Mammifères). La structure quaternaire complète de MFN2 n'est pas totalement élucidée. En 2004, Koshiba et coll. ont montré que le domaine HR2 de MFN1 était directement impliqué dans le processus de fusion *via* des complexes protéiques qui agissent en trans (Koshiba *et al.*, 2004). Par ailleurs, MFN2 existerait sous deux conformations dynamiques. D'une part un état non permissif, défini par une interaction intramoléculaire antiparallèle des domaines HR1 et HR2, empêcherait l'interaction avec son partenaire situé sur la membrane mitochondriale externe opposée. D'autre part, suite à la déstabilisation de l'interaction HR1-HR2, le domaine HR2 peut interagir avec le domaine HR2 d'une mitofusine opposée. (Franco *et al.*, 2016). L'arginine en position 707 pourrait avoir un rôle important dans l'une ou plusieurs des interactions initiées par les domaines HR2.

A l'état hétérozygote, le variant p.Arg707Trp n'a pas été impliqué dans l'apparition de signe clinique d'ordre métabolique mais pourrait donner un CMT à bas bruit (Sawyer *et al.*, 2015). Par contre, exception faite de p.Arg707Trp, quel que soit le variant de *MFN2* incriminé, il est à lui seul suffisant pour induire un phénotype de CMT2A.

Le spectre des variants de *LIPE* associée à une lipodystrophie et/ou lipomatose est plus varié que celui de *MFN2*. Les trois variants homozygotes décrits dans la littérature, ainsi que celui que nous décrivons dans ce travail, conduisent à une protéine LHS aberrante. LHS est tronquée de presque la moitié de sa séquence dans le cas p.Ala507fsTer563 (Farhan *et al.*, 2014), ou raccourcie de quelques dizaines ou centaine d'acides aminés pour les variants p.Val767Glyfs\*102 (Albert *et al.*, 2014), p.Glu1035\* (Zolotov *et al.*, 2017) et p.Glu943Glyfs\*22 (notre étude). Ces variants altèrent le domaine catalytique ou le module régulateur de la protéine (figure 27). L'équipe d'Albert et coll. a montré un défaut d'expression et une altération marquée de la fonction lipolytique de la protéine LHS dans le tissu lipomateux des patients. Nous trouvons des résultats identiques avec une expression indétectable de LHS et une lipolyse inefficace en réponse à la forskoline (agent lipolytique) dans les tissus et les ASC isolées de la patiente porteuse du variant p.Glu943Glyfs\*22. Ces deux variants entraînent donc probablement une perte de fonction du fait de l'absence de la protéine dans les adipocytes.

### ***Développement d'un modèle cellulaire d'étude des syndromes lipodystrophiques***

Dans la littérature, les ASC sont utilisées dans un nombre croissant d'études. Elles sont capables de se différencier dans différents lignages cellulaires et représentent un modèle physiologique d'intérêt. Ces cellules sont des modèles cellulaires pour entre autres, la différenciation ostéogénique (Bereziat *et al.*, 2019), chondrogénique (Yang *et al.*, 2018), hépatique (Davoodian *et al.*, 2017), endothéliale (Shi *et al.*, 2014), myogénique (Seo *et al.*, 2018), neuronale par transdifférenciation des ASC vers le lignage ectodermique (Lo Furno *et al.*, 2018) mais aussi adipogénique (Liu *et al.*, 2018). Au cours de mon travail de thèse j'ai pu étudier la différenciation adipocytaire des ASC des patientes en comparaison à des contrôles. Les études publiées précédemment ont été menées sur des homogénats de TA de patients et/ou des fibroblastes porteurs des variants p.Arg707Trp de *MFN2*. C'est donc la première fois que l'impact des variants de *MFN2* et de la LHS a pu être évalué dans ce type de modèle. Les ASC permettent d'étudier les conséquences fonctionnelles des mutations de *MFN2* et *LIPE* au cours du processus de différenciation adipocytaire. L'expression génique et protéique des facteurs clés de la différenciation adipocytaire blanche et de marqueurs d'adipocyte mature révèle un défaut de différenciation associé à une insulino-résistance. Malgré la compensation du nombre de mitochondries évalué par le *mitotracker*, la respiration mitochondriale (par mesure du taux d'oxygène dans le milieu cellulaire) diminue considérablement dans les ASC différenciées LLB-*MFN2* et LLB-*LIPE*. Ce défaut de respiration mitochondriale pourrait aussi être en partie expliqué par le défaut de différenciation adipocytaire des ASC en lui-même, les rendant peu ou pas fonctionnelles.

De façon intéressante au niveau cellulaire, le tissu lipomateux des patientes LLB-*MFN2* exprime les marqueurs beiges *CITED1* et *FGF21*. Bien que le *FGF21* soit essentiellement d'origine hépatique, les analyses immuno-histochimiques des lipomes de deux patientes montrent un marquage à proximité des vaisseaux mais aussi au sein même des adipocytes. Les adipocytes des zones lipomateuses pourraient participer à l'augmentation majeure du taux de *FGF21* dans le sérum. Ce taux élevé de *FGF21* circulant, par son rôle cardio-métabolique protecteur, pourrait expliquer le phénotype métabolique modéré en comparaison des autres causes génétiques de lipodystrophie. Compte tenu de l'expression de ces marqueurs beiges, et de la localisation des lipomes dans des territoires anatomiques pouvant héberger le TA brun chez l'Homme, nous avons émis l'hypothèse que les adipocytes de ces pseudo-lipomes pourraient provenir de précurseurs beiges. Afin de vérifier cette hypothèse, j'ai mis au point un protocole de différenciation adipocytaire beige à partir d'ASC. Après 14 jours de différenciation *in vitro*, l'expression génique des marqueurs beiges *CITED1*, *UCPI* et

*PPARGCIA* est significativement augmentée dans les ASC témoins. Les résultats préliminaires concernant les ASC soumises à la différenciation adipocytaire beige montrent une réponse différente entre les ASC LLB-*MFN2* et LLB-*LIPE*, objectivée lors du marquage au *Red Oil*. Dans les ASC porteuses du variant p.Arg707Trp, on note une expression protéique et génique des marqueurs adipocytaires blancs et beiges/bruns comparable aux ASC contrôles. Ces résultats nécessitent d'être reproduits et précisés par des expériences complémentaires notamment dans les ASC LLB-*LIPE*. De plus, on note que seules les ASC LLB-*MFN2* ont une expression génique de la leptine diminuée en accord avec la leptinémie basse mesurée chez ces patientes. Dans le cas du variant p.Arg707Trp de *MFN2*, ce protocole de différenciation beige permettrait de récapituler *in vitro* le phénotype adipocytaire observé *in vivo*.

En somme, les ASC LLB-*MFN2* soumises à une différenciation adipocytaire beige sont capables de se différencier *in vitro* alors qu'elles présentent un défaut d'adipogenèse lorsqu'elles sont soumises à une différenciation adipocytaire blanche. Cette dichotomie pourrait expliquer que la lipoatrophie sous-cutanée (défaut de différenciation blanche) co-existe avec une hypertrophie de masses lipomateuses (de phénotype beige). Les ASC représentent probablement un modèle cellulaire pertinent pour l'étude physiopathologique des formes monogéniques de syndromes lipodystrophiques. Nous suggérons par cette étude une hypothèse physiopathologique nouvelle pour la lipodystrophie associée aux variants du gène *MFN2*, qui pourrait provenir d'une altération de la balance de différenciation adipocytaire blanche/beige.

### ***Limites de l'étude et perspectives***

Néanmoins, ces résultats moléculaires proviennent de la caractérisation des tissus et cellules issus de deux patientes LLB-*MFN2* et d'une seule patiente LLB-*LIPE*, ce qui représente l'une des principales limites à notre étude. Il sera nécessaire de valider ces données chez d'autres patients si c'est possible puisqu'il s'agit de maladies rares où il est parfois difficile d'avoir accès au TA.

De plus, les ASC proviennent des pseudo-lipomes et ne sont peut-être pas le reflet des adipocytes du TA sous-cutané. En effet, comme discuté plus haut, ils sont localisés dans des territoires bruns/beiges. Compte tenu des différences régionales (Karpe et Pinnick, 2015) et des origines embryonnaires différentes (Sebo et Rodeheffer, 2019) des dépôts de TA, il se pourrait que le tissu lipomateux chez les patients LLB-*MFN2* provienne de précurseurs beiges. Il pourrait en être de même pour le variant pathogène de *LIPE*.



Pour compléter nos analyses, l'utilisation de la technologie d'édition de gène CRISPR-Cas9 (*CRISPR associated protein 9*) ou TALEN (*transcription activator-like effector nuclease*) dans les ASC porteuses des variants pathogènes permettrait d'étudier la possibilité de réversion de l'altération de différenciation adipocytaire blanche dans des cellules par ailleurs isogéniques. En cas de réversion, il serait intéressant de comparer les ASC mutées *versus* corrigées par des analyses de transcriptomique par *RNAseq*, l'analyse du protéome et/ou un *adipokine array* afin d'identifier les voies cellulaires de signalisation et/ou métaboliques impactées par les variants de MFN2 et de la LHS. Ces études permettraient d'avancer dans les mécanismes physiopathologiques impliqués.

Par ailleurs, on observe une infiltration macrophagique et une fibrose dans les tissus adipeux lipomateux de la patiente LLB-*LIPE*, non retrouvée chez les patientes LLB-*MFN2*. Un remodelage de la MEC pourrait participer à la mise en place de la maladie comme montré dans la littérature dans d'autres lipodystrophies (Le Dour *et al.*, 2017, Bereziat *et al.*, 2011, Gandotra *et al.*, 2011a). L'inflammation du TA joue aussi un rôle important dans la physiopathologie de plusieurs formes de lipodystrophies. Ainsi la lipodystrophie peut s'intégrer dans un tableau de maladie systémique auto-inflammatoire d'origine génétique (variants homozygotes dans le gène *PSMB8* par exemple, Agarwal *et al.*, 2010 et Kitamura *et al.*, 2011). Dans les formes dites « acquises » de lipodystrophies, d'origine auto-immune ou associée aux antirétroviraux du VIH, mais aussi dans les formes génétiques liées aux variants du gène *LMNA*, on peut retrouver une inflammation du tissu adipeux avec des structures en forme de couronnes caractérisés par une infiltration de macrophages autour des adipocytes en apoptose (Araujo-Vilar *et al.*, 2012, Savage *et al.*, 2009, Lagathu *et al.*, 2007). Il serait important d'explorer cette composante inflammatoire dans les homogénats de TA mais aussi dans les ASC. Une culture d'ASC de la patiente *LIPE* en présence de milieux conditionnés de lignées macrophagiques humaines (tel THP-1 ou U937) ou une co-culture entre ces deux lignées cellulaires pourraient montrer s'il y a une influence des cellules inflammatoires dans la pathologie.

Les patients LLB-*MFN2* ont une leptinémie effondrée. Compte tenu des résultats bénéfiques obtenus chez d'autres patients lipodystrophiques, un traitement par la leptine recombinante humaine (metreleptine) pourrait être une solution thérapeutique à envisager chez ces patients afin d'améliorer leur confort de vie et d'atténuer les troubles métaboliques associés (Vatier *et al.*, 2016).

Au plan clinique, cette étude permet de mettre en lumière la difficulté d'associer un phénotype clinique à un phénotype moléculaire dans le domaine des lipodystrophies. Il est peut-être nécessaire de redéfinir le groupe hétérogène des lipodystrophies génétiques à la lumière des mécanismes physiopathologiques démontrés ou présumés.

Dans ce contexte, les lipodystrophies génétiques n'ont jusqu'alors pas impliqué de protéine mitochondriale dans leur physiopathologie. Or *MFN2* code pour une protéine mitochondriale. Une étude publiée en 2017 met en cause le gène *SLC25A24* codant pour un transporteur de phosphate mitochondrial dans un syndrome progéroïde avec lipoatrophie (Writzl *et al.*, 2017). Au laboratoire, dans le cadre de lipodystrophies d'origine génétique, nous venons d'identifier d'autres gènes candidats codant des protéines exprimées dans la mitochondrie. Le rôle majeur de la mitochondrie dans le processus de différenciation et/ou de fonctions adipocytaires est probablement un champ physiopathologique nouveau à explorer.

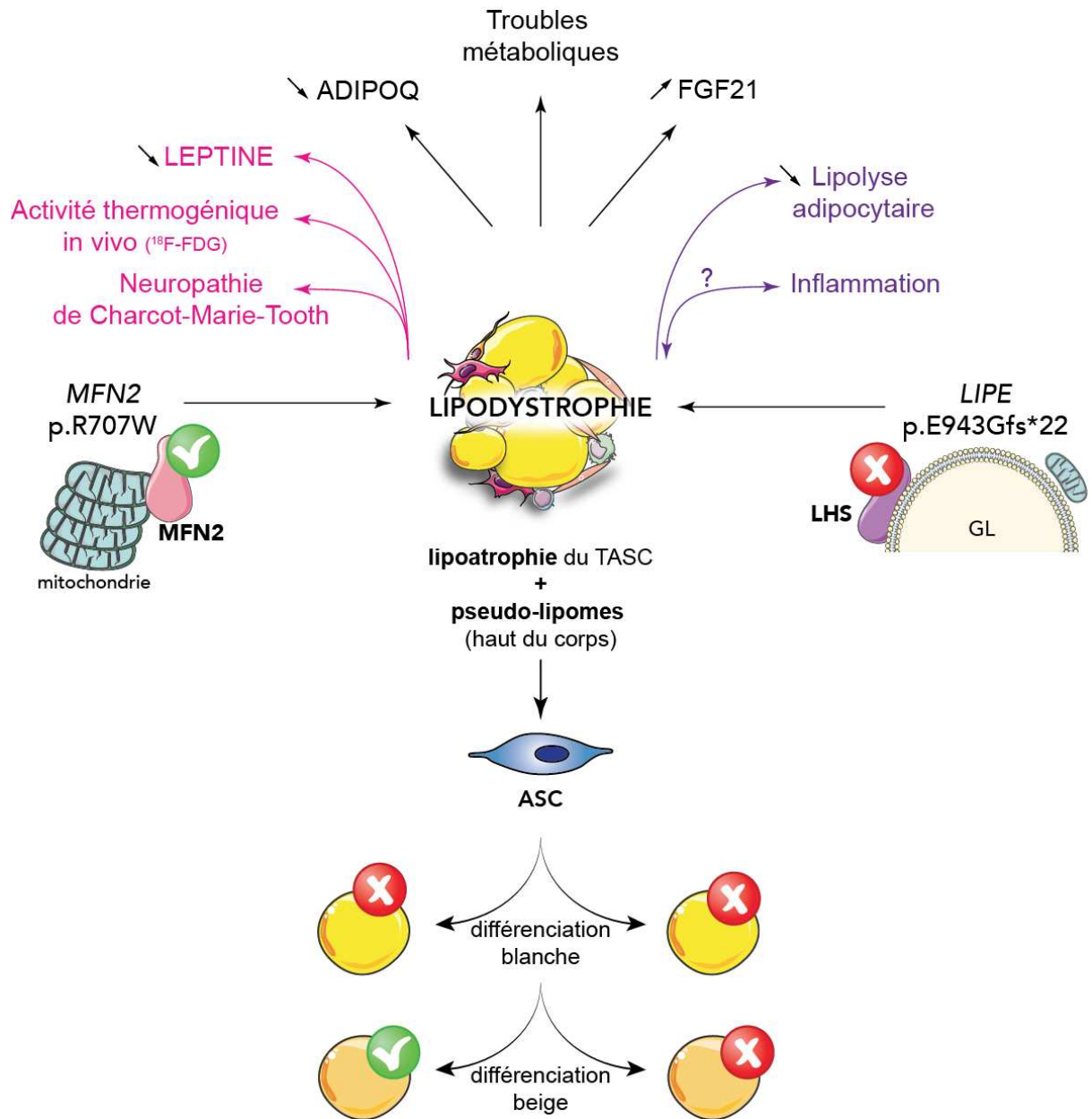


Figure 40 : Retentissement adipocytaire des variants pathogènes de *MFN2* p.Arg707Trp et de *LIPE* p.Glu943Glyfs\*22.

## Références bibliographiques

---

Afonso P, Auclair M, Caron-Debarle M, Capeau J (2017) Impact of CCR5, integrase and protease inhibitors on human endothelial cell function, stress, inflammation and senescence. *Antivir Ther.* **22**:645-57.

Agarwal AK, Arioglu E, De Almeida S, Akkoc N, Taylor SI, Bowcock AM, *et al.* (2002) AGPAT2 is mutated in congenital generalized lipodystrophy linked to chromosome 9q34. *Nat Genet.* **31**:21-3.

Agarwal AK, Simha V, Oral EA, Moran SA, Gorden P, O'Rahilly S, *et al.* (2003) Phenotypic and genetic heterogeneity in congenital generalized lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab.* **88**:4840-7.

Agarwal AK, Xing C, DeMartino GN, Mizrachi D, Hernandez MD, Sousa AB, *et al.* (2010) PSMB8 encoding the beta5i proteasome subunit is mutated in joint contractures, muscle atrophy, microcytic anemia, and panniculitis-induced lipodystrophy syndrome. *Am J Hum Genet.* **87**:866-72.

Aguilar-Salinas CA, Garcia EG, Robles L, Riano D, Ruiz-Gomez DG, Garcia-Ulloa AC, *et al.* (2008) High adiponectin concentrations are associated with the metabolically healthy obese phenotype. *J Clin Endocrinol Metab.* **93**:4075-9.

Akinci B, Meral R, Oral EA (2018) Phenotypic and Genetic Characteristics of Lipodystrophy: Pathophysiology, Metabolic Abnormalities, and Comorbidities. *Curr Diab Rep.* **18**:143.

Akinci B, Onay H, Demir T, Savas-Erdeve S, Gen R, Simsir IY, *et al.* (2017) Clinical presentations, metabolic abnormalities and end-organ complications in patients with familial partial lipodystrophy. *Metabolism.* **72**:109-19.

Albert JS, Yerges-Armstrong LM, Horenstein RB, Pollin TI, Sreenivasan UT, Chai S, *et al.* (2014) Null mutation in hormone-sensitive lipase gene and risk of type 2 diabetes. *N Engl J Med.* **370**:2307-15.

Alexander CM, Kasza I, Yen CL, Reeder SB, Hernando D, Gallo RL, *et al.* (2015) Dermal white adipose tissue: a new component of the thermogenic response. *J Lipid Res.* **56**:2061-9.

Alligier M, Gabert L, Meugnier E, Lambert-Porcheron S, Chanseume E, Pilleul F, *et al.* (2013) Visceral fat accumulation during lipid overfeeding is related to subcutaneous adipose tissue characteristics in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab.* **98**:802-10.

Antuna-Puente B, Boutet E, Vigouroux C, Lascols O, Slama L, Caron-Debarle M, *et al.* (2010) Higher adiponectin levels in patients with Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy due to seipin as compared with 1-acylglycerol-3-phosphate-o-acyltransferase-2 deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* **95**:1463-8.

Araujo-Vilar D, Victoria B, Gonzalez-Mendez B, Barreiro F, Fernandez-Rodriguez B, Cereijo R, *et al.* (2012) Histological and molecular features of lipomatous and nonlipomatous adipose

tissue in familial partial lipodystrophy caused by LMNA mutations. *Clin Endocrinol (Oxf)*. **76**:816-24.

Arch JR (2002) beta(3)-Adrenoceptor agonists: potential, pitfalls and progress. *Eur J Pharmacol*. **440**:99-107.

Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, *et al.* (1999) Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun*. **257**:79-83.

Arner P (2001) Regional differences in protein production by human adipose tissue. *Biochem Soc Trans*. **29**:72-5.

Auclair M, Afonso P, Capel E, Caron-Debarle M, Capeau J (2014) Impact of darunavir, atazanavir and lopinavir boosted with ritonavir on cultured human endothelial cells: beneficial effect of pravastatin. *Antivir Ther*. **19**:773-82.

Auclair M, Vigouroux C, Boccara F, Capel E, Vigerat C, Guerci B, *et al.* (2013) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma mutations responsible for lipodystrophy with severe hypertension activate the cellular renin-angiotensin system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **33**:829-38.

Bach D, Naon D, Pich S, Soriano FX, Vega N, Rieusset J, *et al.* (2005) Expression of Mfn2, the Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A gene, in human skeletal muscle: effects of type 2 diabetes, obesity, weight loss, and the regulatory role of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6. *Diabetes*. **54**:2685-93.

Ballard FJ, Hanson RW, Leveille GA (1967) Phosphoenolpyruvate carboxykinase and the synthesis of glyceride-glycerol from pyruvate in adipose tissue. *J Biol Chem*. **242**:2746-50.

Bartelt A, Heeren J (2014) Adipose tissue browning and metabolic health. *Nat Rev Endocrinol*. **10**:24-36.

Bartz R, Li WH, Venables B, Zehmer JK, Roth MR, Welte R, *et al.* (2007) Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic. *J Lipid Res*. **48**:837-47.

Beale EG, Antoine B, Forest C (2003) Glyceroneogenesis in adipocytes: another textbook case. *Trends Biochem Sci*. **28**:402-3.

Beigneux AP, Davies BS, Gin P, Weinstein MM, Farber E, Qiao X, *et al.* (2007) Glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 plays a critical role in the lipolytic processing of chylomicrons. *Cell Metab*. **5**:279-91.

Benabou E, Salame Z, Wendum D, Lequoy M, Tahraoui S, Merabtene F, *et al.* (2019) Insulin receptor isoform A favors tumor progression in human hepatocellular carcinoma by increasing stem/progenitor cell features. *Cancer Lett*. **450**:155-68.

Bereziat V, Cervera P, Le Dour C, Verpont MC, Dumont S, Vantyghem MC, *et al.* (2011) LMNA mutations induce a non-inflammatory fibrosis and a brown fat-like dystrophy of enlarged cervical adipose tissue. *Am J Pathol*. **179**:2443-53.

- Bereziat V, Mazurier C, Auclair M, Ferrand N, Jolly S, Marie T, *et al.* (2019) Systemic Dysfunction of Osteoblast Differentiation in Adipose-Derived Stem Cells from Patients with Multiple Myeloma. *Cells*. **8**.
- Bernard-Marissal N, van Hameren G, Juneja M, Pellegrino C, Louhivuori L, Bartesaghi L, *et al.* (2019) Altered interplay between endoplasmic reticulum and mitochondria in Charcot-Marie-Tooth type 2A neuropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **116**:2328-37.
- Berner HS, Lyngstadaas SP, Spahr A, Monjo M, Thommesen L, Drevon CA, *et al.* (2004) Adiponectin and its receptors are expressed in bone-forming cells. *Bone*. **35**:842-9.
- Betz MJ, Enerback S (2018) Targeting thermogenesis in brown fat and muscle to treat obesity and metabolic disease. *Nat Rev Endocrinol*. **14**:77-87.
- Bidault G, Garcia M, Vantyghem MC, Ducluzeau PH, Morichon R, Thiyagarajah K, *et al.* (2013) Lipodystrophy-linked LMNA p.R482W mutation induces clinical early atherosclerosis and in vitro endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **33**:2162-71.
- Billon N, Dani C (2012) Developmental origins of the adipocyte lineage: new insights from genetics and genomics studies. *Stem Cell Rev Rep*. **8**:55-66.
- Billon N, Iannarelli P, Monteiro MC, Glavieux-Pardanaud C, Richardson WD, Kessar N, *et al.* (2007) The generation of adipocytes by the neural crest. *Development*. **134**:2283-92.
- Bluher M (2005) Transgenic animal models for the study of adipose tissue biology. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. **19**:605-23.
- Bornstein SR, Abu-Asab M, Glasow A, Path G, Hauner H, Tsokos M, *et al.* (2000) Immunohistochemical and ultrastructural localization of leptin and leptin receptor in human white adipose tissue and differentiating human adipose cells in primary culture. *Diabetes*. **49**:532-8.
- Bouloumie A, Lolmede K, Sengenès C, Galitzky J, Lafontan M (2002) Angiogenesis in adipose tissue. *Ann Endocrinol (Paris)*. **63**:91-5.
- Braathén GJ (2012) Genetic epidemiology of Charcot-Marie-Tooth disease. *Acta Neurol Scand Suppl*.iv-22.
- Brasaemle DL, Dolios G, Shapiro L, Wang R (2004) Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*. **279**:46835-42.
- Brodie B (1846) Lectures illustrative of various subjects in pathology and surgery. *London, Longman*.
- Brown MS, Goldstein JL (1997) The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*. **89**:331-40.
- Brown RJ, Araujo-Vilar D, Cheung PT, Dunger D, Garg A, Jack M, *et al.* (2016) The Diagnosis and Management of Lipodystrophy Syndromes: A Multi-Society Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. **101**:4500-11.

- Brun RP, Tontonoz P, Forman BM, Ellis R, Chen J, Evans RM, *et al.* (1996) Differential activation of adipogenesis by multiple PPAR isoforms. *Genes Dev.* **10**:974-84.
- Bryant NJ, Govers R, James DE (2002) Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **3**:267-77.
- Buechler C, Krautbauer S, Eisinger K (2015) Adipose tissue fibrosis. *World J Diabetes.* **6**:548-53.
- Burl RB, Ramseyer VD, Rondini EA, Pique-Regi R, Lee YH, Granneman JG (2018) Deconstructing Adipogenesis Induced by beta3-Adrenergic Receptor Activation with Single-Cell Expression Profiling. *Cell Metab.* **28**:300-9 e4.
- Camino JE, Nogueiras R, Gaytan F, Pineda R, Gonzalez CR, Barreiro ML, *et al.* (2008) Novel expression and direct effects of adiponectin in the rat testis. *Endocrinology.* **149**:3390-402.
- Cannon B, Nedergaard J (2004) Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* **84**:277-359.
- Cao H, Hegele RA (2000) Nuclear lamin A/C R482Q mutation in canadian kindreds with Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Hum Mol Genet.* **9**:109-12.
- Cao Y (2007) Angiogenesis modulates adipogenesis and obesity. *J Clin Invest.* **117**:2362-8.
- Capel E, Auclair M, Caron-Debarle M, Capeau J (2012) Effects of ritonavir-boosted darunavir, atazanavir and lopinavir on adipose functions and insulin sensitivity in murine and human adipocytes. *Antivir Ther.* **17**:549-56.
- Capel E, Vazier C, Cervera P, Stojkovic T, Disse E, Cottureau AS, *et al.* (2018) MFN2-associated lipomatosis: Clinical spectrum and impact on adipose tissue. *J Clin Lipidol.* **12**:1420-35.
- Carboni N, Brancati F, Cocco E, Solla E, D'Apice MR, Mateddu A, *et al.* (2014) Partial lipodystrophy associated with muscular dystrophy of unknown genetic origin. *Muscle Nerve.* **49**:928-30.
- Carey AL, Vorlander C, Reddy-Luthmoodoo M, Natoli AK, Formosa MF, Bertovic DA, *et al.* (2014) Reduced UCP-1 content in in vitro differentiated beige/brite adipocytes derived from preadipocytes of human subcutaneous white adipose tissues in obesity. *PLoS One.* **9**:e91997.
- Carobbio S, Guenantin AC, Samuelson I, Bahri M, Vidal-Puig A (2019) Brown and beige fat: From molecules to physiology and pathophysiology. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* **1864**:37-50.
- Carr AS, Polke JM, Wilson J, Pelayo-Negro AL, Laura M, Nanji T, *et al.* (2015) MFN2 deletion of exons 7 and 8: founder mutation in the UK population. *J Peripher Nerv Syst.* **20**:67-71.
- Carriere A, Jeanson Y, Cousin B, Arnaud E, Casteilla L (2013) [Recruitment and activation of brown and/or BRITE adipocytes : potential therapeutic against metabolic diseases]. *Med Sci (Paris).* **29**:729-35.

- Caspar-Bauguil S, Cousin B, Galinier A, Segafredo C, Nibbelink M, Andre M, *et al.* (2005) Adipose tissues as an ancestral immune organ: site-specific change in obesity. *FEBS Lett.* **579**:3487-92.
- Cawthorn WP, Scheller EL, MacDougald OA (2012) Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: going back to the future. *J Lipid Res.* **53**:227-46.
- Chartoumpakis DV, Habeos IG, Ziros PG, Psyrogiannis AI, Kyriazopoulou VE, Papavassiliou AG (2011) Brown adipose tissue responds to cold and adrenergic stimulation by induction of FGF21. *Mol Med.* **17**:736-40.
- Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, *et al.* (1996) Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell.* **84**:491-5.
- Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC (2003) Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol.* **160**:189-200.
- Chen H, McCaffery JM, Chan DC (2007) Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell.* **130**:548-62.
- Chen YJ, Liu HY, Chang YT, Cheng YH, Mersmann HJ, Kuo WH, *et al.* (2016) Isolation and Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells from Porcine Subcutaneous Adipose Tissues. *J Vis Exp.* e53886.
- Chondronikola M, Volpi E, Borsheim E, Porter C, Annamalai P, Enerback S, *et al.* (2014) Brown adipose tissue improves whole-body glucose homeostasis and insulin sensitivity in humans. *Diabetes.* **63**:4089-99.
- Chong PS, Vucic S, Hedley-Whyte ET, Dreyer M, Cros D (2003) Multiple Symmetric Lipomatosis (Madelung's Disease) Caused by the MERRF (A8344G) Mutation: A Report of Two Cases and Review of the Literature. *J Clin Neuromuscul Dis.* **5**:1-7.
- Chouchani ET, Kazak L, Spiegelman BM (2019) New Advances in Adaptive Thermogenesis: UCP1 and Beyond. *Cell Metab.* **29**:27-37.
- Cinti S (2005) The adipose organ. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* **73**:9-15.
- Cinti S (2012) The adipose organ at a glance. *Dis Model Mech.* **5**:588-94.
- Cnop M, Havel PJ, Utzschneider KM, Carr DB, Sinha MK, Boyko EJ, *et al.* (2003) Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex. *Diabetologia.* **46**:459-69.
- Coin A, Enzi G, Bussolotto M, Ceschin E, Difito M, Angelini C (2000) Multiple symmetric lipomatosis: evidence for mitochondrial dysfunction. *J Clin Neuromuscul Dis.* **1**:124-30.
- Coskun T, Bina HA, Schneider MA, Dunbar JD, Hu CC, Chen Y, *et al.* (2008) Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. *Endocrinology.* **149**:6018-27.



- Cousin B, Cinti S, Morroni M, Raimbault S, Ricquier D, Penicaud L, *et al.* (1992) Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: molecular and morphological characterization. *J Cell Sci.* **103 ( Pt 4)**:931-42.
- Cristancho AG, Lazar MA (2011) Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **12**:722-34.
- Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, *et al.* (2009) Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med.* **360**:1509-17.
- Cypess AM, Weiner LS, Roberts-Toler C, Franquet Elia E, Kessler SH, Kahn PA, *et al.* (2015) Activation of human brown adipose tissue by a beta3-adrenergic receptor agonist. *Cell Metab.* **21**:33-8.
- Dalen KT, Schoonjans K, Ulven SM, Weedon-Fekjaer MS, Bentzen TG, Koutnikova H, *et al.* (2004) Adipose tissue expression of the lipid droplet-associating proteins S3-12 and perilipin is controlled by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Diabetes.* **53**:1243-52.
- Davoodian N, Lotfi AS, Soleimani M, Ghaneialvar H (2017) The combination of miR-122 overexpression and Let-7f silencing induces hepatic differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Cell Biol Int.* **41**:1083-92.
- de Azevedo Medeiros LB, Candido Dantas VK, Craveiro Sarmiento AS, Agnez-Lima LF, Meireles AL, Xavier Nobre TT, *et al.* (2017) High prevalence of Berardinelli-Seip Congenital Lipodystrophy in Rio Grande do Norte State, Northeast Brazil. *Diabetol Metab Syndr.* **9**:80.
- De Pauw A, Tejerina S, Raes M, Keijer J, Arnould T (2009) Mitochondrial (dys)function in adipocyte (de)differentiation and systemic metabolic alterations. *Am J Pathol.* **175**:927-39.
- Di Franco A, Guasti D, Squecco R, Mazzanti B, Rossi F, Idrizaj E, *et al.* (2016) Searching for Classical Brown Fat in Humans: Development of a Novel Human Fetal Brown Stem Cell Model. *Stem Cells.* **34**:1679-91.
- Diaz B, Fuentes-Mera L, Tovar A, Montiel T, Massieu L, Martinez-Rodriguez HG, *et al.* (2015) Saturated lipids decrease mitofusin 2 leading to endoplasmic reticulum stress activation and insulin resistance in hypothalamic cells. *Brain Res.* **1627**:80-9.
- Divoux A, Clement K (2011) Architecture and the extracellular matrix: the still unappreciated components of the adipose tissue. *Obes Rev.* **12**:e494-503.
- Dollet L, Magre J, Cariou B, Prieur X (2014) Function of seipin: new insights from Bsc12/seipin knockout mouse models. *Biochimie.* **96**:166-72.
- Drolet R, Richard C, Sniderman AD, Mailloux J, Fortier M, Huot C, *et al.* (2008) Hypertrophy and hyperplasia of abdominal adipose tissues in women. *Int J Obes (Lond).* **32**:283-91.
- Duran S, Saves M, Spire B, Cailleton V, Sobel A, Carrieri P, *et al.* (2001) Failure to maintain long-term adherence to highly active antiretroviral therapy: the role of lipodystrophy. *AIDS.* **15**:2441-4.

Eberle D, Hegarty B, Bossard P, Ferre P, Foufelle F (2004) SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie*. **86**:839-48.

Elsen M, Raschke S, Tennagels N, Schwahn U, Jelenik T, Roden M, *et al.* (2014) BMP4 and BMP7 induce the white-to-brown transition of primary human adipose stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. **306**:C431-40.

Emont MP, Kim DI, Wu J (2019) Development, activation, and therapeutic potential of thermogenic adipocytes. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. **1864**:13-9.

Enerback S, Jacobsson A, Simpson EM, Guerra C, Yamashita H, Harper ME, *et al.* (1997) Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature*. **387**:90-4.

Enzi G, Busetto L, Ceschin E, Coin A, Digito M, Pigozzo S (2002) Multiple symmetric lipomatosis: clinical aspects and outcome in a long-term longitudinal study. *Int J Obes Relat Metab Disord*. **26**:253-61.

Enzi G, Busetto L, Sergi G, Coin A, Inelmen EM, Vindigni V, *et al.* (2015) Multiple symmetric lipomatosis: a rare disease and its possible links to brown adipose tissue. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. **25**:347-53.

Escher P, Braissant O, Basu-Modak S, Michalik L, Wahli W, Desvergne B (2001) Rat PPARs: quantitative analysis in adult rat tissues and regulation in fasting and refeeding. *Endocrinology*. **142**:4195-202.

Esteve D, Boulet N, Volat F, Zakaroff-Girard A, Ledoux S, Coupaye M, *et al.* (2015) Human white and brite adipogenesis is supported by MSCA1 and is impaired by immune cells. *Stem Cells*. **33**:1277-91.

Fajas L, Schoonjans K, Gelman L, Kim JB, Najib J, Martin G, *et al.* (1999) Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism. *Mol Cell Biol*. **19**:5495-503.

Fang H, Judd RL (2018) Adiponectin Regulation and Function. *Compr Physiol*. **8**:1031-63.

Farhan SM, Robinson JF, McIntyre AD, Marrosu MG, Ticca AF, Loddo S, *et al.* (2014) A novel LIPE nonsense mutation found using exome sequencing in siblings with late-onset familial partial lipodystrophy. *Can J Cardiol*. **30**:1649-54.

Fayyad AM, Khan AA, Abdallah SH, Alomran SS, Bajou K, Khattak MNK (2019) Rosiglitazone Enhances Browning Adipocytes in Association with MAPK and PI3-K Pathways During the Differentiation of Telomerase-Transformed Mesenchymal Stromal Cells into Adipocytes. *Int J Mol Sci*. **20**.

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

Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, *et al.* (1998) Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*. **279**:1528-30.

Fève B, Bastard C, Fellahi S, Bastard JP, Capeau J (2016) New adipokines. *Ann Endocrinol (Paris)*. **77**:49-56.

Fiaschi T, Magherini F, Gamberi T, Modesti PA, Modesti A (2014) Adiponectin as a tissue regenerating hormone: more than a metabolic function. *Cell Mol Life Sci*. **71**:1917-25.

Filadi R, Greotti E, Turacchio G, Luini A, Pozzan T, Pizzo P (2015) Mitofusin 2 ablation increases endoplasmic reticulum-mitochondria coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **112**:E2174-81.

Filadi R, Pendin D, Pizzo P (2018) Mitofusin 2: from functions to disease. *Cell Death Dis*. **9**:330.

Fisher FM, Chui PC, Antonellis PJ, Bina HA, Kharitonov A, Flier JS, *et al.* (2010) Obesity is a fibroblast growth factor 21 (FGF21)-resistant state. *Diabetes*. **59**:2781-9.

Fisher FM, Kleiner S, Douris N, Fox EC, Mepani RJ, Verdeguer F, *et al.* (2012) FGF21 regulates PGC-1 $\alpha$  and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev*. **26**:271-81.

Fon Tacer K, Bookout AL, Ding X, Kurosu H, John GB, Wang L, *et al.* (2010) Research resource: Comprehensive expression atlas of the fibroblast growth factor system in adult mouse. *Mol Endocrinol*. **24**:2050-64.

Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MI, Lima FB (2007) Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *J Pediatr (Rio J)*. **83**:S192-203.

Forest C, Tordjman J, Glorian M, Duplus E, Chauvet G, Quette J, *et al.* (2003) Fatty acid recycling in adipocytes: a role for glyceroneogenesis and phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Biochem Soc Trans*. **31**:1125-9.

Franco A, Kitsis RN, Fleischer JA, Gavathiotis E, Kornfeld OS, Gong G, *et al.* (2016) Correcting mitochondrial fusion by manipulating mitofusin conformations. *Nature*. **540**:74-9.

Frayn KN, Karpe F, Fielding BA, Macdonald IA, Coppack SW (2003) Integrative physiology of human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord*. **27**:875-88.

Friedman J (2016) The long road to leptin. *J Clin Invest*. **126**:4727-34.

Frontini A, Cinti S (2010) Distribution and development of brown adipocytes in the murine and human adipose organ. *Cell Metab*. **11**:253-6.

Frontini A, Vitali A, Perugini J, Murano I, Romiti C, Ricquier D, *et al.* (2013) White-to-brown transdifferentiation of omental adipocytes in patients affected by pheochromocytoma. *Biochim Biophys Acta*. **1831**:950-9.

Gaich G, Chien JY, Fu H, Glass LC, Deeg MA, Holland WL, *et al.* (2013) The effects of LY2405319, an FGF21 analog, in obese human subjects with type 2 diabetes. *Cell Metab*. **18**:333-40.

Gandotra S, Le Dour C, Bottomley W, Cervera P, Giral P, Reznik Y, *et al.* (2011a) Perilipin deficiency and autosomal dominant partial lipodystrophy. *N Engl J Med.* **364**:740-8.

Gandotra S, Lim K, Girousse A, Saudek V, O'Rahilly S, Savage DB (2011b) Human frame shift mutations affecting the carboxyl terminus of perilipin increase lipolysis by failing to sequester the adipose triglyceride lipase (ATGL) coactivator AB-hydrolase-containing 5 (ABHD5). *J Biol Chem.* **286**:34998-5006.

Gao H, Volat F, Sandhow L, Galitzky J, Nguyen T, Esteve D, *et al.* (2017) CD36 Is a Marker of Human Adipocyte Progenitors with Pronounced Adipogenic and Triglyceride Accumulation Potential. *Stem Cells.* **35**:1799-814.

Garg A (2004) Acquired and inherited lipodystrophies. *N Engl J Med.* **350**:1220-34.

Geer EB, Shen W (2009) Gender differences in insulin resistance, body composition, and energy balance. *Gen Med.* **6 Suppl 1**:60-75.

Gegg ME, Cooper JM, Chau KY, Rojo M, Schapira AH, Taanman JW (2010) Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. *Hum Mol Genet.* **19**:4861-70.

Ghaben AL, Scherer PE (2019) Adipogenesis and metabolic health. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **20**:242-58.

Giorgi C, Missiroli S, Patergnani S, Duszynski J, Wieckowski MR, Pinton P (2015) Mitochondria-associated membranes: composition, molecular mechanisms, and physiopathological implications. *Antioxid Redox Signal.* **22**:995-1019.

Giralt M, Gavaldà-Navarro A, Villarroya F (2015) Fibroblast growth factor-21, energy balance and obesity. *Mol Cell Endocrinol.* **418 Pt 1**:66-73.

Giralt M, Villarroya F (2013) White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions? *Endocrinology.* **154**:2992-3000.

Girard J (2003) [Contribution of free fatty acids to impairment of insulin secretion and action: mechanism of beta-cell lipotoxicity]. *Med Sci (Paris).* **19**:827-33.

Goldstein BJ, Scalia RG, Ma XL (2009) Protective vascular and myocardial effects of adiponectin. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* **6**:27-35.

Greenberg AS, Egan JJ, Wek SA, Garty NB, Blanchette-Mackie EJ, Londos C (1991) Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. *J Biol Chem.* **266**:11341-6.

Gregoire FM, Smas CM, Sul HS (1998) Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev.* **78**:783-809.

Grigoriadis AE, Heersche JN, Aubin JE (1988) Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone. *J Cell Biol.* **106**:2139-51.

- Gu W, Li X, Liu C, Yang J, Ye L, Tang J, *et al.* (2006) Globular adiponectin augments insulin secretion from pancreatic islet beta cells at high glucose concentrations. *Endocrine*. **30**:217-21.
- Guénant AC, Briand N, Capel E, Dumont F, Morichon R, Provost C, *et al.* (2017) Functional Human Beige Adipocytes From Induced Pluripotent Stem Cells. *Diabetes*. **66**:1470-8.
- Guerra C, Koza RA, Yamashita H, Walsh K, Kozak LP (1998) Emergence of brown adipocytes in white fat in mice is under genetic control. Effects on body weight and adiposity. *J Clin Invest*. **102**:412-20.
- Guillin-Amarelle C, Fernandez-Pombo A, Sanchez-Iglesias S, Araujo-Vilar D (2018) Lipodystrophic laminopathies: Diagnostic clues. *Nucleus*. **9**:249-60.
- Hales KG, Fuller MT (1997) Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell*. **90**:121-9.
- Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A, Nezu A, Yamamoto A, Fujita N, *et al.* (2013) Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature*. **495**:389-93.
- Hanssen MJ, Hoeks J, Brans B, van der Lans AA, Schaart G, van den Driessche JJ, *et al.* (2015) Short-term cold acclimation improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes mellitus. *Nat Med*. **21**:863-5.
- Haque WA, Shimomura I, Matsuzawa Y, Garg A (2002) Serum adiponectin and leptin levels in patients with lipodystrophies. *J Clin Endocrinol Metab*. **87**:2395.
- Harms M, Seale P (2013) Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med*. **19**:1252-63.
- Hauner H, Schmid P, Pfeiffer EF (1987) Glucocorticoids and insulin promote the differentiation of human adipocyte precursor cells into fat cells. *J Clin Endocrinol Metab*. **64**:832-5.
- Hausman GJ, Wright JT, Richardson RL (1996) The influence of extracellular matrix substrata on preadipocyte development in serum-free cultures of stromal-vascular cells. *J Anim Sci*. **74**:2117-28.
- Hayashi YK, Matsuda C, Ogawa M, Goto K, Tominaga K, Mitsuhashi S, *et al.* (2009) Human PTRF mutations cause secondary deficiency of caveolins resulting in muscular dystrophy with generalized lipodystrophy. *J Clin Invest*. **119**:2623-33.
- Heath KV, Chan KJ, Singer J, O'Shaughnessy MV, Montaner JS, Hogg RS (2002) Incidence of morphological and lipid abnormalities: gender and treatment differentials after initiation of first antiretroviral therapy. *Int J Epidemiol*. **31**:1016-20.
- Hemrich K, von Heimburg D, Cierpka K, Haydarlioglu S, Pallua N (2005) Optimization of the differentiation of human preadipocytes in vitro. *Differentiation*. **73**:28-35.
- Herbst KL, Tannock LR, Deeb SS, Purnell JQ, Brunzell JD, Chait A (2003) Kobblerling type of familial partial lipodystrophy: an underrecognized syndrome. *Diabetes Care*. **26**:1819-24.

- Hernandez A, Obregon MJ (2000) Triiodothyronine amplifies the adrenergic stimulation of uncoupling protein expression in rat brown adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **278**:E769-77.
- Himms-Hagen J, Melnyk A, Zingaretti MC, Ceresi E, Barbatelli G, Cinti S (2000) Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* **279**:C670-81.
- Hondares E, Gallego-Escuredo JM, Flachs P, Frontini A, Cereijo R, Goday A, *et al.* (2014) Fibroblast growth factor-21 is expressed in neonatal and pheochromocytoma-induced adult human brown adipose tissue. *Metabolism.* **63**:312-7.
- Hoseini SJ, Ghazavi H, Forouzanfar F, Mashkani B, Ghorbani A, Mahdipour E, *et al.* (2017) Fibroblast Growth Factor 1-Transfected Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Promote Angiogenic Proliferation. *DNA Cell Biol.* **36**:401-12.
- Hu L, Yang G, Hagg D, Sun G, Ahn JM, Jiang N, *et al.* (2015) IGF1 Promotes Adipogenesis by a Lineage Bias of Endogenous Adipose Stem/Progenitor Cells. *Stem Cells.* **33**:2483-95.
- Hussain I, Patni N, Garg A (2019) Lipodystrophies, dyslipidaemias and atherosclerotic cardiovascular disease. *Pathology.* **51**:202-12.
- Hutley L, Shurety W, Newell F, McGeary R, Pelton N, Grant J, *et al.* (2004) Fibroblast growth factor 1: a key regulator of human adipogenesis. *Diabetes.* **53**:3097-106.
- Ibrahim MM (2010) Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev.* **11**:11-8.
- Ikeda K, Maretich P, Kajimura S (2018) The Common and Distinct Features of Brown and Beige Adipocytes. *Trends Endocrinol Metab.* **29**:191-200.
- Inagaki T, Dutchak P, Zhao G, Ding X, Gautron L, Parameswara V, *et al.* (2007) Endocrine regulation of the fasting response by PPARalpha-mediated induction of fibroblast growth factor 21. *Cell Metab.* **5**:415-25.
- Ishibashi J, Seale P (2010) Medicine. Beige can be slimming. *Science.* **328**:1113-4.
- Izumiya Y, Bina HA, Ouchi N, Akasaki Y, Kharitonov A, Walsh K (2008) FGF21 is an Akt-regulated myokine. *FEBS Lett.* **582**:3805-10.
- Jan V, Cervera P, Maachi M, Baudrimont M, Kim M, Vidal H, *et al.* (2004) Altered fat differentiation and adipocytokine expression are inter-related and linked to morphological changes and insulin resistance in HIV-1-infected lipodystrophic patients. *Antivir Ther.* **9**:555-64.
- Jensen M, De Meyts P (2009) Molecular mechanisms of differential intracellular signaling from the insulin receptor. *Vitam Horm.* **80**:51-75.
- Jeru I, Vantyghem MC, Bismuth E, Cervera P, Barraud S, Group PL-S, *et al.* (2019) Diagnostic challenge in PLIN1-associated Familial Partial Lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab.*

- Joe AW, Yi L, Natarajan A, Le Grand F, So L, Wang J, *et al.* (2010) Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nat Cell Biol.* **12**:153-63.
- Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU (1998) In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res.* **238**:265-72.
- Jurgens WJ, Oedayrajsingh-Varma MJ, Helder MN, Zandiehoulabi B, Schouten TE, Kuik DJ, *et al.* (2008) Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Cell Tissue Res.* **332**:415-26.
- Kahn CR, Wang G, Lee KY (2019) Altered adipose tissue and adipocyte function in the pathogenesis of metabolic syndrome. *J Clin Invest.* **129**:3990-4000.
- Kakudo N, Shimotsuma A, Kusumoto K (2007) Fibroblast growth factor-2 stimulates adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **359**:239-44.
- Kang Q, Song WX, Luo Q, Tang N, Luo J, Luo X, *et al.* (2009) A comprehensive analysis of the dual roles of BMPs in regulating adipogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells Dev.* **18**:545-59.
- Kanneganti TD, Dixit VD (2012) Immunological complications of obesity. *Nat Immunol.* **13**:707-12.
- Karpe F, Pinnick KE (2015) Biology of upper-body and lower-body adipose tissue--link to whole-body phenotypes. *Nat Rev Endocrinol.* **11**:90-100.
- Kasza I, Suh Y, Wollny D, Clark RJ, Roopra A, Colman RJ, *et al.* (2014) Syndecan-1 is required to maintain intradermal fat and prevent cold stress. *PLoS Genet.* **10**:e1004514.
- Kharitonov A, Shiyanova TL, Koester A, Ford AM, Micanovic R, Galbreath EJ, *et al.* (2005) FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J Clin Invest.* **115**:1627-35.
- Kido Y, Nakae J, Accili D (2001) Clinical review 125: The insulin receptor and its cellular targets. *J Clin Endocrinol Metab.* **86**:972-9.
- Kim CA, Delepine M, Boutet E, El Mourabit H, Le Lay S, Meier M, *et al.* (2008) Association of a homozygous nonsense caveolin-1 mutation with Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab.* **93**:1129-34.
- Kim JB, Spiegelman BM (1996) ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev.* **10**:1096-107.
- Kim JK, Gavrilova O, Chen Y, Reitman ML, Shulman GI (2000) Mechanism of insulin resistance in A-ZIP/F-1 fatless mice. *J Biol Chem.* **275**:8456-60.
- Kitamura A, Maekawa Y, Uehara H, Izumi K, Kawachi I, Nishizawa M, *et al.* (2011) A mutation in the immunoproteasome subunit PSMB8 causes autoinflammation and lipodystrophy in humans. *J Clin Invest.* **121**:4150-60.

- Koshiba T, Detmer SA, Kaiser JT, Chen H, McCaffery JM, Chan DC (2004) Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science*. **305**:858-62.
- Kuhn E, Binart N, Lombes M (2012) [Brown, white, beige: the color of fat and new therapeutic perspectives for obesity...]. *Ann Endocrinol (Paris)*. **73 Suppl 1**:S2-8.
- Kuri-Harcuch W, Arguello C, Marsch-Moreno M (1984) Extracellular matrix production by mouse 3T3-F442A cells during adipose differentiation in culture. *Differentiation*. **28**:173-8.
- Kusminski CM, Bickel PE, Scherer PE (2016) Targeting adipose tissue in the treatment of obesity-associated diabetes. *Nat Rev Drug Discov*. **15**:639-60.
- Lagathu C, Eustace B, Prot M, Frantz D, Gu Y, Bastard JP, et al. (2007) Some HIV antiretrovirals increase oxidative stress and alter chemokine, cytokine or adiponectin production in human adipocytes and macrophages. *Antivir Ther*. **12**:489-500.
- Large V, Peroni O, Letexier D, Ray H, Beylot M (2004) Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes Metab*. **30**:294-309.
- Le Dour C, Wu W, Bereziat V, Capeau J, Vigouroux C, Worman HJ (2017) Extracellular matrix remodeling and transforming growth factor-beta signaling abnormalities induced by lamin A/C variants that cause lipodystrophy. *J Lipid Res*. **58**:151-63.
- Lee KY, Luong Q, Sharma R, Dreyfuss JM, Ussar S, Kahn CR (2019) Developmental and functional heterogeneity of white adipocytes within a single fat depot. *EMBO J*. **38**.
- Lee TJ, Shim MS, Yu T, Choi K, Kim DI, Lee SH, et al. (2018) Bioreducible Polymer Micelles Based on Acid-Degradable Poly(ethylene glycol)-poly(amino ketal) Enhance the Stromal Cell-Derived Factor-1alpha Gene Transfection Efficacy and Therapeutic Angiogenesis of Human Adipose-Derived Stem Cells. *Int J Mol Sci*. **19**.
- Lee YH, Petkova AP, Mottillo EP, Granneman JG (2012) In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by beta3-adrenoceptor activation and high-fat feeding. *Cell Metab*. **15**:480-91.
- Lefterova MI, Lazar MA (2009) New developments in adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab*. **20**:107-14.
- Lehmann JM, Lenhard JM, Oliver BB, Ringold GM, Kliewer SA (1997) Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem*. **272**:3406-10.
- Lehr L, Canola K, Leger B, Giacobino JP (2009) Differentiation and characterization in primary culture of white adipose tissue brown adipocyte-like cells. *Int J Obes (Lond)*. **33**:680-6.
- Letexier D, Pinteur C, Large V, Frering V, Beylot M (2003) Comparison of the expression and activity of the lipogenic pathway in human and rat adipose tissue. *J Lipid Res*. **44**:2127-34.
- Levitt RC, Liu Z, Nouri N, Meyers DA, Brandriff B, Mohrenweiser HM (1995) Mapping of the gene for hormone sensitive lipase (LIPE) to chromosome 19q13.1-->q13.2. *Cytogenet Cell Genet*. **69**:211-4.



Lightbourne M, Brown RJ (2017) Genetics of Lipodystrophy. *Endocrinol Metab Clin North Am.* **46**:539-54.

Lin Z, Pan X, Wu F, Ye D, Zhang Y, Wang Y, *et al.* (2015) Fibroblast growth factor 21 prevents atherosclerosis by suppression of hepatic sterol regulatory element-binding protein-2 and induction of adiponectin in mice. *Circulation.* **131**:1861-71.

Lindner A, Marbach F, Tschernitz S, Ortner C, Berneburg M, Felthaus O, *et al.* (2019) Calcyphosine-like (CAPSL) is regulated in Multiple Symmetric Lipomatosis and is involved in Adipogenesis. *Sci Rep.* **9**:8444.

Liu R, Jin P, Yu L, Wang Y, Han L, Shi T, *et al.* (2014) Impaired mitochondrial dynamics and bioenergetics in diabetic skeletal muscle. *PLoS One.* **9**:e92810.

Liu Y, Wang Y, He X, Zhang S, Wang K, Wu H, *et al.* (2018) LncRNA TINCR/miR-31-5p/C/EBP-alpha feedback loop modulates the adipogenic differentiation process in human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res.* **32**:35-42.

Lo Furno D, Mannino G, Giuffrida R, Gili E, Vancheri C, Tarico MS, *et al.* (2018) Neural differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells induced by glial cell conditioned media. *J Cell Physiol.* **233**:7091-100.

Loffreda S, Yang SQ, Lin HZ, Karp CL, Brengman ML, Wang DJ, *et al.* (1998) Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J.* **12**:57-65.

Lombardi F, Fasciglione GF, D'Apice MR, Vielle A, D'Adamo M, Sbraccia P, *et al.* (2008) Increased release and activity of matrix metalloproteinase-9 in patients with mandibuloacral dysplasia type A, a rare premature ageing syndrome. *Clin Genet.* **74**:374-83.

Long JZ, Svensson KJ, Tsai L, Zeng X, Roh HC, Kong X, *et al.* (2014) A smooth muscle-like origin for beige adipocytes. *Cell Metab.* **19**:810-20.

Lotta LA, Gulati P, Day FR, Payne F, Ongen H, van de Bunt M, *et al.* (2017) Integrative genomic analysis implicates limited peripheral adipose storage capacity in the pathogenesis of human insulin resistance. *Nat Genet.* **49**:17-26.

Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR (2007) Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest.* **117**:175-84.

Lumeng CN, DelProposto JB, Westcott DJ, Saltiel AR (2008) Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes. *Diabetes.* **57**:3239-46.

Luong Q, Huang J, Lee KY (2019) Deciphering White Adipose Tissue Heterogeneity. *Biology (Basel).* **8**.

Magre J, Delepine M, Khallouf E, Gedde-Dahl T, Jr., Van Maldergem L, Sobel E, *et al.* (2001) Identification of the gene altered in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy on chromosome 11q13. *Nat Genet.* **28**:365-70.

- Mann JP, Savage DB (2019) What lipodystrophies teach us about the metabolic syndrome. *J Clin Invest.* **130**:4009-21.
- Mantzoros CS, Magkos F, Brinkoetter M, Sienkiewicz E, Dardeno TA, Kim SY, *et al.* (2011) Leptin in human physiology and pathophysiology. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **301**:E567-84.
- Marcelin G, Silveira ALM, Martins LB, Ferreira AV, Clement K (2019) Deciphering the cellular interplays underlying obesity-induced adipose tissue fibrosis. *J Clin Invest.* **129**:4032-40.
- Markan KR, Naber MC, Ameka MK, Anderegg MD, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA, *et al.* (2014) Circulating FGF21 is liver derived and enhances glucose uptake during refeeding and overfeeding. *Diabetes.* **63**:4057-63.
- Martinez E, Mocroft A, Garcia-Viejo MA, Perez-Cuevas JB, Blanco JL, Mallolas J, *et al.* (2001) Risk of lipodystrophy in HIV-1-infected patients treated with protease inhibitors: a prospective cohort study. *Lancet.* **357**:592-8.
- Matsuzawa Y (2006) Therapy Insight: adipocytokines in metabolic syndrome and related cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* **3**:35-42.
- Mattie S, Riemer J, Wideman JG, McBride HM (2018) A new mitofusin topology places the redox-regulated C terminus in the mitochondrial intermembrane space. *J Cell Biol.* **217**:507-15.
- McIntyre TM, Pontsler AV, Silva AR, St Hilaire A, Xu Y, Hinshaw JC, *et al.* (2003) Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPARgamma agonist. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**:131-6.
- McTernan PG, Harte AL, Anderson LA, Green A, Smith SA, Holder JC, *et al.* (2002) Insulin and rosiglitazone regulation of lipolysis and lipogenesis in human adipose tissue in vitro. *Diabetes.* **51**:1493-8.
- Merrick D, Sakers A, Irgebay Z, Okada C, Calvert C, Morley MP, *et al.* (2019) Identification of a mesenchymal progenitor cell hierarchy in adipose tissue. *Science.* **364**.
- Misko AL, Sasaki Y, Tuck E, Milbrandt J, Baloh RH (2012) Mitofusin2 mutations disrupt axonal mitochondrial positioning and promote axon degeneration. *J Neurosci.* **32**:4145-55.
- Misra A, Peethambaram A, Garg A (2004) Clinical features and metabolic and autoimmune derangements in acquired partial lipodystrophy: report of 35 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore).* **83**:18-34.
- Mizuno T, Bergen H, Kleopoulos S, Bauman WA, Mobbs CV (1996) Effects of nutritional status and aging on leptin gene expression in mice: importance of glucose. *Horm Metab Res.* **28**:679-84.
- Moitra J, Mason MM, Olive M, Krylov D, Gavrilova O, Marcus-Samuels B, *et al.* (1998) Life without white fat: a transgenic mouse. *Genes Dev.* **12**:3168-81.

Morigny P, Houssier M, Mouisel E, Langin D (2016) Adipocyte lipolysis and insulin resistance. *Biochimie*. **125**:259-66.

Moro C, Pillard F, De Glisezinski I, Harant I, Riviere D, Stich V, *et al.* (2005) Training enhances ANP lipid-mobilizing action in adipose tissue of overweight men. *Med Sci Sports Exerc*. **37**:1126-32.

Mozdy AD, Shaw JM (2003) A fuzzy mitochondrial fusion apparatus comes into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **4**:468-78.

Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, Mazda T, Tomita M (1996) Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J Biochem*. **120**:803-12.

Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B (2007) Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. **293**:E444-52.

Nishida J, Ehara S, Shiraishi H, Tada H, Satoh T, Okada K, *et al.* (2009) Clinical findings of hibernoma of the buttock and thigh: rare involvements and extremely high uptake of FDG-PET. *Med Sci Monit*. **15**:CS117-22.

Nishimura T, Nakatake Y, Konishi M, Itoh N (2000) Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochim Biophys Acta*. **1492**:203-6.

Nisoli E, Regianini L, Briscini L, Bulbarelli A, Busetto L, Coin A, *et al.* (2002) Multiple symmetric lipomatosis may be the consequence of defective noradrenergic modulation of proliferation and differentiation of brown fat cells. *J Pathol*. **198**:378-87.

Nye C, Kim J, Kalhan SC, Hanson RW (2008) Reassessing triglyceride synthesis in adipose tissue. *Trends Endocrinol Metab*. **19**:356-61.

Osuga J, Ishibashi S, Oka T, Yagy H, Tozawa R, Fujimoto A, *et al.* (2000) Targeted disruption of hormone-sensitive lipase results in male sterility and adipocyte hypertrophy, but not in obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**:787-92.

Ottaviani E, Malagoli D, Franceschi C (2011) The evolution of the adipose tissue: a neglected enigma. *Gen Comp Endocrinol*. **174**:1-4.

Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K (2011) Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*. **11**:85-97.

Ouedraogo R, Wu X, Xu SQ, Fuchsel L, Motoshima H, Mahadev K, *et al.* (2006) Adiponectin suppression of high-glucose-induced reactive oxygen species in vascular endothelial cells: evidence for involvement of a cAMP signaling pathway. *Diabetes*. **55**:1840-6.

Park K, Kim KH (1993) The site of cAMP action in the insulin induction of gene expression of acetyl-CoA carboxylase is AP-2. *J Biol Chem*. **268**:17811-9.

Patni N, Garg A (2015) Congenital generalized lipodystrophies--new insights into metabolic dysfunction. *Nat Rev Endocrinol*. **11**:522-34.

- Patti ME, Butte AJ, Crunkhorn S, Cusi K, Berria R, Kashyap S, *et al.* (2003) Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**:8466-71.
- Peirce V, Carobbio S, Vidal-Puig A (2014) The different shades of fat. *Nature.* **510**:76-83.
- Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI (2004) Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med.* **350**:664-71.
- Petrovic N, Walden TB, Shabalina IG, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J (2010) Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem.* **285**:7153-64.
- Petryszak R, Keays M, Tang YA, Fonseca NA, Barrera E, Burdett T, *et al.* (2016) Expression Atlas update--an integrated database of gene and protein expression in humans, animals and plants. *Nucleic Acids Res.* **44**:D746-52.
- Pineiro R, Iglesias MJ, Gallego R, Raghay K, Eiras S, Rubio J, *et al.* (2005) Adiponectin is synthesized and secreted by human and murine cardiomyocytes. *FEBS Lett.* **579**:5163-9.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, *et al.* (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* **284**:143-7.
- Poissonnet CM, Burdi AR, Bookstein FL (1983) Growth and development of human adipose tissue during early gestation. *Early Hum Dev.* **8**:1-11.
- Poissonnet CM, Burdi AR, Garn SM (1984) The chronology of adipose tissue appearance and distribution in the human fetus. *Early Hum Dev.* **10**:1-11.
- Proenca AR, Sertie RA, Oliveira AC, Campana AB, Caminhotto RO, Chimin P, *et al.* (2014) New concepts in white adipose tissue physiology. *Braz J Med Biol Res.* **47**:192-205.
- Qi Y, Ma J, Li S, Liu W (2019) Applicability of adipose-derived mesenchymal stem cells in treatment of patients with type 2 diabetes. *Stem Cell Res Ther.* **10**:274.
- Raajendiran A, Ooi G, Bayliss J, O'Brien PE, Schittenhelm RB, Clark AK, *et al.* (2019) Identification of Metabolically Distinct Adipocyte Progenitor Cells in Human Adipose Tissues. *Cell Rep.* **27**:1528-40 e7.
- Ramage LE, Akyol M, Fletcher AM, Forsythe J, Nixon M, Carter RN, *et al.* (2016) Glucocorticoids Acutely Increase Brown Adipose Tissue Activity in Humans, Revealing Species-Specific Differences in UCP-1 Regulation. *Cell Metab.* **24**:130-41.
- Rambold AS, Kostecky B, Elia N, Lippincott-Schwartz J (2011) Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **108**:10190-5.

- Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA (1963) The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet*. **1**:785-9.
- Rocha N, Bulger DA, Frontini A, Titheradge H, Gribsholt SB, Knox R, *et al.* (2017) Human biallelic MFN2 mutations induce mitochondrial dysfunction, upper body adipose hyperplasia, and suppression of leptin expression. *Elife*. **6**.
- Rodeheffer MS, Birsoy K, Friedman JM (2008) Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo. *Cell*. **135**:240-9.
- Rosen ED, MacDougald OA (2006) Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **7**:885-96.
- Rosen ED, Spiegelman BM (2000) Molecular regulation of adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. **16**:145-71.
- Rosen ED, Spiegelman BM (2014) What we talk about when we talk about fat. *Cell*. **156**:20-44.
- Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM (2000) Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev*. **14**:1293-307.
- Rubio-Cabezas O, Puri V, Murano I, Saudek V, Semple RK, Dash S, *et al.* (2009) Partial lipodystrophy and insulin resistant diabetes in a patient with a homozygous nonsense mutation in CIDEC. *EMBO Mol Med*. **1**:280-7.
- Rupnick MA, Panigrahy D, Zhang CY, Dallabrida SM, Lowell BB, Langer R, *et al.* (2002) Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99**:10730-5.
- Rutkowski JM, Stern JH, Scherer PE (2015) The cell biology of fat expansion. *J Cell Biol*. **208**:501-12.
- Sadie-Van Gijsen H (2019) Adipocyte biology: It is time to upgrade to a new model. *J Cell Physiol*. **234**:2399-425.
- Saito M, Okamatsu-Ogura Y, Matsushita M, Watanabe K, Yoneshiro T, Nio-Kobayashi J, *et al.* (2009) High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes*. **58**:1526-31.
- Salle-Teyssieres L, Auclair M, Terro F, Nemani M, Elsayed SM, Elsobky E, *et al.* (2016) Maladaptative Autophagy Impairs Adipose Function in Congenital Generalized Lipodystrophy due to Cavin-1 Deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. **101**:2892-904.
- Salo VT, Belevich I, Li S, Karhinen L, Vihinen H, Vigouroux C, *et al.* (2016) Seipin regulates ER-lipid droplet contacts and cargo delivery. *EMBO J*. **35**:2699-716.
- Samuel VT, Petersen KF, Shulman GI (2010) Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *Lancet*. **375**:2267-77.

Savage DB, Semple RK, Clatworthy MR, Lyons PA, Morgan BP, Cochran EK, *et al.* (2009) Complement abnormalities in acquired lipodystrophy revisited. *J Clin Endocrinol Metab.* **94**:10-6.

Sawyer SL, Cheuk-Him Ng A, Innes AM, Wagner JD, Dymont DA, Tetreault M, *et al.* (2015) Homozygous mutations in MFN2 cause multiple symmetric lipomatosis associated with neuropathy. *Hum Mol Genet.* **24**:5109-14.

Scheja L, Heeren J (2019) The endocrine function of adipose tissues in health and cardiometabolic disease. *Nat Rev Endocrinol.* **15**:507-24.

Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF (1995) A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem.* **270**:26746-9.

Schoettl T, Fischer IP, Ussar S (2018) Heterogeneity of adipose tissue in development and metabolic function. *J Exp Biol.* **221**.

Seale P, Kajimura S, Yang W, Chin S, Rohas LM, Uldry M, *et al.* (2007) Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell Metab.* **6**:38-54.

Sebastian D, Hernandez-Alvarez MI, Segales J, Sorianoello E, Munoz JP, Sala D, *et al.* (2012) Mitofusin 2 (Mfn2) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with insulin signaling and is essential for normal glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **109**:5523-8.

Sebo ZL, Rodeheffer MS (2019) Assembling the adipose organ: adipocyte lineage segregation and adipogenesis in vivo. *Development.* **146**.

Sengenès C, Bouloumie A, Hauner H, Berlan M, Busse R, Lafontan M, *et al.* (2003) Involvement of a cGMP-dependent pathway in the natriuretic peptide-mediated hormone-sensitive lipase phosphorylation in human adipocytes. *J Biol Chem.* **278**:48617-26.

Seo E, Kang H, Lim OK, Jun HS (2018) Supplementation with IL-6 and Muscle Cell Culture Conditioned Media Enhances Myogenic Differentiation of Adipose Tissue-Derived Stem Cells through STAT3 Activation. *Int J Mol Sci.* **19**.

Shen W, Wang Z, Punyanita M, Lei J, Sinav A, Kral JG, *et al.* (2003) Adipose tissue quantification by imaging methods: a proposed classification. *Obes Res.* **11**:5-16.

Shi Z, Neoh KG, Kang ET, Poh CK, Wang W (2014) Enhanced endothelial differentiation of adipose-derived stem cells by substrate nanotopography. *J Tissue Eng Regen Med.* **8**:50-8.

Shioda T, Fenner MH, Isselbacher KJ (1996) msg1, a novel melanocyte-specific gene, encodes a nuclear protein and is associated with pigmentation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**:12298-303.

Shoffner JM LM, Lezza AM, Seibel P, Ballinger SW, Wallace DC. (1990) Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation. *Cell.* **61**:931-7.

Shulman GI (2000) Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest.* **106**:171-6.

Shutt T, Geoffrion M, Milne R, McBride HM (2012) The intracellular redox state is a core determinant of mitochondrial fusion. *EMBO Rep.* **13**:909-15.

Slieker LJ, Sloop KW, Surface PL, Kriauciunas A, LaQuier F, Manetta J, *et al.* (1996) Regulation of expression of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. *J Biol Chem.* **271**:5301-4.

Sollier C, Vazier C, Capel E, Lascols O, Auclair M, Janmaat S, *et al.* (in press) Lipodystrophic syndromes : from diagnosis to treatment. *Ann Endocrinol (Paris)*.

Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, *et al.* (2008) Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature.* **453**:783-7.

Staiger H, Tschritter O, Machann J, Thamer C, Fritsche A, Maerker E, *et al.* (2003) Relationship of serum adiponectin and leptin concentrations with body fat distribution in humans. *Obes Res.* **11**:368-72.

Stern JH, Rutkowski JM, Scherer PE (2016) Adiponectin, Leptin, and Fatty Acids in the Maintenance of Metabolic Homeostasis through Adipose Tissue Crosstalk. *Cell Metab.* **23**:770-84.

Strom K, Gundersen TE, Hansson O, Lucas S, Fernandez C, Blomhoff R, *et al.* (2009) Hormone-sensitive lipase (HSL) is also a retinyl ester hydrolase: evidence from mice lacking HSL. *FASEB J.* **23**:2307-16.

Struik D, Dommerholt MB, Jonker JW (2019) Fibroblast growth factors in control of lipid metabolism: from biological function to clinical application. *Curr Opin Lipidol.* **30**:235-43.

Sugiura A, Nagashima S, Tokuyama T, Amo T, Matsuki Y, Ishido S, *et al.* (2013) MITOL regulates endoplasmic reticulum-mitochondria contacts via Mitofusin2. *Mol Cell.* **51**:20-34.

Sun K, Tordjman J, Clement K, Scherer PE (2013) Fibrosis and adipose tissue dysfunction. *Cell Metab.* **18**:470-7.

Suzuki M, Uehara Y, Motomura-Matsuzaka K, Oki J, Koyama Y, Kimura M, *et al.* (2008) betaKlotho is required for fibroblast growth factor (FGF) 21 signaling through FGF receptor (FGFR) 1c and FGFR3c. *Mol Endocrinol.* **22**:1006-14.

Sztalryd C, Brasaemle DL (2017) The perilipin family of lipid droplet proteins: Gatekeepers of intracellular lipolysis. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* **1862**:1221-32.

Szymanski KM, Binns D, Bartz R, Grishin NV, Li WP, Agarwal AK, *et al.* (2007) The lipodystrophy protein seipin is found at endoplasmic reticulum lipid droplet junctions and is important for droplet morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**:20890-5.

Takahashi Y, Shinoda A, Furuya N, Harada E, Arimura N, Ichi I, *et al.* (2013) Perilipin-mediated lipid droplet formation in adipocytes promotes sterol regulatory element-binding protein-1 processing and triacylglyceride accumulation. *PLoS One.* **8**:e64605.

- Tanaka A, Cleland MM, Xu S, Narendra DP, Suen DF, Karbowski M, *et al.* (2010) Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *J Cell Biol.* **191**:1367-80.
- Tang W, Zeve D, Suh JM, Bosnakovski D, Kyba M, Hammer RE, *et al.* (2008) White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science.* **322**:583-6.
- Tansey JT, Sztalryd C, Gruia-Gray J, Roush DL, Zee JV, Gavriloova O, *et al.* (2001) Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**:6494-9.
- Tansey JT, Sztalryd C, Hlavin EM, Kimmel AR, Londos C (2004) The central role of perilipin a in lipid metabolism and adipocyte lipolysis. *IUBMB Life.* **56**:379-85.
- Todorovic M, Hilton C, McNeil C, Christodoulides C, Hodson L, Karpe F, *et al.* (2017) A cellular model for the investigation of depot specific human adipocyte biology. *Adipocyte.* **6**:40-55.
- Tomas E, Tsao TS, Saha AK, Murrey HE, Zhang Cc C, Itani SI, *et al.* (2002) Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**:16309-13.
- Vague J (1956) The degree of masculine differentiation of obesities: a factor determining predisposition to diabetes, atherosclerosis, gout, and uric calculous disease. *Am J Clin Nutr.* **4**:20-34.
- van Beek EA, Bakker AH, Kruijff PM, Vink C, Saris WH, Franssen-van Hal NL, *et al.* (2008) Comparative expression analysis of isolated human adipocytes and the human adipose cell lines LiSa-2 and PAZ6. *Int J Obes (Lond).* **32**:912-21.
- Van Harmelen V, Rohrig K, Hauner H (2004) Comparison of proliferation and differentiation capacity of human adipocyte precursor cells from the omental and subcutaneous adipose tissue depot of obese subjects. *Metabolism.* **53**:632-7.
- van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommel JW, Smulders NM, Drossaerts JM, Kemerink GJ, Bouvy ND, *et al.* (2009) Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med.* **360**:1500-8.
- Vasan SK, Osmond C, Canoy D, Christodoulides C, Neville MJ, Di Gravio C, *et al.* (2018) Comparison of regional fat measurements by dual-energy X-ray absorptiometry and conventional anthropometry and their association with markers of diabetes and cardiovascular disease risk. *Int J Obes (Lond).* **42**:850-7.
- Vatier C, Fetita S, Boudou P, Tchankou C, Deville L, Riveline J, *et al.* (2016) One-year metreleptin improves insulin secretion in patients with diabetes linked to genetic lipodystrophic syndromes. *Diabetes Obes Metab.* **18**:693-7.
- Vatier C, Vantighem MC, Storey C, Jeru I, Christin-Maitre S, Feve B, *et al.* (2019) Monogenic forms of lipodystrophic syndromes: diagnosis, detection, and practical management considerations from clinical cases. *Curr Med Res Opin.* **35**:543-52.



Vegiopoulos A, Muller-Decker K, Strzoda D, Schmitt I, Chichelnitskiy E, Ostertag A, *et al.* (2010) Cyclooxygenase-2 controls energy homeostasis in mice by de novo recruitment of brown adipocytes. *Science*. **328**:1158-61.

Vigouroux C (2018) Recent pathophysiologic and therapeutic data on lipodystrophic syndromes. *Médecine des maladies Métaboliques*. **12**:642-9.

Vigouroux C, Guenantin AC, Vazier C, Capel E, Le Dour C, Afonso P, *et al.* (2018) Lipodystrophic syndromes due to LMNA mutations: recent developments on biomolecular aspects, pathophysiological hypotheses and therapeutic perspectives. *Nucleus*. **9**:235-48.

Vila MR, Gamez J, Solano A, Playan A, Schwartz S, Santorelli FM, *et al.* (2000) Uncoupling protein-1 mRNA expression in lipomas from patients bearing pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Biochem Biophys Res Commun*. **278**:800-2.

Villarroya F, Gavaldà-Navarro A, Peyrou M, Villarroya J, Giralt M (2017) The Lives and Times of Brown Adipokines. *Trends Endocrinol Metab*. **28**:855-67.

Villarroya J, Cereijo R, Villarroya F (2013) An endocrine role for brown adipose tissue? *Am J Physiol Endocrinol Metab*. **305**:E567-72.

Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, *et al.* (2009) Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med*. **360**:1518-25.

Virtue S, Vidal-Puig A (2010) Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome--an allostatic perspective. *Biochim Biophys Acta*. **1801**:338-49.

Vishvanath L, Gupta RK (2019) Contribution of adipogenesis to healthy adipose tissue expansion in obesity. *J Clin Invest*. **129**:4022-31.

Vitali A, Murano I, Zingaretti MC, Frontini A, Ricquier D, Cinti S (2012) The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes. *J Lipid Res*. **53**:619-29.

Wabitsch M, Brenner RE, Melzner I, Braun M, Moller P, Heinze E, *et al.* (2001) Characterization of a human preadipocyte cell strain with high capacity for adipose differentiation. *Int J Obes Relat Metab Disord*. **25**:8-15.

Wabitsch M, Bruderlein S, Melzner I, Braun M, Mechttersheimer G, Moller P (2000) LiSa-2, a novel human liposarcoma cell line with a high capacity for terminal adipose differentiation. *Int J Cancer*. **88**:889-94.

Wai T, Langer T (2016) Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. *Trends Endocrinol Metab*. **27**:105-17.

Wajchenberg BL (2000) Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev*. **21**:697-738.

- Walker GE, Marzullo P, Verti B, Guzzaloni G, Maestrini S, Zurleni F, *et al.* (2008) Subcutaneous abdominal adipose tissue subcompartments: potential role in rosiglitazone effects. *Obesity (Silver Spring)*. **16**:1983-91.
- Weedon MN, Ellard S, Prindle MJ, Caswell R, Lango Allen H, Oram R, *et al.* (2013) An in-frame deletion at the polymerase active site of POLD1 causes a multisystem disorder with lipodystrophy. *Nat Genet*. **45**:947-50.
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. **112**:1796-808.
- Wente W, Efanov AM, Brenner M, Kharitonov A, Koster A, Sandusky GE, *et al.* (2006) Fibroblast growth factor-21 improves pancreatic beta-cell function and survival by activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Akt signaling pathways. *Diabetes*. **55**:2470-8.
- Wormser D, Kaptoge S, Di Angelantonio E, Wood AM, Pennells L, Thompson A, *et al.* (2011) Separate and combined associations of body-mass index and abdominal adiposity with cardiovascular disease: collaborative analysis of 58 prospective studies. *Lancet*. **377**:1085-95.
- Writzl K, Maver A, Kovacic L, Martinez-Valero P, Contreras L, Satrustegui J, *et al.* (2017) De Novo Mutations in SLC25A24 Cause a Disorder Characterized by Early Aging, Bone Dysplasia, Characteristic Face, and Early Demise. *Am J Hum Genet*. **101**:844-55.
- Wu H, Ghosh S, Perrard XD, Feng L, Garcia GE, Perrard JL, *et al.* (2007) T-cell accumulation and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted upregulation in adipose tissue in obesity. *Circulation*. **115**:1029-38.
- Wu J, Bostrom P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, *et al.* (2012) Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*. **150**:366-76.
- Wynn TA, Ramalingam TR (2012) Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med*. **18**:1028-40.
- Xia B, Cai GH, Yang H, Wang SP, Mitchell GA, Wu JW (2017) Adipose tissue deficiency of hormone-sensitive lipase causes fatty liver in mice. *PLoS Genet*. **13**:e1007110.
- Yamamoto Y, Gesta S, Lee KY, Tran TT, Saadatirad P, Kahn CR (2010) Adipose depots possess unique developmental gene signatures. *Obesity (Silver Spring)*. **18**:872-8.
- Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, *et al.* (2002) Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med*. **8**:1288-95.
- Yang C, Jin C, Li X, Wang F, McKeehan WL, Luo Y (2012) Differential specificity of endocrine FGF19 and FGF21 to FGFR1 and FGFR4 in complex with KLB. *PLoS One*. **7**:e33870.
- Yang Z, Li R, Ao J, Wa QD, Zhang Y, Chen L, *et al.* (2018) miR-1307-3p suppresses the chondrogenic differentiation of human adipose-derived stem cells by targeting BMP2. *Int J Mol Med*. **42**:3115-24.

- Ye R, Wang M, Wang QA, Scherer PE (2015) Adiponectin-mediated antilipotoxic effects in regenerating pancreatic islets. *Endocrinology*. **156**:2019-28.
- Yeo CR, Agrawal M, Hoon S, Shabbir A, Shrivastava MK, Huang S, *et al.* (2017) SGBS cells as a model of human adipocyte browning: A comprehensive comparative study with primary human white subcutaneous adipocytes. *Sci Rep*. **7**:4031.
- Yoneshiro T, Aita S, Kawai Y, Iwanaga T, Saito M (2012) Nonpungent capsaicin analogs (capsinoids) increase energy expenditure through the activation of brown adipose tissue in humans. *Am J Clin Nutr*. **95**:845-50.
- Yoneshiro T, Aita S, Matsushita M, Kayahara T, Kameya T, Kawai Y, *et al.* (2013) Recruited brown adipose tissue as an antiobesity agent in humans. *J Clin Invest*. **123**:3404-8.
- Yu Y, He J, Li S, Song L, Guo X, Yao W, *et al.* (2016) Fibroblast growth factor 21 (FGF21) inhibits macrophage-mediated inflammation by activating Nrf2 and suppressing the NF-kappaB signaling pathway. *Int Immunopharmacol*. **38**:144-52.
- Zamani N, Brown CW (2011) Emerging roles for the transforming growth factor- $\beta$  superfamily in regulating adiposity and energy expenditure. *Endocr Rev*. **32**:387-403.
- Zaragosi LE, Wdziekonski B, Villageois P, Keophiphath M, Maumus M, Tchkonja T, *et al.* (2010) Activin A plays a critical role in proliferation and differentiation of human adipose progenitors. *Diabetes*. **59**:2513-21.
- Zechner R (2015) FAT FLUX: enzymes, regulators, and pathophysiology of intracellular lipolysis. *EMBO Mol Med*. **7**:359-62.
- Zechner R, Kienesberger PC, Haemmerle G, Zimmermann R, Lass A (2009) Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. *J Lipid Res*. **50**:3-21.
- Zechner R, Langin D (2014) Hormone-sensitive lipase deficiency in humans. *Cell Metab*. **20**:199-201.
- Zechner R, Strauss JG, Haemmerle G, Lass A, Zimmermann R (2005) Lipolysis: pathway under construction. *Curr Opin Lipidol*. **16**:333-40.
- Zhang X, Yeung DC, Karpisek M, Stejskal D, Zhou ZG, Liu F, *et al.* (2008) Serum FGF21 levels are increased in obesity and are independently associated with the metabolic syndrome in humans. *Diabetes*. **57**:1246-53.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. **372**:425-32.
- Zhou Y, Carmona S, Muhammad A, Bell S, Landeros J, Vazquez M, *et al.* (2019) Restoring mitofusin balance prevents axonal degeneration in a Charcot-Marie-Tooth type 2A model. *J Clin Invest*. **130**:1756-71.
- Zhu M, Heydarkhan-Hagvall S, Hedrick M, Benhaim P, Zuk P (2013) Manual isolation of adipose-derived stem cells from human lipoaspirates. *J Vis Exp*. e50585.

Zhu S, Ma L, Wu Y, Ye X, Zhang T, Zhang Q, *et al.* (2014) FGF21 treatment ameliorates alcoholic fatty liver through activation of AMPK-SIRT1 pathway. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. **46**:1041-8.

Zimmermann R, Haemmerle G, Wagner EM, Strauss JG, Kratky D, Zechner R (2003) Decreased fatty acid esterification compensates for the reduced lipolytic activity in hormone-sensitive lipase-deficient white adipose tissue. *J Lipid Res*. **44**:2089-99.

Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R, Riederer M, *et al.* (2004) Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science*. **306**:1383-6.

Zolotov S, Xing C, Mahamid R, Shalata A, Sheikh-Ahmad M, Garg A (2017) Homozygous LIPE mutation in siblings with multiple symmetric lipomatosis, partial lipodystrophy, and myopathy. *Am J Med Genet A*. **173**:190-4.

Zuchner S, De Jonghe P, Jordanova A, Claeys KG, Guergueltcheva V, Cherninkova S, *et al.* (2006) Axonal neuropathy with optic atrophy is caused by mutations in mitofusin 2. *Ann Neurol*. **59**:276-81.

Zuchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, Dadali EL, *et al.* (2004) Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet*. **36**:449-51.

Zuchner S, Vance JM (2006) Molecular genetics of autosomal-dominant axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular Med*. **8**:63-74.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, *et al.* (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. **7**:211-28.

Zuriaga MA, Fuster JJ, Gokce N, Walsh K (2017) Humans and Mice Display Opposing Patterns of "Browning" Gene Expression in Visceral and Subcutaneous White Adipose Tissue Depots. *Front Cardiovasc Med*. **4**:27.





## Functional Human Beige Adipocytes From Induced Pluripotent Stem Cells

Anne-Claire Guénantin,<sup>1,2</sup> Nolwenn Briand,<sup>1</sup> Emilie Capel,<sup>1</sup> Florent Dumont,<sup>3</sup> Romain Morichon,<sup>1</sup> Claire Provost,<sup>4</sup> Francesca Stillitano,<sup>5</sup> Dorota Jeziorowska,<sup>6</sup> Jean-Pierre Siffroi,<sup>7</sup> Roger J. Hajjar,<sup>5</sup> Bruno Fève,<sup>1,8</sup> Jean-Sébastien Hulot,<sup>5,6</sup> Philippe Collas,<sup>9,10</sup> Jacqueline Capeau,<sup>1</sup> and Corinne Vigouroux<sup>1,8,11</sup>

*Diabetes* 2017;66:1470–1478 | <https://doi.org/10.2337/db16-1107>

**Activation of thermogenic beige adipocytes has recently emerged as a promising therapeutic target in obesity and diabetes. Relevant human models for beige adipocyte differentiation are essential to implement such therapeutic strategies. We report a straightforward and efficient protocol to generate functional human beige adipocytes from human induced pluripotent stem cells (hiPSCs). Without overexpression of exogenous adipogenic genes, our method recapitulates an adipogenic developmental pathway through successive mesodermal and adipogenic progenitor stages. hiPSC-derived adipocytes are insulin sensitive and display beige-specific markers and functional properties, including upregulation of thermogenic genes, increased mitochondrial content, and increased oxygen consumption upon activation with cAMP analogs. Engraftment of hiPSC-derived adipocytes in mice produces well-organized and vascularized adipose tissue, capable of  $\beta$ -adrenergic-responsive glucose uptake. Our model of human beige adipocyte development provides a new and scalable tool for disease modeling and therapeutic screening.**

The role of adipose tissue in the regulation of energy metabolism has been recently revisited with the discovery

of brown and beige fat in human adults (1). Whereas white adipocytes store triglycerides, brown adipocytes carry out efficient thermogenesis through mitochondrial uncoupling. A third type of adipocytes, named “brite” or “beige,” was recently shown to also dissipate energy upon induction by thermogenic stimuli (2,3). Beige adipocytes display a distinct molecular signature and may constitute the majority of energy-dissipating cells in human adults. As thermogenic activity of adipose tissue inversely correlates with the risk of obesity and diabetes (4), therapies aiming to activate beige adipocytes may offer perspectives to face metabolic diseases.

As prerequisite, robust knowledge of developmental pathways leading to brown or beige adipocytes in humans is paramount (5). Human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) could provide highly relevant models to achieve this goal; however, current protocols of hiPSC differentiation into adipocytes are relatively inefficient. These rely on derivation of mesenchymal stem cells (MSCs) or embryoid bodies before applying an adipogenic stimulus (6) or on overexpression of adipogenic genes (7). These protocols however bypass key adipogenic signaling pathways, hampering developmental and physiological studies.

<sup>1</sup>Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie, INSERM UMR\_S938, Centre de Recherche Saint-Antoine, Institute of Cardiometabolism and Nutrition, Paris, France

<sup>2</sup>Metabolic Research Laboratories, Addenbrooke's Treatment Centre, Institute of Metabolic Science, Addenbrooke's Hospital, University of Cambridge, Cambridge, U.K.

<sup>3</sup>Institut Cochin, Université Paris Descartes, INSERM U1016, Paris, France

<sup>4</sup>Plateforme LIMP, UMS28 Phénotypage du petit animal, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

<sup>5</sup>Cardiovascular Research Center, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY

<sup>6</sup>Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie, UMR\_S1166, Institute of Cardiometabolism and Nutrition, France

<sup>7</sup>Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Service de Génétique et d'Embryologie Médicales, Hôpital Trousseau, Paris, France

<sup>8</sup>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Service d'Endocrinologie, Hôpital Saint-Antoine, Paris, France

<sup>9</sup>Department of Molecular Medicine, Institute of Basic Medical Sciences, Faculty of Medicine, University of Oslo, Oslo, Norway

<sup>10</sup>Norwegian Center for Stem Cell Research, Oslo University Hospital, Oslo, Norway

<sup>11</sup>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Laboratoire Commun de Biologie et Génétique Moléculaires, Hôpital Saint-Antoine, Paris, France

Corresponding authors: Anne-Claire Guénantin, [anne-claire.guenantin@inserm.fr](mailto:anne-claire.guenantin@inserm.fr), and Nolwenn Briand, [nolwenn.briand@inserm.fr](mailto:nolwenn.briand@inserm.fr).

Received 11 September 2016 and accepted 2 March 2017.

This article contains Supplementary Data online at <http://diabetes.diabetesjournals.org/lookup/suppl/doi:10.2337/db16-1107/-/DC1>.

A.-C.G. and N.B. contributed equally to this work.

© 2017 by the American Diabetes Association. Readers may use this article as long as the work is properly cited, the use is educational and not for profit, and the work is not altered. More information is available at <http://www.diabetesjournals.org/content/licence>.

We report an efficient and scalable protocol to differentiate hiPSCs into beige adipocytes involving successive mesodermal and adipogenic induction steps. This unlimited source of human adipocytes, able to produce well-organized fat after engraftment *in vivo*, represents a powerful tool to model adipose tissue pathophysiology and develop new therapeutic approaches.

## RESEARCH DESIGN AND METHODS

### hiPSCs and Adipogenic Differentiation

We used hiPSC lines reprogrammed from fibroblasts of three individuals (Supplementary Table 1). Mesoderm differentiation was induced on day 0 (D0) in STEMPro34 with 2 mmol/L GlutaMAX (Life Technologies), 50  $\mu$ g/mL ascorbic acid (Sigma-Aldrich), 10 ng/mL bone morphogenic protein-4 (BMP4), and 25 ng/mL activin A (R&D Systems). On D4, adipose differentiation was induced in DMEM/F12 (Life Technologies) with 10% FCS, 10  $\mu$ g/mL insulin, 500  $\mu$ mol/L isobutylmethylxanthine (IBMX), 1  $\mu$ mol/L dexamethasone, and 50  $\mu$ mol/L indomethacin (Sigma-Aldrich). Adipocytes were cultured in DMEM/F12 with 10% FCS and 1  $\mu$ g/mL insulin (D10 to D20).

### Transcriptome Analysis

RNA was isolated from hiPSC#1 on D0, D4, D8, D12, and D20 of differentiation and hybridized onto Affymetrix Human Gene 2.0 ST arrays.

Immunofluorescence microscopy, immunohistochemistry, RT-quantitative PCR (RT-qPCR), and Western blot were performed using standard procedures (Supplementary Tables 2 and 3). Protein and mRNA extracts from PAZ6 cells, before and/or after 20 days of differentiation, were obtained from Antonio Vidal-Puig (Institute of Metabolic Science, Cambridge, U.K.).

### Oxygen Consumption Measurements

Cells were harvested on D20 and transferred to Oxoplate OP96C (PreSens).  $PO_2$  was measured using FlexStation3 (Molecular Devices) supplied with SoftMax ProMicroplate Data Acquisition and Analysis Software.

### Adipocyte Transplantation

Ten million hiPSC#1 were harvested on D18 of differentiation (TrypLE Express; Life Technologies), resuspended in a DMEM/F12/Matrigel solution (1:1) containing 10  $\mu$ g/mL insulin, 100  $\mu$ mol/L IBMX, 1  $\mu$ mol/L dexamethasone, and 50  $\mu$ mol/L indomethacin, and subcutaneously injected in the back of 6-week-old FoxN1<sup>Nu</sup> athymic mice (Taconic Biosciences). As controls,  $3 \times 10^7$  hiPSC-derived MSCs differentiated as previously described (8) and characterized by FACS (Supplementary Table 2), or Matrigel only, were injected subcutaneously in the sternum region of the same mice. Engrafted cells were excised after 30 days.

### In Vivo Stimulation and <sup>18</sup>Fluorodeoxyglucose Uptake Analysis of Neoformed Fat Pads

Mice were subcutaneously injected daily with 100  $\mu$ L isoproterenol (5  $\mu$ mol/L; Sigma-Aldrich) or PBS for 7 days,

fasted for 6 h with free access to water, and then injected with 100  $\mu$ L isoproterenol and 5 MBq <sup>18</sup>F-fluorodeoxyglucose (<sup>18</sup>FDG) in the retro-orbital sinus. After 75 min, mice were euthanized and fat pads removed and weighed. Counts per minute of <sup>18</sup>F were measured (gamma counter Wizard 1480; PerkinElmer). The percentage of injected <sup>18</sup>FDG per gram of tissue was calculated after correction (<sup>18</sup>F decay).

### Statistical Analyses

Mean  $\pm$  SEM of at least three independent experiments are shown. Significance ( $P < 0.05$ ) was tested with non-parametric unpaired Mann-Whitney *U* test unless indicated otherwise.

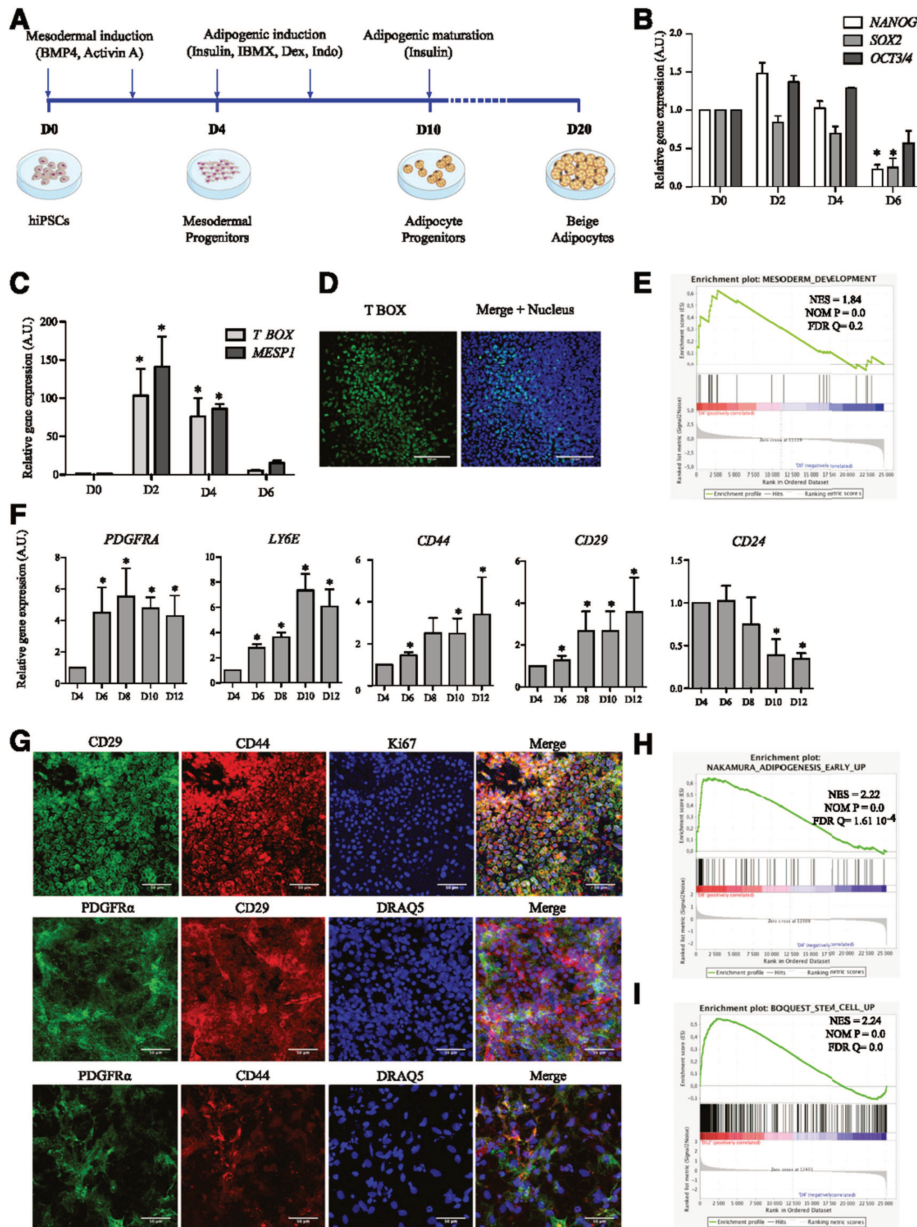
## RESULTS

### Adipogenic Differentiation of hiPSCs via Small Molecule-Driven Mesodermal Induction

Adipogenesis and angiogenesis are tightly interdependent during embryonic development and adulthood (9), and human beige adipocyte progenitors proliferate in association with capillary networks (10). We therefore rationalized that inducing mesodermal differentiation of hiPSCs in a medium supporting hematopoietic differentiation would enhance subsequent white and/or beige adipose differentiation.

To test this hypothesis, we subjected three hiPSC lines (Supplementary Table 1 and Supplementary Fig. 1A–E) to a three-step adipogenic differentiation procedure recapitulating mesodermal induction, adipogenic stimulation, and adipogenic maturation (Fig. 1A). First, BMP4 and activin A, two mesodermal inducers, elicit differentiation of subconfluent plated hiPSCs. In addition to the decreased expression of pluripotency genes from D0 onwards (Fig. 1B and Supplementary Fig. 1F), mesodermal induction is shown by transient expression of transcripts of the mesodermal markers *TBOX* (*T-brachyury* homolog) and *MESP1* (Fig. 1C and Supplementary Fig. 1G), expression of T BOX protein (Fig. 1D), and transcriptome analysis revealing significant correlations of genes directly implicated in mesoderm development on D4 (Fig. 1E and Supplementary Fig. 3C).

Second, D4 mesodermal precursors are subjected to an adipogenic cocktail without thiazolidinedione. From D4 to D12, mRNA expression of the adipose progenitor cell markers *PDGFRA*, *LY6E* (human homolog of murine *Sca1*), *CD44*, and *CD29* increases, whereas *CD24* expression decreases, in agreement with an adipogenic commitment (11) (Fig. 1F and Supplementary Fig. 2A). PDGFR $\alpha$ , CD44, and CD29 proteins are coexpressed, and cells are positive for the proliferation marker Ki67 (Fig. 1G). Transcriptome analysis reveals consecutive waves of transcriptional activation and repression consistent with recent transcriptome profiling by RNA sequencing in differentiating human primary adipose progenitors (Supplementary Fig. 3A and B) (12). Gene set enrichment analysis (GSEA) further indicates that on D8 relative to D4, genes upregulated in hiPSC-derived cells strongly correlate with gene sets upregulated during early adipogenic differentiation (13) (Fig. 1H and Supplementary Fig. 3D). On D12, the



**Figure 1**—hiPSC-derived mesodermal progenitors efficiently differentiate into adipose progenitors. **A**: Experimental scheme for the differentiation of hiPSCs into beige adipocytes. RT-qPCR analysis of expression of indicated pluripotency markers (**B**) and mesodermal transcription factors (**C**) in hiPSC#1 clone from D0 to D6 (mean ± SEM arbitrary units [A.U.] relative to D0;  $n \geq 3$  independent experiments; \* $P < 0.05$  relative to D0, Mann-Whitney  $U$  test). **D**: T BOX immunostaining of mesodermal progenitors issued from hiPSC#1 (D4). Nuclei were stained with DRAQ5 (blue). Scale bars = 100 μm. **E**: GSEA of hiPSC-derived cells on D4 vs. D0 using the mesoderm development Gene Ontology gene set (GO:0007498),  $n \geq 3$  experiments. **F**: Time-course RT-qPCR analysis of expression of indicated genes after adipogenic induction of hiPSC#1 (D4 to D12; mean ± SEM A.U. relative to D4;  $n \geq 3$  experiments; \* $P < 0.05$  relative



transcriptome of hiPSC-derived adipose progenitors is remarkably similar to that of adult human primary adipose stem cells (Fig. 1I and Supplementary Fig. 3E) (14). Thus, adipogenic induction of hiPSC-derived mesodermal precursors drives the emergence of proliferating adipose progenitors.

#### High-Yield Adipogenic Differentiation

The third step of differentiation consists of culturing hiPSC-derived adipose progenitors (from D10 onwards) under conditions supporting adipogenic differentiation and maturation. We find that transcripts of CCAAT/enhancer-binding proteins *CEBPA*, *CEBPB*, and *CEBPD* and of the master adipogenic transcription factor *PPARG* are robustly induced from D10 to D20 (Fig. 2A and Supplementary Fig. 2B). In accordance, the adipose-specific protein isoforms *PPAR $\gamma$ 2* and *C/EBP $\alpha$  p30/p42* and the mature adipose proteins insulin receptor (IR), perilipin 1, caveolin 1, and GLUT4 are induced (Fig. 2B and C). hiPSC-derived adipocytes store triglycerides, as shown by Nile Red, Oil Red O, and BODIPY staining, and respond to insulin through phosphorylation of the IR- $\beta$  subunit and its downstream target AKT/PKB (Fig. 2C–E). Collectively, these results demonstrate that hiPSCs efficiently differentiate into functional, hormone-responsive adipocytes within 20 days.

#### hiPSC-Derived Adipocytes Display a Beige Phenotype In Vitro

Lineage tracing studies identified PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> cells as bipotential adipose progenitors able to differentiate toward white and beige adipocytes in vivo (15). Therefore, we examined beige/brown markers expressed from D4 to D20 in hiPSC-derived cells. Remarkably, we note the mRNA induction of uncoupling protein-1 (*UCP1*) and of the transcription factors *PGC1A* and *PRDM16* that characterize beige and brown adipocytes (5) (Fig. 3A and Supplementary Fig. 2C). However, progenitor or mature brown adipocyte markers *MYF5* or *ZIC1* are not detected throughout differentiation (not shown), suggesting that hiPSC-derived cells are not of the brown adipocyte lineage. In addition, the beige adipocyte markers *CITED1*, *TMEM26*, *CD137*, *HOXC9*, *EPST11*, *CAR4*, *MTUS1*, and *KCNK3* (16) are upregulated during differentiation (Fig. 3B and Supplementary Fig. 2D) and we confirm *PRDM16* and *UCP1* protein expression by Western blotting (Fig. 3C). Moreover, *PRDM16* and *CITED1* proteins are clearly detected by immunofluorescence in nuclei of Nile Red-positive cells (Fig. 3D). We also compared the expression of the thermogenic markers *UCP1* and *PRDM16* in hiPSC-derived adipocytes and in PAZ6 cells, an established model of human thermogenic adipocytes (17). Protein

and mRNA expression of these markers were comparable in both cell models, studied at baseline and/or after 20 days of differentiation (Fig. 3E). These results confirm the thermogenic phenotype of hiPSC-derived adipocytes and collectively indicate that hiPSC-derived differentiated cells harbor a beige phenotype.

A key functional feature of beige adipocytes is their capacity to activate a thermogenic program under long-term  $\beta$ -adrenergic stimulation (3). Accordingly, treatment of D20 hiPSC-derived adipocytes with the cAMP analog 8Br-cAMP for 48 h significantly upregulates thermogenic genes, including *PGC1A*, *PRDM16*, *PPARA*, and *DIO2* (Fig. 3F), increases intracellular mitochondrial content and *UCP1* staining, and induces a shrinking of lipid droplets (Fig. 3G and H). We did not observe any increase in the mRNA expression of *UCP1* after 8Br-cAMP stimulation in our model (Fig. 3F). However, it was previously shown that *UCP1* mRNA levels do not consistently correlate with the thermogenic capacity of beige adipocytes (18). In addition, hiPSC-derived adipocytes display a 2.5-fold increase in oxygen consumption in response to acute 8Br-cAMP stimulation (Fig. 3I). Thus, hiPSC-derived adipocytes show typical beige functional properties.

#### hiPSC-Derived Adipocytes Give Rise to Adipose Tissue In Vivo

Subcutaneous injection of hiPSC-derived adipocytes specifically results in the neo-formation of fat pads positively stained for human-specific antibodies (Fig. 4A, B, and G and data not shown). hiPSC-derived adipocytes were organized in a fully differentiated and vascularized adipose tissue, in contrast to tissues formed from hiPSC-derived MSCs (Fig. 4C). Moreover, hiPSC-derived adipose tissue contains clusters of terminally differentiated beige multilocular adipocytes, as shown by perilipin 1, *UCP1*, *PRDM16*, *DIO2*, and *CITED1* staining (Fig. 4D, E, and G).

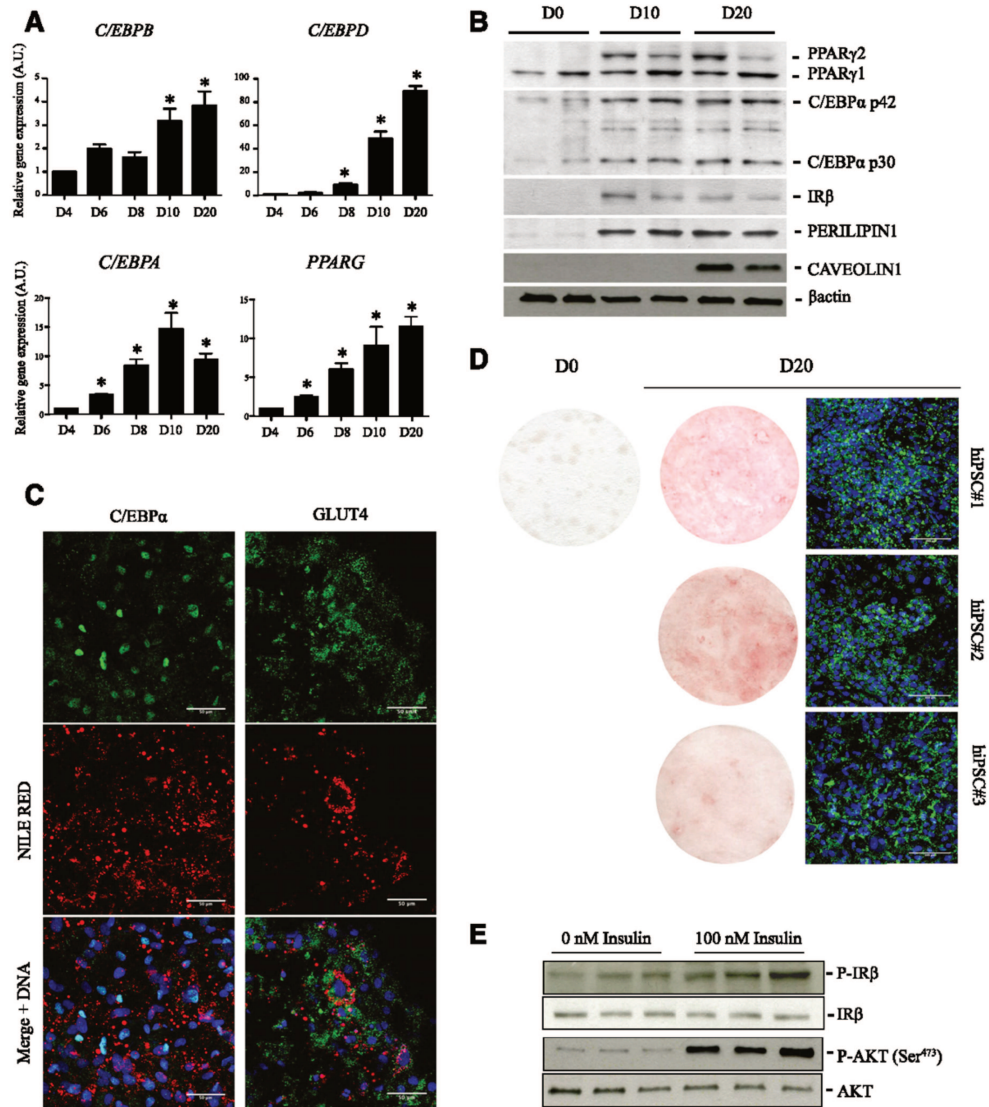
In vivo, beige and brown adipose tissues respond to  $\beta$ -adrenergic stimulation by increasing glucose uptake (1). Accordingly, after acute isoproterenol stimulation, <sup>18</sup>F<sup>18</sup>FDG uptake is increased in neofomed pads pretreated with isoproterenol for 7 days (Fig. 4F). Importantly, in these long-term stimulated pads, *UCP1*, *PRDM16*, *CITED1*, and *DIO2* levels are enhanced while the diameter of most adipocytes is reduced and their mitochondrial content is increased (Fig. 4G), consistent with a  $\beta$ -adrenergic-mediated increase in thermogenic activity.

We describe a straightforward and efficient protocol to derive from hiPSC adipocytes able to form bona fide human adipose tissue of dual white/beige phenotype. hiPSC-derived adipocytes are capable of responding to a

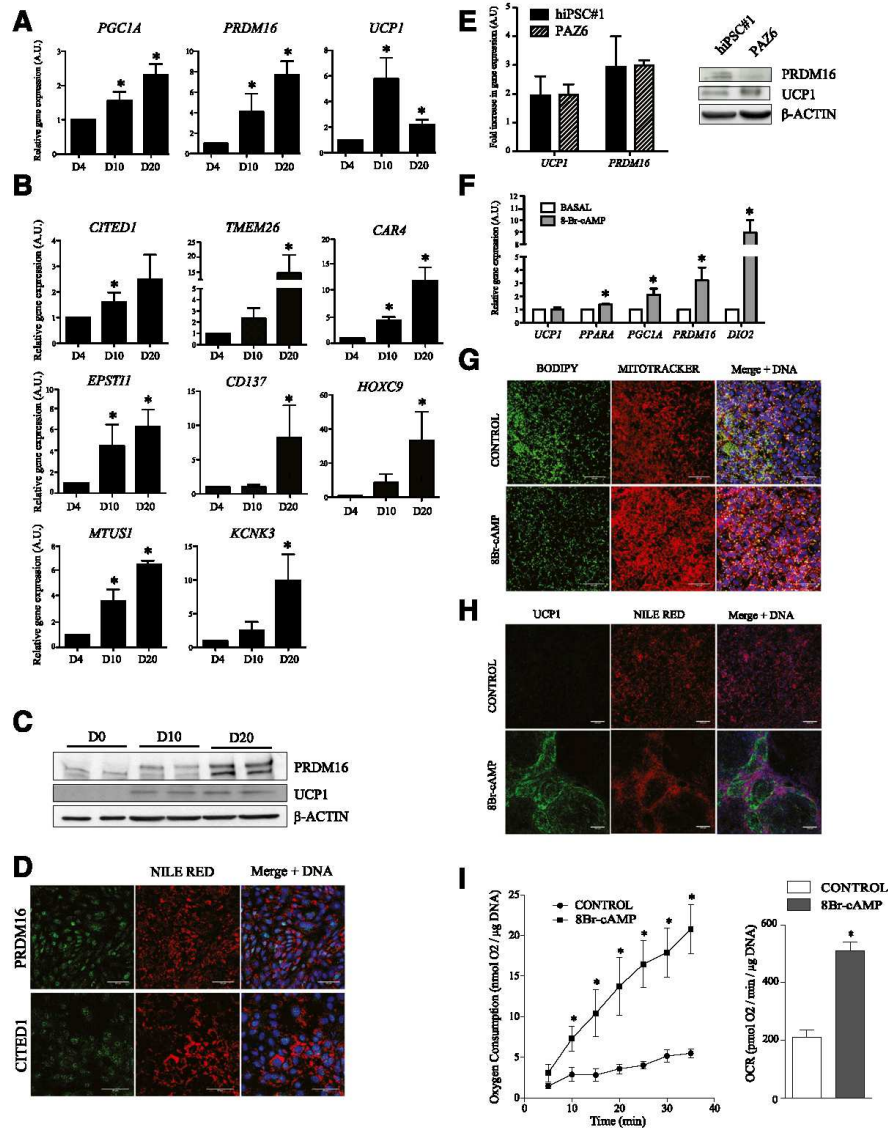
---

to D4; Mann-Whitney *U* test). G: Immunodetection of markers of adipose progenitors and of cell proliferation (Ki67) on D10. Nuclei were stained with DRAQ5. Scale bars = 50  $\mu$ m. H and I: GSEA of hiPSC-derived cells using published data sets, with early adipogenesis transcriptomic signatures on D8 vs. D4 (H) and human adult adipose stromal cell signature on D12 vs. D4 (I) (*n* = 3 independent experiments).

---

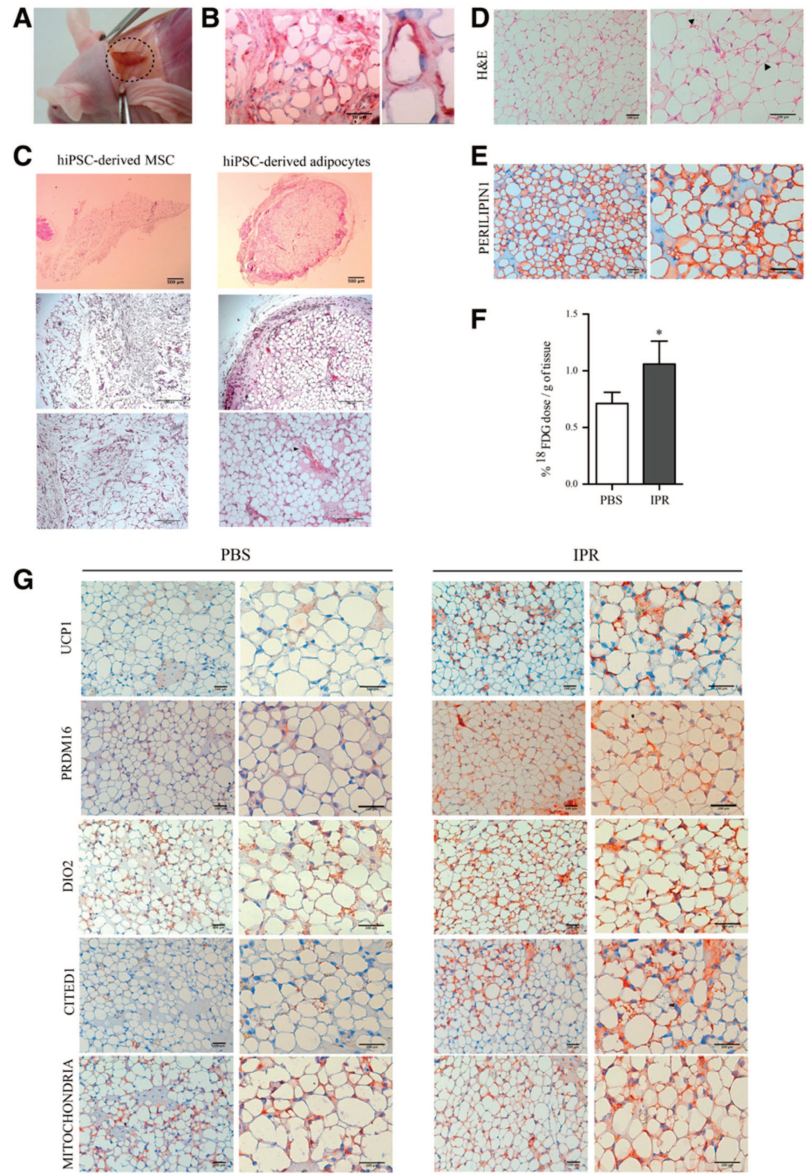


**Figure 2**—hiPSCs differentiate into adipocytes. **A:** Time-course mRNA expression of indicated adipocyte transcription factors during differentiation of hiPSC#1 (mean ± SEM arbitrary units [A.U.] relative to D4;  $n \geq 3$  experiments; \* $P < 0.05$  relative to D4, Mann-Whitney  $U$  test). **B:** Detection of PPAR- $\gamma$ 1, PPAR- $\gamma$ 2, C/EBP $\alpha$  p30/p42, IR- $\beta$ , perilipin 1, and caveolin 1 in hiPSC#1 on D0, D10, and D20.  $\beta$ -Actin was used as loading control. Duplicate lanes shown are from duplicate differentiation wells. **C:** Immunodetection of C/EBP $\alpha$  and GLUT4 in lipid-containing (Nile Red) adipocytes (hiPSC#1) on D20. Scale bars = 50  $\mu$ m. **D:** Oil Red O (left panels) and BODIPY (right panel) staining of adipocyte-differentiated hiPSC#1, hiPSC#2, and hiPSC#3 on D0 and/or D20. Cells were fixed in 3.2% paraformaldehyde for 20 min and incubated for 1 h in Oil Red O (O0625; Sigma-Aldrich) diluted in isopropanol. Scale bars = 100  $\mu$ m. **E:** Short-term insulin-mediated phosphorylation of IR- $\beta$  and AKT/PKB evaluated using phosphospecific and pan antibodies in hiPSC#1 on D20. Differentiated adipocytes were deprived in insulin and serum for 12 h before 10 min incubation in 100 nmol/L insulin (Sigma-Aldrich), and then immediately lysed and processed for Western blotting. Triplicate lanes are from three independent stimulation experiments.



**Figure 3**—hiPSC-derived adipocytes display beige properties. Time-course mRNA expression of beige/brown adipocyte markers (A) and beige adipocyte-specific genes (B) (mean  $\pm$  SEM arbitrary units [A.U.] relative to D4;  $n \geq 3$  experiments; \* $P < 0.05$  relative to D4, Mann-Whitney  $U$  test). C: PRDM16 and UCP1 protein expression on D0, D10, and D20. D: PRDM16 and CITED1 immunostaining on D20 in lipid-containing (Nile Red) adipocytes. Scale bars = 50  $\mu$ m. E: Comparison of PRDM16 and UCP1 mRNA and protein expression in hiPSC-derived adipocytes and in PAZ6 cells, at baseline and/or after 20 days of differentiation. F: Relative levels of expression of indicated genes in hiPSC-derived adipocytes at D20 treated or not with 1 mmol/L 8Br-cAMP (Sigma-Aldrich) for 48 h (mean  $\pm$  SEM A.U. relative to D4;  $n \geq 3$  experiments; \* $P < 0.05$  relative to D4; Mann-Whitney  $U$  test). Mitochondrial content (MitoTracker) (G) and UCP1 immunostaining (H) in lipid-containing cells (BODIPY or Nile Red, as indicated) analyzed as in F. Cells were incubated with 1  $\mu$ mol/L MitoTracker Red CMXRos (Life Technologies) for 45 min and fixed with 3.2% paraformaldehyde for 15 min. Scale bars = 50  $\mu$ m. I: Time-course analysis of oxygen consumption (left) and oxygen consumption rates (OCR, right) in hiPSC#1-derived adipocytes at D20 stimulated or not with 8Br-cAMP (mean  $\pm$  SEM;  $n \geq 3$ ; \* $P < 0.05$  relative to control, Mann-Whitney  $U$  test). PO<sub>2</sub> values were plotted over time to calculate OCR from the slope.





**Figure 4**—hiPSC-derived adipocytes generate adipose tissue in vivo. *A*: Macroscopic view of a neoformed fat pad developed from hiPSC-derived adipocytes. *B*: Human cytoplasmic staining of neoformed adipose tissue ( $n \geq 3$ ). *C*: Hematoxylin-eosin (H&E) staining of fat pads developed from hiPSC-derived MSCs or hiPSC-derived adipocytes. Arrowheads indicate blood vessels. Scale bars = 500  $\mu\text{m}$  (top), 200  $\mu\text{m}$  (middle), 100  $\mu\text{m}$  (bottom) ( $n \geq 3$ ). Staining of a neoformed fat pad developed from hiPSC-derived adipocytes with H&E (*D*) or antibodies against perilipin 1 (*E*). Arrowheads indicate multilocular adipocytes. Scale bars = 100  $\mu\text{m}$  ( $n \geq 3$  independent experiments). *F*: <sup>18</sup>F-FDG uptake in neoformed fat pads after hiPSC-derived adipocyte engraftment in immunodeficient mice treated with vehicle (PBS) or isoproterenol (IPR; mean  $\pm$  SEM;  $n \geq 3$  independent experiments; \* $P < 0.05$  relative to PBS control, Wilcoxon signed rank test). *G*: Immunostaining of a neoformed fat pad developed from hiPSC-derived adipocytes for UCP1, PRDM16, DIO2, CITED1, and a human-specific mitochondrial marker (targeted by the MAB1273 antibody) in basal (PBS) and stimulated (IPR) conditions. Scale bars = 100  $\mu\text{m}$ .

$\beta$ -adrenergic stimulation in vivo, indicative of their functional relevance for developmental and metabolic pathophysiological studies of adipose tissue.

## DISCUSSION

Metabolically active adipose tissues arise from mesoderm, and intrinsic properties of discrete body fat depots suggest distinct mesodermal origins (5). A key feature of the adipose differentiation protocol reported here is the derivation of human beige adipocytes after an initial mesodermal induction. Importantly, our protocol is distinct from existing pluripotent cell-based adipogenic protocols by its approach and end point: 1) it relies on a developmental mesodermal induction of hiPSCs rather than a differentiation through the previously described derivation of MSCs (7,19); 2) adipocytes are obtained without overexpression of adipogenic transcription factors, which have been used to force and accelerate adipocyte differentiation by others (7,20); 3) it requires a simple bidimensional cell culture, avoiding the initial derivation of embryoid bodies, which necessitates further selection and cellular dissociation, as performed classically (7,19,21–25); 4) it is fast, allowing differentiated adipocytes to be obtained within 20 days, whereas other protocols require at least 48 days (19–25); 5) it leads to functional adipocytes with a beige phenotype and respiratory function; and 6) hiPSC-derived adipocytes can form well-organized and vascularized adipose tissue in vivo, capable of  $\beta$ -adrenergic-responsive glucose uptake.

Adipogenic induction of mesodermal cells give rise to a progenitor population closely related to adult primary adipose stromal cells (14) and expressing markers such as *PDGFRA*, *LY6E*, *CD29*, and *CD44* (26). Of relevance to the markers examined here,  $CD29^+$  human adipose progenitors were recently shown to display strong potential to differentiate toward thermogenic adipocytes in vitro (27). A  $Sca1(LY6E)^+/PDGFR\alpha^+$  population has also been shown to give rise to both  $UCP1^+$  and  $UCP1^-$  cells in vivo in mice (28), and a  $PDGFR\alpha^+/CD44^+$  progenitor population can be differentiated into beige or white adipocytes in response to  $\beta_3$  agonists or to a high-fat diet (15). These studies suggest that white and beige adipocytes could derive from a  $PDGFR\alpha^+$  common progenitor, although they may also potentially originate from bidirectional differentiation depending on the fat depot (29,30). Accordingly, in vitro and in vivo differentiation of hiPSC-derived adipose progenitors gives rise to adipocytes displaying beige markers and a functional beige adipocyte response. Mesodermal induction of hiPSCs in hematopoietic medium introduced in our protocol may favor a thermogenic adipose phenotype. In accordance, human beige adipocytes develop in association with capillary networks, and angiogenesis regulates beige adipocyte differentiation via a paracrine mechanism (10,31). In addition, BMP4, used for mesodermal induction in our protocol, may direct adipocytes toward a beige phenotype, as demonstrated for human adult preadipocytes (32). Beige adipocytes are likely present, albeit in small amounts, in various human adipose depots and may constitute an important subset of thermogenic cells in adults (2,3). The scalability of our protocol makes

it a valuable tool to provide an unlimited source of cells to model beige adipose tissue development and physiology, and for metabolic investigations, including therapeutic screening.

**Acknowledgments.** The authors thank C. Cowan (Harvard Department of Stem Cell and Regenerative Biology) for the hiPSC#1 cell line, A. Vidal-Puig and S. Carobbio (Institute of Metabolic Science, University of Cambridge) for the protein and mRNA extracts from PAZ6 cells, L. Douay and L. Kobari (Centre de Recherche Saint-Antoine, INSERM UMR\_S938) for cDNA from hES cells, T. Ledent (Centre de Recherche Saint-Antoine, INSERM UMR\_S938) for help with in vivo experiments, and S. Dumont and F. Merabene (Unité Mixte de Service d'Imagerie et de Cytométrie [UMS30 LUMIC], INSERM/Université Pierre et Marie Curie) for help with immunohistochemistry.

**Funding.** This work was supported by the Institute of Cardiometa-bolism and Nutrition (ANR-10-IAHU-06), INSERM, Université Pierre et Marie Curie, Société Francophone du Diabète/Pierre Fabre Médicament, and SATF-Lutec. A.-C.G. was funded by the Institute of Cardiometa-bolism and Nutrition, and N.B. by DIM-Biotherapies/STEM Pole and Fondation de France. R.J.H. is supported by grants from the National Institutes of Health National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) (R01 HL117505, HL119046, and P50 HL112324) and an NHLBI Program of Excellence in Nanotechnology (PEN) Award (contract HHSN268201000045C). P.C. is supported by the Research Council of Norway and the University of Oslo.

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

**Author Contributions.** A.-C.G. designed the study, developed protocols, analyzed transcriptomic data, and wrote the manuscript. N.B. designed the study, developed protocols, analyzed data, and wrote the manuscript. E.C. maintained and characterized hiPSCs and performed differentiation experiments and histology. F.D. analyzed transcriptomic data. R.M. performed image acquisitions. C.P. performed  $^{18}F$ FDG experiments. F.S. and D.J. provided hiPSC#2 and hiPSC#3, respectively, and helped with characterization. J.-P.S. performed karyotyping. R.J.H., B.F., J.-S.H., and P.C. contributed to the manuscript. J.C. contributed to study design and to the manuscript. C.V. contributed to study design and wrote the manuscript. A.-C.G. and N.B. are the guarantors of this work and, as such, had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

## References

1. Cypess AM, Lehman S, Williams G, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med* 2009;360:1509–1517
2. Lidell ME, Betz MJ, Dahlqvist Leinhard O, et al. Evidence for two types of brown adipose tissue in humans. *Nat Med* 2013;19:631–634
3. Cereijo R, Giralt M, Villarroya F. Thermogenic brown and beige/brite adipogenesis in humans. *Ann Med* 2015;47:169–177
4. Chondronikola M, Volpi E, Bersheim E, et al. Brown adipose tissue improves whole-body glucose homeostasis and insulin sensitivity in humans. *Diabetes* 2014;63:4089–4099
5. Kajimura S, Spiegelman BM, Seale P. Brown and beige fat: physiological roles beyond heat generation. *Cell Metab* 2015;22:546–559
6. Hafner AL, Dani C. Human induced pluripotent stem cells: a new source for brown and white adipocytes. *World J Stem Cells* 2014;6:467–472
7. Ahfeldt T, Schinzel RT, Lee YK, et al. Programming human pluripotent stem cells into white and brown adipocytes. *Nat Cell Biol* 2012;14:209–219
8. Denis JA, Rochon-Beaucourt C, Champon B, Pietu G. Global transcriptional profiling of neural and mesenchymal progenitors derived from human embryonic stem cells reveals alternative developmental signaling pathways. *Stem Cells Dev* 2011;20:1395–1409
9. Tang W, Zeve D, Suh JM, et al. White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science* 2008;322:583–586
10. Min SY, Kady J, Nam M, et al. Human 'brite/beige' adipocytes develop from capillary networks, and their implantation improves metabolic homeostasis in mice. *Nat Med* 2016;22:312–318

11. Berry R, Rodeheffer MS. Characterization of the adipocyte cellular lineage in vivo. *Nat Cell Biol* 2013;15:302–308
12. Shah A, Oldenburg A, Collas P. A hyper-dynamic nature of bivalent promoter states underlies coordinated developmental gene expression modules. *BMC Genomics* 2014;15:1186
13. Nakamura T, Shiojima S, Hirai Y, et al. Temporal gene expression changes during adipogenesis in human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;303:306–312
14. Boquest AC, Shahdadfar A, Frønsdal K, et al. Isolation and transcription profiling of purified uncultured human stromal stem cells: alteration of gene expression after in vitro cell culture. *Mol Biol Cell* 2005;16:1131–1141
15. Lee YH, Petkova AP, Mottlillo EP, Granneman JG. In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by  $\beta$ 3-adrenoceptor activation and high-fat feeding. *Cell Metab* 2012;15:480–491
16. de Jong JM, Larsson O, Cannon B, Nedergaard J. A stringent validation of mouse adipose tissue identity markers. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2015;308:E1085–E1105
17. Kazantzis M, Takahashi V, Hinkle J, et al. PAZ6 cells constitute a representative model for human brown pre-adipocytes. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2012;3:13
18. Nedergaard J, Cannon B. UCP1 mRNA does not produce heat. *Biochim Biophys Acta* 2013;183:943–949
19. Xiong ZM, LaDana C, Wu D, Cao K. An inhibitory role of progerin in the gene induction network of adipocyte differentiation from iPS cells. *Aging (Albany NY)* 2013;5:288–303
20. Moisan A, Lee YK, Zhang JD, et al. White-to-brown metabolic conversion of human adipocytes by JAK inhibition. *Nat Cell Biol* 2015;17:57–67
21. Haflner AL, Conlet J, Ravaut C, et al. Brown-like adipose progenitors derived from human induced pluripotent stem cells: identification of critical pathways governing their adipogenic capacity. *Sci Rep* 2016;6:32490
22. Nishio M, Yoneshiro T, Nakahara M, et al. Production of functional classical brown adipocytes from human pluripotent stem cells using specific hemopoietin cocktail without gene transfer. *Cell Metab* 2012;16:394–406
23. Taura D, Noguchi M, Sone M, et al. Adipogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells: comparison with that of human embryonic stem cells. *FEBS Lett* 2009;583:1029–1033
24. Noguchi M, Hosoda K, Nakane M, et al. In vitro characterization and engraftment of adipocytes derived from human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 2013;22:2895–2905
25. Mohsen-Kanson T, Haflner AL, Wdziekowski B, et al. Differentiation of human induced pluripotent stem cells into brown and white adipocytes: role of Pax3. *Stem Cells* 2014;32:1459–1467
26. Berry DC, Jiang Y, Graff JM. Emerging roles of adipose progenitor cells in tissue development, homeostasis, expansion and thermogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 2016;27:574–585
27. Xue B, Lynes MD, Dreyfuss JM, et al. Clonal analyses and gene profiling identify genetic biomarkers of the thermogenic potential of human brown and white preadipocytes. *Nat Med* 2015;21:760–768
28. Lee YH, Granneman JG. Seeking the source of adipocytes in adult white adipose tissues. *Adipocyte* 2012;1:230–236
29. Hyvönen MT, Spalding KL. Maintenance of white adipose tissue in man. *Int J Biochem Cell Biol* 2014;56:123–132
30. Rosenwald M, Wolfrum C. The origin and definition of brite versus white and classical brown adipocytes. *Adipocyte* 2014;3:4–9
31. Seki T, Hosaka K, Lim S, et al. Endothelial PDGF-CC regulates angiogenesis-dependent thermogenesis in beige fat. *Nat Commun* 2016;7:12152
32. Gustafson B, Hammarstedt A, Hedjazifar S, et al. BMP4 and BMP antagonists regulate human white and beige adipogenesis. *Diabetes* 2015;64:1670–1681



## Short communication

# Effects of ritonavir-boosted darunavir, atazanavir and lopinavir on adipose functions and insulin sensitivity in murine and human adipocytes

Emilie Capel<sup>1,2</sup>, Martine Auclair<sup>1,2</sup>, Martine Caron-Debarle<sup>1,2</sup>, Jacqueline Capeau<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>INSERM, UMR\_S 938, Faculté de Médecine Saint Antoine, Paris, France

<sup>2</sup>UPMC Univ Paris 06, UMR\_S 938, Paris, France

<sup>3</sup>AP-HP, Hôpital Tenon, Department of Biochemistry, Paris, France

\*Corresponding author e-mail: jacqueline.capeau@inserm.fr

**Background:** Ritonavir-boosted protease inhibitors (PIs) could adversely affect metabolism and adipose tissue to different extents, depending on the molecule. Using drugs with minimal adverse metabolic effects is an important consideration in at-risk HIV-infected patients. *In vitro* adipocyte models can be useful for comparing the effects of different PIs.

**Methods:** We compared the effects of darunavir, darunavir/ritonavir, atazanavir/ritonavir and lopinavir/ritonavir in murine and human adipocytes on differentiation, mitochondrial function, reactive oxygen species (ROS) production and insulin sensitivity.

**Results:** In human and murine adipocytes, differentiation evaluated by lipid content and protein expression of adipogenic markers, mitochondrial function evaluated by aggregation of the cationic dye JC-1 and by 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyltetrazolium bromide lysis, and mitochondrial mass evaluated by MitoTracker fluorescence and the expression of mitochondrial proteins were unaffected by darunavir, mildly affected by darunavir/ritonavir

and further altered by atazanavir/ritonavir and lopinavir/ritonavir. ROS production was unaltered by darunavir and darunavir/ritonavir but was increased by lopinavir/ritonavir and atazanavir/ritonavir. Regarding insulin sensitivity, darunavir and darunavir/ritonavir had no significant effect on insulin activation of protein kinase B (Akt/PKB) and MAP kinase and of glucose transport, whereas lopinavir/ritonavir and atazanavir/ritonavir partly impaired the effect of insulin. The effect of atazanavir/ritonavir was generally milder than that of lopinavir/ritonavir.

**Conclusions:** The various PIs differentially modified adipocyte functions. Darunavir alone did not affect adipocyte functions and only modestly altered differentiation and mitochondrial function when associated with ritonavir. Lopinavir/ritonavir adversely affected differentiation and lipid content, mitochondrial function, ROS production and insulin sensitivity, and the effect of atazanavir/ritonavir was intermediate. Thus, *in vitro*, darunavir/ritonavir presented a safer metabolic profile on adipocytes than atazanavir/ritonavir and lopinavir/ritonavir.

## Introduction

Protease inhibitors (PIs) are still widely used to control HIV infection. Because of the inhibitory effect of ritonavir (RTV) on cytochrome CYP3A4 activity, most PIs are used in combination with a boosting concentration of RTV. Although first-generation PIs, including full-dose ritonavir, exerted major adverse effects on insulin sensitivity, lipid parameters and probably on adipose tissue function and repartition, the effect of currently used PIs is less obvious. Several PIs have, however, been associated with an increased cardiovascular risk, only partly explained by their dyslipidaemic effect [1,2].

The PI effects on lipid parameters are markedly dependent upon the PI used [3]. In healthy volunteers, RTV-boosted lopinavir (LPV/r) increased low-density lipoprotein (LDL) cholesterol and triglyceride levels after 5 days, whereas atazanavir (ATV) had no effect [4]. In HIV-infected patients, RTV-boosted atazanavir (ATV/r) and darunavir (DRV/r) had minimal effects on lipid parameters [3]. In healthy volunteers, ATV/r and DRV/r only slightly and similarly increased LDL cholesterol and triglycerides and decreased high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, these effects being mainly related to the RTV boost [5]. Importantly, a once-daily dosing of



100 or 200 mg RTV to healthy volunteers decreased HDL and increased triglycerides in relation to the RTV dosage. These data further support the effect of RTV even at low dosages on lipid parameters [6].

In healthy volunteers, LPV/r but not ATV/r decreased insulin sensitivity. For ATV/r, insulin sensitivity was not modified when tested by the hyperinsulinaemic clamp technique but clearly altered during an oral glucose tolerance test [7]. DRV/r exhibited a slightly more favourable effect on insulin sensitivity than ATV/r [5]. Thus, the three PIs affected insulin sensitivity to different extents. They were also recently reported to differentially affect peripheral and visceral fat [8–10].

The three widely used PI combinations could therefore alter, to different extents, insulin sensitivity and fat metabolism. To evaluate their effect in more detail, we comparatively studied their ability to affect different adipocyte functions.

## Methods

### Cell cultures and treatment

Murine 3T3-F442A preadipocytes were cultured in 10% newborn calf serum and differentiated in 10% fetal calf serum (FCS) in the presence of insulin, biotin and panthothenic acid, as previously described [11]. Human preadipocytes (HWP, PromoCell, Heidelberg, Germany) were differentiated in 3% FCS according to the instructions of the manufacturer. At day 3 or 8 of the differentiation programme (day 0 [D0] of the PI-treatment period), murine or human cells were exposed for 5 days (D5) to clinically relevant concentrations of DRV (11.8  $\mu\text{mol/l}$ ), DRV/r (11.8/0.8  $\mu\text{mol/l}$ ) [12], LPV/r (15.9/1.4  $\mu\text{mol/l}$ ) [13], ATV/r (7.4/1.3  $\mu\text{mol/l}$ ) [14], or to the solvent (0.1% dimethyl sulfoxide [DMSO]). DRV was obtained from Janssen–Cilag/Tibotec (Issy-les-Moulineaux, France) and the other PIs purchased or obtained as previously reported [11]. The total protein concentration was determined in whole cells lysates with the Bradford protein assay (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France).

### Adipose cell differentiation

Adipose cell differentiation was evaluated by cell lipid accumulation and by the protein expression of adipose cell differentiation markers. Briefly, cells cultured in 12-well plates were fixed in 10% neutral buffered formalin solution and stained with Oil red O (0.6% in isopropanol 60%) for 2 h at 22°C. Cells were then solubilized in 10% SDS and staining was quantified at 520 nm [11]. Adipocyte differentiation markers were identified by antibodies directed against CCAAT/enhancer binding protein- $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ ; antibody sc-61), peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ; antibody sc-7196) and adipocyte protein-2 (aP2; antibody

sc-18661) all from Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA, USA), and fatty acid synthase (FAS; antibody 3180) from Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA);  $\beta$ -actin (A5441; Sigma-Aldrich, Saint Quentin-Fallavier, France) was used as a control of protein loading.

### Lipolysis

Lipolysis was evaluated at D0 and D5 of the PI treatment by the release of glycerol into the 3-day culture medium by using the free glycerol reagent kit (F6428; Sigma-Aldrich). The staining was measured at 540 nm and the results were expressed as nmol glycerol secreted per  $\mu\text{g}$  of cellular protein and normalized to Oil red O staining.

### Mitochondrial function

Mitochondrial function was estimated by the aggregation of the cationic dye JC-1 (T-3168; Molecular Probes, Eugene, OR, USA), an indicator of mitochondrial membrane potential [15] and by protein expression on western blot of cytochrome oxidase-2 (COX-2; antibody sc-23983, Santa Cruz Biotechnologies). The reduction of MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyltetrazolium bromide; Sigma-Aldrich; 250  $\mu\text{g/ml}$ ) was also used as an index of mitochondrial function. After 1 h at 37°C, MTT staining was solubilized in DMSO and quantified at 540 nm. Mitochondrial mass was measured by the fluorescent labelling of the MitoTracker Red 580 probe (MTR; M-22425, Molecular Probes) normalized to the DNA content [16] and by the protein expression of COX-4 (antibody MS-408; Mitosciences, Eugene, OR, USA) and porin (PC548; Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, C-6827 Germany);  $\beta$ -actin was used as an index of protein loading.

### Reactive oxygen species production

Reactive oxygen species (ROS) production was assessed by the oxidation of the CM-H<sub>2</sub>DCFDA derivatives (5-[and 6]-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester; Molecular Probes) and by the reduction of nitroblue tetrazolium (NBT) [11].

### Insulin sensitivity

The effect of insulin on protein kinase B (Akt/PKB) or extracellular-regulated kinase (ERK) activation was determined by western blot on whole-cell lysates from FCS-depleted cells stimulated for 10 min with insulin (100 nmol/l) using antibodies directed against Akt and p-Akt (sc-8313 and sc-7985-R; Santa Cruz Biotechnology) or ERK 1 and p-ERK (sc-93 and sc-7383; Santa Cruz Biotechnology).

Glucose transport was measured by incubating the cells for 2 h in glucose transport solution (pH 7.6) containing HEPES (12.5 mmol/l), NaCl (120 mmol/l), KCl

(5 mmol/l), MgSO<sub>4</sub> (1.2 mmol/l), CaCl<sub>2</sub> (1 mmol/l), NaHPO<sub>4</sub> (1 mmol/l), sodium pyruvate (2 mmol/l) and 2% BSA, with or without cytochalasin B (5 μmol/l). Insulin (100 nmol/l) and a mix containing 0.2 mmol/l 2-deoxy-glucose and 9.25 kBq 2-deoxy-D-[1-<sup>14</sup>C]glucose (2.2 GBq/mmol; GE-Healthcare, Saclay, France) were added successively for 30 and 5 min. Cells were washed with PBS, solubilized for 30 min with 0.1% SDS and counted. Insulin stimulation was expressed as a percentage of the basal value.

#### Statistical analysis

The experiments were generally repeated 3–5 times. Results are expressed as mean ± SEM relative to the protein or DNA content (MTR and ROS production). Statistical significance was determined using ANOVA and the Kruskal–Wallis non-parametric test, followed by a Fisher protected least significant difference test for pairwise differences. *P*-values of <0.05 were considered significant.

## Results

### Effect of PIs on adipocyte differentiation and lipid content

The adipocyte differentiation markers C/EBPα and PPARγ were increased in untreated murine (Figure 1A) and human (data not shown) adipocytes between D0 and D5 of the PI-treatment period, whereas the level of adipocyte markers FAS and aP2 were already maximal. The lipid content, as evaluated by Oil red O staining, increased by 1.5- and 2.2-fold in untreated murine and human adipocytes, respectively (Figure 1B).

At D5 of PI treatment, DRV did not alter the protein expression of the adipogenic markers, whereas ritonavir-boosted PIs decreased C/EBPα and PPARγ but not FAS and aP2 (Figure 1A). Lipid accumulation was unaffected by a 5-day treatment with DRV and DRV/r, whereas a 20–35% decrease was observed in murine and human adipocytes treated with ATV/r and LPV/r, respectively (Figure 1B). PI treatment did not alter the cellular protein level in murine or human adipocytes (Figure 1C), suggesting the absence of cell toxicity.

The level of glycerol released from the cells increased by 1.5-fold in the untreated control from D0 to D5. It was not increased by treatment with any PI as compared with the untreated control at D5 (data not shown), suggesting there was no involvement of lipolysis in the PI-induced decrease in lipid content.

### Effect of PIs on mitochondrial functions

Mitochondrial function was evaluated by JC-1 aggregation (murine adipocytes), protein expression of the mitochondrial DNA encoded protein COX-2 [16] and MTT lysis. The mitochondrial mass was evaluated by MTR

fluorescence and the expression of two mitochondrial constitutive proteins encoded by nuclear-DNA, COX-4 and porin.

DRV did not alter JC-1 aggregation, COX-2 expression, MTT lysis, MTR fluorescence or porin and COX-4 protein expression (Figure 2A–2D). DRV/r decreased MTT lysis by 30% but did not affect the other parameters. Conversely, LPV/r or ATV/r decreased JC-1 aggregation in murine adipocytes (by 44% and 38%, respectively), decreased MTT lysis by 50% and 35% (murine cells), and 35% and 27% (human cells), and increased porin and COX-4 expression and MTR fluorescence in murine and human adipocytes (Figure 2A–2D). These results indicated that ATV/r and LPV/r, but not DRV or DRV/r, induced mitochondrial dysfunction and a compensatory increase in mitochondria.

We then tested the ability of the PIs to increase ROS production by measuring the oxidation of CM-H<sub>2</sub>DCFDA and the reduction of NBT. DRV or DRV/r did not modify ROS production, whereas LPV/r or ATV/r increased CM-H<sub>2</sub>DCFDA oxidation and NBT reduction in murine and human adipocytes (Figure 2E and 2F).

### Effect of PIs on insulin sensitivity

Insulin activation of the metabolic Akt/PKB and mitogenic MAP-kinase pathways was not significantly altered by DRV alone or in association with RTV. The other PI combinations exerted a mild effect on these insulin-signalling pathways (Figure 3A and 3B). LPV/r or ATV/r markedly impaired insulin activation of glucose transport whereas DRV or DRV/r had no effect, indicating that this test had a higher sensitivity to detect insulin resistance than Akt/PKB phosphorylation (Figure 3C).

## Discussion

We show here that DRV/r exerted less adverse effects on cultured adipocytes than did ATV/r and LPV/r.

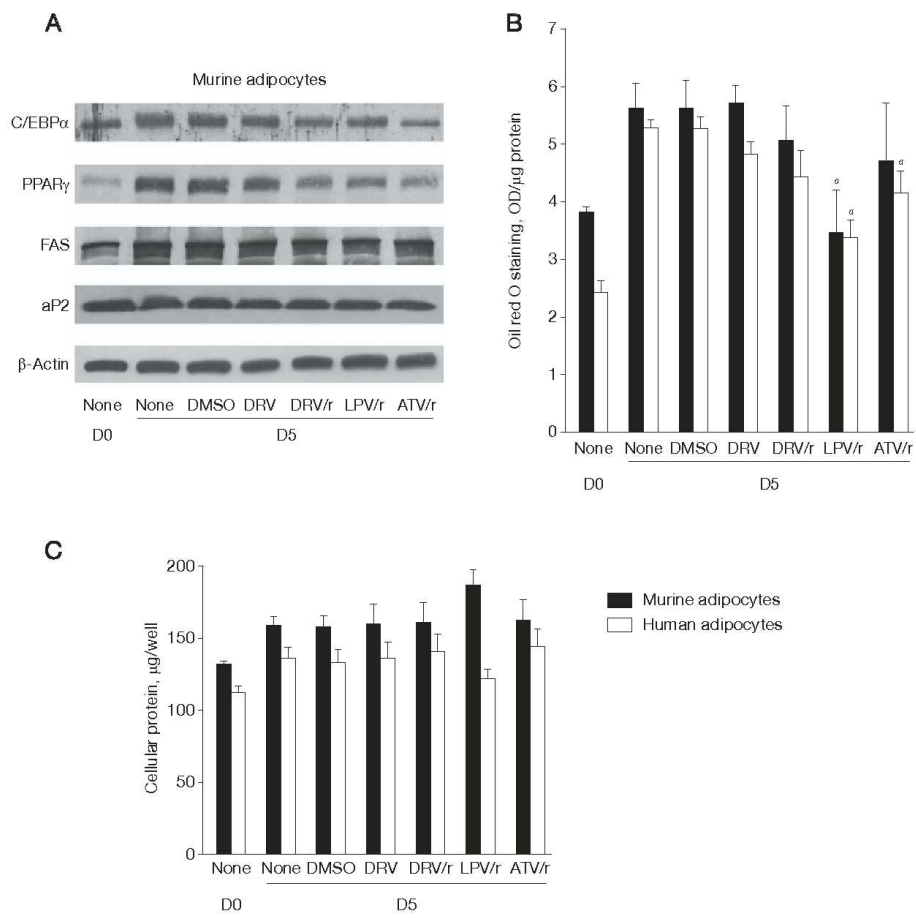
This differential effect could be related in part to differences in RTV concentrations. Indeed, in accordance with pharmacokinetic [13,14] and clinical data [5,12], the circulating concentration of RTV when associated with DRV was lower than with ATV or LPV (0.8, 1.3 and 1.4 μmol/l, respectively). Accordingly, healthy volunteers treated with DRV/r had lower lipid disorders than those treated with ATV/r [5]. In contrast, the daily dosage of 200 mg RTV is probably involved in the dyslipidaemic profile of LPV/r-treated patients.

It is important to consider the impact of recently marketed PIs on adipose tissue. Lipodystrophy remains a matter of concern in HIV-infected patients even if severe lipoatrophic phenotypes are less prevalent. In the ACTG5224s metabolic substudy of the

ACTG5202 study, in which antiretroviral therapy (ART)-naive patients were initiated with ATV/r or efavirenz together with tenofovir/emtricitabine (TDF/FTC) or abacavir/lamivudine (ABC/3TC), 14–20% of patients lost >10% limb fat after 96 weeks, whatever

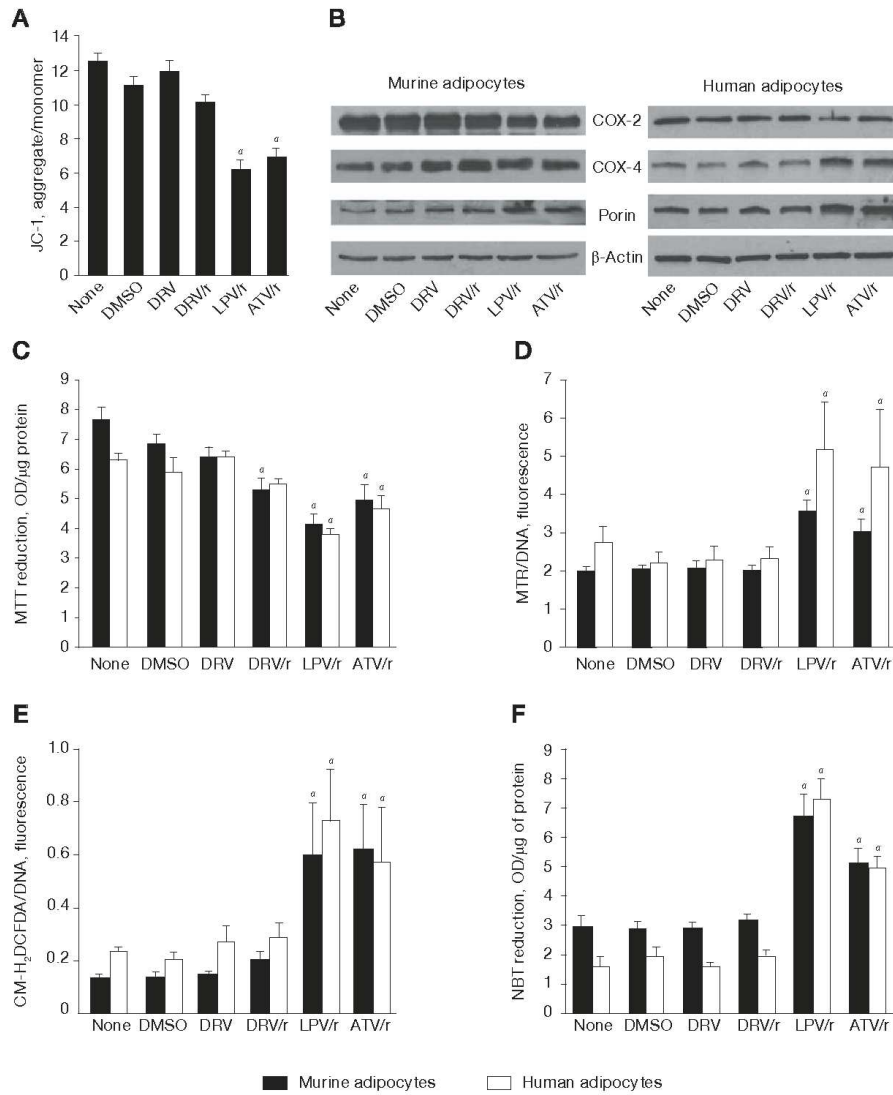
the treatment [9]. In a French observational study evaluating 2,139 patients in 2009, peripheral lipoatrophy was diagnosed in 26% and fat hypertrophy in 48% of patients who had been initiated into ART for <5 years [17]. Fat hypertrophy could result from

Figure 1. Effects of PIs on adipocyte differentiation and lipid content



Murine or human adipocytes taken 3 or 8 days after the induction of differentiation (D0) were incubated with the indicated protease inhibitor(s) (PIs) for 5 days (D5). Data were collected at D0 and D5. (A) Adipocyte differentiation was assessed by the protein expression of the transcription factors CCAAT/enhancer binding protein- $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ ) and peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) and the adipocyte markers fatty acid synthase (FAS) and adipocyte protein 2 (aP2) in murine adipocytes.  $\beta$ -Actin was used as a control of protein loading. (B) PI-treated or -untreated cells were stained with Oil red O. The staining was assessed at 540 nm and normalized to the protein content evaluated in parallel. (C) Total cell protein level was assessed in 12-well plates. Experiments were repeated 3–5 times. Representative blots are shown. Results are means  $\pm$  SEM. \* $P$ <0.05 versus control untreated cells. ATV/r, atazanavir boosted with ritonavir; DMSO, dimethyl sulfoxide; DRV, darunavir; DRV/r, darunavir boosted with ritonavir; LPV/r, lopinavir boosted with ritonavir; OD, optical density.

Figure 2. Effects of PIs on mitochondrial function and ROS production

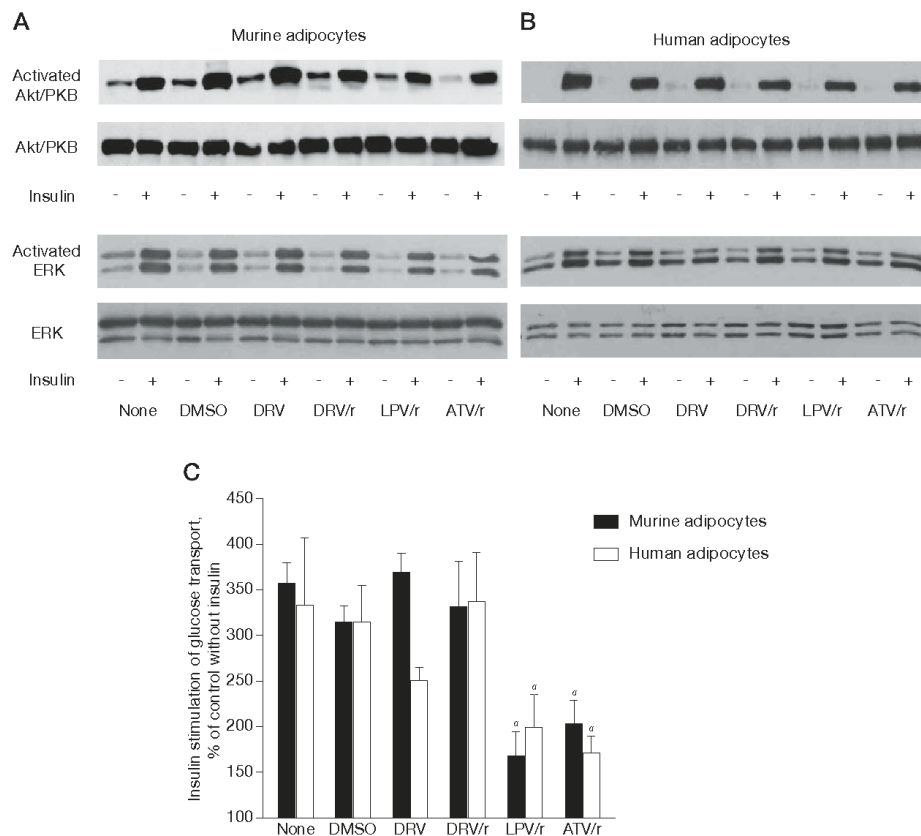


Murine or human adipocytes were incubated with the indicated protease inhibitors (PIs) for 5 days. (A) Mitochondrial membrane potential was evaluated by the aggregate/monomer ratio of JC-1 (a cationic dye) fluorescence in murine adipocytes. (B) Mitochondrial markers were evaluated by western blot. Representative blots are shown. β-Actin was used as a control for protein loading. (C) 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction was performed as indicated in *Methods*. Results are normalized to the cellular protein content. (D) The mitochondrial mass was estimated by the fluorescent labelling of Mitotracker Red 580 probe (MTR) normalized to the DNA content. (E,F) Reactive oxygen species (ROS) production was assessed by the oxidation of 5-[and 6]-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H<sub>2</sub>DCFDA) derivatives and the reduction of nitroblue tetrazolium (NBT) and normalized to the DNA and the protein content, respectively. Experiments were repeated 3–5 times. Results are means ± SEM. \*P<0.05 versus control untreated cells. ATV/r, atazanavir boosted with ritonavir; COX-2, cytochrome oxidase-2; COX-4, cytochrome oxidase-4; DMSO, dimethyl sulfoxide; DRV, darunavir; DRV/r, darunavir boosted with ritonavir; LPV/r, lopinavir boosted with ritonavir; OD, optical density.

the effect of some PIs able to induce mitochondrial dysfunction [8]. Indeed, in situations of human and murine obesity, adipocyte hypertrophy has been linked to decreased mitochondrial function and/or mtDNA level [8] suggesting that mild mitochondrial dysfunction and increased oxidative stress could result in increased fat amount. PIs can adversely affect mitochondrial function [18]. Importantly, in ART-naive patients, ATV and efavirenz increased visceral abdominal fat (VAT) and total abdominal fat (TAT).

However, the mean percentage increases from baseline in VAT, subcutaneous abdominal adipose tissue (SAT) and TAT were higher in the ATV than the efavirenz group [19]. Accordingly, in the ACTG5224s substudy, patients given ATV/r presented a greater gain in trunk fat than those receiving efavirenz [9]. In the MONOI and MONET studies, controlled HIV-infected patients switched to DRV/r presented an increased amount of trunk fat in the two arms after 48 or 96 weeks [10,20]. In the METABOLIK

Figure 3. Effects of PIs on insulin signalling



Murine or human adipocytes were incubated with the indicated protease inhibitor (PI) for 5 days. (A&B) Fetal calf serum (FCS)-depleted cells were incubated with insulin (100 nmol/l) for 10 min. Insulin stimulation of protein kinase B (Akt/PKB) and extracellular-regulated kinase (ERK) was measured on whole cell lysates by western blot. Representative experiments are shown. (C) Insulin-stimulated glucose transport in murine and human adipocytes. Experiments were repeated 3–4 times. Results are means  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  versus control untreated cells. ATV/r, atazanavir boosted with ritonavir; DMSO, dimethyl sulfoxide; DRV, darunavir; DRV/r, darunavir boosted with ritonavir; LPV/r, lopinavir boosted with ritonavir.

study, ART-naïve patients receiving DRV/r or ATV/r together with TDF/FTC presented increased TAT and SAT but peripheral adipose tissue did not increase in the ATV/r arm, indicating a differential effect of the two combinations on adipose tissue [21]. These data support a milder and differential effect of DRV/r versus ATV/r on fat

*In vitro* models are useful for deciphering the potential impact of drugs. Because even recently marketed PIs can modify adipose tissue, we comparatively evaluated the effects of these drugs on routinely used murine 3T3L1 adipocytes but also on human adipocytes in primary culture, more relevant to the physiological situation. The results we obtained with the two cell systems are largely comparable and reveal the ability of LPV/r and, to a lesser extent, ATV/r to affect adipocyte differentiation and insulin sensitivity, and induce mitochondrial dysfunction and ROS production, whereas DRV and DRV/r have no or minimal effects.

*In vitro* studies have previously evaluated the ability of PIs to alter adipocyte function. LPV and RTV but not ATV increased oxidative stress leading to defective lipid storage [22]. Accordingly, in human subcutaneous and visceral adipocytes, RTV but not ATV affected differentiation [23]. In another study [11] ATV/r (5/2 µmol/l) and LPV/r (10/2 µmol/l) altered adipocyte functions, arguing that the RTV boost has a major role in altering adipocyte function. Only one recent paper evaluated the effect of DRV on cultured adipocytes [24]. DRV and ATV did not alter lipid accumulation, in contrast to LPV and RTV, further stressing the safe profile of these two PIs when not boosted, and confirming the adverse effects of RTV and LPV [24].

Regarding insulin sensitivity, our *in vitro* studies are in good agreement with data obtained *in vivo* with healthy volunteers [4,5,7]. Previous *in vitro* studies reported the ability of ATV/r and LPV/r to induce insulin resistance in cultured adipocytes [11]. However, the RTV concentration was higher than in the present study. Accordingly, LPV and RTV but not unboosted ATV and DRV decreased insulin-activated glucose uptake into cultured adipocytes [24].

We acknowledge some limitations. We have not evaluated human fat samples or adipocytes from SAT and VAT, in particular from HIV-infected patients. Some PIs are strongly linked to serum proteins which can modify their effective concentration in a different way than in culture media containing 3% or 10% FCS. *In vivo* studies in healthy volunteers evaluated the effect of ATV/r and DRV/r on lipid and glucose parameters but not on adipose tissue markers [5]. This should be considered.

In conclusion, we report here that DRV/r exhibited a safe profile on cultured adipocytes in good accordance with its safe metabolic profile in HIV-infected patients. This could be related to the

booster RTV concentration being lower in DRV/r combinations.

## Acknowledgements

This work was supported by a grant from Janssen-Cilag/Tibotec and by INSERM, and has been presented as an abstract at the *12th Adverse Drug Reactions and Comorbidities in HIV Workshop*, 4–6 November 2010, London, UK. Abstract P01.

MC-D and JC were involved in conception of the study. EC and MA were involved in technical realization. EC, MA, MC-D and JC were involved in interpretation of the data, EC, MC-D and JC were involved in drafting of the article.

## Disclosure statement

This work was supported by a grant from Janssen-Cilag/Tibotec. JC received honoraria for lectures or travel grants from ViiV healthcare, Merck, Boehringer Ingelheim, BMS, Abbott and Janssen-Tibotec. All other authors declare no competing interests.

## References

- Lang S, Mary-Krause M, Cotte L, *et al.* Impact of individual antiretroviral drugs on the risk of myocardial infarction in human immunodeficiency virus-infected patients: a case-control study nested within the French Hospital Database on HIV ANRS cohort CO4. *Arch Intern Med* 2010; 170:1228–1238.
- Worm SW, Sabin C, Weber R, *et al.* Risk of myocardial infarction in patients with HIV infection exposed to specific individual antiretroviral drugs from the 3 major drug classes: the data collection on adverse events of anti-HIV drugs (D:A:D) study. *J Infect Dis* 2010; 201:318–330.
- Mallon PW. Antiretroviral therapy-induced lipid alterations: *in-vitro*, animal and human studies. *Curr Opin HIV AIDS* 2007; 2:282–292.
- Noor MA, Parker RA, O'Mara E, *et al.* The effects of HIV protease inhibitors atazanavir and lopinavir/ritonavir on insulin sensitivity in HIV-seronegative healthy adults. *AIDS* 2004; 18:2137–2144.
- Tomaka F, Lefebvre E, Sekar V, *et al.* Effects of ritonavir-boosted darunavir vs. ritonavir-boosted atazanavir on lipid and glucose parameters in HIV-negative, healthy volunteers. *HIV Med* 2009; 10:318–327.
- Collot-Teixeira S, De Lorenzo F, Waters L, *et al.* Impact of different low-dose ritonavir regimens on lipids, CD36, and adipophilin expression. *Clin Pharmacol Ther* 2009; 85:375–378.
- Noor MA, Flint OP, Maa JF, Parker RA. Effects of atazanavir/ritonavir and lopinavir/ritonavir on glucose uptake and insulin sensitivity: demonstrable differences *in vitro* and clinically. *AIDS* 2006; 20:1813–1821.
- Caron-Debarle M, Lagathu C, Boccara F, Vigouroux C, Capeau J. HIV-associated lipodystrophy: from fat injury to premature aging. *Trends Mol Med* 2010; 16:218–229.
- McComsey G, Kitch D, Daar E, *et al.* Bone and limb fat outcomes of ACTG A5224s, a substudy of ACTG A5202: a prospective, randomized, partially blinded phase III trial of ABC/3TC or TDF/FTC with EFV or ATV/r for initial treatment of HIV-1 infection. *17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections*. 16–19 February 2010, San Francisco, CA, USA. Abstract 106LB.

10. Valantin MA, Flandre P, Kolta S, *et al.* Fat tissue distribution changes in HIV-infected patients with viral suppression treated with CDRV/r monotherapy vs 2 NRTI + DRV/r in the MONOI-ANRS 136 randomized trial: results at 48 weeks. *17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections*. 16–19 February 2010, San Francisco, CA, USA. Abstract 721.
11. Boccara F, Auclair M, Cohen A, *et al.* HIV protease inhibitors activate the adipocyte renin angiotensin system. *Antivir Ther* 2010; **15**:363–375.
12. de Jesus E, Ortiz R, Khanlou H. Efficacy and safety of darunavir/ritonavir versus lopinavir/ritonavir in ARV-treatment-naïve HIV-1-infected patients at week 48: ARTEMIS (TMC114-C211). *47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 17–20 September 2007, Chicago, IL, USA. Abstract H718B.
13. Taburet AM, Raguin G, Le Tiec C, *et al.* Interactions between atazanavir and the lopinavir-ritonavir combination in heavily pretreated patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin Pharmacol Ther* 2004; **75**:310–323.
14. Taburet AM, Piketty C, Chazallon C, *et al.* Interactions between atazanavir-ritonavir and tenofovir in heavily pretreated human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**:2091–2096.
15. Caron M, Auclair M, Vissian A, Vigouroux C, Capeau J. Contribution of mitochondrial dysfunction and oxidative stress to cellular premature senescence induced by antiretroviral thymidine analogues. *Antivir Ther* 2008; **13**:27–38.
16. Walker UA, Auclair M, Lebrecht D, *et al.* Uridine abrogates the adverse effects of antiretroviral pyrimidine analogues on adipose cell functions. *Antivir Ther* 2006; **11**:25–34.
17. Leclercq P, Goujard C, Allaert F, *et al.* Prevalence of lipodystrophy among patients on antiretroviral therapy for up to 10 years. A French observational study. *Antivir Ther* 2010; **15** Suppl 4:A38.
18. Kim MJ, Leclercq P, Lanoy E, *et al.* A 6-month interruption of antiretroviral therapy improves adipose tissue function in HIV-infected patients: the ANRS EP29 Lipostop Study. *Antivir Ther* 2007; **12**:1273–1283.
19. Jemsek JG, Arathoon E, Arlotti M, *et al.* Body fat and other metabolic effects of atazanavir and efavirenz, each administered in combination with zidovudine plus lamivudine, in antiretroviral-naïve HIV-infected patients. *Clin Infect Dis* 2006; **42**:273–280.
20. Horban A, HArribas J, Hill A, van Delft Y, Moecklinghoff C. Anthropometric sub-study of the MONET trial: darunavir/ritonavir with or without nucleoside analogues, for patients with HIV RNA <50 copies/ml at screening. *Antivir Ther* 2010; **15** Suppl 4:A36.
21. Tebas P, Sax P, Aberg J, *et al.* METABOLIK (Metabolic Evaluation in Treatment-naïves Assessing the impact of two Boosted protease inhibitors on Lipids and other markers): week 48 comparison of body fat changes in ARV-naïve subjects receiving darunavir/ritonavir- or atazanavir/ritonavir-based therapy. *Antivir Ther* 2010; **15** Suppl 4:A39.
22. Lagathu C, Eustace B, Prot M, *et al.* Some HIV antiretrovirals increase oxidative stress and alter chemokine, cytokine or adiponectin production in human adipocytes and macrophages. *Antivir Ther* 2007; **12**:489–500.
23. Jones SP, Waitt C, Sutton R, Back DJ, Pirmohamed M. Effect of atazanavir and ritonavir on the differentiation and adipokine secretion of human subcutaneous and omental preadipocytes. *AIDS* 2008; **22**:1293–1298.
24. Hruz PW, Yan Q, Tsai L, *et al.* GS-8374, a novel HIV protease inhibitor, does not alter glucose homeostasis in cultured adipocytes or in a healthy rodent model system. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**:1377–1382.

---

Accepted 25 July 2011; published online 28 November 2011





## **Formes monogéniques de lipomatose de Launois-Bensaude : étude clinique et moléculaire, et modélisation cellulaire**

### **RESUME**

Ce travail initié en lien avec le centre de référence des Pathologies Rares de la Résistance à l'Insuline et de l'Insulino-Sensibilité, s'intéresse à l'étude de la physiopathologie de formes rares de syndromes lipodystrophiques. Parmi ceux-ci, la lipomatose de Launois-Bensaude (LLB) est caractérisée par la présence de masses lipomateuses associées à des troubles métaboliques. Nous avons investigué la plus grande cohorte de patients atteints de LLB due au variant p.Arg707Trp du gène *MFN2*, codant la mitofusine 2, une protéine de la fusion mitochondriale. Nous avons également étudié une patiente présentant des symptômes compatibles avec une LLB porteuse d'un nouveau variant p.Glu943Glyfs\*22 de *LIPE*, codant la lipase hormono-sensible, enzyme-clé de la lipolyse adipocytaire. Les caractéristiques de ces patients porteurs de variants de *MFN2* et *LIPE* sur le plan clinico-biologique et tissulaire, permettent de mieux définir les particularités de la LLB au sein des syndromes lipodystrophiques. Nous avons isolé les cellules souches adipocytaires (ASC) des lipomes et utilisé ce modèle pour évaluer le retentissement des variants sur la différenciation et les fonctions adipocytaires. Les études morphologiques (microscopie optique et électronique) et fonctionnelles (immuno-histochimie, expression génique et protéique, lipolyse et respiration mitochondriale) des lipomes et/ou des ASC, montrent des altérations adipocytaires multiples avec un phénotype thermogénique des adipocytes LLB-*MFN2*. La lipodystrophie associée à *MFN2* pourrait provenir d'une altération de la balance de différenciation adipocytaire blanche/beige.

*Mots-clés : Lipodystrophie - Lipomatose de Launois-Bensaude - Mitofusine 2 - Lipase hormono-sensible - Cellules souches adipocytaires - Mitochondrie*

## **Monogenic forms of multiple symmetric lipomatosis: clinical and molecular study, and cell modelling**

### **ABSTRACT**

This work, initiated in cooperation with the rare diseases reference center 'Pathologies de la Résistance à l'Insuline et de l'Insulino-Sensibilité', focuses on the pathophysiology of rare lipodystrophic syndromes. Among them, Launois-Bensaude lipomatosis, also called multiple symmetric lipomatosis (MSL), is characterized by upper-body lipomatous masses and frequent metabolic alterations. We have investigated the largest reported series of patients with MSL due to the *MFN2* p.Arg707Trp variant. *MFN2* encodes mitofusin 2, a protein involved in mitochondrial fusion. Additionally, a patient with clinical symptoms consistent with MSL, harboring a new p. Glu943Glyfs\*22 variant of *LIPE*, encoding hormone-sensitive lipase, a key enzyme in the lipolysis pathway, has also been studied. The clinical, biological and adipose tissue characteristics of patients carrying *MFN2* and *LIPE* variants, allow for a better definition of MSL within the lipodystrophic syndromes. We have isolated adipose-derived stem cells (ASC) from lipomas and used this cellular model to assess the impact of variants on adipocyte differentiation and functions. Morphological (optic and electronic microscopy) and functional studies (immunohistochemistry, gene and protein expression, lipolysis, and mitochondrial respiration) on pseudo-lipomas and/or on ASC show numerous adipose dysfunctions and highlight the thermogenic phenotype of adipocytes from *MFN2*-MSL patients. This *MFN2*-related lipodystrophy could result from a misbalance of white and beige adipocyte differentiation.

*Keywords: Lipodystrophy - Multiple symmetric lipomatosis - Mitofusin 2 - Hormono-sensitive lipase - Adipose-derived stem cells - Mitochondria*