



HAL
open science

Étude sur les mécanismes moléculaires impliqués dans l'auto-renouvellement, la différenciation et la conversion thermogénique des cellules adipocytaires dans différentes situations pathologiques

Martin Paré

► **To cite this version:**

Martin Paré. Étude sur les mécanismes moléculaires impliqués dans l'auto-renouvellement, la différenciation et la conversion thermogénique des cellules adipocytaires dans différentes situations pathologiques. Biologie cellulaire. COMUE Université Côte d'Azur (2015 - 2019), 2019. Français. NNT : 2019AZUR4022 . tel-03352255

HAL Id: tel-03352255

<https://theses.hal.science/tel-03352255v1>

Submitted on 23 Sep 2021

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

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

THÈSE DE DOCTORAT

Étude sur les mécanismes moléculaires impliqués dans l'auto-renouvellement, la différenciation et la conversion thermogénique des cellules adipocytaires dans différentes situations pathologiques

Martin PARÉ

Institut de biologie Valrose

Présentée en vue de l'obtention
du grade de docteur en SVS
d'Université Côte d'Azur
Dirigée par : Christian Dani
Co-encadrée par : Annie Ladoux
Soutenue le : 10 avril 2019

Devant le jury, composé de :
Frédéric Luton, Directeur de recherche Inserm,
Université Côte d'Azur
Anne Bouloumié, Directeur de recherche
Inserm, Université Toulouse III Paul Sabatier
Véronique Maguer-Satta, Directeur de recherche
CNRS, Université de Lyon
Adrien Rossary, MCU, Université Clermont-
Auvergne

Étude sur les mécanismes moléculaires impliqués dans l'auto-renouvellement, la différenciation et la conversion thermogénique des cellules adipocytaires dans différentes situations pathologiques

Jury :

Président du jury :

Frédéric Luton, Directeur de recherche Inserm, Université Côte d'Azur

Rapporteurs :

Anne Bouloumié, Directeur de recherche Inserm, Université Toulouse III Paul Sabatier

Véronique Maguer-Satta, Directeur de recherche CRNS, Université de Lyon

Examineurs

Adrien Rossary, MCU, Université Clermont-Auvergne

Étude sur les mécanismes moléculaires impliqués dans l'auto-renouvellement, la différenciation et la conversion thermogénique des cellules adipocytaires dans différentes situations pathologiques

Résumé :

Il existe deux types de tissus adipeux (TA). Le **tissu adipeux blanc** stocke les lipides sous forme de triglycérides. Le **tissu adipeux brun** possède une signature thermogénique *via* la protéine UCP1 utilisant les lipides pour former de la chaleur. Il existe aussi des adipocytes qui ont des caractéristiques similaires aux adipocytes bruns (adipocytes beiges) au sein du TA blanc. Le TA sécrète également des hormones lui conférant une fonction endocrinienne. Il maintient l'homéostasie énergétique et peut être altéré de différentes façons, ce qui conduit à des **dysfonctionnements métaboliques** :

- Une perte importante du TA dans les **lipotrophies** est observée lors d'un traitement antirétroviral hautement actif contre le VIH (**thérapie HAART**). Ceci amène à des modifications métaboliques graves, dues à des niveaux élevés de lipides circulants et à une résistance à l'insuline systémique. Cette thérapie HAART est composée d'**inhibiteurs de la protéase du VIH (IPs)** ou de la transcriptase inverse (INTI). Les effets inhibiteurs des IPs sur le processus de différenciation adipocytaire blanche sont bien connus. Cependant, les **mécanismes spécifiques qui affectent les différents dépôts adipeux humains distinctement** ainsi que la **différenciation adipocytaire brune** le sont moins.
- Le **cancer** est une pathologie caractérisée par la prolifération dérégulée de cellules capables de former des métastases. Les cellules tumorales interagissent activement avec leur **microenvironnement**, notamment avec le TA qui est présent autour de nombreux organes et qui peut favoriser la progression tumorale (**tissu adipeux associé au cancer**). Le TA promeut la prolifération des cellules cancéreuses par la sécrétion d'adipocytokines. De plus, les cellules tumorales modifient le TA pour tirer leur énergie des lipides ce qui favorise leur expansion et leur dissémination. Nous avons étudié les interactions entre adipocytes et **cellules tumorales de sein** puisque **le TA fait partie intégrante de la glande mammaire**.

Mon travail de thèse a consisté à identifier de nouveaux mécanismes moléculaires importants pour le développement physiopathologique et/ou l'altération du TA. Nous avons d'abord étudié les effets **des IPs sur la perte de l'auto-renouvellement des progéniteurs adipeux (PAs)** (1) et sur les **modifications métaboliques des adipocytes** (2). Nous étudions aussi **les interactions entre les cellules de cancer du sein et le microenvironnement adipeux** (3).

Tout d'abord, les **IPs inhibent l'auto-renouvellement des PAs** en diminuant IER3 ce qui déstabilise en aval la boucle autocrine de l'Activine A. Les IPs **bloquent la différenciation** des PAs en adipocytes. La perte de ces deux processus indique que **les IPs induisent des lipotrophies retrouvées au cours de la thérapie HAART**.

Par la suite, nous observons que les **IPs réduisent l'expression des marqueurs thermogéniques** dans les adipocytes beiges et bruns par **l'inhibition de la transcription d'UCP1**.

Ils altèrent aussi l'expression des sirtuines, enzymes anti-âge. L'utilisation d'un **activateur de la sirtuine 1** permet de **renverser partiellement les effets des IP sur l'expression d'UCP1**.

Enfin, nos résultats démontrent que des **mammosphères de cancer de sein induisent la protéine UCP1** dans les adipocytes adjacents. L'**adrénomedulline produite** par les mammosphères participe à ce processus et nous avons pu caractériser son mécanisme d'action.

En conclusion, les travaux réalisés pendant ma thèse ont permis de mieux comprendre **les mécanismes** par lesquels les IP **inhibent l'auto-renouvellement** des progéniteurs adipeux ainsi que **l'altération de la signature thermogénique via la perte d'UCP1** dans les adipocytes bruns. Les cellules tumorales, quant à elles, induisent l'expression d'UCP1 résultant en **une conversion métabolique des adipocytes blancs en adipocytes bruns**.

Mots clés : Tissu adipeux, Progéniteurs adipeux, Activine A, Différenciation adipocytaire, Adipocytes beiges/bruns, UCP1, Inhibiteurs protéases du VIH, Resvératrol, Cancer du sein, Adipocytes associés au cancer, Lipolyse, Conversion métabolique.

Study of molecular mechanisms implicated in self-renewal, differentiation and thermogenic conversion of adipocyte cells in different pathological contexts

Abstract

There are two types of adipose tissues (AT). **White adipose tissue** stocks lipids in the form of triglycerides. **Brown adipose tissue** possesses a thermogenic signature through the protein UCP1 in order to generate heat by using lipids. Some adipocytes have brown-like adipocyte characteristics (beige adipocytes) and are localized in the white adipose tissue. AT also secretes hormones giving it an endocrine function. AT maintains energetic balance and can be altered in many ways, leading to **metabolic dysfunctions**:

- Important loss of AT in **lipoatrophy** are observed during highly active antiretroviral therapy against HIV (**HAART therapy**). This leads to severe metabolic modifications resulting in high levels of circulating fatty acids and systemic insulin resistance. The HAART therapy is composed of **HIV protease inhibitors (PIs)** or reverse transcriptase inhibitors (NRTI). PIs inhibitory effects on white adipocyte differentiation are well known. However, **specific mechanisms distinctly altering different human adipose depots or brown adipocyte differentiation** are less known.
- The pathology of **cancer** is characterized by upregulated proliferation of cells capable of metastasis. Tumor cells interact with their **microenvironment**, especially the AT surrounding numerous organs and can promote cancer progression (**cancer-associated adipose tissue**). AT induces cancer cells proliferation through secretion of adipocytokines. Furthermore, tumor cells modify the AT in order to gain energy from their lipids resulting in tumoral expansion and invasion. We have studied the interactions between adipocytes and **breast cancer cells** because **AT is an integral part of the mammary gland**.

My thesis work consists of identifying new molecular mechanisms implicated in the physiopathological development and/or alteration of the AT. We have first studied the **PIs effects on the loss of adipose progenitors (APs) self-renewal** (1) and the **metabolic modifications of adipocytes** (2). We also studied **the interactions between breast cancer cells and the adipose microenvironment** (3).

First, **PIs inhibit self-renewal of APs** by decreasing IER3 which disrupts the activin A autocrine loop downstream. PIs also **block the differentiation** of APs into adipocytes. The loss of both processes shows that **PIs induce lipoatrophy observed during HAART therapy**.

After, we observed that **PIs decrease the expression of thermogenic markers** in beige and brown adipocytes through **inhibition of UCP1 transcription**. They also impair the expression of sirtuins, anti-aging enzymes. The use of a **sirtuin 1 activator** can **partially reverse the PIs effects on UCP1 expression**.

Finally, our results show that **breast cancer mammospheres increase UCP1 protein expression in adjacent adipocytes**. **Adrenomedullin is produced by the mammospheres** and participated in this process and we were able to characterize its mechanism of action.

In conclusion, the work done during my thesis have allowed us to better understand **the mechanisms** by which **PIs inhibit self-renewal of APs** as well as the **impairment of the thermogenic signature through the loss of UCP1** in beige and brown adipocytes. Tumor cells, however, induce UCP1 expression resulting in the **metabolic conversion of white adipocytes into brown adipocytes**.

Key words: Adipose tissue, Adipose progenitors, Activin A, Adipose differentiation, Beige/brown adipocytes, UCP1, HIV protease inhibitors, Resveratrol, Breast cancer, Cancer-associated adipocyte, Lipolysis, Metabolic conversion.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Docteur **Anne Bouloumié** et le Docteur **Véronique Maguer-Satta** d'avoir accepté d'être rapportrices de ma thèse. Je tiens également le Docteur **Adrien Rossary** d'être examinateur de cette thèse. Finalement, je remercie le Docteur **Frédéric Luton** d'être à la fois examinateur et président de mon jury de thèse.

Je tiens à remercier le programme **Labex SIGNALIFE** qui m'a permis d'obtenir une bourse de recherche pour effectuer ces 3 années de thèse ainsi que la **fondation ARC** pour avoir financé mon projet de recherche sur l'interaction entre le cancer du sein et le tissu adipeux.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, le docteur **Christian Dani**, qui avec seulement deux semaines de rotation disponible au cours du programme Labex, m'a accepté au sein de son équipe de recherche. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée ainsi que votre écoute et votre disponibilité pour discuter de l'avancement de mon projet.

Il est évident que si je suis maintenant rendu à défendre ma thèse, c'est en grande partie grâce à **Annie Ladoux**. Merci infiniment pour l'encadrement pendant ces années de thèse, le soutien pendant les débuts difficiles de mon projet sur le cancer ainsi que les recommandations données sur le développement de mes projets. J'ai pu apprendre beaucoup à tes côtés et je sais que cet apprentissage me servira tout au long de ma carrière. Je suis très content d'avoir été un doctorant sous ta supervision.

Je souhaite aussi remercier les autres chercheurs du laboratoire : **Pascal** pour sa bonne humeur et son humour. **Nicole** pour ses conseils et sa gentillesse. **Phi** pour toutes ces discussions concernant la comparaison entre la France et le Québec. **Claude**, qui même s'il a pris sa retraite, apportait humour et joie au labo.

Je tiens à remercier **Stéphane Azoulay** pour avoir fourni les IPs au cours de mes projets de recherche. Merci à la plateforme de microscopie PRISM pour les expériences de time lapse, notamment **Simon Lachambre** ainsi que **Magali Mondin**. Un grand merci à **Virginie Virolle** pour nous avoir aidé à créer le CRISPR afin de valider notre hypothèse de recherche sur le projet cancer. Merci au Dr **Bérengère Chignon-Sicard** qui, vers la fin de mon projet, a pu acquérir des cellules provenant de sein de patientes.

Merci à l'équipe «Régulation cellulaire et moléculaire de la masse grasse» : **Cécilia**, **Rayane**, **Didier**, **Jean-Claude**, **Nadine**, **Nathalie** et **Zoubir** ainsi que l'équipe «Formation des vaisseaux dans le développement et la maladie» : **Nicole**, **Siyue** et **Kay**.

Il est nécessaire de remercier tous les autres doctorants du laboratoire avec qui j'ai eu la chance d'interagir. Merci à **Nico** même si nous n'avons pas pu énormément interagir puisque tu étais en rédaction de thèse, j'ai bien rit au cours des repas du midi. **Claudine** et son sens de l'humour au premier degré ainsi que sa déficience en vitamine D alors que l'on est dans le sud de la France avec beaucoup de Soleil. Merci à **Vincent**, qui même arrivé récemment dans l'équipe, a permis de me faire rire à plusieurs reprises autant sur les expériences que des petits pépins de la vie.

I would like to thank **Xi**, I had a great time talking with you about China and its traditions that might be weird for a Canadian like me. I hope that seeing me struggling during the writing of my thesis will help you to focus more on the job ahead of you ;). Also, try not to kill too many of your fishes from now on :P.

Un grand merci à **Christophe** avait qui j'ai bien déconné durant les manip en cours ainsi que les merveilleuses chansons que j'ai pu lui mettre dans la tête toute la journée. Merci pour ta bonne humeur ainsi que les belles soirées au Ma Nolan's à discuter de tout et de rien autour d'une pinte. Je souhaite que tout se passe bien en Angleterre malgré le Brexit!

I would like to thank «The Quislings» from the Labex program: **Aidan, Anthony, Torsten, Racha** and even **Pierre** with whom we had great time trying to do the twelve pubs of Christmas and the Bubble football game in Antibes. I would like to thank the other Labex students: **Vishnu** for his smile and appetite, **Katharina** for finally coming to a retrogaming event and **Joana** for all the fun we had together.

Merci à mes **amis du Québec** qui m'ont encouragé et en même temps m'ont dit que c'était de la folie d'aller en France pour un doctorat. Sur ce, je leur dit que c'est à moitié faux puisque j'ai survécu mais gardé quelques séquelles durant mon doctorat :P.

Un grand merci à mes **parents** et à ma sœur, **Véronique**, qui m'ont encouragé et soutenu durant mes études même si je ne suis pas le type qui d'écrit beaucoup mes projets de recherche. Malgré la distance, ils ont toujours été présents dans mon cœur pour avancer et ne pas abandonner.

Et la personne la plus importante, ma conjointe **Marie-Claude**. Merci tellement du fond du cœur d'avoir été présente dans les moments les plus heureux mais aussi ceux un peu plus tristes. Toi, qui m'a dit qu'un doctorat ne nécessitait pas forcément d'être fait dans la même ville, la même province ou le même pays où j'ai effectué ma Licence et mon Master, tu m'as donné le courage de faire face à un doctorat dans un autre continent. Je suis heureux de t'avoir dans ma vie depuis déjà 5 ans, qui selon moi, se sont passés très rapidement. Après ma défense thèse, nous commencerons un nouveau chapitre de notre vie à Montréal ou Québec, peu importe tant que nous sommes ensemble. Je t'aime fort.

Sommaire

Sommaire	p1
Liste des figures	p4
Liste des tableaux	p6
Liste des abréviations	p7
Introduction bibliographique	p11
1 - Le tissu adipeux	p12
1.1 - Historique et importance du tissu adipeux	p12
1.2 - Types de tissus adipeux	p14
1.2.1 - Tissu adipeux blanc - WAT	p14
1.2.2 - Tissu adipeux brun - BAT	p16
1.2.3 - Tissu adipeux du sein	p17
1.2.4 - Autres types de tissus adipeux	p18
1.2.4.1 - Tissu adipeux du derme - dermal WAT	p18
1.2.4.2 - Tissu adipeux de la moelle osseuse - MAT	p19
1.3 - Composition du tissu adipeux	p20
1.3.1 - La fraction stroma-vasculaire	p21
1.3.2 - Adipocytes matures	p24
1.3.2.1 - Adipocytes blancs	p25
1.3.2.2 - Adipocytes bruns	p25
1.3.2.3 - Adipocytes brites	p26
1.4 - Fonctions du tissu adipeux	p29
1.4.1 - Stockage énergétique dans le WAT	p30
1.4.2 - Lipolyse du WAT	p33
1.4.3 - Fonction endocrinienne du WAT	p38
1.4.4 - Dépense énergétique du BAT - la thermogénèse	p44
1.4.5 - Fonction endocrinienne du BAT	p53

2 - Développement de la masse adipocytaire	p57
2.1 - Progéniteurs adipeux	p57
2.1.1 - Progéniteurs adipeux blanc	p58
2.1.2 - Progéniteurs adipeux brun	p59
2.1.3 - Progéniteurs adipeux brite	p60
2.2 - Auto-renouvellement des progéniteurs adipeux	p62
2.2.1 - FGF2	p63
2.2.2 - Activine A	p64
2.2.3 - Voie Hedgehog	p66
2.2.4 - Hypoxie	p67
2.3 - Adipogenèse	p69
2.3.1 - Engagement	p69
2.3.2 - Différenciation terminale	p73
2.4 - Conversion métabolique du tissu adipeux	p80
2.4.1 - Conversion blanc vers brun : brunissage	p81
2.4.2 - Conversion brun vers blanc : blanchiment	p85
3 - Pathologies du tissu adipeux	p88
3.1 - Obésité	p89
3.1.1 - Définition et prévalence	p89
3.1.2 - Expansion du tissu adipeux pendant l'obésité	p91
3.1.3 - Infiltration des macrophages, inflammation et hypoxie du tissu adipeux	p93
3.1.4 - Effets des macrophages, de l'inflammation et de l'hypoxie sur les adipocytes et leurs précurseurs	p96
3.1.5 - Morbidités associées à l'obésité	p97
3.2 - Lipodystrophies et désordres métaboliques	p101
3.2.1 - Lipodystrophies génétiques	p101
3.2.2 - Lipodystrophies acquises	p103
3.2.3 - Le VIH et SIDA	p105
3.2.3.1 - Traitements contre le VIH	p110
3.2.3.2 - Effets de la thérapie HAART sur le tissu adipeux	p115

4 - Cancer et tissu adipeux	p121
4.1 - Le cancer du sein	p121
4.1.1 - Facteurs de risque associés au cancer du sein	p122
4.1.2 - Structure du sein	p124
4.1.3 - Développement du cancer	p125
4.1.3.1 - Initiation et prolifération cellulaire	p125
4.1.3.2 - Transition épithélio-mésenchymateuse et invasion	p128
4.1.3.3 - Angiogenèse/lymphangiogenèse et métastases	p130
4.1.3.4 - Hétérogénéité du cancer	p131
4.1.3.5 - Caractéristiques propres aux cellules souches cancéreuses	p133
4.2 - Interaction entre le cancer et le microenvironnement	p135
4.2.1 - Cellules immunitaires	p136
4.2.2 - Cellules endothéliales	p142
4.2.3 - Fibroblastes associés au cancer	p143
4.3 - Tissu adipeux associé au cancer	p144
4.3.1 - Impact de l'obésité sur la progression tumorale	p145
4.3.2 - Impact du cancer sur le tissu adipeux	p150
4.3.3 - Adrénomedulline	p152
Modèles cellulaires	p160
Objectifs	p163
Résultats	
1) Effets des IPs sur les PAs de différents dépôts dans l'auto-renouvellement	p165
2) Effets des IPs sur la différenciation adipocytaire brune et la signature thermogénique	p168
3) Identification d'une molécule produite par le cancer du sein entraînant le brunissage du tissu adipeux : l'adrénomedulline	p171
Conclusion	p176
Bibliographie	p178

Liste des figures

Figure 1 : Représentation du tissu adipeux omental	p12
Figure 2 : Localisation des différents dépôts ainsi que de leurs fonctions respectives dans le corps humain	p15
Figure 3 : Coupe histologique de différents dépôts de tissus adipeux humains	p17
Figure 4 : Séparation des différentes composantes cellulaires provenant d'une lipoaspiration de tissu adipeux	p20
Figure 5 : Immunosélection des cellules de la fraction stroma-vasculaire provenant de tissu adipeux humain	p24
Figure 6 : Représentation d'un adipocyte blanc et brun	p25
Figure 7 : Évaluation des marqueurs chez les adipocytes blancs, brites et bruns chez la souris et chez l'homme	p28
Figure 8 : Localisation des différents types adipocytaires dans le cou	p29
Figure 9 : Lipogenèse et synthèse des triglycérides dans l'adipocyte	p32
Figure 10 : Synthèse des triglycérides dans l'adipocyte	p33
Figure 11 : Étapes successives de la lipolyse des triglycérides	p34
Figure 12 : Régulation de la lipolyse adipocytaire humaine	p36
Figure 13 : Fonction endocrine du WAT	p39
Figure 14 : Formation du gradient de protons pour la formation d'ATP ou de la thermogénèse	p46
Figure 15 : Transport des protons par UCP1	p48
Figure 16 : Représentation des sites de régulation du promoteur <i>UCP1</i>	p49
Figure 17 : Représentation des rôles métaboliques et endocriniens de l'adipocyte blanc et brun	p57
Figure 18 : Comparaison des différentes populations de précurseurs adipocytaires Myf5 positifs ou négatifs dans les différents dépôts adipeux de souris	p61
Figure 19 : Origine des différents progéniteurs adipeux	p62
Figure 20 : Auto-renouvellement des progéniteurs adipeux par le FGF2 et l'activine A	p67

Figure 21 : Signalisation des BMPs dans l'adipogenèse	p71
Figure 22 : Modulation de la voie Wnt dans l'adipogenèse	p72
Figure 23 : Schéma récapitulatif des différentes étapes de l'adipogenèse	p80
Figure 24 : Conversion métabolique des adipocytes	p88
Figure 25 : Pourcentage de prévalence de l'obésité dans le monde	p90
Figure 26 : Expansion de la masse adipocytaire	p93
Figure 27 : Expansion et inflammation du tissu adipeux chez la souris sous régime riche en lipides	p94
Figure 28 : Expansion du tissu adipeux sain et pathologique	p95
Figure 29 : Auto-renouvellement des progéniteurs adipeux en contexte d'obésité	p97
Figure 30 : Développement systémique de la résistance à l'insuline par l'obésité	p98
Figure 31 : Pathologies reliées à l'obésité	p100
Figure 32 : Représentation des diverses mutations dans les lipodystrophies congénitales	p103
Figure 33 : Représentation du génome du VIH	p107
Figure 34 : Représentation structurelle de la particule virale du VIH	p108
Figure 35 : Cycle de réplication du VIH	p109
Figure 36 : Présentation des différentes cibles des inhibiteurs du cycle de réplication du VIH	p111
Figure 37 : Mécanisme catalytique de la protéase du VIH	p113
Figure 38 : Structure chimique des différents inhibiteurs de la protéase du VIH	p114
Figure 39 : Comparaison des effets entraînés par l'obésité et les lipoatrophies associées à la thérapie HAART	p116
Figure 40 : Effets secondaires des inhibiteurs de protéase dans les adipocytes	p119
Figure 41 : Taux d'incidence et de mortalité du cancer du sein dans le monde en 2018	p122
Figure 42 : Représentation schématique d'une coupe de sein	p125
Figure 43 : Différentes mutations induisant les cancers	p126
Figure 44 : Caractérisation des différents sous-types de cancer du sein	p128
Figure 45 : Développement de la tumeur primaire et des métastases	p131

Figure 46 : Différences entre le modèle stochastique et celui de cellules souches	p133
Figure 47 : Système immunitaire inactif et actif combattant la progression tumorale	p140
Figure 48 : Recrutement des fibroblastes par le cancer	p144
Figure 49 : Interaction du cancer avec son microenvironnement	p145
Figure 50 : Effet du tissu adipeux obèse sur la progression du cancer	p150
Figure 51 : Maturation de l'adrénomedulline et de la PAMP à partir du pré-pro-peptide	p154
Figure 52 : Composition des différents récepteurs de l'adrénomedulline ainsi que de leur affinité pour le peptide	p156
Figure 53 : Effets de l'adrénomedulline sur la progression tumorale	p158

Liste des tableaux

Tableau 1 : Comparaison de l'accumulation des lipides allant des invertébrés jusqu'aux mammifères	p14
Tableau 2 : Classifications de l'IMC selon l'organisation mondiale de la santé	p90

Liste des abréviations

AC	Adénylate cyclase
ActR	Activin receptor
ADM	Adrénomedulline
ADNmt	ADN mitochondrial
ADMR	Adrenomedullin receptor
ALK	Activin receptor-like kinase
AG/AGL	Acide gras/acide gras libre
AMPC	AMP cyclique
AMPK	AMP-activated protein kinase
Ang-2	Angiotensine 2
α 2-AR	α 2-Adrenergic receptor
β -AR	β -Adrenergic receptor
ASC	Adipose stem cells
ASP	Acylation stimulating protein
ATGL	Adipose triglyceride lipase
ATR	Ang-2 Receptor
BAT	Brown adipose tissue
iBAT	Interscapular brown adipose tissue
BMP	Bone morphogenic protein
CAAT	Cancer-associated adipose tissue
CAC	Cancer-associated cachexia
CAF	Cancer-associated fibroblast
CAV1	Cavéoline-1
CE	Cellule endothéliale
CEBP	CCAAT-enhancer-binding protein
CIDE	Cell-death inducing DNA fragmentation factor-like effector
CLS	Crown-like structure
CREB	cAMP response element-binding protein
CRLR	Calcitonin receptor-like receptor
CSC	Cancer stem cell
DAG	Diacylglycérol
DIO2	Type II iodothyronine deiodinase
DRV	Darunavir
ECM	Extracellular matrix
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
EGF	Epidermal growth factor
EGR1	Early growth response protein 1
ER	Estrogen receptor

FABP	Fatty-acid-binding protein
FAT	Fatty acid translocase
FATP	Fatty acid transport protein
FGF	Fibroblast growth factor
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
G3P	Glycérol-3-phosphate
GC	Guanylate cyclase
GLUT	Glucose transporter
GMPc	GMP cyclique
GPAT	Glycerol-3-phosphate acyltransferase
GPCR	G protein-coupled receptor
GSK-3	Glycogen synthase kinase 3
HAART	Highly active antiretroviral therapy
HAT	Histone acetyltransferase
HDAC	Histone deacetylase
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
HFD	High fat diet
HGF	Hepatocyte growth factor
Hh	Hedgehog
HIF	Hypoxia inducible factor
hMADS	human multipotent adipose-derived stem cell
HSL	Hormone sensitive lipase
HSPG	Heparan sulfate proteoglycan
IER3	Immediate early response 3
IL-1	Interleukine-1
IL-6	Interleukine-6
IMC	Indice de masse corporelle
INTI/INNTI	Inhibiteur nucléosidique/non nucléosidique de la transcriptase inverse du VIH
IP	Inhibiteur de protéase du VIH
KLF	Krüppel-like factor
LDL	Low-density lipoprotein
LPL	Lipoprotein lipase
LPV	Lopinavir
MAT	Marrow adipose tissue
MAG	Monoacylglycérol
MAGL	Monoacylglycérol lipase
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCE	Mitotic clonal expansion
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MSC	Mesenchymal stem cells
miRNA	Micro RNA
Myf5	Myogenic factor 5

NE	Norépinéphrine
OMS	Organisation mondiale de la santé
PA	Progéniteur adipeux
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1
Pax7	Paired box protein 7
PDE	Phosphodiesterase
PDGFR α	Platelet-derived growth factor receptor α
PGC-1 α	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α
PRDM16	PRD1-BF-1-RIZ1 homologous domain-containing protein-16
PI3K	Phosphoinosidine 3-kinase
PKA	Protéine kinase A
PKB	Protéine kinase B
PKC	Protéine kinase C
PKG	Protéine kinase G
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PR	Progesterone receptor
RAMP	Receptor activity-modifying protein
RCP	Receptor component protein
ROS	Reactive oxygen species
SIDA	Syndrôme de l'immunodéficience acquise
siRNA	Small interfering RNA
SIRT	Sirtuine
SNS	Système nerveux sympathique
SREBP	Sterol regulatory element-binding protein
SVF	Stromal vascular fraction
T3	Triiodothyronine
TA	Tissu adipeux
TGF- β	Transforming growth factor β
TNF α	Tumor necrosis factor α
tPA	Tissue plasminogen activator
TG	Triglycéride
TZD	Thiazolidinedione
UCP1	Uncoupling protein 1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VLDL	Very-low-density lipoprotein
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine

WAT	White adipose tissue
dWAT	Dermal white adipose tissue
mgWAT	Mammary gland white adipose tissue
scWAT	Subcutaneous white adipose tissue
vWAT	Visceral white adipose tissue

ZFP	Zinc finger protein
-----	---------------------

Introduction Bibliographique

1 Le tissu adipeux

1.1 Historique et importance du tissu adipeux

Le tissu adipeux (TA) a longtemps été négligé en faveur des tissus et organes considérés comme plus essentiels tels que les systèmes nerveux, cardiaque, digestif. Les premières découvertes effectuées sur le TA ont, avec le temps, permis de montrer que ce tissu avait une importance physiologique considérable. Une des plus anciennes publications sur le TA apparue dans *The Physiological Anatomy and Physiology of Man*, Todd et Bowman expliquaient que ce tissu ne servait qu'à occuper l'espace vide entre les organes afin de faciliter la motricité. À cette époque, il y avait déjà une distinction entre le tissu (l'enveloppe) et le gras (la substance à l'intérieur de l'enveloppe) (Figure 1). De plus, le TA n'étant que du gras, on ne savait pas s'il devait être décrit comme étant principalement constitué de cellules ou bien seulement de «vésicules de graisse» (Todd et Bowman, 1845).

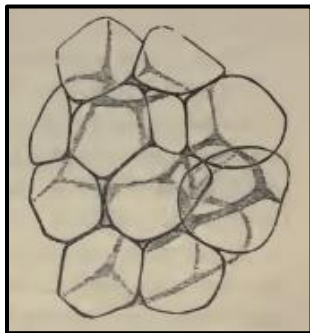


Figure 1 : Représentation du tissu adipeux omental montrant la forme polyédrique des adipocytes. Illustration issue du: «*The physiological anatomy and physiology of man*» de Todd et Bowman, 1845.

Kölliker décrit ces cellules comme ayant une morphologie polygonale possédant un protoplasme clair qui s'engorgeait de gras dans le temps. Pendant plus de 30 ans, il continua d'affirmer que ces cellules graisseuses provenaient d'un tissu conjonctif spécial et qu'elles avaient la capacité de se reconvertir en tissu conjonctif pour redevenir, à un moment défini, des cellules graisseuses (Kölliker, 1886). Plusieurs chercheurs se sont intéressés à l'origine de ces cellules dont Metzner qui proposa qu'elles proviennent du tissu conjonctif. Ces cellules étaient selon lui différentes de celles déjà caractérisées dans le tissu telles que les fibroblastes (Metzner, 1890). Par

la suite, il a été démontré qu'une accumulation de gras s'effectue dans ces cellules lors d'une alimentation excessive. À l'inverse, une forte privation alimentaire amène à la disparition de ces cellules. Ces études ont été les premières à montrer que le TA, en plus de son rôle de support pour les organes, peut aussi jouer un rôle dans l'homéostasie énergétique. Plusieurs études ont encore prouvé l'existence de vaisseaux sanguins au niveau du TA pouvant acheminer les lipides vers ces «cellules de stockage». Pour appuyer cette observation, une forte corrélation fut décrite entre la proximité du vaisseau sanguin avec la cellule grasseuse et l'augmentation de la quantité de gras dans celle-ci.

Un autre rôle attribué au TA est celui de maintenir la température corporelle. En effet, celui-ci agirait comme un isolant thermique principalement pendant les périodes de grands froids (Stini, 1981). Au cours des années, de plus en plus d'études se concentreront sur le rôle énergétique du TA; du fait de l'augmentation accrue de pathologies associées à une trop grande expansion de la masse adipeuse telles que l'obésité et ses complications comme l'hypertension, les maladies cardiovasculaires et le diabète (Kopelman, 2000). C'est par le biais de l'ensemble de ces études que l'existence de différents types de TA sera démontrée: le TA blanc (WAT pour White Adipose Tissue) déjà connu pour le stockage d'énergie et le TA brun (BAT pour Brown Adipose Tissue) impliqué dans la dépense énergétique sous forme de chaleur (Foster et Frydman, 1978). Néanmoins, les recherches ne se sont pas arrêtées à l'implication du TA dans l'homéostasie énergétique. Des études récentes ont montré que ce tissu possédait aussi une fonction endocrinienne *via* la libération de plusieurs adipocytokines. L'identification de la leptine en 1994 dans un contexte d'obésité chez la souris a établi la reconnaissance du TA en tant qu'organe endocrinien (Zhang et al., 1994). Ces résultats ont conduit au constat que le TA n'était pas seulement un tissu de stockage de lipides mais aussi un organe sécrétoire (Kershaw et Flier, 2004; Klaus, 2004). Il est aujourd'hui connu que le TA est bien présent chez les mammifères mais on constate qu'il est également exprimé

chez les invertébrés sous forme de réservoirs de triacylglycérols (drosophile, nématode) ainsi que chez les vertébrés inférieurs (poissons, amphibiens, reptiles) et même chez les oiseaux (Gesta et al., 2007) (Tableau 1). Ainsi, on découvre que même dans une biodiversité animale allant des insectes aux mammifères, le TA a son importance pour la survie de l'espèce.









Species	 <i>Caenorhabditis elegans</i>	 <i>Drosophila melanogaster</i>	 <i>Carcharodon carcharias</i>	 <i>Cyprinus carpio</i>	 <i>Xenopus laevis</i>	 <i>Gallus gallus domesticus</i>	 <i>Mus musculus</i>	 <i>Homo sapiens</i>
Fat storage	Stored in intestinal cells	Stored in the "fat body"	Stored in liver	Stored in WAT	Intra-abdominal WAT (no subcutaneous WAT)	Subcutaneous and internal WAT	Subcutaneous and internal WAT	Subcutaneous and internal WAT
Leptin	No	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
BAT	No	No	No	No	No	No	Present throughout life	Present at birth; reduced in adults
UCP	UCP-like protein (ucp-4)	No	?	UCP-1 in liver	UCP-4 in oocytes	Avian UCP in muscle	UCP-1 in BAT	UCP-1 in BAT
Thermo-regulation	Ectotherm	Ectotherm	Ectotherm	Ectotherm	Ectotherm	Endotherm Shivering and nonshivering thermogenesis	Endotherm Shivering and nonshivering thermogenesis	Endotherm Shivering and nonshivering thermogenesis

Tableau 1 : Comparaison de l'accumulation des lipides allant des invertébrés jusqu'aux mammifères. Importance du stockage des lipides dans divers organismes afin de l'utiliser comme réservoir énergétique. Présence ou non de tissu adipeux brun ainsi que l'origine de leur thermorégulation. Tableau d'après : Gesta et al., Cell, 2007.

1.2 Types de tissu adipeux

Chez l'homme, il existe principalement deux types majeurs de tissus adipeux : le tissu adipeux blanc (WAT) et le tissu adipeux brun (BAT). Chaque tissu possède des fonctions et des localisations spécifiques.

1.2.1 Tissu adipeux blanc - WAT

Le WAT est le TA le plus abondant chez l'être humain et sert de stockage aux lipides. Son pourcentage de masse grasseuse corporelle varie de 12-20% pour l'homme et de 20-30% pour la femme. Si ce pourcentage devient supérieur, des risques peuvent survenir sur la santé de la

personne tels que l'obésité avec des complications associées comme les maladies cardiovasculaires ou le diabète (Bray, 1998). Ce tissu est divisé en deux groupes : le WAT sous-cutané (scWAT) et le WAT viscéral (vWAT). Comme le nom l'indique, le tissu sous-cutané se situe en dessous la peau et représente 80% du WAT total chez l'homme. Il possède des dépôts dits abdominal, fémoral et glutéal (Choe et al., 2016). Son rôle principal est celui d'isolateur thermique et plusieurs études cliniques lui ont conféré des effets bénéfiques pour le métabolisme (Pond, 1992; Tran et al., 2008) (Figure 2).

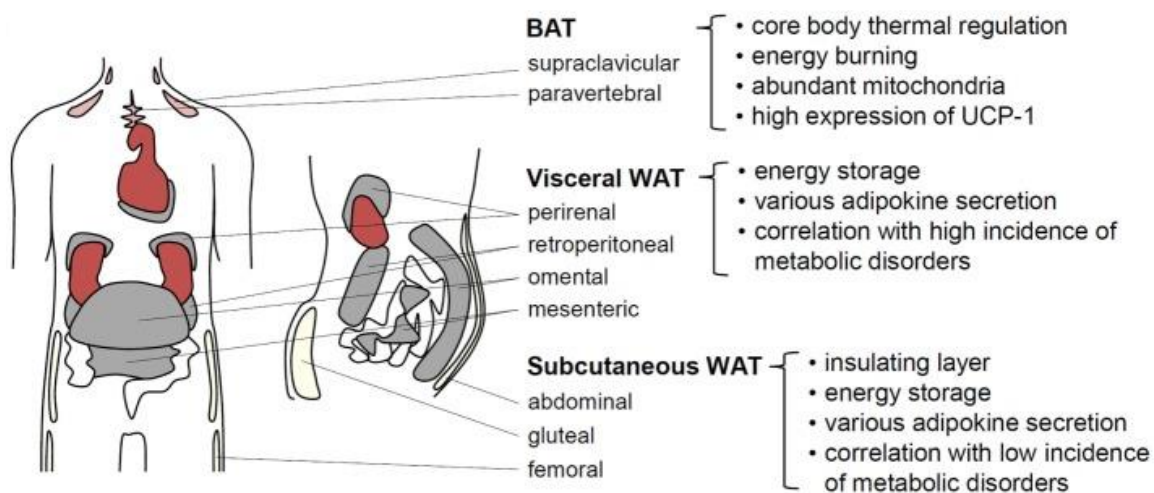


Figure 2 : Localisation des différents dépôts ainsi que de leurs fonctions respectives dans le corps humain. Illustration d'après Choe et *al.*, *Frontiers in Endocrinology*, 2016.

Le tissu viscéral, quant à lui, possède plusieurs localisations dans différents organes : omental, mésentérique, rétropéritonéal, péricardial et périrénal (Wajchenberg, 2000). Le vWAT se retrouve en plus grande quantité chez l'homme que la femme (20% versus 5-10%). Toutefois avec l'âge, l'accumulation de gras dans ce tissu s'effectue plus rapidement chez la femme comparativement à l'homme. Dans un contexte d'obésité, l'augmentation du tissu viscéral entraîne plusieurs désordres métaboliques tels que le diabète et les maladies cardiovasculaires ainsi que de l'hypertension (Kopelman, 2000; Shuster et al., 2012). Le stockage des graisses chez l'homme se fera principalement au niveau viscéral tandis qu'il y aura lieu dans le dépôt glutéal chez la femme.

On constate que ces deux tissus ont des fonctions communes mais aussi diverses et n'ont pas la même sensibilité face à certains stimulus. Le scWAT est plus résistant que le vWAT en ce qui concerne la libération des lipides (lipolyse) tandis que le vWAT est résistant aux effets antilipolytiques de l'insuline (Stears et Byrne, 2001; Wajchenberg, 2000). La figure 3 permet d'observer les différences morphologiques entre les deux sous-types de WAT et le BAT.

1.2.2 Tissu adipeux brun - BAT

Le BAT est à l'opposé du WAT puisqu'au lieu de stocker l'énergie, il l'utilise pour générer de la chaleur. Le BAT a été longtemps supposé n'être présent que chez les petits mammifères exposés au froid et les nouveau-nés afin de maintenir leur température corporelle (Wang et Seale, 2016). Étant donné la quantité supérieure de masse musculaire et de WAT déjà présente chez les mammifères possédant 10kg ou plus, il a été longtemps postulé que ceux-ci ne nécessitaient pas de thermogénèse par le BAT pour acquérir de la chaleur corporelle. Chez le fœtus, le BAT se développe au niveau embryonnaire bien avant le WAT, permettant ainsi au nouveau-né d'avoir un moyen de garder sa température corporelle afin de ne pas être en hypothermie. Le BAT constitue 1 à 4% de la masse corporelle du nouveau-né. On observe que la quantité de BAT diminue après l'enfance mais on peut toujours retrouver une certaine partie chez l'adulte qui a conservé ses capacités thermogéniques (Cunningham et al., 1985; Lean et al., 1986; Lepper et Fan, 2010). La découverte du BAT est due à l'utilisation d'un radiotracer de glucose pour la détection de cellules tumorales, cellules possédant un fort métabolisme. En effet, l'utilisation du ¹⁸F-fluorodésoxyglucose montrait des zones intenses en tomographie à émissions de positons (TEP-scan) le long des vertèbres ainsi qu'au niveau des clavicules. Pensant que c'était un artéfact du signal, il a fallu par la suite la combinaison du TEP-scan et de la tomodensitométrie afin de montrer qu'il s'agissait bien d'un tissu qui utilise le glucose pour former de la chaleur (Chakraborty et al.,

2015). Chez l'homme, ces dépôts sont retrouvés au niveau cervical, supra claviculaire et paravertébral (Figure 2). Le BAT est fortement vascularisé ce qui lui permet d'amener les nutriments nécessaires à la thermogénèse ainsi que de pouvoir propager la chaleur produite. Il possède une innervation reliée au système nerveux sympathique (SNS) et par son neurotransmetteur, la norépinéphrine (NE). Lors d'une exposition au froid, le cerveau libèrera la NE qui agira sur le récepteur β -adrénergique (β -AR), principalement l'isoforme 3 dans le BAT. La signalisation de celui-ci entraînera l'induction des gènes impliqués dans la thermogénèse, et ce, à court ou long terme (Lowell et Flier, 1997; Nicholls et al., 1986). On retrouve la présence du BAT chez des patients souffrant de tumeurs bénignes du tissu adipeux brun (hibernome) ou de phéochromocytomes, des tumeurs de la glande surrénale sécrétant de fortes quantités de catécholamines (Houstěk et al., 1993; Lean et al., 1986; Ricquier et al., 1982).

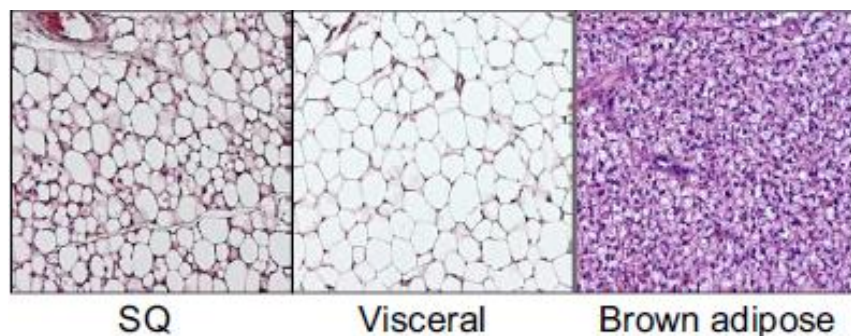


Figure 3 : Coupe histologique de différents dépôts de tissus adipeux humains. Coupe histologique avec coloration hématoxyline et éosine sur du scWAT (gauche), du vWAT (centre) et du BAT (droite). Illustration adaptée de Berry et al., Development, 2013.

1.2.3 Tissu adipeux du sein

Le tissu adipeux de la glande mammaire (mgWAT pour mammary gland WAT) a été proposé provenant du WAT. Cependant, ce tissu possède certaines différences avec le WAT. Il se caractérise par une forte plasticité cellulaire lors de la reproduction. Le sein est un tissu très fibreux possédant canaux épithéliaux associés à des lobules adipeux. Les études chez la souris montrent

que lors de la gestation, la taille des adipocytes augmente pouvant aller jusqu'au double de leur capacité à former et entreposer des lipides. À la fin de cette gestation, la lactation va démarrer et arrêter la lipogenèse. Par la suite, la taille du mgWAT diminue et on constate une transition des adipocytes mammaires vers des cellules épithéliales mammaires sécrétoires, qui permet d'effectuer le transfert des lipides aux cellules adjacentes lors de la synthèse du lait. On constatera en premier la diminution des cellules à proximité de l'épithélium. À la fin de la lactation, le mgWAT retournera à son état de pré-gestation avec des adipocytes de taille normale (Cinti, 2018). La croissance de ce tissu nécessite le remodelage du micro-environnement de la glande mammaire par l'implication de protéases dégradant la matrice ainsi que des macrophages nichés dans le tissu (Lilla et Werb, 2010). Le mgWAT interagit sur l'épithélium mammaire en induisant la croissance cellulaire, en jouant le rôle de support structurel et en régulant divers signaux tels que la différenciation, l'apoptose et la ramification des canaux galactophores. Il a été démontré que la perte d'adipocytes matures entraînait un faible embranchement des canaux épithéliaux. Le mgWAT sécrète aussi des hormones qui lui sont propres telles que la prolactine qui joue un rôle dans la production de lait et ainsi que des hormones stéroïdiennes telles que les œstrogènes. Le mgWAT produit de l'œstrone et de l'œstradiol grâce à une aromatasase (Couldrey et al., 2002; Hovey et Aimò, 2010; Hugo et al., 2008).

1.2.4 Autres types de tissus adipeux

1.2.4.1 Tissu adipeux du derme - dermal WAT

Au niveau du derme situé dans la peau, le dWAT (pour dermal WAT) est en contact avec les follicules pileux et possède une plasticité associée avec le cycle des follicules (Chase et al., 1953; Driskell et al., 2014). Le dWAT s'expand au début de la formation de nouveaux poils et se réduit à la fin du processus (Stenn et Paus, 2001). Certaines études ont pu impliquer l'expansion

du dWAT dans la réponse contre le froid (Kasza et al., 2014). Les adipocytes dermaux induisent la cicatrisation des plaies mais ces mécanismes restent pour l'instant inconnus (Schmidt et Horsley, 2013). Il a été démontré chez la souris que la régénération des follicules pileux et des adipocytes dermaux s'effectuait pendant la réparation de plaies large mais pas au niveau des petites plaies (Ito et al., 2007; Plikus et al., 2017). Enfin, le dWAT est important dans la réponse immunitaire innée face aux infections bactériennes. Lors d'une infection au niveau de la peau par *Staphylococcus Aureus*, le dWAT augmente ce qui lui permet de produire et sécréter la cathélicidine, un peptide antimicrobien qui perturbe les membranes éliminant ainsi les bactéries (Kościuczuk et al., 2012; Zhang et al., 2015).

1.2.4.2 Tissu adipeux de la moelle osseuse - MAT

Le concept de MAT (Marrow Adipose Tissue) débute dans les années 1940 suggérant que certains adipocytes provenaient de précurseurs hématopoïétiques. Le MAT constitue 7% du volume de la moelle osseuse et compte pour 10% de la masse adipeuse totale chez une personne saine. Le MAT possède des cellules stromales pouvant être multipotentes : l'utilisation de certaines molécules permettent d'inhiber l'ostéogénèse et d'activer l'adipogénèse. Ces effets amènent à l'augmentation d'adipocytes dans les os ainsi qu'une perte de la densité osseuse dans la majorité des études (Cawthorn et al., 2014; Fazeli et al., 2013). Il existe deux types de MAT : un qui influence l'hématopoïèse et/ou le remodelage squelettique (rMAT) et l'autre qui est impliqué dans le développement du squelette (cMAT). La composition lipidique et l'expression génique diffèrent entre ces deux sous-types (Scheller et al., 2015). Le MAT a un impact négatif sur la formation de cellules hématopoïétiques par la diminution des précurseurs et l'on observe une expansion ou accumulation du MAT associée à diverses pathologies telles que le vieillissement, l'ostéoporose, le diabète de type 1 et la déficience en œstrogène chez la femme (Botolin et McCabe, 2007;

Justesen et al., 2001; Naveiras et al., 2009; Syed et al., 2008). Certaines lipodystrophies congénitales ainsi que la maladie de Gauchers diminue la quantité de MAT résultant en une accumulation de lipides au niveau du foie (Scheller et Rosen, 2014).

En conclusion, il existe une variété de TA qui sont distribués dans des régions distinctes du corps humain et qui possèdent des fonctions spécifiques allant du maintien de la température corporelle au stockage d'énergie.

1.3 Composition du TA

Le TA n'est pas constitué que d'adipocytes mais contient d'autres types cellulaires. Lorsque le TA est dissocié mécaniquement, digéré par des enzymes telles que la collagénase et centrifugé, on observe la formation de plusieurs couches dans le tube. La couche supérieure est constituée de lipides sous forme d'huile et, sous cette couche, on a les adipocytes matures. Le culot cellulaire au fond du tube renferme la fraction stroma-vasculaire (SVF pour Stromal vascular fraction). Entre le culot et les adipocytes matures, il y a une couche aqueuse résultant de la digestion du TA (Rodbell et Jones, 1966) (Figure 4).

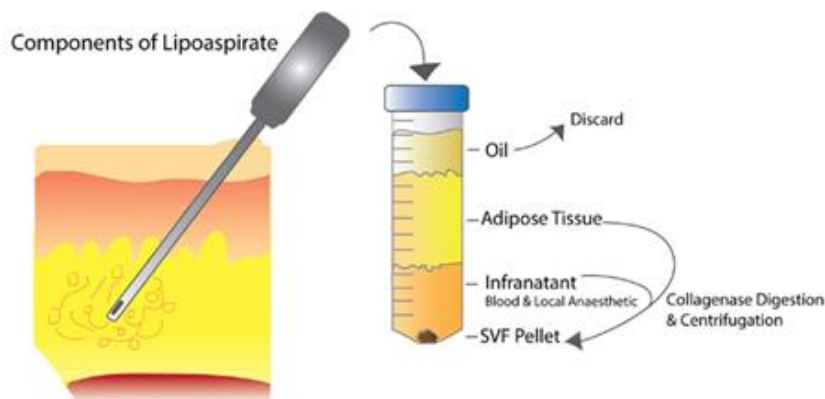


Figure 4 : Séparation des différentes composantes cellulaires provenant du tissu adipeux. Illustration adaptée de Shukla et *al.*, *Frontiers in Surgery*, 2015.

1.3.1 La fraction stroma-vasculaire

Les adipocytes ne représentent que 30 à 60% du contenu cellulaire dans le TA mais constituent 90% du volume du tissu en raison de l'accumulation des lipides. Le reste du tissu est composé par plusieurs types cellulaires qui font partie de la SVF. Il existe des cellules sanguines, des cellules impliquées dans la vascularisation du TA telles que les cellules endothéliales (CE) et les péricytes ainsi que des cellules immunitaires. Il y a aussi et surtout les progéniteurs adipocytaires qui s'auto-renouvellent et se différencieront en adipocytes matures (Ailhaud et al., 1992). La composition des différents types cellulaires du TA peut varier en fonction de la localisation des dépôts ainsi que de la nature du TA (WAT vs BAT) (Prunet-Marcassus et al., 2006; Williams et al., 1994). Avec les techniques de cytométrie en flux, on est désormais capable de distinguer les précurseurs adipocytaires des autres cellules stromales non adipogéniques (Rodeheffer et al., 2008; Tang et al., 2008). La caractérisation des différents types cellulaires a pu être effectuée grâce à des marqueurs de surface : CD14, CD34 et CD31. Le CD14 ou récepteur aux lipopolysaccharides est fortement exprimé sur les cellules immunitaires telles que les monocytes et macrophages. CD34 est exprimé dans les cellules souches hématopoïétiques ainsi que les cellules endothéliales. Finalement, CD31 ou PECAM (Platelet endothelial cell adhesion molecule) ne se retrouve qu'au niveau des cellules endothéliales dans cette sélection (Bouloumié et al., 2006) (Figure 5).

a) Les précurseurs adipocytaires

Les adipocytes sont des cellules différenciées qui ne peuvent pas proliférer et qui ont une espérance de vie d'environ 10 ans. Des cellules capables de proliférer et pouvant devenir des adipocytes sont indispensables pour préserver la fonctionnalité du TA (Spalding et al., 2008). Dans la SVF, il existe une faible fraction de cellules (environ 2,5%) que l'on appelle cellules souches adipeuses (ASC pour Adipose-derived Stem Cells) (Nunes et al., 2013). Il a été démontré que ces

ASC provenant de lipoaspiration pouvaient, dépendamment des conditions de culture, se différencier vers plusieurs types cellulaires tels que des adipocytes, des ostéoblastes ou des chondrocytes (Zuk et al., 2002). Certains ont même proposé l'obtention de neurones tandis que d'autres proposaient que ces cellules différenciées soient similaires à des neurones (Fujimura et al., 2005; Safford et al., 2002). Ces ASC sont similaires aux cellules souches mésenchymateuses (MSC pour Mesenchymal Stem Cells). Cependant, la forte expression du CD34 chez les ASC contrairement aux MSC amène à ne pas faire l'amalgame entre ces deux types cellulaires (Maumus et al., 2011). D'autre part pour la même condition de culture, ces deux populations de cellules possèdent des signatures protéomiques et génomiques différentes (Noël et al., 2008). Les ASC sont étudiées dans le contexte de médecine régénérative puisqu'il a été montré que ces cellules migrent vers les sites de blessures et relarguent des peptides pouvant réduire l'inflammation ainsi qu'augmenter la cicatrisation (Huang et al., 2013; Li et al., 2016). Elles affectent aussi la densité capillaire, la perfusion du tissu adipeux, l'assemblage du réseau ainsi que sa stabilité (Cai et al., 2007; Traktuev et al., 2008). Par ailleurs, ces cellules ont permis d'avancer la compréhension de la différenciation des progéniteurs en adipocytes, l'adipogenèse. Cette partie sera vu plus en détails dans la section 2. Il existe des progéniteurs adipeux (PAs) capables de proliférer et de se convertir en adipocytes. Cependant, ces cellules souches sont déjà engagées dans l'adipogenèse et ne peuvent se différencier qu'en adipocytes. Elles se distinguent des ASC par un potentiel de différenciation moins important.

b) Les cellules des vaisseaux sanguins

Le TA a besoin d'être irrigué afin de stocker et de relarguer les nutriments. Pour ce faire, il nécessite des cellules endothéliales (CE) pour former des tubules vasculaires pouvant acheminer le sang (Madri et Williams, 1983). Les cellules qui les entourent, les cellules périvasculaires,

possèdent le récepteur beta pour lier le PDGF (PDGFR β : Platelet-Derived Growth Factor Receptor beta). Ces dernières jouent un rôle majeur dans la stabilisation des tubules vasculaires formés (Maijub et al., 2015). Les CE et cellules périvasculaires représentent respectivement 30% et 20% des cellules de la SVF (Nunes et al., 2013). L'absence de CE dans la SVF rend impossible toute formation d'un réseau vasculaire *in vivo* (Madri et Williams, 1983). Les autres constituants cellulaires de la SVF ne sont alors pas assez suffisants pour former des tubules sanguins. Même si les CE peuvent former des tubules en absence d'autres cellules de la SVF, il a déjà été mis en évidence que les autres cellules de la SVF contribuent à la formation et la stabilité du réseau sanguin mature dans le TA.

c) Les cellules immunitaires

La SVF contient plusieurs cellules impliquées dans la régulation immunitaire et le remodelage vasculaire. Les macrophages/monocytes constituent environ 5% du nombre de cellules du TA. Une étude démontre que ceux-ci participent à l'assemblage des vaisseaux sanguins du TA (Koh et al., 2011; Weisberg et al., 2003). L'absence de macrophages dans les souris se traduit par une augmentation de l'intégrité des vaisseaux sanguin au cœur du dépôt adipeux comparativement à la périphérie de ce même dépôt tandis que cette intégrité est uniforme chez les souris contrôles (Fantin et al., 2010). Au niveau de vWAT, on constate une plus grande proportion de cellules immunitaires que dans le scWAT. Sachant qu'il y a plus d'inflammation dans le vWAT dans un contexte d'obésité, on constate une augmentation de l'expression de la protéine chimiotactique des macrophages/monocytes MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1) chez les souris ayant reçus un régime riche en gras (HFD pour High Fat Diet). On observe aussi l'augmentation de cette protéine dans la SVF de patients obèses (Hamaguchi et al., 2012; O'Rourke et al., 2011). Dans un contexte d'obésité, la quantité de macrophages peut atteindre jusqu'à 50%, dépendamment de la

masse adipeuse (Canello et al., 2005; Ortega Martinez de Victoria et al., 2009; Weisberg et al., 2003). Dès le développement de l'obésité, on observe que les macrophages ont tendance à s'agglutiner et à accumuler les lipides (Kosteli et al., 2010; Lumeng et al., 2008). L'accumulation de macrophages ainsi que l'environnement hypoxique dans le TA des patients obèses induit l'expression de diverses cytokines pro-inflammatoires dont l'interleukine-1 beta (IL-1 β) et l'interleukine 6 (IL-6) (Dong et al., 2013; O'Rourke et al., 2011).

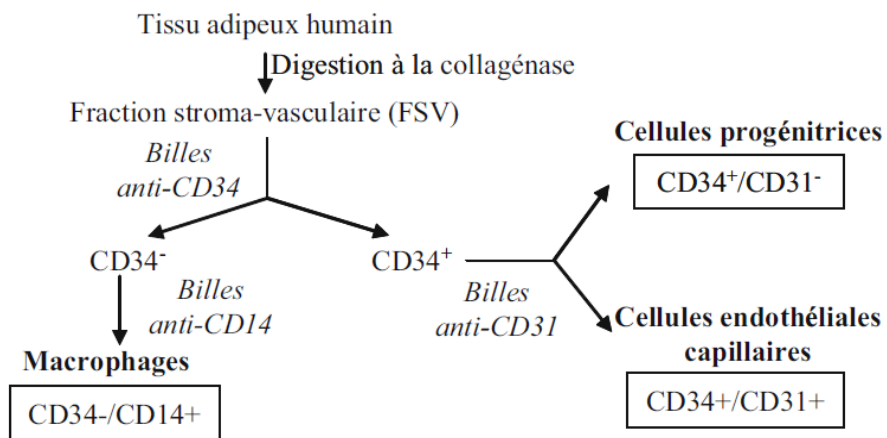


Figure 5 : Immunoselection des cellules de la fraction stroma-vasculaire provenant de tissus adipeux humains. Illustration d'après Bouloumié et al., Obésité, 2006.

1.3.2 Adipocytes

En peut constater que la SVF fait partie intégrante du TA mais ce sont les adipocytes qui effectuent principalement les fonctions de ce tissu. Dans la partie qui suit, nous allons discuter des types d'adipocytes qui existent dans les différents TA. L'origine des adipocytes blancs, bruns et brites sera discuté dans la partie 2.1 - Progéniteurs adipeux. Nous verrons alors que les adipocytes blancs et bruns ont des origines distinctes.

1.3.2.1 Adipocytes blancs

Les adipocytes blancs possèdent une forme sphérique et ont une taille qui peut varier de 25µm jusqu'à 200 µm dépendamment de la quantité de triglycérides incorporés dans la cellule. Il n'existe qu'une seule énorme gouttelette lipidique dans cette cellule pour stocker les triglycérides. En effet, les triglycérides ont un fort apport énergétique et nécessitent très peu d'eau pour être stockés, contrairement au glycogène et aux protéines qui en demandent cinq fois plus (Klaus et al., 2012). Ils constituent donc le moyen le plus efficace pour stocker l'énergie dans l'organisme. Le stockage lipidique représente 90% du volume cellulaire et occupe la majeure partie du cytoplasme. De ce fait, le noyau cellulaire ainsi que les mitochondries, qui sont en faible quantité, sont aplatis vers la membrane cellulaire (Hirsch et Batchelor, 1976) (Figure 6). Le rôle de l'adipocyte blanc mature sera vu plus tard dans la section 1.4.1 à 1.4.3 : le stockage des lipides, la lipolyse et le rôle endocrinien du WAT.

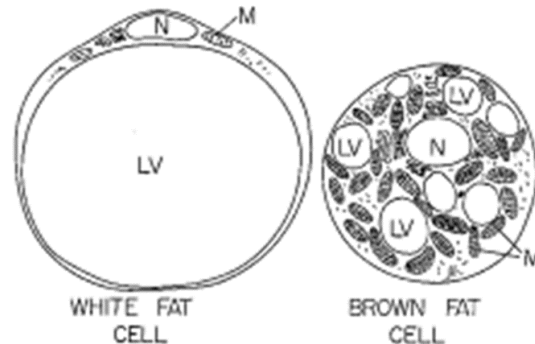


Figure 6 : Représentation d'un adipocyte blanc et brun. Cette figure montre les différences morphologiques entre ces deux types d'adipocytes, principalement au niveau du nombre de mitochondries et de la taille des gouttelettes lipidiques. N = noyau, M = mitochondrie, LV = vacuole lipidique. Création de courtoisie du Dr. John Horowitz, U.C. Davis.

1.3.2.2 Adipocytes bruns

Les adipocytes bruns sont plus petits que les adipocytes blancs allant de 15 à 60µm en taille et ayant une forme polygonale. Leurs gouttelettes lipidiques contenant les triglycérides sont aussi

beaucoup plus petites, de formes polygonales et de tailles variables. Ils ont de très nombreuses mitochondries qui sont plus larges que chez les adipocytes blancs. L'accumulation de ces multiples mitochondries confèrent une coloration brune d'où l'appellation de tissu adipeux brun (Figure 6). On retrouve uniquement dans ces adipocytes la protéine UCP1 (Uncoupling protein 1) qui permet de découpler la phosphorylation oxydative permettant d'utiliser les lipides pour produire de la chaleur. Sa présence est liée à la température biologique des adipocytes bruns et son rôle sera vu dans la section 1.4.4 : Dépense énergétique du BAT - la thermogénèse.

1.3.2.3 Adipocytes brites

Il existe aussi, dans le WAT, des adipocytes ayant des caractéristiques thermogéniques d'adipocytes bruns que l'on nomme beige ou brite (pour brown in white) (Petrovic et al., 2010). En condition normale chez des rongeurs, ces adipocytes ont les caractéristiques morphologiques ainsi que l'expression de la protéine UCP1 similaires aux adipocytes blancs. Cependant lors d'exposition au froid ou sous l'induction de signalisation des catécholamines, on constate une augmentation d'UCP1 ainsi que l'apparition de plusieurs gouttelettes lipidiques les faisant ressembler à des adipocytes bruns (Wu et al., 2012). L'expression d'UCP1 dans les adipocytes brites est fortement induite comparativement aux adipocytes blanc chez la souris. Cependant, la détection d'UCP1 dans les adipocytes brites est nettement inférieure à celle retrouvée chez les adipocytes bruns (Nedergaard et Cannon, 2013). On remarque aussi une différence de leur abondance dans les différents dépôts, la quantité d'adipocytes brites est plus élevée dans les TA inguinaux et rétropéritonéaux que le TA périgonadal (Xue et al., 2007). Cet adipocyte posséderait deux fonctions : la première de stocker les lipides et la deuxième de les utiliser pour produire de chaleur au moment opportun.

Chez l'homme, les cellules positives pour UCP1 sont localisées dans le BAT supraclaviculaire sous forme de grappes entourées d'adipocytes blancs, ce qui ressemble étrangement à l'apparition des adipocytes beiges chez la souris lors d'une exposition au froid. L'expression de gènes thermogéniques tels qu'*UCP1*, *PGC-1 α* (Peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1-alpha), *PRDM16* (PRD1-BF-RIZ1 homologous domain containing protein-16) dans tous les dépôts de BAT humains montre que ceux-ci sont capables de thermogénèse mais cette signature thermogénique ne permet pas de déterminer si ce sont des adipocytes bruns ou beiges (Virtanen et al., 2009). Plusieurs études chez la souris ont permis de mettre en évidence plusieurs marqueurs spécifiques pour les différents adipocytes. Par la suite, Wu a mesuré l'expression des différents marqueurs dans les différents dépôts d'adultes et d'enfants (Waldén et al., 2012; Wu et al., 2012). Ils ont découvert que des marqueurs étaient identiques au scWAT et ils ne permettent donc pas de différencier les trois types d'adipocytes. Ils ont remarqué qu'une forte expression du marqueur spécifique brun ZIC1 ainsi une faible expression du marqueur brite TBX1 dans le BAT interscapulaire (iBAT) chez l'enfant comparativement à son homologue adulte (Lidell et al., 2013). Ces résultats démontrent que le iBAT chez l'adulte et l'enfant ne sont pas les mêmes. De plus, le BAT adulte est particulièrement enrichi en marqueurs brites (Sharp et al., 2012). L'expression de divers gènes se retrouve entre les deux types cellulaires. La majorité des gènes impliqués dans la thermogénèse tels qu'*UCP1*, *PGC-1 α* , *PRDM16* et *CIDEA* sont présents dans les deux adipocytes bruns et brites (Cohen et Spiegelman, 2015). Mais, il existe des gènes qui sont spécifiques aux adipocytes bruns et non aux brites et vice-versa (Waldén et al., 2012; Wu et al., 2012). La figure 7 présente les marqueurs des différents adipocytes chez la souris et l'homme (Peirce et al., 2014).

D'autres études indiquent que les trois différents adipocytes peuvent être présents dans un même tissu notamment au niveau du cou. Une équipe a prélevé du TA provenant du cou dans 5

différents dépôts selon la profondeur chez une trentaine de patients. Les analyses ont permis de découvrir que les adipocytes blancs étaient situés en périphérie du cou (Figure 8). L'apparition d'adipocytes bruns survient dans la couche intermédiaire avec des gouttelettes lipidiques de tailles intermédiaires et un niveau de mitochondries supérieur à celui des adipocytes blancs. En allant plus en profondeur, le ratio d'adipocytes bruns versus adipocytes brites augmente pour n'y avoir que des adipocytes bruns ayant une forte quantité de mitochondries et des gouttelettes lipidiques très petites (Cypess et al., 2013; Jespersen et al., 2013; Lidell et al., 2013; Sharp et al., 2012; Wu et al., 2012).

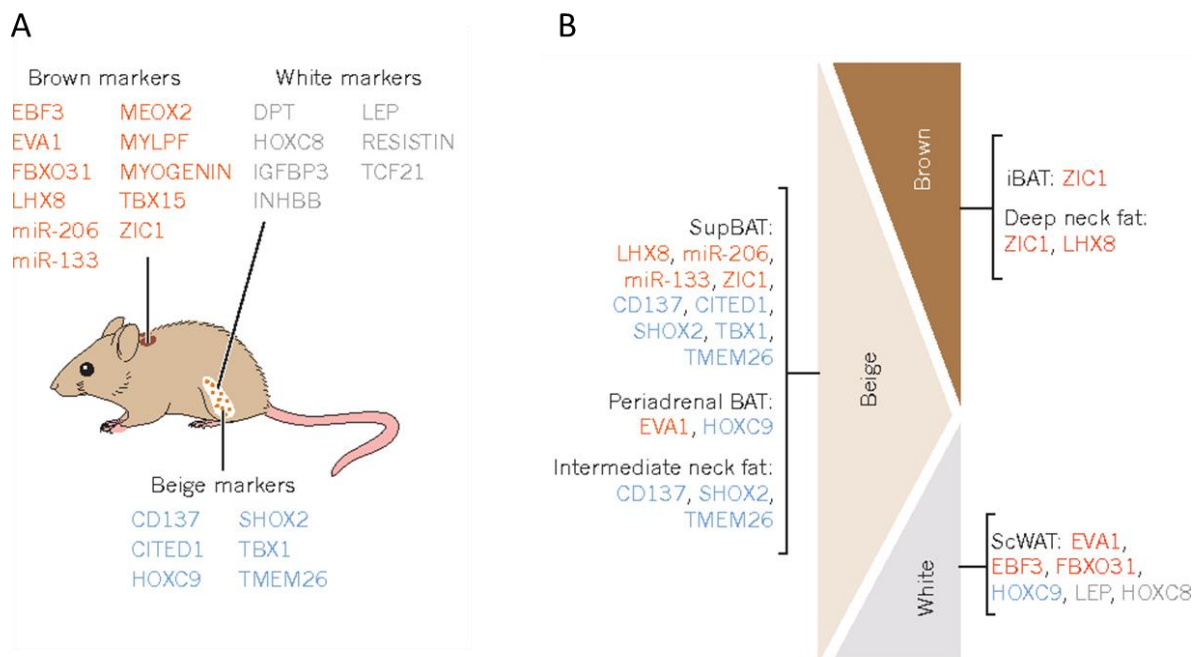


Figure 7 : Évaluation des marqueurs dans les adipocytes blancs, brites et bruns chez la souris et chez l'homme. A) Les marqueurs blancs, brites et bruns bien établis chez la souris. Les marqueurs brites sont surexprimés dans le scWAT après exposition au froid. B) Comparaison des différents marqueurs retrouvés chez la souris dans les certains dépôts humains. Illustration adaptée de Peirce et al., Nature, 2014.

Les fortes différences observées entre les adipocytes murins des humains montrent que toutes études effectuées sur la souris ne peuvent pas être transposées à l'homme. Puisque l'expression des marqueurs varie entre les types cellulaires murins et humains, il serait désormais

préférable d'utiliser des modèles cellulaires humains à partir de PAs provenant de différents dépôts mais aussi de diverses profondeurs du dépôt. Cette utilisation permettra d'approfondir les études spécifiques sur les adipocytes humains.

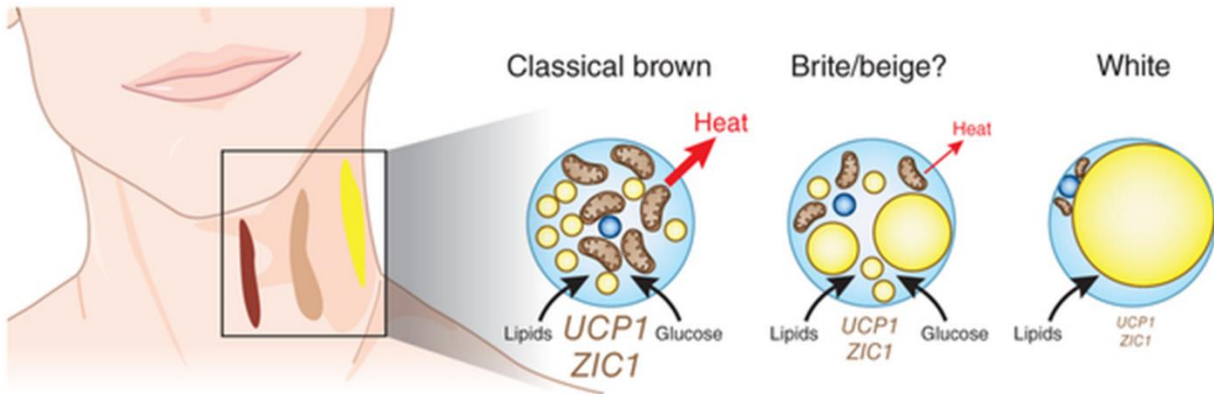


Figure 8 : Localisation des différents types adipocytaires dans le cou. En périphérie du tissu, les adipocytes majoritaires sont blancs avec leur énorme gouttelette lipidique (jaune) et leur faible niveau de mitochondries (brun). Dans les dépôts intermédiaires, on constate des adipocytes de type brite dont les gouttelettes sont de taille moyenne et un niveau de mitochondries un peu plus élevé comparativement aux adipocytes blancs. Finalement, les dépôts en profondeur sont bruns et possèdent de très petites gouttelettes et une forte quantité de mitochondries. On constate avec la progression en profondeur des différents dépôts une augmentation de l'expression de gènes bruns comme UCP1 et ZIC1. Illustration d'après Nedergaard et Cannon, *Nature Medicine*, 2013.

De plus, une question fait toujours débat de nos jours : Est-ce que les adipocytes brites proviennent d'une transdifférenciation d'adipocytes blancs ou bien proviennent-ils d'une lignée de précurseurs adipocytaires bien définie? (Cinti, 2009; Wu et al., 2012). Cette question sera vue dans le chapitre 2 - Développement de la cellule adipeuse.

1.4 Fonction du tissu adipeux

Comme mentionné précédemment, le WAT ne sert pas que d'isolant thermique et est impliqué dans diverses fonctions servant de régulateur de l'homéostasie énergétique ou de tissu endocrinien. Dans l'homéostasie énergétique, le WAT permet d'emmagasiner l'énergie sous forme de lipides en période de repos et de l'utiliser en période d'effort à travers un processus appelé

lipolyse. La fonction endocrinienne du WAT est implicitement reliée cette homéostasie. Le BAT, quant à lui, dépense l'énergie de la cellule afin de produire de la chaleur afin de réguler la température corporelle et possède aussi des fonctions endocrines qui sont liées au processus thermogénique. Dans cette partie, nous allons décrire en détails les diverses fonctions de ces deux TA.

1.4.1 Stockage énergétique dans le WAT

Une des principales fonctions du tissu adipeux est de stocker l'énergie sous forme de lipides. Ce stockage peut s'effectuer de deux façons : soit par la lipogenèse *de novo*, soit par le recaptage d'acides gras libres plasmatiques. La lipogenèse est la synthèse d'AGL à partir de substrats non lipidiques. Chez l'humain, le TA possède toutes les enzymes impliquées dans la lipogenèse mais ce processus va plutôt s'effectuer au niveau du foie. (Björntorp et Sjöström, 1978; Sjöström et al., 1973). Le glucose, qui est le substrat principal pour la lipogenèse, induit la libération de l'insuline qui possède des effets activateurs de la lipogenèse et inhibe le relargage pancréatique du glucagon, molécule inhibant ce processus. En revanche, la lipogenèse est inhibée lors de jeûne puisqu'il y a diminution des niveaux sanguins de glucose et d'acide gras libres (Kersten, 2001).

Le TA va principalement constituer ses réserves de lipides par le recaptage d'AGL. Lors de repas riches en carbohydrates, la lipogenèse dans le foie mène à l'élévation des niveaux de TG. Les TG sont stockés dans des particules circulantes, majoritairement les chylomicrons et les lipoprotéines à très faible densité (VLDL : Very Low Density Lipoprotein). Ces particules sont beaucoup trop grosses pour pouvoir passer à travers les capillaires sanguins et se faire absorber par les adipocytes. Afin d'être transportés vers les adipocytes, les TG doivent être dissociés en AGL et relargués par les chylomicrons (CM) ou les VLDL par le biais de la lipoprotéine lipase (LPL)

(Wong et Schotz, 2002; Wong et al., 1997). La LPL est produite et libérée par les adipocytes sous l'effet de l'insuline pendant la nutrition; à l'opposé, elle diminue en période de sevrage (Sadur et Eckel, 1982). Elle se transloque vers la lumière artérielle et sera séquestrée par des protéines glycosaminoglycane à la surface des cellules endothéliales appelées héparane sulfate (HSPG : Heparan Sulfate Proteoglycans). Les apolipoprotéines des CM et des VLDL, chargées négativement, vont lier les HSPG, qui eux sont chargées négativement, afin de faciliter la libération des AGL par la LPL (Fielding et Frayn, 1998; Goldberg, 1996) (Figure 9).

Les AGL libérés seront absorbés par les adipocytes de deux manières : soit de manière passive à travers la membrane cellulaire ou par un transport accéléré par certaines protéines membranaires. Par transport passif, comme les AGL sont des molécules hydrophobes, elles diffusent à l'intérieur des rafts lipidiques et peuvent diffuser rapidement si la concentration est élevée (Hamilton et al., 2002; Kamp et Hamilton, 2006; Kleinfeld et al., 1997). D'autres protéines telles que les protéines de transport d'acide gras (FATP pour Fatty Acid Transport Protein) facilitent ce transport. Il existe deux types de FATP chez les adipocytes, FATP-1 et FATP-4. Chez la souris, l'insuline favorise la translocation de FATP-1 vers la membrane des adipocytes et on constate une augmentation du captage des AGL (Stahl et al., 2002). FATP-1 joue un rôle dans la captation des AGL au niveau basal ou stimulé par l'insuline (Lobo et al., 2007; Stahl et al., 2002). FATP-4, quant à elle, est plutôt impliquée dans la recapture des AGL qui seront réestérifiées pour donner suite à la lipolyse (voir section suivante). Il existe aussi la FAT/CD36 (Fatty Acid Translocase) qui permet le transport des AGL dans les adipocytes et dans les muscles. Ainsi, chez les souris déficientes pour CD36, il y a une concentration faible de gras dans les adipocytes ainsi qu'une augmentation des niveaux plasmatiques d'AGL et de TG comparativement aux souris sauvages (Febbraio et al., 1999; Hajri et Abumrad, 2002).

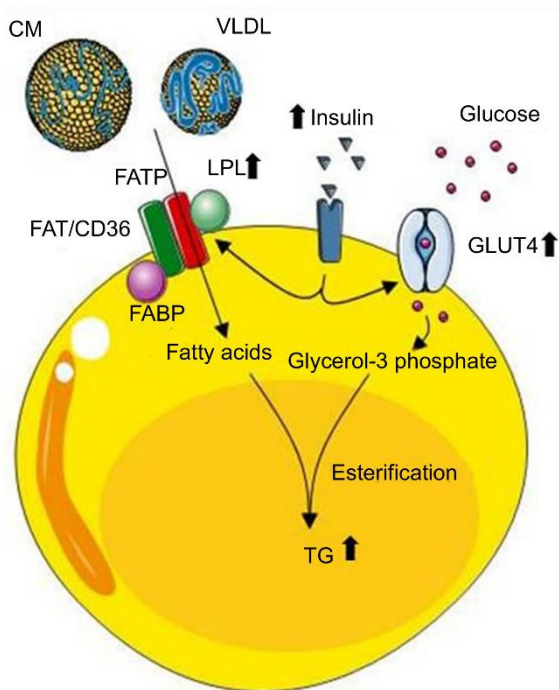


Figure 9 : Lipogenèse et synthèse des triglycérides dans l'adipocyte. Les CM et les VLDL contenant les triglycérides sont en mouvement dans la circulation sanguine. Les effets de l'insuline induisent la production et sécrétion de la LPL dans les adipocytes. La LPL au niveau des cellules endothéliales libère les AGL qui sont acheminés dans l'adipocyte par des protéines de transport. L'insuline va aussi transloquer GLUT4 pour acheminer le glucose qui deviendra par la glycolyse du G3P. Par l'acyl-CoA synthétase, les AGL deviennent des acyl-CoA qui s'associeront avec le G3P pour donner les triglycérides. Illustration adaptée de Badimon et *al.*, Revista española de cardiología (English edition), 2015.

À l'intérieur de l'adipocyte, les AGL sont transformés en acyl-CoA par l'acyl-CoA synthétase (Ellis et al., 2010). La formation des TG implique l'ajout séquentiel d'acyl-CoA sur une base de glycérol. La voie de synthèse principale des TG démarre avec le glycérol provenant de la glycolyse. Le glycérol est phosphorylé par la glycérol kinase pour donner du glycérol-3-phosphate (G3P). La première étape nécessite l'ajout d'un groupement acyl-CoA sur le G3P grâce à l'enzyme GPAT (Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase) pour donner l'acide lysophosphatidique (Figure 10). Une deuxième étape entraîne le transfert d'un autre acyl-CoA sur cet acide lysophosphatidique résultant en un acide phosphatidique. La phosphatidate lipase ou Lipin retire un groupement phosphate de l'acide phosphatidique afin de donner du DAG. L'étape finale consiste à transférer le dernier acyl-CoA sur le DAG pour former le TG (Du et al., 2015). Cette dernière réaction s'effectue principalement par deux enzymes, DGAT1 et DGAT2 (Diglyceride acyltransferase). Leurs expressions sont les plus élevées au niveau du TA et du foie, d'où la formation importante de TG dans ces deux tissus. (Cases et al., 1998, 2001).

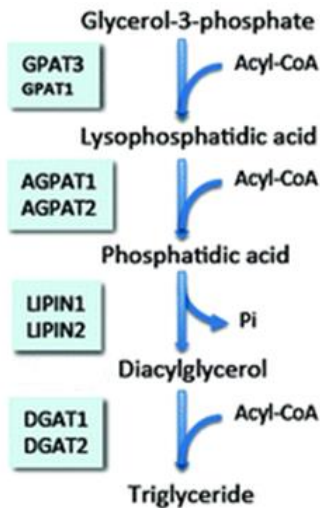


Figure 10: Synthèse des triglycérides dans les adipocytes. Les différentes étapes en partant du G3P pour devenir triglycéride. Illustration réalisée par F. Fougelle et P. Ferré et adaptée du : « Physiology and Physiopathology of Adipose Tissue de J. Bastard et B. Fève, 2013.

Les TG ne peuvent pas se retrouver libres dans le cytoplasme. Ils doivent alors être stockés dans les compartiments que l'on nomme gouttelette lipidique. Les gouttelettes sont composées de diverses molécules dont la périlipine qui est la protéine majeure qui constitue l'enveloppe des gouttelettes (Greenberg et al., 1991). La périlipine est utilisée comme barrière protectrice empêchant la lipolyse des gouttelettes (voir section suivant : Lipolyse du WAT) (Brasaemle et al., 1997). Grâce à la spectrométrie de masse, on a mis en évidence l'existence d'une quarantaine de protéines impliquées dans la synthèse l'utilisation et le stockage des lipides (Liu et al., 2004). La famille des FABP (Fatty Acid Binding Protein) dont FABP4 facilite le transfert des acide gras en dehors des adipocytes pour donner suite à une lipolyse (Coe et al., 1999). La cavéoline-1 (CAV1) est fortement retrouvée dans les adipocytes au niveau des gouttelettes lipidiques et permet la régulation de plusieurs signaux dont la lipolyse (Brasaemle et al., 2004; Cohen et al., 2004; Razani et al., 1999).

1.4.2 Lipolyse du WAT

À l'opposé de la lipogénèse, la lipolyse est impliquée lorsque les niveaux d'énergie de l'organisme sont faibles et nécessitent l'utilisation des réserves de TG. Les AGL sont les produits énergétiques les plus relargués par le tissu adipeux. Pour libérer les trois AGL qui sont liés au

glycérol par des groupements esters, il existe principalement trois enzymes impliquées: l'adipose triglycéride lipase (ATGL), la lipase hormonosensible (HSL : hormone-sensitive lipase) ainsi que la monoacylglycérol lipase (MAGL) (Figure 11).

L'ATGL a une forte affinité pour les triglycérides et ne libère qu'un AGL soit en position 1 ou 2 du triglycéride. La triglycéride lipase est inhibée par l'action de l'insuline. En effet lors d'un apport alimentaire, le TA doit stocker les acides gras et non les libérer (Frayn et al., 2006).

La protéine HSL peut couper le groupement ester en position 1 ou 3. Même si HSL peut agir sur les triglycérides, son activité catalytique *in vivo* se porte principalement sur le diacylglycérol (DAG). La dégradation du DAG en monoacylglycérol (MAG) est de 10 à 30 fois supérieure à celle du TG en DAG (Giudicelli et al., 1974). HSL peut être modulée par diverses molécules : elle est inhibée par l'insuline, comme l'ATGL, et activée par le glucagon et la norépinéphrine.

La MAGL va retirer le dernier acide gras sur le glycérol. Ces AGL sortent de la cellule à l'aide de la protéine FABP4 et se lieront avec l'albumine pour migrer dans la circulation sanguine vers les tissus nécessitant de l'énergie (Coe et al., 1999). Dans des conditions optimales de lipolyse, il n'y aurait que 2 molécules d'AGL libérées en moyenne par molécule de glycérol. L'AGL restant sera recyclé en TG par la liaison avec le glycérol. Le glycérol libre, quant à lui, est relargué hors de la cellule par l'aquaporine 7 pour être réutilisé dans le foie. (Fredrikson et al., 1981; Kersten, 2001; Zimmermann et al., 2004).

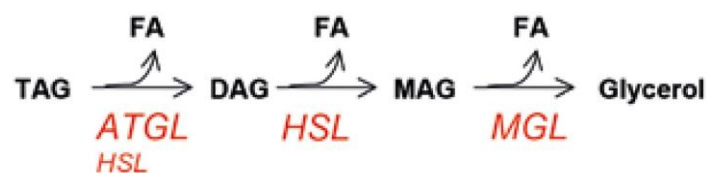


Figure 11 : Étape successive de la lipolyse des triglycérides. L'hydrolyse du triglycéride en acides gras libres et en glycérol par les lipases (ATGL, HSL et MGL). Illustration d'après Bolsoni-Lopes et al., Archives of Endocrinology and metabolism, 2015.

a) Catécholamines

Les catécholamines (norépinéphrine-épinéphrine) sont synthétisées par le système nerveux sympathique. Elles induisent fortement la lipolyse et furent étudiées intensivement (Arner, 2005; Carey, 1998; Fain et García-Sáinz, 1983; Large et al., 2004). Toutefois, la composante basale de la lipolyse qui libère très peu d'AGL n'est pas touchée. Les catécholamines se lient sur des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR : G Protein-Coupled Receptor), les β -AR, et les activent. Il existe diverses sous-unités alpha de protéines G mais celle du β -AR est une sous-unité $G\alpha_s$ qui est connue pour stimuler l'adénylate cyclase (AC) (Figure 12). L'AC augmente le taux d'AMP cyclique (AMPC) à partir de l'ATP. L'AMPC va se fixer sur les sites régulateurs de la protéine kinase A (PKA) et les dissocier des sites catalytiques (Kim et al., 2005). La PKA active va phosphoryler ATGL sur la sérine 404 afin d'effectuer la première hydrolyse sur le TG (Pagnon et al., 2012). La protéine HSL sera aussi phosphorylée sur divers sites (sérines 552, 554, 649, 650) afin de transloquer celle-ci du cytosol vers les gouttelettes lipidiques (Anthonsen et al., 1998; Holm, 2003; Su et al., 2003). La PKA phosphoryle la périlipine (sur les sites de sérines 81, 436, 497 et 522) afin de remodeler la gouttelette pour augmenter la surface disponible pour les enzymes lipolytiques et pour faciliter l'interaction entre HSL et la gouttelette (Clifford et al., 2000; Marcinkiewicz et al., 2006; Miyoshi et al., 2006; Moore et al., 2005; Sztalryd et al., 2003). La PKA interagit aussi avec CAV1 qui faciliterait l'interaction entre PKA et la périlipine (Cohen et al., 2004). Cependant, il semblerait que CAV1 intervienne aussi dans l'inhibition de la PKA (Razani et al., 1999). L'implication de CAV1 dans la lipolyse serait ambivalente.

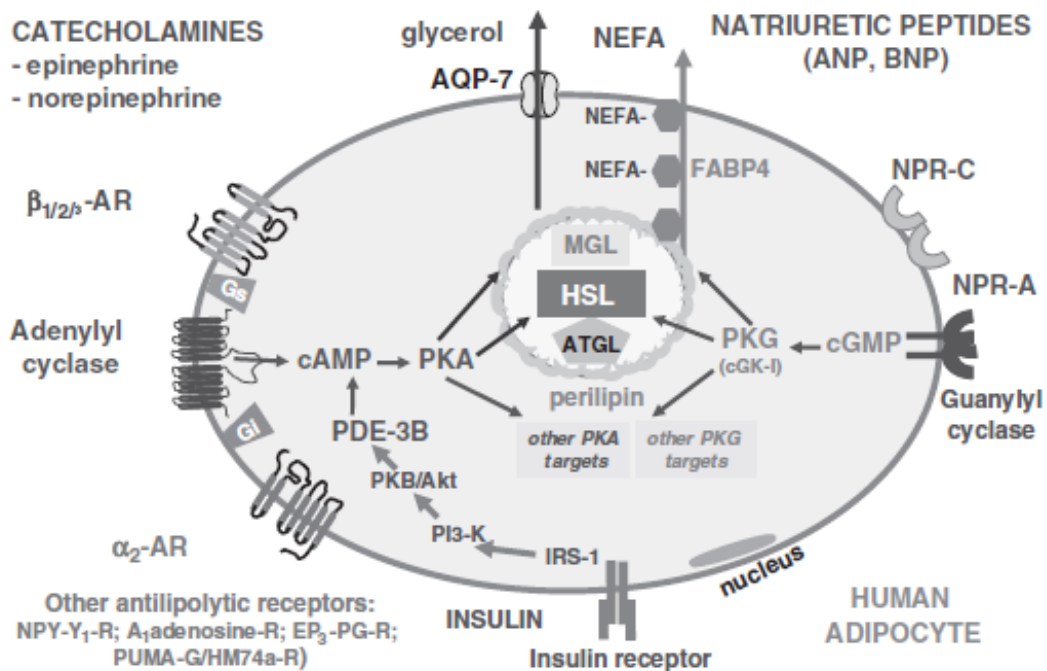


Figure 12 : Régulation de la lipolyse adipocytaire humaine. Les catécholamines et les peptides natriurétiques induisent la lipolyse par soit la PKA ou la PKG suite à leur interaction avec leurs récepteurs respectifs. Ces deux protéines kinases activent les trois enzymes clés de la lipolyse (ATGL, HSL et MGL) libérant les acides gras libres et le glycérol. Le glycérol sortira de la cellule par une aquaporine. Les AGL se lieront avec FABP4 pour accéder à la circulation sanguine. Les molécules antilipolytiques activent la protéine Gi et inhibent la lipolyse. L'insuline, quant à elle, inhibe la lipolyse en induisant l'hydrolyse de l'AMPc par la phosphodiesterase. Illustration d'après Lafontan, International Journal of Obesity, 2008.

b) Peptides natriurétiques

Les peptides natriurétiques sont connus pour leurs implications dans le système cardiovasculaire et rénal. En 2000, une première étude a pu montrer que ces peptides sont des puissants agents lipolytiques autant *in vivo* qu'*in vitro* (Sengenès et al., 2000). Leur signalisation est différente de celle des catécholamines, l'activation du récepteur A du peptide natriurétique induit l'activation de la guanylyl cyclase (GC) (Figure 12). La GC, tout comme l'AC, induit la cyclisation nucléotidique mais du GTP en GMPc au lieu de l'ATP. Le GMPc active la protéine kinase G (PKG) qui va phosphoryler HSL pour induire la lipolyse (Sengenes et al., 2003). Cette lipolyse est indépendante des voies de signalisations des β -AR (Galitzky et al., 2001). La recherche

sur l'utilisation soit d'analogues de peptides natriurétiques, soit d'inhibiteurs de leurs enzymes de dégradation est mise en place afin d'induire et de contrôler la lipolyse pour combattre l'obésité (Abassi et al., 2004; Colucci et al., 2000).

c) GPCR-Gi

Nous avons montré que les catécholamines par l'activation des β -AR peuvent induire la lipolyse. Cependant, ces mêmes peptides par une autre voie de signalisation entraînent l'inhibition de ce processus. Le récepteur α 2-adrénergique (α 2-AR) est un GPCR qui inhibe la formation d'AMPc, mais cette fois-ci, *via* la sous-unité $G\alpha_i$ (Figure 12). Les catécholamines ont une affinité plus grande pour α 2-AR que pour les β -AR et l'expression de α 2-AR est prédominante dans le scWAT (Lafontan et Berlan, 1995). Il existe d'autres peptides qui activent les GPCR par la sous-unité $G\alpha_i$. L'acide nicotinique, la prostaglandine E2, l'adénosine, le neuropeptide Y ainsi que le peptide YY ont des effets anti-lipolytiques après liaison à leurs récepteurs respectifs (Børghlum et al., 1999; Castan et al., 1993; Chatzipanteli et al., 1992; Kather, 1990; Serradeil-Le Gal et al., 2000; Valet et al., 1990; Zhang et al., 2005).

d) Insuline

L'insuline est aussi impliquée de manière inhibitrice dans le processus lipolytique, notamment par un mécanisme AMPc-dépendant. L'insuline se lie sur son récepteur et entraîne la phosphorylation d'une sous-unité régulatrice de la PI3K (Phosphatidyl inositol 3-kinase), ce qui va induire son activation. La PI3K activée va phosphoryler une de ses cibles : la protéine kinase B (PKB) aussi connue sous le nom d'Akt. PKB phosphoryle et active la phosphodiesterase 3B (PDE-3B). Les PDE sont impliquées dans la cassure du lien cyclique des nucléotides de l'AMPc ou du GMPc. PDE-3B va dégrader l'AMPc en AMP et empêcher la stimulation de la PKA (Langin, 2006)

(Figure 12). Cependant, la PDE-3B est incapable d'interagir avec la GMPc (Moro et al., 2004). L'autre mécanisme AMPc-indépendant de l'insuline implique la protéine phosphatase 1 (PP-1). L'insuline active PP-1 par phosphorylation ce qui induit la déphosphorylation rapide et la désactivation de HSL, inhibant ainsi la lipolyse (Olsson et Belfrage, 1987; Ragolia et Begum, 1998; Strålfors et Honnor, 1989).

1.4.3 Fonction endocrinienne du WAT

Comme mentionné précédemment, la découverte de la leptine en 1994 a permis de montrer que le tissu adipeux possède une fonction endocrinienne. Il existe une multitude de molécules sécrétées par le TA appelées adipocytokines ou adipokines. La production et sécrétion de ces adipokines varient dépendamment de la localisation du dépôt adipeux (viscéral versus sous-cutané). Les adipokines n'agissent pas seulement au niveau du métabolisme énergétique. Certaines d'entre elles sont impliquées dans la réponse immunitaire, l'inflammation et peuvent aussi avoir des effets sur le système vasculaire (Chaldakov et al., 2003). La figure 13 montre l'ensemble des molécules sécrétées par le WAT ainsi que leurs effets respectifs. Celles encadrées (ainsi que l'ASP/adipsine et l'angiotensine) seront vues brièvement dans cette section puisque mon sujet de recherche ne porte pas la fonction endocrinienne du WAT.

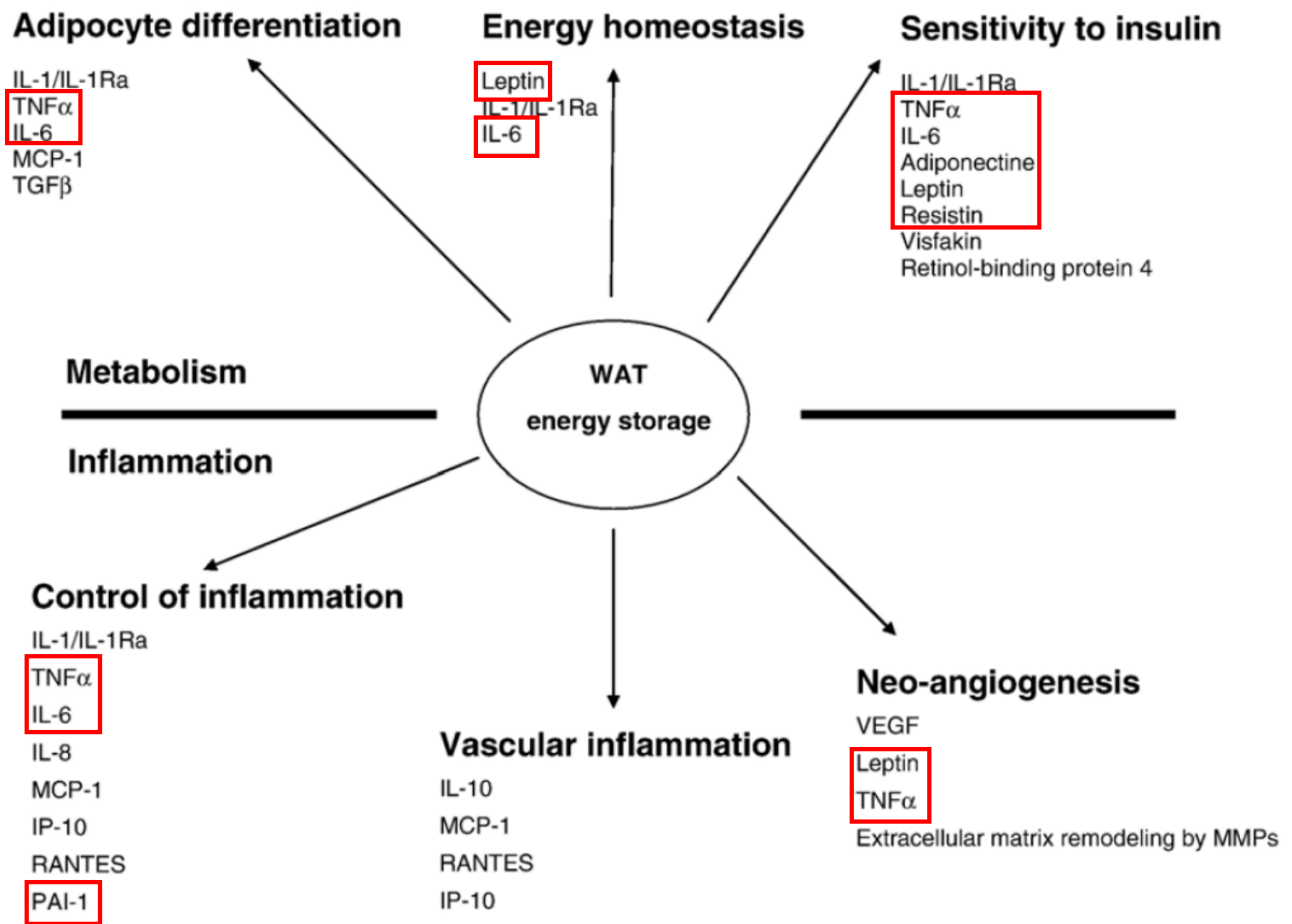


Figure 13 : Fonction endocrine du WAT. Les dépôts de tissu adipeux blanc sécrètent plusieurs protéines impliquées dans différents processus physiologiques : Différentiation, homéostasie énergétique, sensibilité à l'insuline, inflammation et angiogenèse. Ces effets se font soit de manière paracrine ou endocrine. Illustration adaptée de Thalmann et Meir, Cardiovascular Research, 2007.

a) Leptine

Découverte en 1994, son rôle principal est de réguler l'homéostasie énergétique de deux façons. La première est de diminuer l'apport alimentaire et la seconde d'augmenter la dépense énergétique. La leptine fut identifiée chez la souris possédant une mutation du gène (*ob*) qui amène à la perte de fonction de la protéine. Cette mutation induit une hyperphagie et une résistance à l'insuline à la suite d'une obésité sévère (Zhang et al., 1994). Lors de la prise d'un repas, l'insuline libérée induit la sécrétion de leptine. Cette molécule joue sur la boucle rétro-négative de la régulation du poids corporel au niveau de l'hypothalamus. Elle active son récepteur (codé par le

gène *db*) qui provient de la superfamille de récepteurs à cytokines de classe I. Ces récepteurs sont exprimés dans le système nerveux central ainsi que périphérique et ont pour effet de mener l'individu à un état de satiété (Bjørbaek et Kahn, 2004). L'expression de la leptine ainsi que de sa sécrétion sont donc proportionnellement corrélées avec la masse graisseuse. Il est alors évident qu'elle est fortement exprimée chez les individus obèses (Considine et al., 1996). Cependant, on constate une perte de la signalisation de cette molécule au niveau du cerveau, ce qui crée un phénomène de résistance (Kershaw et Flier, 2004). La résistance à la leptine empêche l'individu d'être rassasié, ce qui le conduit à manger une quantité excessive de nourriture. L'hyperphagie produit une abondante quantité d'AGL qui doivent être absorbés par l'organisme. Le tissu adipeux, ne pouvant pas stocker tous les lipides, ceux-ci iront vers les muscles et le foie et induiront une insulino-résistance. La leptine peut aussi affecter les cellules immunitaires en induisant l'infiltration, la prolifération et l'activité phagocytaire des monocytes/macrophages (Stofkova, 2009).

b) Adiponectine

C'est 1 an après la leptine que l'adiponectine fut découverte et elle est la seule adipokine qui soit sécrétée exclusivement par le tissu adipeux. Elle possède des propriétés anti-inflammatoires et permet d'augmenter la sensibilité à l'insuline (Stefan et Stumvoll, 2002; Ukkola et Santaniemi, 2002). Il existe deux récepteurs GPCR associés à la protéine $G\alpha_i$ pour l'adiponectine : AdipoR1 et AdipoR2 (Kadowaki et Yamauchi, 2005). Les deux isoformes sont principalement exprimées dans les muscles mais on retrouve AdipoR2 fortement présent au niveau du foie. La signalisation des récepteurs agit sur l'AMP-activated protein kinase (AMPK), qui sert de détecteur d'énergie (Kubota et al., 2007). Lorsque les niveaux d'ATP sont bas, l'AMPK activée amène à l'incorporation du glucose dans la cellule par son transporteur (Glucose transporter 4 ou GLUT4)

ainsi que la dégradation des AGL pour fournir de l'énergie à la cellule. L'adiponectine peut aussi stimuler l'appétit et diminuer la dépense énergétique. C'est la seule adipokine qui soit négativement corrélée avec l'obésité puisque son taux sanguin augmente lorsque l'indice de masse corporelle (IMC) diminue (Díez et Iglesias, 2003). Une étude utilisant des souris invalidées pour l'adiponectine montre que la délétion de manière hétérozygote induit une résistance à l'insuline légère tandis que les souris homozygotes développent qu'une intolérance au glucose (Kubota et al., 2002). La délétion complète de l'adiponectine entraîne la formation d'une plaque athéromateuse. Comparé aux patients ayant une triglycéridémie normale, ceux qui ont une hypertriglycéridémie sans syndrome métabolique ont un niveau d'adiponectine plus élevé. Le développement d'une résistance à l'insuline est observé chez les patients ayant des niveaux faibles en adiponectine (Gómez Rosso et al., 2009).

c) Tumor necrosis factor alpha (TNF α)

La sécrétion de TNF α provient principalement des macrophages de la SVF et ses effets principaux interfèrent sur le métabolisme du tissu adipeux (Fain et al., 2004). Le TNF α réduit l'oxydation des AGL par l'inhibition de voie de l'AMPK au niveau des muscles et des hépatocytes. L'injection de TNF α chez des rats induit une forte diminution des niveaux plasmatiques d'adiponectine ainsi qu'une élévation accrue du taux d'AGL résultant d'une lipolyse. Ces deux facteurs sont impliqués dans l'insulino-résistance (Hotamisligil et al., 1993). De plus, cette hausse des AGL induit la formation de DAG et active les protéines kinases C (PKC). Les PKC inactivent les sites actifs de phosphorylation du récepteur à l'insuline par inhibition compétitive, ce qui favorise le développement du diabète (Draznin, 2006). De plus, on observe une augmentation de l'infiltration de macrophages dans le tissu adipeux obèse entraînant une forte sécrétion de TNF α (Weisberg et al., 2003). Le TNF α , en plus de ces effets métaboliques, peut activer une cascade de

signaux pro-apoptotiques. Cette signalisation dans les adipocytes hypertrophiés pourrait mener à une libération importante d'AGL et amplifier la résistance à l'insuline chez le patient (Suganami et Ogawa, 2010).

d) Interleukine-6 (IL-6)

Environ 30% de l'IL-6 circulant dans le sang provient du tissu adipeux et sa concentration est plus élevée au niveau viscéral que sous-cutané (Fried et al., 1998). Elle est aussi produite par l'hypothalamus et régule l'appétit ainsi que le métabolisme du glucose et des lipides. Tout comme le TNF α , l'IL-6 provient majoritairement des cellules stromales vasculaires. En général, l'IL-6 inhibe l'activité de la LPL, induit la lipolyse, l'oxydation des AGL et augmente le recaptage de glucose (Carey et al., 2006; Wallenius et al., 2002). L'expression de cette molécule peut être amplifiée dans un contexte d'obésité par le TNF et l'interleukine-1. Des niveaux élevés d'IL-6 amènent des risques de maladie coronarienne, d'athérosclérose et de formation d'angine de poitrine (Prins, 2002). L'inactivation du gène de l'IL-6 chez les souris entraîne le développement rapide d'une obésité *via* l'augmentation de 50% de la masse adipeuse. Chez l'homme, l'IL-6 est un modulateur du métabolisme lipidique en augmentant la lipolyse du WAT (van Hall et al., 2003).

e) Résistine

La résistine fut découverte en 2001 (Haugen et al., 2001). La résistine est sécrétée par les adipocytes ainsi que par les cellules immunitaires. Bien qu'elle soit présente dans les adipocytes, l'expression de la résistine est plus élevée dans les précurseurs adipocytaires. Au niveau des adipocytes et les hépatocytes, elle inhibe la voie de signalisation de l'insuline, ce qui bloque la capture de glucose. L'utilisation d'anticorps ciblant cette protéine permet d'améliorer la glycémie lors de régimes riches en gras chez les souris ainsi que les effets de l'insuline (Steppan et al., 2001).

L'injection de résistine conduit à une intolérance au glucose ainsi qu'une résistance à l'insuline *in vivo* chez la souris (Kim et al., 2001). Chez l'homme, sa sécrétion semble provenir principalement des monocytes circulants (Savage et al., 2001). Sa production et son relargage sont stimulés par l'inflammation, l'IL-6 ainsi que l'hyperglycémie. La résistine est impliquée dans l'inflammation puisqu'elle induit l'expression d'IL-6 et de TNF α (Bokarewa et al., 2005).

f) Acylation stimulating protein (ASP) et adiposine

L'ASP est produite et sécrétée par les adipocytes lors de la réponse immunitaire pour activer une cascade alternative du complément. La combinaison du complément 3, du facteur B et de l'adiposine donnera le complément C3a qui deviendra l'ASP à la suite de son clivage par des carboxypeptidases (Baldo et al., 1993). Elle induit la lipogénèse par la translocation de GLUT4 à la membrane ainsi que l'activation de l'enzyme DGAT. À la suite d'un repas, ses niveaux sont induits pour activer la synthèse et le stockage des triglycérides dans les adipocytes. L'exercice et la perte de poids diminuent son expression. À l'inverse, elle est fortement exprimée dans les contextes d'obésité, de diabète de type 2 et de maladies cardiovasculaires (Cianflone et al., 2005). Tout comme pour l'insuline, le développement d'une résistance à l'ASP perturbe le métabolisme du tissu adipeux entraînant des dyslipidémies (Paglialunga et al., 2008).

g) Angiotensine 2 (Ang-2)

Les adipocytes possèdent le système rénine-angiotensine-aldostérone permettant la production de l'Ang-2. Les adipocytes possèdent le récepteur de type I et type II à l'angiotensine 2 (ATR1 et ATR2) (Ahima et Flier, 2000). On constate une baisse de son expression lors d'un jeûne et une augmentation lors d'un apport alimentaire. L'angiotensine stimule la formation d'AGL dans le tissu adipeux ainsi que la différenciation adipocytaire chez le rat (Engeli et Sharma,

2000; Engeli et al., 2000). Chez l'homme, l'angiotensine 2 inhibe la lipolyse par ATR1 et induit la lipogénèse par ATR2 (Goossens et al., 2007; Jones et al., 1997)).

h) Inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1 : Plasminogen activator inhibitor)

Les CE et musculaires lisses vasculaires sont les principales cellules qui produisent PAI-1 mais il a été reporté que d'autres types cellulaires pouvaient produire cet inhibiteur, notamment les adipocytes, les macrophages et les cellules stromales du tissu adipeux (Christ et al., 1993; Mutch et al., 2001). Lors de dommages au niveau de la lumière artérielle des vaisseaux sanguins, les plaquettes forment un caillot de fibrine pour empêcher la perte de sang et pour permettre la réparation du vaisseau (Sidelmann et al., 2000). Lorsque la réparation est terminée, le caillot doit être dégradé pour rétablir une circulation sanguine correcte. Ce processus, nommé fibrinolyse, nécessite la dégradation de la fibrine par la plasmine. Cette enzyme est issue du plasminogène qui doit être clivé par des protéases, notamment l'urokinase et l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA). PAI-1 est un régulateur majeur de la fibrinolyse puisqu'il inhibe l'urokinase et le t-PA. Certaines molécules augmentent son expression principalement le TNF α et le transforming growth factor beta (TGF- β) mais aussi l'insuline, les glucocorticoïdes et l'angiotensine 2. À l'opposé, les catécholamines ont un effet inhibiteur. La production de PAI-1 est plus élevée dans le tissu viscéral et est proportionnelle à la masse adipocytaire (Mutch et al., 2001). Chez les patients obèses, l'induction plasmatique élevée entraîne des désordres de thromboses comme l'athérosclérose.

1.4.4 Dépense énergétique du BAT : la thermogénèse

Chez les mammifères adultes, le maintien de la température corporelle est dû à une couche de gras sous-cutanée qui agit comme isolant thermique ainsi qu'à la thermogénèse frissonnante qui permet de créer de la chaleur à partir des muscles. Cependant, les nouveau-nés n'ont pas assez de

muscles pour maintenir leur chaleur corporelle et donc ils ont besoin de la produire d'une autre façon. Le BAT a pour effet de produire de la chaleur par le processus de thermogénèse non frissonnante ou adaptative. Tout comme mentionné précédemment, les adipocytes bruns possèdent de très nombreuses mitochondries qui permettront de créer une quantité de chaleur suffisante par l'oxydation des lipides

Afin de mieux comprendre ce processus, il est nécessaire de connaître le fonctionnement de la chaîne de respiration mitochondriale. La cellule utilise de l'ATP comme source d'énergie. Pour le produire, elle utilise principalement le glucose qui sous l'effet de la glycolyse se transforme en pyruvate puis en acétyl-Coenzyme A (acétyl-CoA) par le processus de glycolyse. L'acétyl-CoA présent dans les mitochondries va amener, par le cycle de Krebs, à la formation de plusieurs composés réduits (majoritairement le NADH ainsi que le FADH₂). Ces composés passeront dans la chaîne de respiration mitochondriale afin de retrouver leur forme oxydée (NAD⁺ et FAD). Ceci amènera la libération d'un fort gradient de protons (H⁺) dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie. Ces protons libres retourneront vers l'intérieur de la mitochondrie *via* l'ATP synthase afin de former de l'ATP à partir de l'ADP et d'un phosphate inorganique (Figure 14). Cette réaction est dite couplée puisqu'elle nécessite de l'énergie pour pouvoir en former par la suite. Dans les adipocytes bruns, il existe une réaction dite découplée qui utilise le gradient de protons et, au lieu de former de l'ATP, produit de la chaleur. Ce processus s'effectue par la protéine découplante UCP1 (Uncoupling protein 1) (Figure 14).

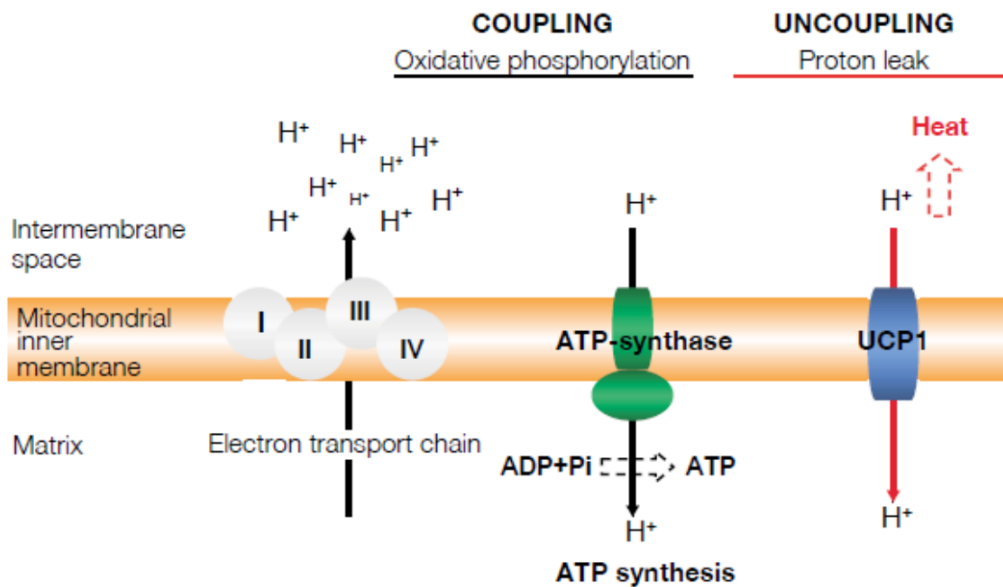


Figure 14 : Formation du gradient de protons pour la formation d'ATP ou de la thermogénèse. La chaîne de transport d'électrons augmente la quantité de protons dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie. Ces protons retourneront à l'intérieur de la mitochondrie *via* l'ATP synthase afin de former de l'ATP pour la réaction couplée. Ce même gradient de protons passera à travers la protéine UCP1, ce qui libérera de la chaleur sans formation d'ATP. Cette réaction est dite découplée. Illustration d'après Brondani et al., Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia, 2012.

a) La protéine UCP1 et sa fonction

UCP1 fût décrite pour la première fois en 1978 dans le BAT de hamster (Heaton et al., 1978). Cependant, sa découverte débute en 1976, ou elle apparait comme étant spécifiquement une protéine mitochondriale localisée dans le BAT et non au niveau du foie. L'expression d'UCP1 augmente chez les animaux exposés au froid et revient à la normale lorsque les animaux sont placés à 24°C (Ricquier et Kader, 1976). UCP1 est une protéine de 32 kDa dont la structure a une forte homologie à l'ATP synthase. La protéine UCP1 représente 1 à 4% des protéines totales des adipocytes bruns et de 2 à 8% des protéines mitochondriales (Aquila et al., 1985). UCP1, qui est située dans l'espace intermembranaire tout comme l'ATP synthase, produira la chaleur en découplant la chaîne de respiration mitochondriale puisqu'il n'y a aucune formation d'énergie (Klaus et al., 2012). Le découplage assure un fort taux d'oxydation des acides gras ainsi que le

dégagement de chaleur. La cellule utilise principalement le glucose pour former de l'acétyl-CoA (deux par molécules de glucose) contrairement aux lipides (un acétyl-CoA formé pour 2 carbones de la chaîne hydrophobe). Les lipides sous formes de TG sont les molécules donnant le plus d'énergie à la cellule. Comme mentionné précédemment, l'exposition au froid entraîne la libération de la NE qui stimule la lipolyse des TG en AGL. Ceux-ci serviront de substrats pour l'oxydation menant à l'augmentation des protons libres. Tant que la lipolyse est active et que le niveau des acides gras libres sont élevés, le découplage de la chaîne mitochondriale est maintenu. De plus, il a été démontré que l'accumulation du succinate, un intermédiaire du cycle de Krebs, active la thermogénèse (Mills et al., 2018). Une hypothèse propose qu'UCP1 agisse en tant que symporteur; c'est-à-dire qu'il nécessite l'utilisation d'un AGL pour faire entrer les protons à l'intérieur de la mitochondrie pour former la chaleur (Garlid et al., 1998) (Figure 15). Son rôle a été mis en évidence en 2012 par la technique de Patch-Clamp. L'utilisation de cette méthode pour mesurer les variations de courant a permis de démontrer qu'un AGL est nécessaire à UCP1 pour faire entrer un proton dans la mitochondrie. L'AGL, ayant une extrémité négative grâce au groupement carboxyle, interagit avec le proton positif ce qui permet son transport. Si l'acide gras possède une courte chaîne de carbone, celui-ci sera dissocié lorsque le proton entrera dans l'espace mitochondrial lui conférant le titre de symporteur. Dans le cas où cette chaîne est longue, l'AGL ne pourra pas se dissocier puisque l'interaction hydrophobe avec UCP1 sera trop forte et UCP1 sera considéré comme étant un uniporteur de protons (Fedorenko et al., 2012). L'activité de la protéine UCP1 peut être modulable. CIDEA (Cell death activator CIDE-A) est une protéine fortement exprimée dans le BAT au niveau mitochondrial. Les souris *CIDEA* déficientes sont fertiles et en bonne santé. En revanche, lorsque ces souris sont exposées au froid; on constate une augmentation du rythme métabolique (10% plus élevé), de la température corporelle ainsi qu'une lipolyse plus élevée au niveau du BAT comparativement aux souris sauvages. Ces souris sont minces et résistent à

l'obésité et au diabète causés par un régime HFD. Lorsque UCP1 et CIDEA sont coexprimés dans la levure, on constate que CIDEA inhibe l'activité découplante d'UCP1 et représente ainsi une protéine capable de moduler la thermogénèse (Zhou et al., 2003).

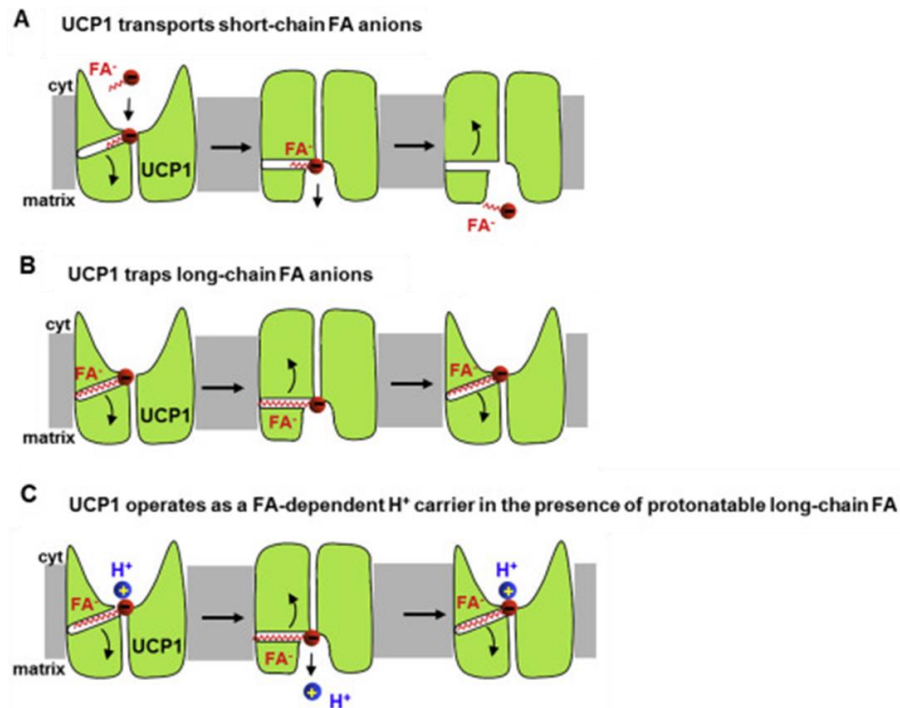


Figure 15 : Transport des protons par UCP1. UCP1 transporte les électrons de manière AGL-dépendante. A) Si l'AGL possède une courte chaîne de carbone, celui-ci se dissociera dans la mitochondrie avec le proton lui conférant le rôle de symporteur AGL/H⁺. B) Si l'AGL est muni d'une longue chaîne de carbone, l'interaction hydrophobe avec UCP1 empêchera sa dissociation lui donnant le rôle d'unipporteur H⁺. C) Le transfert des protons chargés positivement s'effectue par l'interaction avec l'extrémité négative du groupement carboxyle. Illustration adaptée de Bertholet et *al.*, Biochimie, 2017.

UCP1 est la protéine principale pour la production de chaleur mais d'autres protéines sont aussi impliquées dans la régulation du processus thermogénique. L'expression d'UCP1 est régulée au niveau de son promoteur par divers facteurs et co-facteurs de transcription, notamment PPAR γ , PGC-1 α et PRDM16 (Cinti, 2009; Cohen et Spiegelman, 2015; Flatmark et Pedersen, 1975). Il existe deux régions non codantes fortement impliquées dans la transcription d'UCP1 : une région amplificatrice éloignée à 3.9kb en amont du promoteur ainsi qu'une région à proximité du promoteur (Villarroya et al., 2017) (Figure 16). La région proximale contient des sites de liaisons

CREB (cAMP response element-binding protein), C/EBP (CCAAT-enhancer-binding protein) et un site pour Zfp (zinc finger protein) qui module positivement la transcription ainsi qu'un site négatif de liaison AP2 (complexe c-Fos/c-Jun) (Dempersmier et al., 2015; Kozak et al., 1994; Yubero et al., 1994, 1998) (Figure 16). La région distale, quant à elle, intervient fortement dans la transcription d'UCP1 et possède des sites interagissant avec des récepteurs nucléaires hormonaux (Cassard-Doulicier et al., 1998; Kozak et al., 1994). Parmi eux : PPAR γ /RXR, PPAR α /RXR, RAR/RXR et TR/RXR (RXR : retinoid receptor, RAR : retinoid acid receptor, TR : thyroid receptor) agissent après activation par divers ligands comme les fibrates, les thiazolidinediones (TZDs), l'acide rétinoïque ainsi que les hormones thyroïdiennes (Alvarez et al., 1995; Cassard-Doulicier et al., 1998; Villarroya et al., 2007). La transcription d'UCP1 est induite par ces récepteurs ainsi que le site ATF2 (activating transcription factor-2) mais *via* la voie p38-MAPK (Cao et al., 2001, 2004). Deux types de transcriptions sont présentes pour UCP1 : la transcription dite basale et celle activable.

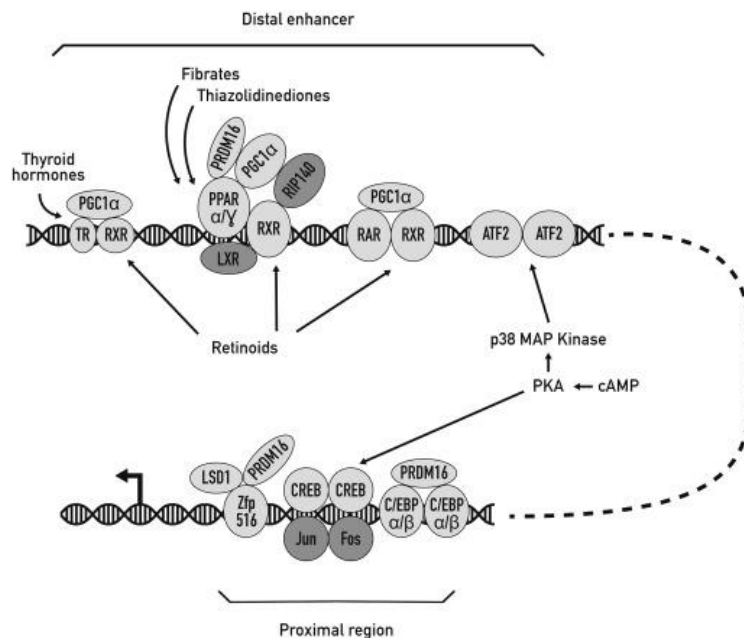


Figure 16 : Représentation des sites de régulation du promoteur *UCP1*. Le promoteur *UCP1* possède un site proximal (en bas) et un site distal (en haut) impliquée dans la transcription d'*UCP1*. Les sites de liaison et facteurs de transcription en gris clairs sont des activateurs de la transcription tandis ceux en gris foncés sont des inhibiteurs. Illustration d'après Villarroya et al., Biochimie, 2017.

b) Transcription basale du promoteur *UCP1*

La transcription basale d'*UCP1* se déroule au cours du développement de l'adipocyte brun et implique plusieurs molécules clés dans le processus thermogénique :

- Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ)

PPAR γ est un régulateur clé dans le processus de différenciation, mais ce rôle sera discuté plus en détails dans la section 2. L'utilisation d'activateurs synthétiques de PPAR γ , les TZDs, active la biogénèse mitochondriale ainsi que des gènes reliés aux adipocytes bruns dont *UCP1*, *PGC-1 α* (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha) et *PRDM16* (*PRDI-BF1-RIZ1* homologous domain-containing protein-16) (Hondares et al., 2006; Petrovic et al., 2010; Vernochet et al., 2009; Wilson-Fritch et al., 2003). Les TZDs retirent les acétylations sur PPAR γ lui permettant d'interagir plus facilement avec *PRDM16* (Ohno et al., 2012). PPAR γ active la transcription des gènes impliqués dans le processus thermogénique mais nécessite l'interaction avec des coactivateurs comme *PRDM16* et *PGC-1 α* (Sears et al., 1996).

- *PGC-1 α*

PGC-1 α est un coactivateur de PPAR γ et son expression est induite par le froid (Puigserver et al., 1998). *PGC-1 α* est un régulateur important de la biogénèse mitochondriale, du métabolisme oxydatif et de la thermogénèse dans les adipocytes bruns (Puigserver et Spiegelman, 2003). *PGC-1 α* est aussi impliqué dans le métabolisme énergétique au niveau des muscles (Arany, 2008). Ces effets sur la mitochondrie ainsi que l'oxydation sont perpétrés à travers plusieurs facteurs de transcription comme *ERR α* et *Nrf-2* (Giguère, 2008; Puigserver et Spiegelman, 2003). *PGC-1 α* est inhibé par l'acétylation et il fut montré que sa désacétylation par la Sirtuine 1 (*SIRT1*) menait à l'activation de la dégradation des lipides (Krishnan et al., 2012). Sa présence entraîne

l'augmentation de protéine découplante UCP1 mais aussi de facteurs nucléaires impliqués de la respiration (Wu et al., 1999a). Il est nécessaire pour la thermogénèse du BAT mais pas pour la différenciation adipocytaire (Uldry et al., 2006). Sa surexpression par infection virale dans le scWAT human augmente l'expression d'*UCP1*, des protéines de la chaîne respiratoire ainsi que les enzymes de la β -oxydation (Tiraby et al., 2003). Chez les souris déficientes pour PGC-1 α dans le TA, on constate une diminution de l'expression des gènes thermogéniques et mitochondriaux dans le scWAT (Kleiner et al., 2012). Dans le BAT, sa délétion entraîne la perte des gènes impliqués dans la thermogénèse mais pas des autres gènes d'adipocytes bruns (Seale et al., 2007).

- PRDM16

PRDM16 a été découvert en 2007 dans les leucémies myéloïdes. Il possède une extrémité N-terminale possédant un domaine de régulation positif, dix doigts de zinc et plusieurs sites de liaison pour interagir avec d'autres protéines (Morishita, 2007). Chez la souris, les précurseurs adipocytaires bruns possèdent le régulateur de transcription PRDM16 permettant de contrôler la différenciation vers des adipocytes bruns (Seale et al., 2007). Il se lie avec CEBP β et recrute des corépresseurs (CtBP1-2) pour empêcher l'expression de gènes associés aux adipocytes blancs ou aux muscles (Kajimura et al., 2008, 2009). PRDM16 induit la transcription de gènes liés avec la différenciation adipocytaire telles que *PPAR γ* , *FABP4* et l'*Adiponectine* mais aussi de marqueurs spécifiques aux adipocytes bruns tels que *UCP1*, *PGC-1 α* , *Elovol3* et *CIDEA*. Comme pour *PPAR γ* , PRDM16 induit la transcription de gènes spécifiques au BAT en s'associant avec PGC-1 α (Kajimura et al., 2008). En même temps, cette protéine inhibe la transcription de gènes impliqués dans la myogenèse comme *MyoD*, *myogenin* et d'autres facteurs myogéniques (Seale et al., 2008). Chez les souris surexprimant PRDM16, on constate une augmentation de la dépense énergétique et une meilleure tolérance au glucose lorsque celles-ci sont sous régime HFD (Seale et al., 2011).

Son invalidation rend les animaux susceptibles au gain de poids et à la résistance à l'insuline sous ce même régime (Cohen et al., 2014). La perte de PRDM16 dans des précurseurs adipocytaires entraîne la différenciation en cellules musculaires. À l'inverse, l'expression ectopique de PRDM16 dans des précurseurs de muscles entraîne la différenciation en adipocytes bruns (Farmer, 2008; Lepper et Fan, 2010; Sanchez-Gurmaches et al., 2012; Seale et al., 2008; Wang et Seale, 2016). PRDM16 est donc une protéine importante dans le processus thermogénique.

c) Transcription activable du promoteur UCP1

Certains stimuli, comme le froid ou le relargage de catécholamines, sont capables d'induire l'expression d'UCP1. Précédemment mentionné, le système nerveux sympathique libère les catécholamines qui lient les β -AR qui activent la PKA par la voie de l'AMPC. La PKA induit la lipolyse mais peut aussi agir par phosphorylation au niveau du facteur de transcription CREB situé dans la région proximale. PKA est aussi connue pour activer p38-MAPK par phosphorylation. p38-MAPK phosphorylé active la transcription d'*UCP1* et de *PGC-1 α* par le biais de l'ATF2 situé dans la région distale. De plus, p38-MAPK peut phosphoryler PGC-1 α , lui permettant de transcrire les gènes liés à la thermogénèse (Cao et al., 2004; Gesta et al., 2007; Nicholls et al., 1986; Robidoux et al., 2005). La voie de l'AMPC permet aussi d'induire l'expression d'enzymes capables d'augmenter la quantité de T3 amplifiant la transcription d'UCP1 (Bianco et Silva, 1988).

L'activation de la thermogénèse par UCP1 dans le BAT est donc extrêmement importante pour le métabolisme énergétique. Une étude montre que la transplantation de BAT embryonnaire chez les souris diabétiques adultes permettait d'améliorer la glycémie, diminuer l'inflammation du WAT et de rétablir le profil des adipokines qui était modifié par le diabète (Gunawardana et Piston, 2012, 2015). Des résultats similaires comme la perte d'obésité induite en régime HFD,

l'amélioration de l'homéostasie glucidique et l'augmentation de la sensibilité à l'insuline ont été confirmés par d'autres études de transfert de BAT embryonnaire (Liu et al., 2013c; Stanford et al., 2013). En revanche, l'ablation du BAT ou sa dénervation chez la souris entraînent l'augmentation du poids corporel (Dulloo et Miller, 1984). Cependant, des études semblaient indiquer initialement que ces effets sur le métabolisme énergétique n'étaient pas forcément reliés avec UCP1. En effet, la délétion de la protéine UCP1 chez la souris montre que celle-ci est moins résistante lorsqu'elle est exposée au froid mais elle ne développe pas un phénotype obèse. Encore plus surprenant, ces souris sont protégées contre l'obésité induite par un régime HFD (Enerbäck et al., 1997; Liu et al., 2003). Cependant, lorsque ces souris sont hébergées en condition de thermoneutralité (c'est-à-dire à 32°C au lieu de 22°C préconisé), elles deviennent obèses même sous un régime normal et l'effet est accentué par un régime HFD. Cette même étude a alors établi que les effets observés dans les études précédentes étaient dus au stress causé par l'exposition au froid et non par la perte de la protéine UCP1 (Feldmann et al., 2009). UCP1 est donc important pour l'homéostasie énergétique par la thermogénèse. De nos jours, l'utilisation de gènes rapporteurs au promoteur *UCP1* est utilisée afin de trouver de nouveaux composés permettant d'induire l'expression de cette protéine et ainsi pouvoir combattre les maladies métaboliques telles que l'obésité et la résistance à l'insuline (Xue et al., 2015). De plus, il est vrai que le BAT possède une activité thermogénique élevée pouvant utiliser les lipides comme substrats énergétiques mais ce tissu pourrait aussi sécréter certaines molécules qui améliorent le métabolisme de manière locale ou systémique.

1.4.5 Fonction endocrinienne du BAT

Tout comme le WAT, le BAT peut libérer des peptides qui sont impliqués dans la fonction endocrinienne, faisant en sorte que ce tissu n'est pas seulement impliqué dans le métabolisme. Le terme batokine est maintenant employé pour définir les adipokines sécrétées par le BAT. Ces

batokines ne sont pas forcément les mêmes que celles du WAT puisque la leptine est très peu exprimée dans le BAT (Cannon et Nedergaard, 2004). À l'inverse, FGF21 (Fibroblast Growth Factor 21) est pratiquement indétectable dans le WAT alors qu'il est significativement exprimé dans le BAT ainsi que les adipocytes bruns (Di Franco et al., 2016; Dushay et al., 2010; Hondares et al., 2014).

a) Triiodothyronine (T3)

À la fin des années 1980, l'hormone thyroïdienne T3 a été la première hormone identifiée provenant de la sécrétion du BAT (Silva et Larsen, 1985). Les hormones thyroïdiennes sont à 80% sous la forme T4 et 20% sous la forme T3. Environ 80% de la T3 circulant dans le sang provient du foie et de l'hypophyse antérieure et le reste est produit par la glande thyroïde (Gereben et al., 2008). Les adipocytes bruns possèdent l'enzyme DIO2 (Type 2 iodothyronine deiodinase) qui permet la conversion de l'hormone T4 en T3 (Silva et Larsen, 1983). En condition d'activation thermogénique par le froid, on observe des forts niveaux systémiques de T3 produits par le BAT dus à la hausse de l'expression de DIO2 par un mécanisme AMPc-dépendant (Bianco et Silva, 1988). En retour, la T3 permet l'induction de la protéine UCP1 ainsi que d'autres protéines impliquées dans le processus thermogénique (Fernandez et al., 1987; Silva et Larsen, 1985).

b) FGF21

FGF21 est principalement produit par le foie et impliqué dans l'amélioration de la glycémie et de la lipidémie par l'usage du glucose dans le TA (Giralt et al., 2015; Markan et al., 2014). FGF21 entraîne aussi l'oxydation du glucose au niveau du foie, du WAT et du pancréas (Coskun et al., 2008). Cependant, lorsque la thermogénèse du BAT est activée, les adipocytes bruns produisent et sécrètent une grande quantité de cette protéine (Chartoumpakis et al., 2011; Hondares

et al., 2011). Son expression et son relargage dans le BAT sont principalement régulés par les mécanismes d'induction de l'AMPc. On estime que FGF21 a des effets autocrines puisqu'il favorise la thermogénèse par l'oxydation des lipides ainsi que l'induction de PGC-1 α qui à son tour va augmenter UCP1 (Fisher et al., 2012; Hondares et al., 2011). L'activation du BAT semble contribuer aux niveaux systémiques de FGF21. Lors d'une activation par le froid, l'expression de FGF21 augmente dans le BAT mais elle est diminuée dans le foie. Chez les souris invalidées pour *UCP1*, on constate une forte quantité de FGF21 provenant du BAT et des muscles mais son niveau d'expression reste stable dans le foie. L'expression de FGF21 est donc alors indépendante de la thermogénèse médiée par UCP1 (Hondares et al., 2011; Keipert et al., 2014, 2015). De plus, FGF21 est plus exprimée dans les adipocytes blancs que chez les adipocytes bruns (Sharp et al., 2012). Tous ses résultats impliquent FGF21 comme ayant plusieurs effets positifs sur le métabolisme par la prévention de l'hyperglycémie et de l'hyperlipidémie ainsi que sur la protection contre l'obésité *via* la dépense énergétique (Giralt et al., 2015).

c) IL-6

L'expression et le relargage d'IL-6 par les adipocytes bruns s'effectue à la suite d'une stimulation thermogénique. Il est à noter que les effets pro-inflammatoires de certaines cytokines dans le WAT n'ont pas les mêmes conséquences physiologiques dans le BAT ou les muscles squelettiques. Les effets de l'IL-6 sont principalement reliés à la lipolyse nécessaire pour alimenter le processus thermogénique. Cela permet aussi d'augmenter la sensibilité à l'insuline (Burýsek et Houstek, 1997; Ikeda et al., 2016). L'IL-6 est importante pour garder les effets bénéfiques lors de la transplantation du BAT. Il n'y a pas d'amélioration de l'homéostasie glucidique et de la sensibilité à l'insuline chez les souris ayant reçu une transplantation de BAT provenant de souris

déficientes pour l'IL-6. De plus, cette invalidation d'IL-6 empêche l'élévation de FGF21 et des effets mentionnés précédemment (Stanford et al., 2013)).

d) Bone morphogenetic protein 8b (BMP8b)

BMP8b, contrairement aux autres protéines de la famille des BMP, n'est pas impliquée dans la différenciation adipocytaire mais dans l'induction de l'activité thermogénique du BAT. Son expression est augmentée pour donner suite à certains stimuli tels que l'exposition au froid ou un régime HFD. La sécrétion de BMP8b par les adipocytes bruns améliore la réponse β -adrénergique de manière autocrine/paracrine. Cette amélioration se fait par une augmentation de la signalisation de certaines protéines de la famille SMAD (1, 5 et 8 respectivement) ainsi que par la voie p38-MAPK, qui augmente l'expression d'UCP1. BMP8b agit aussi sur l'hypothalamus afin d'activer la thermogénèse *via* stimulation du système nerveux sympathique (Whittle et al., 2012). Il est à noter que la présence d'œstrogènes induit l'expression de BMP8b et que son expression est plus élevée chez les souris femelles que les mâles, ceci montrant que l'activité du BAT est variable dépendamment du sexe de l'individu (Grefhorst et al., 2015).

Les rôles métaboliques et endocriniens des adipocytes blancs et bruns sont résumés dans la figure 17.

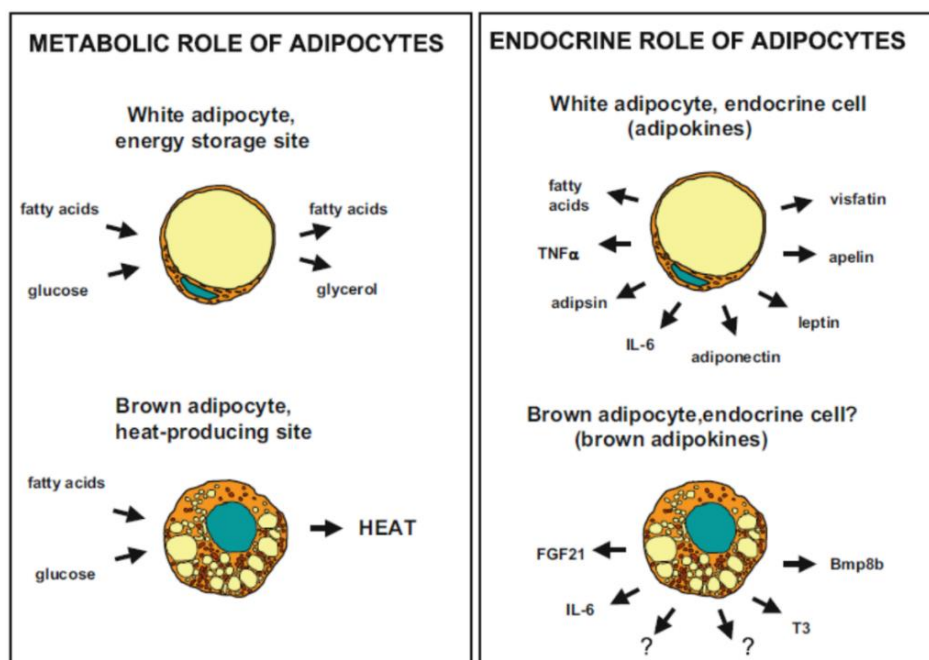


Figure 17 : Représentation des rôles métaboliques et endocriniens de l'adipocyte blanc et brun. À gauche, le rôle métabolique de l'adipocyte blanc pour le stockage et la lipolyse, l'adipocyte brun pour la production de chaleur. À droite, les cytokines relâchées par les adipocytes blancs et bruns dans leur contexte endocrinien. Illustration d'après Giralt et al., Handbook of Experimental Pharmacology, 2016.

2 Développement de la masse adipocytaire

2.1 Progéniteur adipeux

L'utilisation de cellules souches embryonnaires de souris a permis de mettre en évidence que ces cellules pouvaient se différencier vers une lignée adipocytaire (Dani et al., 1997). Le traitement de corps embryoides par l'acide rétinoïque puis par un milieu de différenciation spécifique a permis d'obtenir des cellules adipocytaires. Ces adipocytes provenant de corps embryoides ont les capacités de stockage des lipides, de lipolyse et possèdent une expression élevée de gènes spécifiques aux adipocytes. Ce modèle a été par la suite étudié afin de connaître les diverses étapes du développement de la cellule adipeuse. Il reste néanmoins nécessaire de déterminer aussi l'origine des progéniteurs humains capables de se différencier en adipocytes.

Initialement, les PAs se développent à partir du mésenchyme, ce qui leur donnent une origine similaire aux cellules souches mésenchymateuses provenant du mésoderme (Farmer, 2006). Cependant, lors du développement des vertébrés, il fût établi que leur origine ne provenait pas forcément du mésenchyme. Une première étude a permis de montrer que les cellules de la crête neurale pouvaient se différencier en adipocytes. En effet, mon laboratoire en 2007 a pu démontrer qu'en utilisant des cellules primaires de la crête neurale céphalique de cailles, on obtient des adipocytes lors de la différenciation (Billon et al., 2007). Par la suite, le laboratoire a utilisé un système CRE relié à une protéine fluorescente pour le gène *Sox10* (le meilleur marqueur pour les cellules provenant de la crête neurale). Lors du développement embryonnaire, le marquage fluorescent se retrouvait seulement au niveau de la crête neurale et non dans le mésoderme. Cette étude a permis de démontrer qu'il existe deux origines aux PAs : une ectodermique pour les dépôts adipeux céphaliques et l'autre mésodermique pour le reste des dépôts adipeux du corps.

2.1.1 Progéniteur adipeux blanc

L'origine du WAT varie selon les espèces. Chez la souris, le WAT se développe après la naissance bien que les progéniteurs blancs soient détectés aux jours 16.5-17.5 du stade embryonnaire (Birsoy et al., 2011). Chez l'humain, le WAT se forme vers les semaines 14 et 16 de grossesse (Poissonnet et al., 1984). La prolifération des PAs diminue vers la fin de la grossesse et les adipocytes se remplissent de lipides jusqu'à l'âge de 10 ans. L'augmentation du nombre de PAs s'effectue pendant l'adolescence jusqu'à la phase adulte, déterminant le nombre total d'adipocytes (Knittle et al., 1979). Plusieurs travaux indiquent que les progéniteurs ont une origine commune avec les CE. En effet, PPAR γ peut servir de marqueur pour identifier les progéniteurs mais aussi les parois des vaisseaux sanguins toutefois cette étude ne permet de distinguer spécifiquement ces progéniteurs des autres cellules vasculaires (Tang et al., 2008). L'utilisation du promoteur de la

VE-cadhérine, protéine spécifique aux CE, pour effectuer un traçage de la lignée adipocytaire montre que le gène rapporteur se retrouve dans les CE ainsi que dans des PAs blancs et bruns (Tran et al., 2012). Certains auteurs ont même suggérés que les progéniteurs proviennent d'une sous population de CE exprimant le marqueur de différenciation adipocytaire ZFP423 (Zinc finger protein 423) qui est localisé dans le compartiment périvasculaire (Gupta et al., 2012). Cependant, une étude a mis en doute ces résultats puisque les cellules précurseurs des adipocytes blancs expriment le PDGFR α mais elles sont différentes des cellules PDGFR α positives situées dans les vaisseaux sanguins. Elles ne proviennent donc pas d'une source de CE (Berry et Rodeheffer, 2013). D'autre part, le KO de PPAR γ dans les CE n'affecte pas la formation du TA mais seule la réponse métabolique est modifiée si les animaux sont soumis à un régime HFD (Kanda et al., 2009). Une population de progéniteurs adipocytaires permettant de reconstruire un WAT fonctionnel lorsque transplanté dans des souris lipoatrophiques a permis d'identifier l'expression des marqueurs CD29, Sca1, CD34 et CD24 sur ces cellules alors qu'elles sont négatives pour CD45, CD31 et Ter119 (Lin) (Rodeheffer et al., 2008). Habituellement, les PAs humains sont sélectionnés par la présence de CD34 et l'absence de CD31 (Sengenès et al., 2005).

2.1.2 Progéniteur adipeux brun

Tout comme les progéniteurs blancs, les PAs bruns expriment PDGFR α et proviennent de précurseurs mésodermiques (Lee et al., 2012). Cependant, les adipocytes bruns possèdent des marqueurs très différents des adipocytes blancs. L'utilisation d'un système Cre-Lox permettant d'insérer un gène de fluorescence dans des cellules montre que les adipocytes bruns et les cellules musculaires lisses squelettiques possèdent des précurseurs communs qui expriment Myf5 (Myogenic factor 5) et Pax7 (Paired box7) (Lepper et Fan, 2010; Lepper et al., 2009; Seale et al., 2008; Tallquist et al., 2000). Myf5 est un facteur de transcription pour la différenciation musculaire

et Pax7, qui est aussi un facteur de transcription, coopère avec Myf5 pour induire la formation des muscles ou myogenèse (Braun et Gautel, 2011; Lang et al., 2005). Même si les adipocytes bruns et les cellules musculaires possèdent un précurseur commun, on constate une divergence entre les jours 9,5 et 12,5 de gestation chez la souris (Lepper et Fan, 2010). Ces résultats impliquent que les progéniteurs adipocytaires bruns expriment certains gènes myogéniques et qu'ils ont une origine différente des précurseurs blancs (Schulz et al., 2011; Timmons et al., 2007).

Tout comme les adipocytes bruns, les cellules musculaires squelettiques ont la possibilité d'utiliser les lipides au lieu de les stocker et sont constituées d'une grande quantité de mitochondries (Billon et Dani, 2012; Tseng et al., 2010). Contrairement aux adipocytes bruns, les cellules musculaires ne possèdent pas la protéine UCP1 qui favorise la thermogénèse (Farmer, 2008).

2.1.3 Progéniteur adipeux brite

Bien que les adipocytes brites possèdent la fonction thermogénique des adipocytes bruns, chez la souris, la majorité provient de progéniteurs négatifs pour l'expression des marqueurs Myf5 et Pax7 les adipocytes blancs (Cinti, 2009). Cependant, certaines études chez la souris ont permis de démontrer que les adipocytes brites de certains dépôts de WAT étaient positifs pour le marqueur Myf5 (WAT rétropéritonéal et sous-cutané antérieur) alors que d'autres ne l'étaient pas (WAT inguinal) (Sanchez-Gurmaches et al., 2012; Tallquist et al., 2000) (Figure 18). Ces résultats indiquent qu'il est bien difficile de trouver des précurseurs spécifiques pour chacun de ces adipocytes.

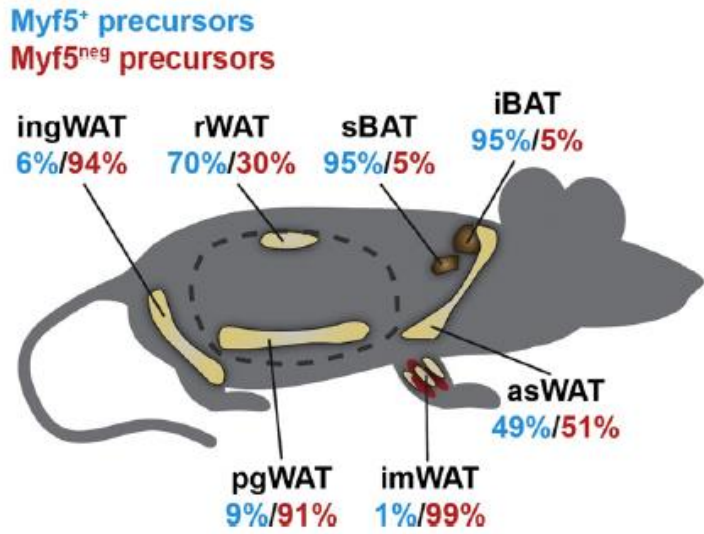


Figure 18 : Comparaison des différentes populations de précurseurs adipocytaires Myf5 positifs et négatifs dans les différents dépôts adipeux de souris. Illustration d'après Sanchez-Gurmaches et *al.*, Biochimica et biophysica acta, 2014.

Une autre étude a permis de déterminer l'origine des adipocytes bruns par le biais de la transdifférenciation. En utilisant un système rapporteur où le promoteur *UCPI* induit l'expression du récepteur humain à l'œstrogène (ER : estrogen receptor), on note que les adipocytes deviennent des adipocytes bruns qui expriment ce récepteur dans le WAT inguinal après exposition au froid. Si on maintient les souris en condition de thermoneutralité qui a pour effet de «blanchir» les adipocytes, les caractéristiques brunes disparaissent mais l'expression du récepteur est maintenant retrouvée dans des adipocytes ayant des caractéristiques d'adipocytes «blancs» (Rosenwald et al., 2013). Donc, ces différents travaux montrent que les adipocytes bruns peuvent être obtenus par différents mécanismes. Une étude récente montre que l'isolation à partir du mésoderme de cellules humaines exprimant le marqueur FOXF1 permet, après différenciation, d'obtenir des adipocytes beiges ayant une activité thermogénique (Su et al., 2018). Un résumé des origines des différents PAs est présenté à la figure 19.

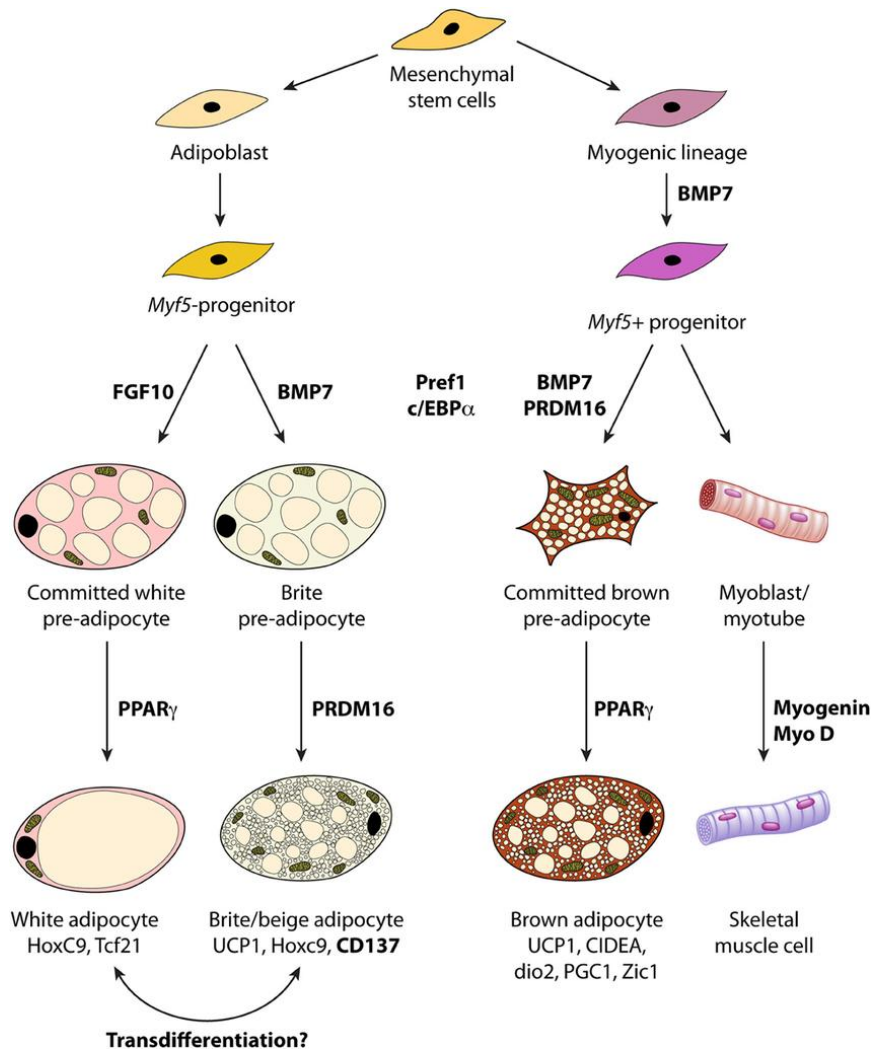


Figure 19 : Origine des différents progéniteurs adipeux. Les progéniteurs adipeux donnant des adipocytes blancs ou brite ne possèdent pas le marqueur *Myf5*. Lors de la différenciation en adipocytes, certains stimuli peuvent transdifférencier les adipocytes blancs en adipocytes brites et vice-versa. Les progéniteurs de la lignée myogénique possédant le marqueur *Myf5* peuvent se différencier en adipocytes bruns par l'implication de PRDM16 ou en cellules musculaires squelettiques par les facteurs MyoD/Myogenine. Illustration d'après Obregon, *Frontiers dans physiology*, 2014.

2.2 Auto-renouvellement des progéniteurs adipeux

Les adipocytes sont des cellules différenciées et impliquées dans l'homéostasie énergétique ou bien dans la thermogénèse. Elles sont incapables de proliférer et elles ne possèdent pas une durée de vie infinie dans le tissu. Chez la souris, environ 0.6% des adipocytes sont renouvelés annuellement. Pour l'homme, ce taux est de 8% et on estime que le temps moyen de vie d'un adipocyte est d'environ 10 ans (Rigamonti et al., 2011; Spalding et al., 2008). Il est donc nécessaire de pouvoir renouveler la quantité nécessaire d'adipocytes afin d'assurer le stockage des lipides,

sinon cela entraînerait des désordres métaboliques précoces tels que la résistance à l'insuline et l'athérosclérose.

Mon laboratoire étudie les PAs humains issus de différents dépôts (Kouidhi et al., 2015). La mise en culture des cellules hMADS (human Multipotent Adipose-Derived Stem cells) a permis d'identifier plusieurs molécules clés dans l'auto-renouvellement de ces cellules. Ces progéniteurs furent isolés en 2004 et possèdent des caractéristiques de MSC leur permettant de se différencier en plusieurs types cellulaires (Rodriguez et al., 2005). Ainsi, mon laboratoire a pu identifier des molécules importantes pour maintenir l'auto-renouvellement des PAs tels que le FGF2 et l'Activine A.

2.2.1 FGF2

Pour les cellules hMADS, l'aptitude à proliférer diminue avec le temps (à passage 15, le temps de dédoublement est de 2 jours contre 4 jours pour les cellules à passage 20) ainsi que leur capacité à se différencier. Cette observation se corrèle avec une diminution de l'expression du FGF2 (Fibroblast growth factor 2) pour les cellules hMADS non différenciées (Zaragosi et al., 2006). FGF2 est exprimé seulement dans les PAs et non les cellules adipocytaires différenciées. Le FGF2 n'est pas sécrété dans le milieu de culture par les cellules mais est bien acheminé à la surface cellulaire. L'ajout exogène de FGF2 permet de maintenir la prolifération des hMADS ainsi que leur potentiel à se différencier après chaque passage. Ceci indique que FGF2 agit de manière autocrine et paracrine. FGF2 interagit avec le récepteur de type 1 au FGF (FGFR1) qui est hautement exprimé dans ces cellules non différenciées et qui possède une forte affinité pour ce facteur de croissance. La signalisation de FGFR1 s'effectue à travers la voie ERK1/2 (Extracellular signal-regulated kinase), voie importante pour la prolifération cellulaire. L'utilisation d'un inhibiteur de MEK1, cible en amont d'ERK1, diminue l'aptitude des cellules à proliférer à l'état

clonal (clonogénicité) mais pas la différenciation. Cependant, l'utilisation d'un inhibiteur spécifique du récepteur au FGF2 (PD173074) entraîne la perte de la prolifération ainsi que le potentiel de différenciation. EGF (Epidermal growth factor), PDGF ou FGF10 ne peuvent pas remplacer le FGF2. Une étude décrit le FGF1 comme étant capable d'induire l'auto-renouvellement des PAs humains ainsi que de favoriser la différenciation (Widberg et al., 2009). Cependant, l'implication de FGF2 dans la prolifération des progéniteurs humains *in vivo* reste à être démontré. Une étude de 2016 suggère néanmoins qu'un taux plasmatique élevé de FGF2 est positivement corrélé à l'obésité pouvant ainsi corroborer l'expansion de la masse adipeuse (Hao et al., 2016).

2.2.2 Activine A

Les activines sont des protéines faisant partie de la superfamille du TGF β (Bartholin et al., 2002) et sont codées par le gène *INHBA*. Pour être actives, elles doivent former des dimères à partir de sous-unités β d'inhibines. Il existe quatre sous-unités qui sont retrouvées chez les mammifères : β A et β B qui sont retrouvés dans presque tous les tissus ainsi que β C et β E dont l'expression est prédominante au niveau du foie. Ces sous-unités sont synthétisées initialement sous forme de précurseurs et, après leur dimérisation, sont clivées par des enzymes dans le réticulum endoplasmique afin de devenir des molécules actives. Les homodimères inhibines β A ou β B forment l'activine A et B respectivement, mais il existe un hétérodimère AB. La signalisation de l'activine s'effectue à travers deux types de récepteurs. Les récepteurs de type II ou I de l'activine (ActRII et ActRI, ce dernier est aussi connu sous le nom de ALK pour activin receptor-like kinase). Ils possèdent une activité transmembranaire sérine/thréonine kinase (Tsuchida et al., 2009). Cependant, d'autres molécules de cette superfamille peuvent interagir avec ce récepteur telles que la myostatine, le GDF11 et nodal (Lee, 2004; Oxburgh et al., 2004; Shen, 2007). Deux ActRII ont

été identifiés (ActRIIB et A qui interagissent avec l'activine B) tandis qu'ActRI contient sept membres (ALK1-7). ALK4-5-7 lient spécifiquement pour les activines et le TGF- β alors que ALK1-2-3-6 interagissent avec le groupe des BMPs (Feng et Derynck, 2005; Mathews et Vale, 1991). L'activine, se liant sur ActRII, induit le recrutement d'ALK et phosphoryle les résidus sérines et/ou thréonines. Le récepteur ALK pourra alors induire la signalisation à travers les protéines Smad2 et Smad3. Il active aussi les voies p38 MAPK, ERK1/2, JNK ainsi que la voie PI3K/Akt et la voie canonique Wnt/ β -caténine (Bao et al., 2005; de Guise et al., 2006; Hirota et al., 2008).

La signalisation des activines semble indispensable pour l'auto-renouvellement et le maintien du caractère souche des cellules souches embryonnaires humaines (Xiao et al., 2006). L'activine A est sécrétée par des ASC non différenciées provenant de divers dépôts adipeux humains. Elle joue un rôle essentiel puisque l'ajout exogène induit la prolifération cellulaire et inhibe la différenciation adipocytaire. L'expression de l'activine A diminue lorsque les cellules sont en différenciation et elle augmente lorsqu'on inhibe l'auto-renouvellement des cellules hMADS. L'inhibition de cette protéine par interférence à l'ARN montre des effets inverses. La signalisation au niveau de son récepteur active les voies SMAD2 et inhibe celle de C/EBP β de manière autocrine/paracrine. L'activine A induit un phénotype similaire à des myofibroblastes (Zaragosi et al., 2010). Le traitement de PAs avec des cytokines inflammatoires, notamment IL-1 β et le TNF α , induit l'expression de l'activine A ((Mohan et al., 2001). Dans un contexte d'obésité où l'accumulation de cellules inflammatoires induisent la sécrétion de ces deux cytokines, on constate une forte expression d'activine A dans le TA de patients obèses (Zaragosi et al., 2010). Dans mon laboratoire, des études récentes ont pu mettre en évidence l'existence d'une boucle autocrine pour l'activine A. La première étude a permis d'identifier un nouveau gène dans l'auto-renouvellement de PAs : *IER3* (Immediate early response 3) qui est un gène sensible à

l'environnement cellulaire, principalement le stress. La stimulation de PAs avec de l'activine A induit l'expression d'*IER3* tandis que l'utilisation de plusieurs siRNA contre *IER3* inhibe la prolifération cellulaire *via* la perte de la signalisation ERK1/2. En plus, l'utilisation d'un siRNA contre *INHBA* diminue l'expression d'*IER3* impliquant cette fameuse boucle autocrine (Ravaud et al., 2015). La deuxième étude, à laquelle j'ai apporté ma contribution, a permis de découvrir une seconde molécule dans la boucle de l'activine A : la protéine EGR1. L'utilisation d'un siRNA contre *IER3* diminue l'expression d'*EGR1* tandis que la surexpression d'*EGR1* permettait d'induire l'expression de l'*INHBA* (voir article 1). La figure 20 récapitule comment le FGF2 et l'activine A maintiennent l'auto-renouvellement des PAs.

Une autre protéine de la superfamille du TGF- β , BMP4, induit la prolifération des ASC de manière autocrine et dose-dépendant tout en gardant leur propriété multipotente, impliquant la signalisation de la superfamille du TGF β dans l'auto-renouvellement (Vicente López et al., 2011; Zamani et Brown, 2011).

2.2.3 La voie Hedgehog

Cette voie est impliquée dans la différenciation et l'auto-renouvellement des PAs. On observe une baisse de la cascade de signalisation dans les progéniteurs en différenciation adipocytaire ou ostéoblastique. De plus, l'engagement de la différenciation n'est pas affecté par l'activation de la voie Hedgehog contrairement au processus de maturation des adipocytes (diminution du stockage lipidique, de la sensibilité à l'insuline, des marqueurs adipocytaires) (Fontaine et al., 2008). Son expression basale semble nécessaire pour maintenir les propriétés prolifératrices et clonales chez les cellules non différenciées, c'est-à-dire l'auto-renouvellement. Contrairement à la voie du FGF2, l'inhibition de la signalisation Hedgehog lors de la prolifération cellulaire ne perturbe pas le potentiel de différenciation de ces cellules (Plaisant et al., 2011).

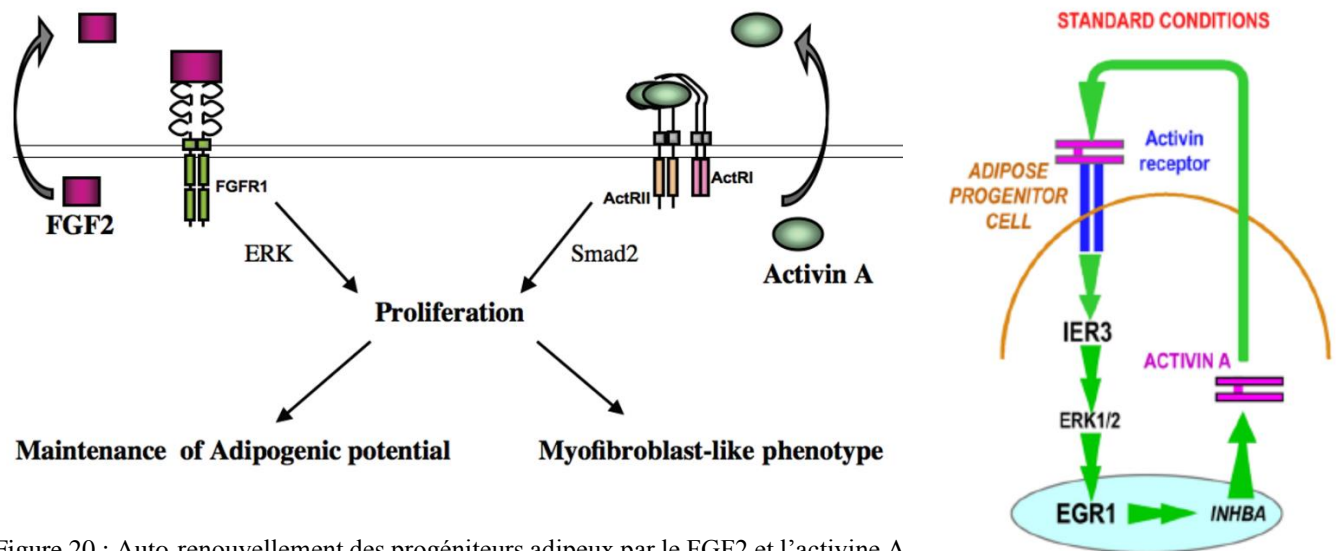


Figure 20 : Auto-renouvellement des progéniteurs adipeux par le FGF2 et l'activine A.

À gauche : Le FGF2 par le biais du récepteur FGFR1 induit la prolifération et maintient le potentiel de différenciation adipocytaire *via* la voie ERK1/2. L'activine A active les récepteurs ActRI/ActRII et induit l'activation de Smad2 permettant la prolifération ainsi que le maintien d'un phénotype ressemblant à des myofibroblastes. Illustration d'après Villageois et *al.*, American Journal of Stem Cells, 2012.

À droite : Boucle autocrine de l'auto-renouvellement de l'activine A. L'activine A interagit avec son récepteur et augmente l'expression de la protéine IER3 qui induit la phosphorylation d'ERK1/2. Cette phosphorylation entraîne l'activation d'EGR1 qui augmente la transcription du gène *INHBA* ce qui conduit à la production d'activine A. Illustration adaptée de Ravaud et *al.*, Scientific Reports, 2017.

2.2.4 Hypoxie

Les tissus et cellules peuvent s'adapter à des baisses du niveau d'oxygénation (hypoxie). Les réponses à une baisse de la pression partielle en O₂ se font en grande partie *via* la protéine HIF-1 qui est un facteur de transcription (Wang et Semenza, 1995). HIF-1 est composé de 2 sous-unités : HIF-1 α qui est stabilisée sous hypoxie et HIF-1 β qui n'est pas sensible à la variation d'O₂ (Huang et al., 1998a). Sous hypoxie, HIF-1 α va induire la transcription de plusieurs gènes impliqués dans l'angiogenèse, le métabolisme du glucose ainsi que la survie cellulaire (Rey et Semenza, 2010; Schipani et al., 2001; Wenger, 2000; Wiesener et al., 1998; Wykoff et al., 2000). Plusieurs études démontrent l'importance de l'hypoxie dans l'auto-renouvellement de cellules souches distinctes telles que les cellules embryonnaires, hématopoïétiques et mésenchymateuses (Hawkins et al.,

2013). De nombreux arguments indiquent qu'un taux d'oxygène à 21% (normoxie) n'est pas l'idéal pour la culture de cellules souches embryonnaires humaines. Ces cellules prolifèrent mieux en présence d'un faible taux d'oxygénation (Forristal et al., 2010). Les MSC, surtout les ASC, sont localisées dans des niches où la pression partielle en O₂ est plutôt faible (2 à 8%) (Mohyeldin et al., 2010). En présence de 2% d'oxygène, on observe une augmentation de la phosphorylation du récepteur à l'EGF et du PDGF ainsi qu'une hausse de la production du VEGF. On observe aussi l'activation de la voie ERK et PI3K/Akt permettant d'induire la prolifération et la migration des ASC (Lee et al., 2009; Rehman et al., 2004). Quand les cellules sont cultivées dans un atmosphère contenant 2% O₂, l'expression d'*IER3* est induite, ce qui active la boucle autocrine de l'Activine A. En délétant *IER3*, on perd totalement la stimulation de la prolifération des PAs par l'hypoxie. L'utilisation d'un siRNA ciblant *HIF-1α* réduit de 40% l'expression en ARNm d'*IER3* (Ravaud et al., 2015). Un préconditionnement en hypoxie permet aux ASC de se protéger contre une hypoxie léthale augmentant leur survie (Liu et al., 2013a). L'hypoxie perturbe la différenciation cellulaire. Cependant, un préconditionnement hypoxique amène à une meilleure différenciation en normoxie ainsi qu'une meilleure production lipidique (Kim et al., 2014; Zhang et al., 2013). De plus, les transplantations en série d'ASC chez la souris ont permis de reconstruire complètement un TA, ce qui montre que l'auto-renouvellement de ces cellules peuvent s'effectuer *in vivo*.

L'auto-renouvellement des PAs est le processus par lequel le TA maintient un stock de cellules progénitrices. Afin de former de nouveaux adipocytes pour remplacer les anciens adipocytes morts ou afin d'augmenter la capacité de stockage des lipides dans le corps dans un contexte d'obésité par exemple, ces progéniteurs devront se différencier pour devenir des adipocytes matures : l'adipogenèse.

2.3 Adipogenèse

La différenciation adipocytaire ou l'adipogenèse est le processus permettant à une cellule souche multipotente de devenir un adipocyte mature. Il existe deux phases dans ce processus : l'engagement et la différenciation terminale.

2.3.1 Engagement

L'engagement est la première étape du processus de différenciation. Les cellules souches multipotentes possèdent plusieurs choix pour se différencier et l'engagement les amène à suivre un chemin plus restreint, les forçant à devenir des PAs. Cette étape n'induit pas de changements morphologiques car la morphologie cellulaire est identique à celle des cellules souches multipotentes. Néanmoins, la majorité des modèles cellulaires utilisés à l'heure actuelle pour étudier l'adipogenèse proviennent de lignées adipocytaires c'est-à-dire des cellules déjà engagées dans le processus de différenciation. On connaît plus facilement les molécules impliquées dans la différenciation terminale que celles importantes pour l'engagement. Il existe toutefois quelques voies de signalisation qui bloquent la phase d'engagement. Les molécules présentées dans cette section sont les plus importantes répertoriées à ce jour.

La densité cellulaire est une composante influente de la différenciation adipocytaire. La différenciation de MSC humainesensemencées à faible densité mène à la formation d'ostéoblastes alors qu'à forte densité, on obtient des adipocytes. La forme cellulaire a son importance puisque les adipocytes formés provenaient de MSC ayant une morphologie contractée les empêchant de s'étaler. À l'inverse, les ostéoblastes pouvaient s'étaler puisque les MSC étaient aplanies (McBeath et al., 2004).

a) La famille des Bone morphogenic proteins (BMPs)

Les BMPs sont des protéines qui induisent des signaux morphologiques et qui appartiennent à la superfamille du TGF- β . Il existe une quinzaine de différents ligands qui peuvent exercer des effets pro- ou anti-adipogéniques. Ces protéines ont été principalement impliquées dans le développement des os et du cartilage. Cependant parmi les BMPs, deux sont impliqués dans la différenciation adipocytaire : BMP4 et BMP7. Premièrement découvert pour son aptitude à promouvoir l'ostéogénèse, BMP4 est reconnu en tant que facteur important pour l'embryogénèse et le développement mais aussi pour l'homéostasie de plusieurs tissus chez l'adulte (Urist, 2002).

BMP4 est une protéine fortement conservée à travers l'évolution et agit de manière autocrine et paracrine (Chen et al., 2004; Zhang et al., 2014). BMP4 interagit avec l'association de ALK3 ou ALK6 et de ActRII afin de transmettre son signal, principalement à travers SMAD1/5/8 qui forme un complexe avec SMAD4 (Kawabata et al., 1998; Miyazono et al., 2010) (Figure 21). BMP4 peut aussi activer des voies indépendantes de SMAD : ERK, p38-MAPK, Akt et plusieurs autres dont leur rôle est de réguler la différenciation cellulaire, la migration, l'apoptose ainsi que la survie (Bragdon et al., 2011). Le traitement des cellules multipotentes par BMP4 induit l'engagement vers la lignée adipocytaire impliquant la MCE (Mitotic clonal expansion) (Bowers et al., 2006; Tang et al., 2004). L'expression de BMP4 diminue pendant la différenciation terminale chez les PA bruns (Suenaga et al., 2013). BMP4 serait très exprimé au niveau de la niche de cellules souches et il existerait une diminution de gradient vers les adipocytes matures. D'autre part, les adipocytes bruns matures sécrètent plusieurs antagonistes des BMP (GREMLIN1, GREMLIN2 et NOGGIN). Les adipocytes bruns autorégulent la différenciation des PA si la quantité d'adipocytes bruns dans son tissu est suffisante (Ashe, 2005; Ramel et Hill, 2012).

BMP7, permet l'adipogénèse des adipocytes bruns en induisant la différenciation des précurseurs adipocytaires bruns (Zamani et Brown, 2011). Une étude *in vivo* sur la souris a

démontré que l'inactivation du gène *bmp7* diminuait la masse de BAT comparativement aux souris contrôles. À l'opposé, la surexpression de BMP7 dans les souris par expression adénovirale augmente la quantité de BAT mais pas du WAT (Tseng et al., 2008).

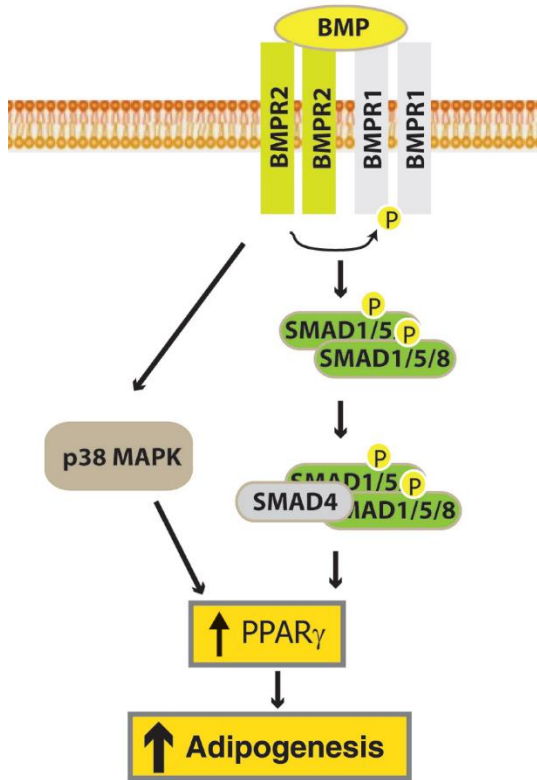


Figure 21 : Signalisation de BMP dans l'adipogenèse. Illustration d'après Lee, *Comprehensive physiology*, 2017.

b) La voie de signalisation Wnt

La voie Wnt est importante pour maintenir le bon fonctionnement des tissus adultes. En l'absence de ligand, la β -caténine est phosphorylée par l'enzyme GSK3 (glycogène synthase kinase 3), ce qui amène à sa dégradation par le protéasome (Figure 22). Lorsque la voie Wnt est active, GSK3 est inhibée et empêche la dégradation de la β -caténine. Celle-ci sera alors transloquée vers le noyau et, en se liant avec la famille de facteurs de transcription TCF, pourra induire l'expression de divers gènes (Logan et Nusse, 2004). La surexpression de Wnt ou d'une forme mutée de β -caténine la rendant plus stable empêche la différenciation de cellules 3T3-L1 en inhibant les facteurs de transcription adipogénique comme PPAR γ et CEBP α . En revanche, l'inhibition de la signalisation de Wnt entraîne spontanément la différenciation dans ces même cellules (Ross et al.,

2000). WNT10b, qui stabilise la β -caténine cytosolique, est présente dans les progéniteurs et diminue au cours de la différenciation adipocytaire. Son expression constitutive dans les cellules inhibe l'adipogenèse. Pour les souris transgéniques exprimant *Wnt10b* dans les adipocytes, on note une réduction de 50% de la masse du WAT et une absence de BAT (Longo et al., 2004). Donc, une activation de cette voie réduit la différenciation adipocytaire.

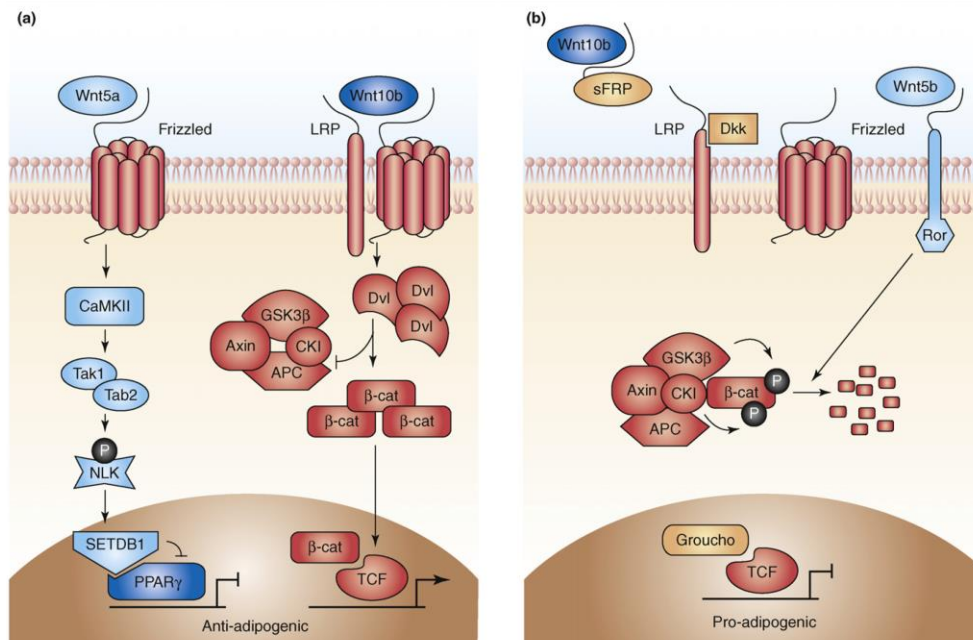


Figure 22 : Modulation de la voie Wnt dans l'adipogenèse. A) En présence du ligand Wnt, la β -Caténine est libérée et entraîne l'inhibition de l'adipogenèse en se liant avec TCF dans le noyau. B) En absence du ligand, la β -Caténine est dégradée par le protéasome permettant la transcription de gènes pro-adipogéniques. Illustration d'après Christodoulides et *al.*, Trends in endocrinology and metabolism, 2008.

c) Zfp423

Zfp423 est un facteur de transcription découvert lors de l'évaluation du potentiel adipogénique des fibroblastes embryonnaires. Ceux qui ne possédaient pas cette protéine ne pouvaient pas se différencier en adipocytes car ils ne pouvaient pas exprimer PPAR γ (Gupta et al., 2010). Zfp423 induit l'engagement adipocytaire en amplifiant la signalisation des BMPs par

interaction avec les domaines SMAD. Sa répression par un autre factor Zfp521 inhibe l'adipogenèse et induit l'ostéogénèse (Festa et al., 2011; Kang et al., 2012).

d) Pref-1

Pref-1 est une protéine transmembranaire qui devient active à la suite d'un clivage enzymatique (Villena et al., 2002). La fraction extracellulaire relâchée inhibe la différenciation, probablement *via* son interaction avec Notch. L'expression de Pref-1 est très élevée dans les PAs et diminue pendant l'adipogenèse. Son expression induite dans les 3T3-L1 est capable de bloquer la différenciation. Une forme soluble de Pref-1 est suffisante pour diminuer la masse adipocytaire ainsi que la sensibilité à l'insuline (Lee et al., 2003).

2.3.2 Différenciation terminale

La différenciation terminale est le processus qui amène les PAs à devenir des adipocytes matures et fonctionnels. Comme mentionné précédemment, on connaît plus de molécules clés impliquées dans cette phase de différenciation que celle d'engagement.

Certains modèles de PAs murins comme la lignée 3T3-L1, arrivant à confluence, entrent en arrêt de prolifération cellulaire. Lors de l'induction d'une adipogenèse, ces cellules doivent retourner dans le cycle de prolifération et effectuer un processus de MCE (Ntambi et Young-Cheul, 2000). Ce processus est nécessaire pour la différenciation terminale puisque lorsque l'on inhibe les cellules 3T3-L1 en phase S lors de la MCE, on inhibe alors la différenciation adipocytaire (Tang et al., 2004). Une hypothèse fût proposée expliquant que la mitose dénoue les brins d'ADN ce qui permet plus facilement l'accès des éléments de réponse aux facteurs de transcription lors de l'adipogenèse (Cornelius et al., 1994). Les principaux facteurs déterminants pour l'adipogenèse terminale sont décrits ci-après :

a) Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ (PPAR γ)

PPAR γ a précédemment été décrit pour son implication dans l'expression des gènes thermogéniques. PPAR γ est reconnu comme étant le régulateur maître de la différenciation adipocytaire, tant pour les adipocytes blancs que bruns (Barak et al., 1999; Rosen et al., 2002). Deux isoformes de PPAR γ existent : PPAR γ 1 qui est exprimé constitutivement dans tous les tissus et PPAR γ 2 qui est spécifique du TA (Zhu et al., 1995). Ces deux isoformes sont fortement induites lors de l'adipogenèse, l'isoforme 1 apparaît plus tôt que la 2. Elle reste maintenue durant la différenciation (Morrison et Farmer, 1999). Plusieurs études de gain ou de perte de fonction sur les souris indiquent que PPAR γ est impliqué dans la formation du TA. La perte de l'expression de PPAR γ entraîne des lipodystrophies ainsi qu'une résistance à l'insuline (Farmer, 2006; Hegele et al., 2002). PPAR γ est nécessaire et suffisant pour l'adipogenèse et son potentiel est assez fort pour entraîner la différenciation de cellules non adipogéniques telles que les fibroblastes ou les myoblastes en adipocytes (Hu et al., 1995; Tontonoz et al., 1994a). PPAR γ contrôle la transcription de plusieurs gènes impliqués dans le stockage et la synthèse des lipides ainsi que le métabolisme du glucose et la sécrétion des adipokines (Barak et al., 1999; Tontonoz et al., 1994b). PPAR γ est important aussi pour maintenir l'état différencié des adipocytes. L'utilisation d'un adénovirus exprimant la forme dominante négative de PPAR γ dans des adipocytes 3T3-L1 cause la dédifférenciation de ceux-ci résultant en une perte de l'accumulation des lipides ainsi que l'expression des marqueurs adipocytaires (Tamori et al., 2002).

b) La famille des CCAAT-Enhancer-Binding Proteins (CEBP)

La famille des CEBP est, après PPAR γ , la plus importante pour l'induction de l'adipogenèse. Elle est constituée de CEBP α , CEBP β et CEBP δ . Cette famille possède un domaine d'activation transcriptionnel joignant un motif «basic leucine zipper» qui permet de se dimériser et

de se fixer sur le site CCAAT du promoteur de plusieurs gènes impliqués dans l'adipogenèse (Birkenmeier et al., 1989).

CEBP α possède un rôle central dans la différenciation adipocytaire. Son expression précède l'expression de gènes spécifiques des adipocytes lors de la différenciation *in vitro* (Garcia de Herreros et Birnbaum, 1989). L'expression ectopique de CEBP α dans les fibroblastes embryonnaires murins induit l'adipogenèse mais seulement en présence de PPAR γ (Freytag et al., 1994). Cependant, la situation inverse n'est pas observée puisque la surexpression de PPAR γ sans CEBP α induit la différenciation adipocytaire. Ces résultats permettent de définir que CEBP α est impliqué dans la différenciation adipocytaire mais qu'il n'est pas suffisant (Rosen et al., 2002). Une boucle de signalisation positive s'effectue entre PPAR γ et CEBP α en un premier temps, suivie d'une deuxième boucle entre PPAR γ et CEBP β qui renforce la différenciation (Park et al., 2012; Rosen et al., 2002; Wu et al., 1999b). L'activation transcriptionnelle par CEBP α induit par exemple la transcription de FABP4, du transporteur GLUT4, du récepteur à l'insuline et de plusieurs autres gènes (Christy et al., 1989; Kaestner et al., 1990; McKeon et Pham, 1991). Un haut niveau d'expression de CEBP α active la transcription spécifique de gènes adipocytaires et l'accumulation de lipides en absence d'agents inducteurs de la différenciation (Lin et Lane, 1994). En effet, l'utilisation d'ARNi (ARN interférent) contre CEBP α empêche l'accumulation de lipides et la conversion des progéniteurs en adipocytes (Lin et Lane, 1992). Cependant, l'expression de protéines exprimées tôt dans la différenciation comme la LPL n'est pas affectée par la délétion de CEBP α (Samuelsson et al., 1991). Les souris déficientes pour CEBP α sont généralement lipodystrophiques. Elles ont moins de WAT, mais les effets sont moindres pour le TA mammaire ainsi que le TA brun (Linhart et al., 2001).

CEBP β et CEBP δ agissent au tout début de la différenciation terminale. L'accumulation de ces deux facteurs s'effectue dans les premières 24h pour donner suite à l'induction de la

différenciation lorsque les cellules sont dans la MCE (Cao et al., 1991; Tang et al., 2003). L'induction de CEBP β s'effectue par l'activation du site CREB par l'AMPc (Zhang et al., 2004). CEBP δ ainsi que CEBP β sont induits par les glucocorticoïdes (Cao et al., 1991). Ces deux protéines induisent directement l'expression de PPAR γ et de CEBP α : les deux facteurs de transcription primordiaux de l'adipogenèse (Tang et al., 2005). Il existe une redondance pour les actions de CEBP β et CEBP δ . En effet, la délétion individuelle de ces deux protéines chez la souris entraîne peu d'effet sur le développement de la masse adipeuse alors qu'un double KO diminue fortement le développement adipocytaire (Tanaka et al., 1997). CEBP β interagit avec PDRM16 afin d'induire la différenciation adipocytaire brune à partir des progéniteurs Myf5 (Kajimura et al., 2009). Leur interaction permet d'induire l'expression de PGC-1 α ainsi qu'UCP1 (Barbera et al., 2001; Karamanlidis et al., 2007). De plus, la surexpression de CEBP β modifie le phénotype des adipocytes blancs en adipocytes ayant des caractéristiques d'adipocyte brun.

c) Sterol-Response-Element-Binding Protein (SREBP)

SREBP est identifié comme un facteur de transcription de type «basic helix-loop-helix (Kim et al., 1998a). SREBP est un précurseur retrouvé ancré dans la membrane du réticulum endoplasmique (Sato et al., 1994). Il nécessite deux étapes successives de clivage afin de pouvoir devenir actif. La première étape est par le biais d'une sérine protéase ancrée dans la membrane. La seconde clive SREBP par une cystéine protéase (Sakai et al., 1998). La forme mature migre vers le noyau pour activer la transcription des gènes reliés à la lipogenèse. Le précurseur inactif doit être ubiquitiné suivi de sa dégradation dans le protéasome (Hirano et al., 2001). SREBP1c induit, *via* l'insuline, l'expression d'enzymes impliquées dans la lipogenèse, principalement la FAS (fatty acid synthase) et l'ACC (Acetyl CoA carboxylase) (Kim et al., 1998b). L'expression d'un

dominant-négatif de SREBP1c inhibe la différenciation adipocytaire mais de manière moins importante comparativement à une perte de fonction de PPAR γ (Kim et Spiegelman, 1996).

d) La famille des Kruppel-Like Finger (KLF)

Les KLF constituent une famille de facteurs de transcription « zinc-finger » impliquée dans l'engagement ainsi que la différenciation terminale. Ils sont impliqués dans la régulation de l'apoptose, la prolifération et la différenciation. Chez les mammifères, 17 KLFs ont été identifiés et de nombreuses études ont leur rôle biologique et leur implication dans des pathologies touchant l'homme. En effet, les KLFs jouent un rôle majeur dans la régulation des systèmes physiologiques dont les systèmes cardiovasculaire, digestif, respiratoire, hématologique et immunitaire . Mais ils peuvent aussi être impliqués dans des pathologies comme l'obésité, la maladie cardiovasculaire, le cancer et les conditions inflammatoires (McConnell et Yang, 2010). Parmi les KLFs, KLF15 est produit tôt dans la différenciation par CEBP β /CEBP δ et permet l'induction de l'adipogenèse par l'activation du promoteur de *PPAR γ 2* ainsi que l'expression de *GLUT4* (Mori et al., 2005). KLF5 active l'adipogenèse de la même manière que KLF15 (Oishi et al., 2005). Dans les cellules 3T3-L1 et les fibroblastes, KLF6 inhibe l'expression de Pref-1 qui est anti-adipogénique. Cependant, la surexpression de cette protéine n'est pas suffisante à elle seule pour promouvoir l'adipogenèse tandis qu'on observe une diminution de la différenciation chez les cellules ayant une baisse de KLF6 (Li et al., 2005). KLF9 régule l'expression de PPAR γ 2 et de CEBP α pendant la différenciation. L'utilisation d'un ARNi contre KLF9 perturbe l'adipogenèse (Pei et al., 2011). Cependant, tous les KLF ne sont pas forcément pro-adipogéniques. KLF7 et KLF2 sont connus pour inhiber l'adipogenèse : l'action de KLF2 est d'inhiber le promoteur de *PPAR γ 2* (Kanazawa et al., 2005; Wu et al., 2005).

e) Micro-ARNs (miARN)

Les miARN sont impliqués dans la différenciation adipocytaire. La démonstration de leur implication a été obtenue par la délétion de *Dicer* (protéine permettant la maturation de miARN) dans des MSC humaines, ce qui perturba fortement la différenciation *in vitro* (Oskowitz et al., 2008). Par la suite, la délétion spécifique de *Dicer* dans le TA de souris induit la perte de plusieurs dépôts de WAT. Cependant, la masse du iBAT n'est pas affectée bien que l'expression des gènes thermogéniques du BAT soit grandement diminuée (Mudhasani et al., 2011). L'étude d'ARN non codants, principalement les miRNA a permis de découvrir environ 70 miRNA impliqués dans l'adipogenèse (Ortega et al., 2010). MiR-143 fût le premier découvert. Son expression augmente dans les adipocytes différenciés. L'utilisation d'un oligonucléotide antisens contre miR-143 inhibe la différenciation de PAs humains résultant en une baisse de l'accumulation de TG ainsi qu'une baisse de l'expression de PPAR γ 2, FABP et GLUT4 (Xie et al., 2009). La surexpression de miR378/378 durant l'adipogenèse augmente l'accumulation des TG, des gènes lipogéniques, de PPAR γ 2 ainsi que de GLUT4 (Gerin et al., 2010). L'inhibition des miRNA-30 entraîne une perte de l'adipogenèse tandis que la surexpression de miRNA-30a et miRNA-30d augmente la formation de cellules adipocytaires (Zaragosi et al., 2011). Pour des souris transgéniques exprimant miR-196a sous le contrôle de promoteur *FABP4*, le gain de poids s'effectue moins rapidement comparativement aux souris contrôles (Mori et al., 2012).

Certains miARNs ciblent directement PPAR γ et CEBP α tandis que d'autres régulent la signalisation de l'insuline, TGF- β et Wnt (Chen et al., 2013a). Il existe aussi des miARNs spécifiques à la formation et de la fonction des adipocytes bruns et/ou beiges qui interagissent avec PRDM16 et CEBP β (Trajkovski et Lodish, 2013).

f) Modifications épigénétiques

Les modifications épigénétiques n'altèrent pas la séquence du génome mais modifient des éléments soit au niveau de l'enroulement de la chromatine autour de l'ADN ou bien modifient directement l'ADN, ce qui permet d'augmenter et de diminuer la transcription des gènes ciblés. Cette machinerie transcriptionnelle nécessite l'interaction du brin d'ADN avec certains cofacteurs pour induire l'expression des gènes. La modification de la chromatine va permettre de transcrire plus ou moins facilement. L'acétylation des histones par les HAT (histone acetyltransférase) induit l'accessibilité des promoteurs adipogéniques tandis que les HDAC (histone deacetylase) bloquent la transcription. La SIRT1, possédant une activité HDAC, réprime l'adipogenèse par son interaction avec PPAR γ (Zhang et al., 2012). La méthylation de l'histone H3 augmente elle aussi la transcription. Dans des cellules 3T3-L1 traitées avec un inhibiteur bloquant la méthylation des histones, on constate une baisse de la différenciation adipocytaire (Musri et al., 2006).

Un des premiers effets observés lors de l'adipogenèse est le changement morphologique cellulaire. Ces cellules, qui avaient une apparence allongée similaire aux fibroblastes, obtiennent une forme plutôt sphérique. Ces modifications sont parallèles avec les changements des composantes de la matrice extracellulaire (ECM : Extracellular matrix) et du cytosquelette (Gregoire et al., 1998). La différenciation terminale est caractérisée par l'apparition de gouttelettes lipidiques ainsi que des protéines impliquées dans la lipogenèse dont l'expression peut augmenter de 10 à 100 fois (Paulauskis et Sul, 1988; Spiegelman et al., 1983; Weiner et al., 1991). L'expression des transporteurs du glucose ainsi que celles des récepteurs de l'insuline augmente à la fin de la différenciation (Garcia de Herreros et Birnbaum, 1989; Rubin et al., 1978). Les niveaux d'actine et de tubuline diminuent lors de la phase terminale de différenciation. L'expression de FABP4, LPL, périlipine, GLUT4 ainsi que les adipokines comme la leptine et l'adiponectine

augmentent (Cawthorn et al., 2012; Greenberg et al., 1991, 1993; Spiegelman et al., 1983). L'ensemble des différents facteurs impliqués dans la différenciation adipocytaire est résumé dans la figure 23.

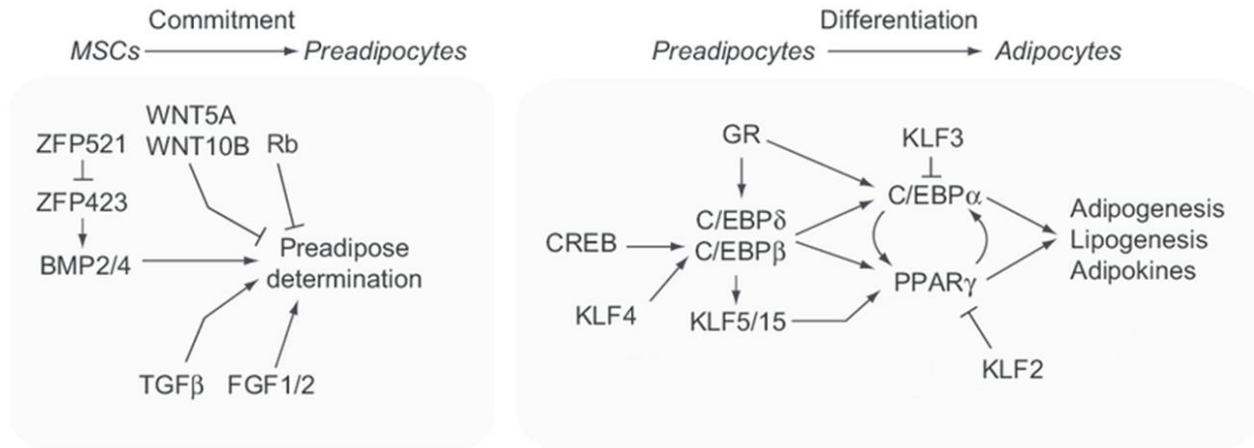


Figure 23 : Schéma récapitulatif des différentes étapes de l'adipogenèse. La première étape de l'engagement donne les progéniteurs adipeux (PA) à partir de cellules mésenchymateuses (MSC). La différenciation terminale induit la transformation des PA en adipocytes fonctionnels. Plusieurs molécules clés sont impliquées dans la différenciation adipocytaire tant au niveau de l'engagement que de la différenciation terminale. Illustration adaptée de Birsoy et *al.*, Journal of Cell Science, 2013.

2.4 Conversion métabolique du tissu adipeux

Comme mentionné précédemment, les adipocytes bruns en absence de stimuli ont des caractéristiques d'adipocytes blancs et obtiennent un potentiel thermogénique seulement sous l'action de certains signaux tels que le froid ou l'activation β -adrénergique. Cette transdifférenciation est importante afin de produire de la chaleur pour permettre à l'individu de survivre, ou pour dépenser de l'énergie. On appelle ce phénomène de conversion métabolique blanc vers brun : le brunissage puisqu'il y a une augmentation du nombre de mitochondries dans l'adipocyte et donc apparition d'une couleur brune. Cette transdifférenciation peut être bidirectionnelle, l'adipocyte brun peut perdre ses caractéristiques thermogéniques pour redevenir adipocyte «blanc». Le terme blanchiment est maintenant utilisé pour désigner cette perte de thermogénèse. Cette section sera très importante pour mon projet de recherche puisque j'ai étudié

les effets de molécules à visée thérapeutique et de peptides dans diverses pathophysiologies qui induisent soit le brunissage ou le blanchiment.

2.4.1 Conversion blanc vers brun : brunissage

Chez l'humain, 40 à 50g de BAT dépense quotidiennement environ 20% de l'énergie et cette dépense métabolique est la plus élevée comparativement aux autres tissus (Cannon et Nedergaard, 2004; Rothwell et Stock, 1979). De plus, le rythme métabolique basal est plus élevé chez les petits mammifères comme la souris, que chez l'homme; 8 Watt/kg versus 1-2 Watt/kg respectivement. Chez l'homme, l'activité du BAT prend en compte 2.7-5% du métabolisme basal et pourrait correspondre à la perte cumulative d'environ 4kg de «gras» par an (van Marken Lichtenbelt et Schrauwen, 2011; van Marken Lichtenbelt et al., 2009; Virtanen et al., 2009). Dans une société où l'obésité et ses complications telles que le diabète et les maladies cardiovasculaires sont de plus en plus présentes, il serait judicieux d'induire la conversion d'adipocytes blanc vers des adipocytes bruns/bruns pour produire de la chaleur à partir des lipides ainsi que, dans une mesure plus faible mais tout aussi efficace, du glucose (Bartelt et al., 2011; Ouellet et al., 2012). Il a été observé que l'activation du BAT chez la souris permet de combattre l'obésité et améliorer l'action de l'insuline (Arch, 2002).

Des chercheurs ont utilisés une molécule chimique, le 2,4-dinitrophénol, qui est un activateur d'UCP1 dans les cellules. Cependant, les fortes doses appliquées entraînaient des irrégularités de découplage de la respiration chez ces cellules induisant l'hyperthermie et la mort (Harms et Seale, 2013). Ne pouvant pas stimuler directement UCP1 par crainte d'obtenir des effets similaires au 2,4-dinitrophénol, la recherche se consacre maintenant sur la découverte d'anciennes ou de nouvelles molécules permettant d'induire la transcription d'UCP1.

L'activation du BAT par les catécholamines a suscité beaucoup d'intérêt pour découvrir de nouvelles molécules permettant la stimulation spécifique du récepteur β_3 adrénergique, impliqué dans l'augmentation de la thermogénèse. L'activation de β_3 -AR chez la souris stimule autant le BAT que le WAT afin d'obtenir une réponse thermogénique maximale (Grujic et al., 1997). Un traitement chronique permet d'améliorer la sensibilité à l'insuline avant d'observer une perte au niveau du poids corporel (Cawthorne et al., 1992). En considérant que l'expression de ce récepteur est beaucoup plus faible chez l'homme que chez la souris, plusieurs molécules sont inefficaces soit parce qu'elles ne sont pas assez sélectives soit parce que la biodisponibilité est insuffisante (Arch, 2002).

La thermogénèse est aussi stimulée par le froid. Le froid empêche la prise de poids et l'obésité induite par un régime HFD chez les souris sauvages (Ravussin et al., 2014). À l'opposé, une étude plus récente montre que l'exposition au froid sous HFD favorise l'obésité. Dans ce cas, l'exposition au froid entraînerait un stress et, la sécrétion de neuropeptide Y, ce qui aurait eu pour conséquence d'augmenter l'appétit des souris en HFD (Kuo et al., 2008; Zhu et al., 2018). Cependant, contrairement à la méthode traditionnelle qui est de laisser ces souris dans une pièce froide pendant plusieurs heures ou plusieurs jours, les souris ont été maintenues dans de l'eau froide pendant 1h puis elles ont été remises à température ambiante (20-24°C). Cette étude amène plusieurs biais. Premièrement, garder des souris à température ambiante entraîne déjà une induction du brunissage puisque la thermoneutralité de ces rongeurs se situe entre 30-32°C (Poole et Stephenson, 1977). Deuxièmement, l'effet du froid et de l'humidité pendant une heure seulement entraîne peut-être un stress différent qui force les souris à manger plus comparativement aux souris contrôles. Chez l'homme, l'exposition au froid pendant 6 semaines à compter de 2h par jour est suffisant pour diminuer la masse grasseuse chez des patients mâles en bonne santé (Yoneshiro et al., 2013). De plus, l'acclimatation de patients diabétiques pendant 10 jours à 14-15°C (1^{ière} journée

pendant 2h, 2^{ième} journée pendant 4h puis les jours suivants pendant 6h) a permis d'augmenter d'environ 40% la sensibilité à l'insuline (Hanssen et al., 2015). L'exposition au froid entraînait une augmentation de l'activité du BAT et de la capture du glucose dans ce tissu sur 10 patients obèses mais ayant un métabolisme normal. On observe aussi ce phénomène dans les muscles par l'induction de l'expression du transporteur GLUT4 (Hanssen et al., 2016)). Cependant, aucune étude n'a été faite à ce jour sur des patients qui ont un TA métaboliquement compromis.

Des changements au niveau du TA incluant l'augmentation de gènes impliqués dans la biogénèse mitochondriale, l'activité mitochondriale, le brunissage du scWAT ainsi qu'une modification du profil des adipokines sont observés chez des souris soumises à un exercice physique (Stanford et al., 2015). Le muscle squelettique produit une hormone appelée irisine qui permet d'induire le brunissage du TA. La surexpression de PGC-1 α dans les muscles de souris entraînait le brunissage du scWAT principalement par la forte concentration d'irisine sécrétée par les muscles. Les effets de l'irisine sont principalement médiés par PPAR α puisque l'utilisation de l'un de ses antagonistes réduit l'induction observée d'*UCPI* (Boström et al., 2012). Une étude chez l'homme montre aussi que l'exercice augmente le brunissage du scWAT, la sensibilité à l'insuline ainsi que l'expression de l'irisine autant chez les personnes en surpoids mais pas chez les patients obèses.

Chez les diabétiques, l'utilisation de TZDs, activateurs de PPAR γ utilisés en clinique dans un contexte de diabète de type 2, permet d'induire la synthèse et la sécrétion d'adiponectine (Nawrocki et al., 2006). Les TZDs diminuent la résistance à l'insuline, augmentent le captage de glucose en périphérie et répriment l'expression de gènes pro-inflammatoires (Chinetti et al., 2000; Miles et al., 1997; Seufert et al., 2004). *In vitro*, l'activation de PPAR γ induit l'expression d'*UCPI* dans environ 10% des cellules adipocytaires obtenues par différenciation des PAs. Dans ces cellules l'expression d'*UCPI* mais aussi de *PGC-1 α* et de *CIDEA* augmente (Petrovic et al., 2010).

Le brunissage causé par les agonistes de PPAR γ n'est démontré que par des effets PPAR γ -dépendant. Cependant, l'utilisation de TZDs en clinique semble montrer une augmentation du brunissage mais aussi un gain de poids par l'augmentation de l'adipogenèse (Petrovic et al., 2010; Tang et al., 2013; Teruel et al., 2003). De plus, l'utilisation des TZDs entraîne des effets secondaires néfastes comme la rétention des fluides, l'ostéoporose et possiblement l'induction d'événements cardiovasculaires ont été observés (Tang et al., 2013).

Plusieurs miARNs sont impliqués dans l'inhibition de l'expression d'UCP1 : miR-9, miR338-3p, miR-34a, miR-155. L'utilisation d'anti-miARNs ou l'inactivation des miARNs induisent le brunissage du TA, augmentent la sensibilité à l'insuline et diminuent la glycémie (Chen et al., 2013b; Fu et al., 2014; Liu et al., 2013b; Zheng et al., 2014). MiARN-193b-365 induit l'augmentation de la taille du BAT par l'inhibition de facteurs de transcription pro-myogéniques ainsi que des répresseurs d'adipogenèse tels que RIP140. MiARN-133 régule PRDM16 en augmentant son expression ce qui permet de brunir le scWAT chez la souris (Sun et al., 2011b; Trajkovski et al., 2012).

In vitro et *in vivo*, le FGF21 augmente l'expression d'UCP1 et d'autres gènes reliés au BAT dans le WAT inguinal et périrénal. Ces effets sont médiés par PGC-1 α puisque les effets de FGF21 sont diminués dans les adipocytes provenant de souris déficientes pour cette protéine (Fisher et al., 2012). BMP7 régule la dépense énergétique ainsi que l'adipogenèse du BAT par la voie p38-MAPK en induisant UCP1 *via* PGC-1 α (Tseng et al., 2008). BMP8b, quant à lui, augmente l'activité thermogénique du BAT par l'interaction avec l'hypothalamus et la glande médullaire au niveau central du cerveau amenant à la stimulation du SNS (Whittle et al., 2012).

Chez la souris, l'inhibition du récepteur de clairance permet aux peptides natriurétiques de s'accumuler dans la circulation et d'amplifier leur signalisation par l'activation de PKG. Ceci amène à l'augmentation d'UCP1 et de PGC-1 α dans le BAT ainsi que dans le WAT épидidymal et

inguinal. Ces effets ne peuvent être observés dans des adipocytes différenciés que par l'activation de la voie p38-MAPK qui permet la liaison de PGC-1 α et ATF2 (Bordicchia et al., 2012). L'utilisation d'inhibiteurs d'endopeptidases pour empêcher la dégradation des peptides natriurétiques conduit à un gain de poids chez les souris (Becker et al., 2010).

Finalement, le brunissage du WAT est observé dans certains types de cancers. La première découverte fut dans les phéochromocytomes mais on découvre ce processus chez d'autres types de cancer comme le sein et le colon (Hu et al., 2018; Ricquier et al., 1982; Wang et al., 2014). Je parlerai du brunissage du TA par le cancer dans la section 4 – Tissu adipeux et cancer.

2.4.2 Conversion brun vers blanc : blanchiment

La majorité des études scientifiques s'est concentrée sur l'induction du brunissage du TA pour combattre l'obésité. Cependant, quelques phénomènes amènent à la perte de fonction ou de la masse du BAT. La baisse de thermorégulation peut amener à l'absence de contrôler le poids corporel, résultant en un gain de poids (Mansell et al., 1990). Plusieurs situations physiologiques peuvent amener au blanchiment des adipocytes bruns/brites.

Le vieillissement est associé avec l'altération du TA. Les PAs provenant de rats âgés perdent leur habilité de prolifération ainsi que de différenciation cellulaire (Caso et al., 2013; Karagiannides et al., 2001). Ces phénomènes ont également été observé chez l'homme (Sepe et al., 2011). Ces pertes sont liées à la sénescence des PAs tant *in vitro* qu'*in vivo*. Le vieillissement, autant chez l'homme que les rongeurs, entraîne la dysfonction de la fonction thermogénique du BAT et de la régulation de la température corporelle (McDonald et al., 1988; Norman et al., 1985). On constate chez les rongeurs âgés une atrophie du BAT et, en parallèle, une perte de l'expression d'UCP1. Ces effets peuvent résulter de la perte de la signalisation de la voie β -adrénergique qui agit sur la masse du BAT ainsi que sur l'expression de la protéine UCP1 (Cannon et Nedergaard,

2004; Langin et al., 1995; Scarpace et al., 1996). De la même manière, le vieillissement chez la souris amène à la perte du tonus adrénergique ainsi que la perte d'adipocytes bruns au niveau du scWAT (Rogers et al., 2012). On observe au niveau du BAT une diminution des adipocytes bruns qui sont remplacés par des adipocytes blancs (Symonds, 2013). Lors du vieillissement chez la souris, le niveau d'espèces réactives à l'oxygène (ROS : Reactive oxygen species) produites par les mitochondries augmente. Cette élévation amène à des dommages oxydatifs qui perturbent l'activité mitochondriale des adipocytes bruns (Weindruch et Sohal, 1997). Étant dysfonctionnels, les adipocytes ne peuvent plus stocker correctement les acides gras et une lipotoxicité s'installe chez l'organisme (Cartwright et al., 2007). Il fût démontré que la réduction calorique au niveau des muscles squelettiques et cardiaque diminue la quantité de radicaux libres. La première conséquence est l'augmentation de la fonction mitochondriale mais on note aussi un retard du vieillissement et une augmentation de l'espérance de vie (Hepple et al., 2006). Des approches génétiques pour éliminer la sénescence permettent d'induire la sensibilité à l'insuline d'améliorer la perte de TA obtenue suite au vieillissement (Baker, 2011; Minamino et al., 2009; Tchkonja et al., 2010). Chez la souris, l'activation de la sirtuine 1 (enzyme antivieillessement) augmente l'oxydation des lipides dans les muscles, le BAT et le foie permettant une protection contre la résistance à l'insuline et l'obésité pour donner suite à un régime HFD (Feige et al., 2008; Guarente, 2005).

En plus du vieillissement, l'obésité peut aussi induire la perte de la signature thermogénique des adipocytes. Chez des animaux obèses et vieux, l'expression d'UCP1 est diminuée comparativement aux animaux vieux et minces. (Ueno et al., 1998). La masse du BAT diminue avec l'augmentation de la masse corporelle (Cypess et al., 2009; van Marken Lichtenbelt et al., 2009; Virtanen et al., 2009). En plus, l'activité du BAT est tout aussi diminuée chez les patients obèses. Cependant, cette activité a été partiellement restaurée chez ces patients à la suite d'une chirurgie bariatrique résultant en une perte de poids (Betz et Enerbäck, 2015). Chez les patients

obèses, les niveaux plasmatiques de BMP4 sont plus élevés comparativement aux patients minces. Nous avons vu que BMP4 était important pour l'engagement de l'adipogenèse. Ici, nous voyons que BMP4 agit aussi sur le phénotype brun et le réduit. BMP4 réduit l'expression d'*UCP1* durant l'adipogenèse des adipocytes bruns (Tseng et al., 2008). BMP4 induit la différenciation des PAs blancs et bruns mais cela entraînent la perte du phénotype d'adipocyte brun. L'administration d'un adénovirus exprimant BMP4 fût directement injectée au niveau du BAT empêchant son expression exogène dans d'autres tissus comme le foie (Modica et al., 2016). Cependant, certaines études ont démontré le contraire, à savoir que l'expression de BMP4 induisait la formation d'adipocytes bruns. L'utilisation d'un modèle murin transgénique utilisant le promoteur *ap2* (protéine FABP4) pour surexprimer BMP4 augmente l'expression d'*UCP1* dans WAT inguinal permettant la dépense énergétique (Qian et al., 2013). Une autre étude a montré qu'un traitement avec BMP4 ou l'inactivation du gène de son inhibiteur, GREMLIN 1, induisent l'apparition d'adipocytes similaires aux adipocytes bruns (Gustafson et al., 2015). Or l'expression du promoteur *ap2* est fortement détectée dans les CE ce qui en fait un mauvais rapporteur pour une expression ciblée dans les adipocytes, engendrant un biais dans l'interprétation des résultats (Jeffery et al., 2014). De plus, les auteurs font l'hypothèse que la surexpression de BMP4 entraîne des effets indirects au niveau du système nerveux central, ce qui activerait le SNS et par la même occasion le brunissage du WAT (Giordano et al., 2016). Par ailleurs, la surexpression de BMP4 dans le foie entraîne le même phénotype métabolique que chez les souris transgéniques exprimant BMP4 sous le contrôle du promoteur *ap2*. La stimulation par le froid diminue fortement l'expression de BMP4 au niveau des adipocytes bruns. BMP4 a donc un rôle physiologique dans l'inhibition de la thermogénèse (Modica et al., 2016).

Il devient alors impératif de comprendre la régulation des voies de signalisation impliquées dans l'induction ou la perte des gènes thermogéniques menant à l'activation de la thermogénèse

dans les adipocytes bruns et bruns. En connaissant ces régulations, ceci permettrait de trouver de nouvelles cibles moléculaires pouvant induire la perte de poids ou d'empêcher une dépense énergétique trop élevée.

La figure 24 résume la conversion métabolique des adipocytes, autant pour le brunissage que le blanchiment.

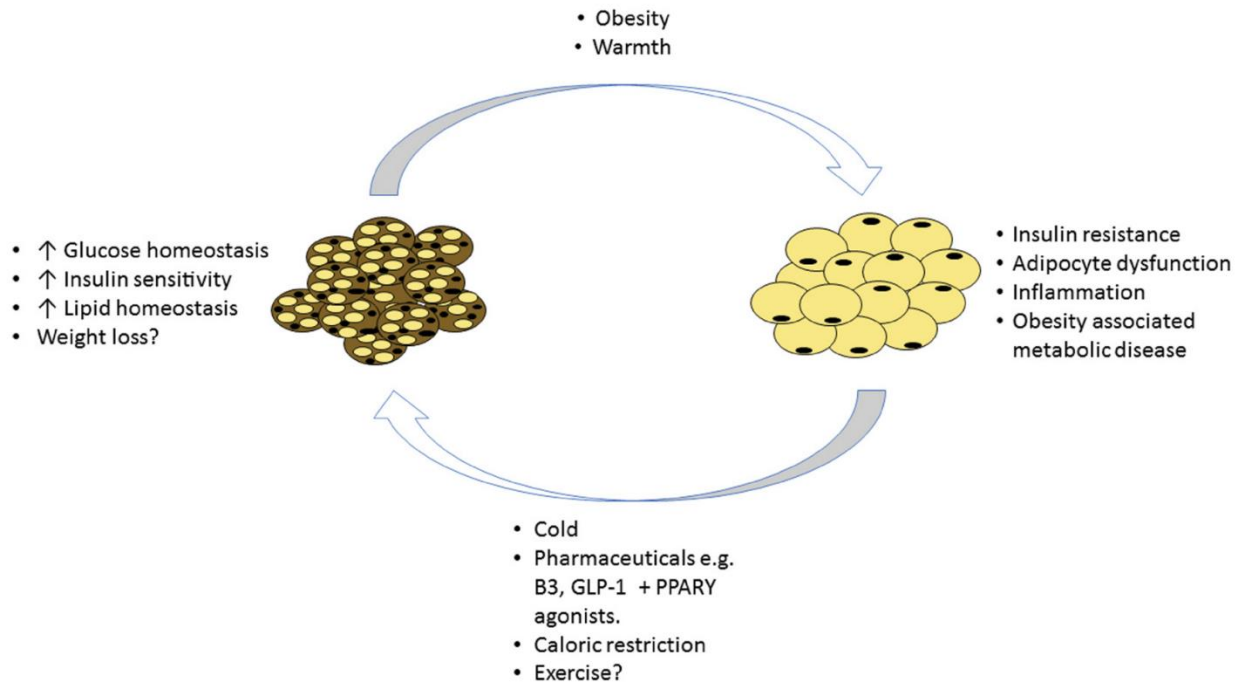


Figure 24 : Conversion métabolique des adipocytes. Le brunissage des adipocytes blancs conduit à un phénotype brun permettant d'obtenir une meilleure sensibilité à l'insuline, une perte de poids et une amélioration de l'homéostasie lipidique et glucidique. Le blanchiment des adipocytes bruns en blancs (incluant le vieillissement) s'accompagne de la résistance à l'insuline, de l'inflammation ainsi que des maladies métaboliques associées à l'obésité. Illustration adaptée d'Aldiss et *al.*, Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation, 2017.

3 Pathologies du tissu adipeux

Le TA est important pour l'homéostasie énergétique de l'organisme. Néanmoins, il existe certaines maladies qui entraînent des perturbations au niveau de sa taille et/ou bien de sa fonction. Deux principales perturbations seront l'obésité et les lipodystrophies. Les causes sont très différentes, mais les conséquences en seront presque identiques.

3.1 Obésité

Le TA a pour rôle d'incorporer les lipides lors de la lipogenèse ainsi que de les utiliser *via* la lipolyse lorsque l'organisme a besoin. Cependant, lorsque le corps humain augmente trop son apport calorique, le TA emmagasine beaucoup trop de lipides ce qui augmente sa masse. Une accumulation excessive mènera vers l'obésité.

3.1.1 Définition et prévalence

L'organisation mondiale de la santé (OMS) présente l'obésité comme étant une accumulation excessive de lipides entraînant des risques pour la santé. Le calcul de l'IMC permet de déterminer si l'individu a un poids santé ou bien s'il tend vers le surpoids ou pire encore, l'obésité. Par la variation de cet IMC, Quetelet fut le premier scientifique à estimer les risques de développer des complications cardiovasculaires ainsi que des maladies chroniques (Quetelet, 1994). Cet indice se calcule par le rapport du poids (en kg) divisé par le carré de la hauteur (en mètre) résultant d'une valeur en kg/m^2 . L'IMC correspondant à une corpulence normale se retrouve entre 18,5 et 25, une maigreur ou une dénutrition est observée si l'IMC est inférieur à 18,5. De 25 jusqu'à 30, la personne sera en surpoids et lorsque l'IMC devient supérieur à 30, l'individu est considéré comme étant obèse (Tableau 2). Cependant, l'IMC est approximatif puisqu'il ne prend pas en compte l'adiposité de la personne. Il est aussi à noter que les muscles pèsent plus que la graisse. Si on compare deux individus de même taille mais que l'un d'eux possède une masse musculaire plus élevée que l'autre, son IMC sera plus élevé mais celui-ci serait en meilleure santé. Afin d'obtenir un IMC prenant d'avantage en compte la «masse adipeuse d'un individu», les mesures du tour de taille et des hanches ainsi qu'une mesure du pourcentage de la masse grasseuse permet d'améliorer ce calcul.

Classification selon l'OMS

Résultat	Correspondance
< 16,5	Dénutrition ou famine
16,5 - 18,5	Maigreur
18,5 - 25	Corpulence normale
25 - 30	Surpoids
30 - 35	Obésité modérée
35 - 40	Obésité sévère
> 40	Obésité morbide ou massive

Tableau 2 : Les classifications de l'IMC selon l'organisation mondiale de la santé. En dessous de la corpulence normale, l'individu est en condition de maigreur ou de dénutrition. Au-dessus, on le retrouve en surpoids ou obésité. Données provenant de l'OMS 1995, 2000 et 2004.

Aujourd'hui, l'OMS estime qu'il y a plus de 1,7 milliards de personnes qui sont classées en surpoids et que 600 millions d'adultes sont considérés obèses (Haslam et James, 2005). Ces nombres représentent 39% et 13% de la population mondiale adulte sans compter les 41 millions d'enfants de moins de 5 ans en surpoids. Depuis 1980, la prévalence de l'obésité a doublé dans plus de 70 pays et il est estimé que la mort d'environ 4 millions de personnes serait due à un IMC très élevé (GBD 2015 Obesity Collaborators et al., 2017) (Figure 25).

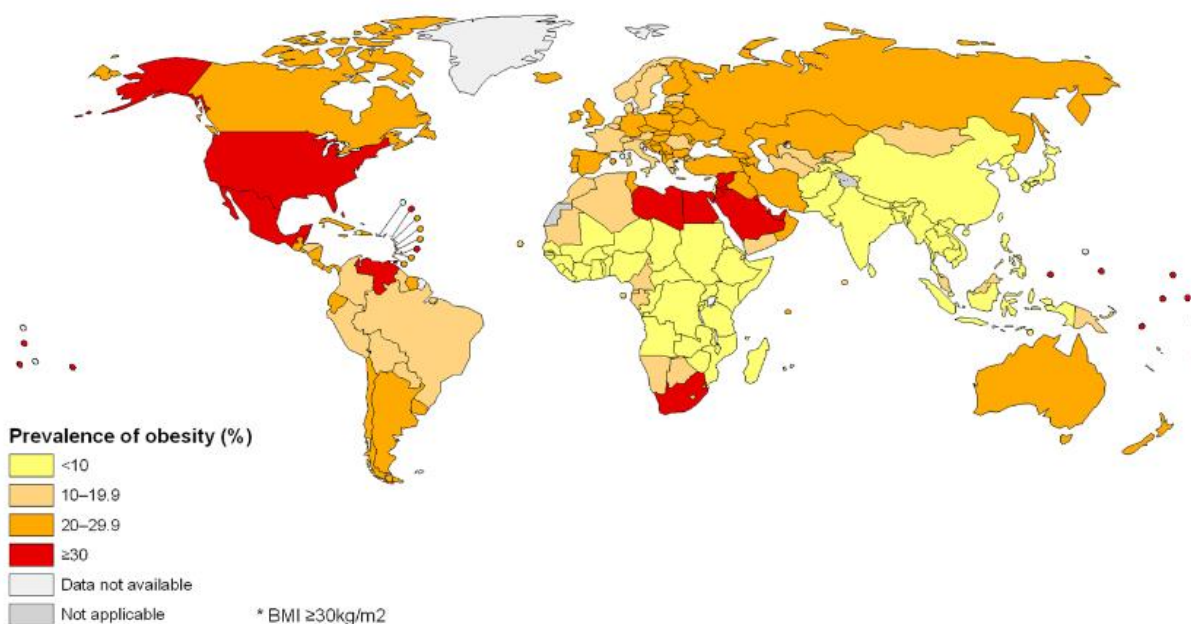


Figure 25 : Pourcentage de la prévalence de l'obésité dans le monde. Illustration provenant de l'OMS, 2014.

L'obésité est une pathologie complexe puisque plusieurs facteurs affectent son développement comme l'environnement, la société, la génétique ainsi que la physiologie de la personne (Heymsfield et Wadden, 2017). L'environnement maternel peut affecter le développement chez le fœtus : la sous-alimentation, l'obésité ainsi que le diabète chez la femme enceinte augmentent les risques que l'enfant développe une obésité précoce (Barker, 2004).

L'obésité résulte d'un déséquilibre énergétique en faveur d'une hausse de la quantité de calories consommées *versus* celles dépensées. Cette hausse provient habituellement de plusieurs causes :

- L'individu mange trop de nourriture et incorpore trop d'énergie. Dans la société actuelle, la présence de restaurants fastfood ainsi que la «malbouffe» dans les supermarchés amènent à une nourriture très riche en glucides et en lipides.
- L'individu ne dépense pas assez d'énergie. Notre société est devenue sédentaire principalement par l'automatisation des moyens de transport (par exemple, les personnes prennent plus l'escalator/les ascenseurs que les escaliers).
- La combinaison des deux augmente plus rapidement l'obésité.

3.1.2 Expansion du tissu adipeux pendant l'obésité

L'expansion du TA fut étudiée autant chez la souris que chez l'homme afin de déterminer les mécanismes impliqués dans cette pathologie. Cependant, la nutrition est excessive lors de l'utilisation de modèles murins comparativement aux études chez l'homme. Évidemment, la transposition des résultats entre l'homme et la souris doit s'effectuer avec attention. Lors de l'expansion du TA, on constate deux mécanismes distincts. Le premier est l'accumulation excessive de gras dans la gouttelette lipidique des adipocytes qui augmente la taille des adipocytes, phénomène que l'on appelle hypertrophie. Cette hypertrophie atteint un seuil limite critique lorsque

la taille de l'adipocyte est maximale. Lorsque le TA est hypertrophié, on constate un roulement accéléré de la formation de nouveaux adipocytes. Ce roulement est principalement causé par une diminution de l'espérance de vie des adipocytes *via* l'apoptose (Strissel et al., 2007). Ce processus amène la mort des adipocytes, puis la prolifération des PAs suivie d'une apparition de petits adipocytes (Krotkiewski et al., 1983; Maumus et al., 2008; Spalding et al., 2008). On parle d'hyperplasie du TA pour ce processus (Figure 26). Les modèles murins montrent une forte hyperplasie en réponse à un régime HFD. Néanmoins, l'hyperplasie chez l'homme reste encore en débat (Faust et al., 1978). Chez celui-ci, la surnutrition pendant plusieurs mois augmente la taille des adipocytes mais pas leur nombre (Salans et al., 1971). Tout dépend de la localisation du dépôt adipeux, soit il y a de l'hyperplasie ou bien de l'hypertrophie. Chez l'homme, les dépôts inférieurs sous-cutanés de l'organisme sont généralement hyperplasiques alors que le gras abdominal s'hypertrophie (Tchoukalova et al., 2010). Une perte de poids s'accompagne d'une diminution du volume du contenu des adipocytes néanmoins cela ne diminue pas le nombre total d'adipocytes (Björntorp et al., 1975; Kral et al., 1977). L'accroissement du TA s'accompagne aussi d'une accumulation des macrophages résultant d'une inflammation qui va entraîner plusieurs désordres métaboliques.

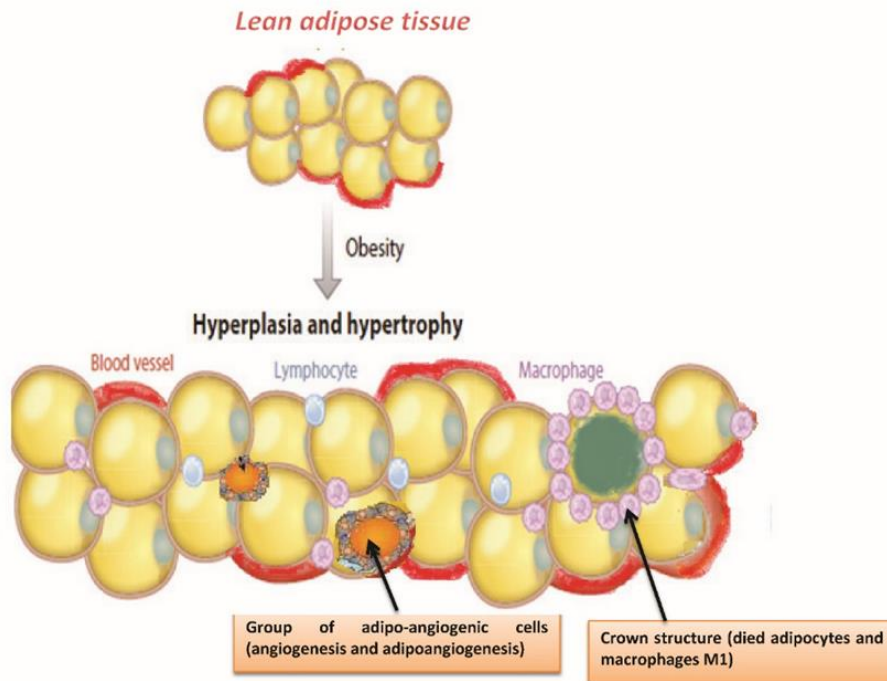


Figure 26 : Expansion de la masse adipocytaire. L'obésité augmente le volume de l'adipocyte par l'hypertrophie et augmente la quantité d'adipocytes par l'hyperplasie. Illustration d'après Divella et *al.*, Journal of Cancer, 2016.

3.1.3 Infiltration de macrophages, inflammation et hypoxie du tissu adipeux

Chez la souris soumise à un régime HFD, on note une augmentation de macrophages et d'autres cellules immunitaires dans le WAT (Lumeng et al., 2007b, 2007a; Weisberg et al., 2003). À 6 semaines, très peu de macrophages ont infiltré le WAT mais on observe que les adipocytes ont atteint leur taille maximale (Cummins et al., 2014) (Figure 27). L'hypertrophie constante du TA, principalement du vWAT, entraîne le recrutement de macrophages dit «malsains» puisque ceux-ci sécrètent des molécules pro-inflammatoires telles que le TNF α et l'IL-6. (Lumeng et al., 2007b, 2007a; Oh et al., 2012; Osborn et Olefsky, 2012). L'inflammation par les macrophages a lieu vers la dixième semaine d'alimentation sous régime HFD. Cela entraîne une mort cellulaire et les macrophages doivent éliminer les cellules mortes par phagocytose. L'élimination des adipocytes amène à la formation de structures ressemblant à une couronne (CLS : Crown-like structures). Les CLS induisent la réponse inflammatoire perturbant le bon fonctionnement des adipocytes à

proximité en empêchant le stockage des lipides et en promouvant la résistance à l'insuline (Glass et Olefsky, 2012; Guilherme et al., 2008; Wentworth et al., 2010). Une fibrose du TA peut aussi apparaître et entraîner une plus forte inflammation, exacerbant cette résistance à l'insuline (Halberg et al., 2009). Après 16 semaines sous régime HFD, on observe une forte «vague nécrotique» associée avec l'augmentation profonde des macrophages dans le TA (Nishimura et al., 2009; Spite et al., 2011). Chez l'homme on observe aussi une accumulation de macrophages pro-inflammatoires ainsi qu'une induction de l'inflammation et la formation de CLS après l'expansion du TA.

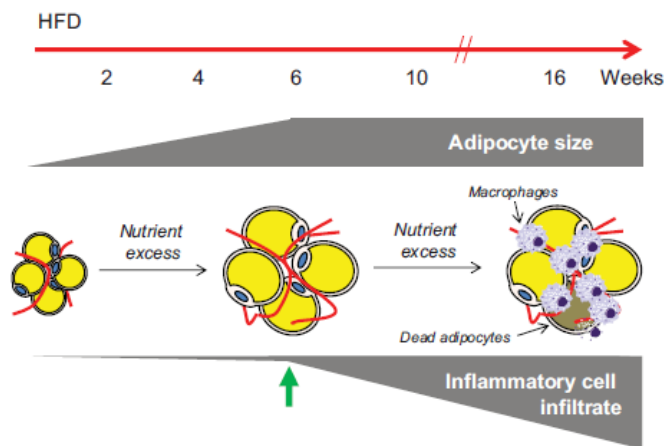


Figure 27 : Expansion et inflammation chez la souris sous régime riche en lipides. Les adipocytes atteignent leur taille maximale à 6 semaine. Cependant, l'inflammation ne débute que lorsque les adipocytes sont hypertrophiés. Illustration d'après Hill, Adipocyte, 2015.

Une élévation du TA entraîne la perte d'oxygénation de celui-ci et induit l'hypoxie du tissu. Chez la souris, la surexpression de HIF-1 α dans le TA entraîne des dysfonctions métaboliques tandis que sa délétion induit des effets opposés (Sun et al., 2013). Des niveaux élevés de HIF-1 α ont plusieurs conséquences comme la suppression de la β -oxydation, une diminution de l'adiponectine ainsi que l'induction de la fibrose et de l'inflammation (Halberg et al., 2009; Jiang et al., 2013; Krishnan et al., 2012). On a supposé que les adipocytes mourraient à cause d'une baisse du réseau vasculaire, en raison d'une grande taille des adipocytes, ce qui implique une diminution du flux sanguin (Sun et al., 2011a; Trayhurn, 2014). Ceci amenait au recrutement des macrophages puis au développement de l'inflammation comme mentionné précédemment (Sun et al., 2011a; Trayhurn et Wood, 2004; Xu et al., 2003) (Figure 28). Néanmoins dans le TA de patients

obèses, on constate l'absence d'hypoxie ainsi qu'une hausse de la tension en oxygène au niveau veineux du tissu sous-cutané abdominal à l'aide d'un cathéter (Goossens et al., 2011; Hodson, 2014; Hodson et al., 2013). Cependant, la consommation en oxygène de ce TA est plus faible comparativement aux patients minces (Hodson, 2014; Hodson et al., 2013; Yin et al., 2014). Cette baisse de consommation est probablement la résultante d'une diminution du contenu des protéines mitochondriales causée par le blanchiment en contexte d'obésité (Cummins et al., 2014; Strissel et al., 2007).

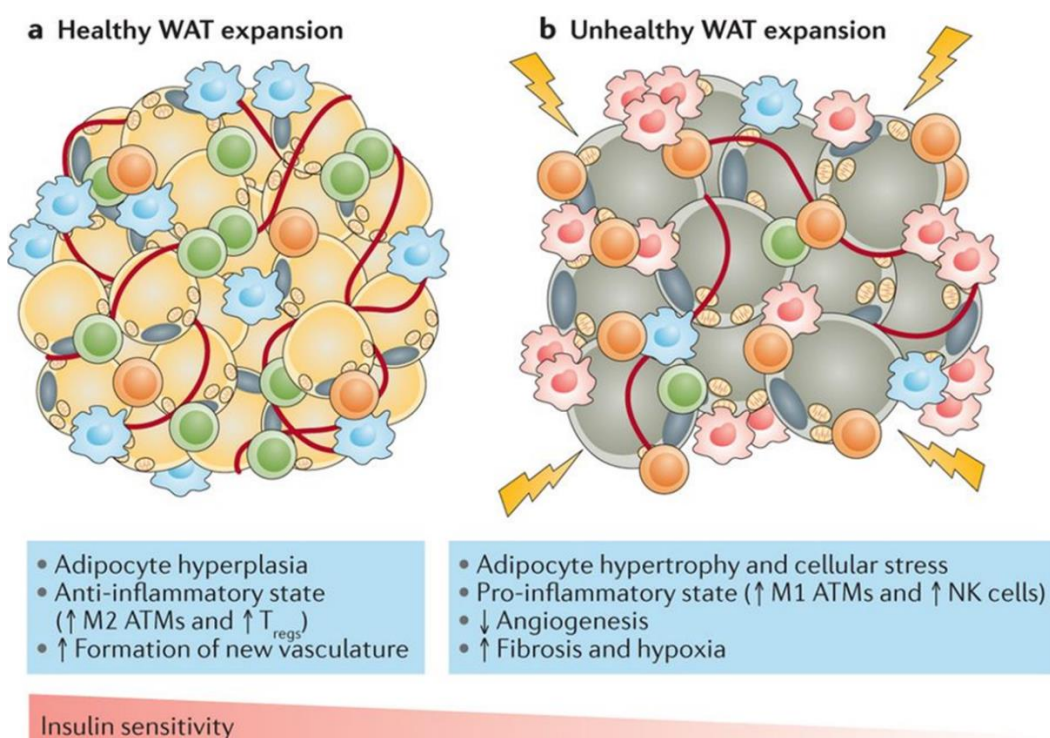


Figure 28 : Expansion du tissu adipeux sain et pathologique. A : L'expansion saine du tissu adipeux est caractérisée par un nombre plus élevé d'adipocytes mais de petites tailles, une irrigation vasculaire ainsi que la présence de plusieurs cellules anti-inflammatoires permettant une meilleure sensibilité à l'insuline. B : L'expansion pathologique est due à l'hypertrophie des adipocytes, une perte de vasculature, une hausse de cellules pro-inflammatoires ainsi que la présence de fibrose menant à une résistance à l'insuline. Illustration d'après Kusminski et al., Nature Reviews Drug Discovery, 2016.

3.1.4 Effets des macrophages, de l'inflammation et de l'hypoxie sur les adipocytes et leurs précurseurs

Les macrophages provenant des dépôts adipeux de patients obèses sécrètent des facteurs, tels que l'IL-1 β et le TNF α , inhibant toute différenciation mais en induisant la prolifération des PAs (Lacasa et al., 2007; Mohan et al., 2001). Comme cela a été décrit précédemment dans la partie auto-renouvellement, les macrophages en culture sécrètent de l'activine A ce qui induit la prolifération des PAs (Zaragosi et al., 2010). Cette signalisation de l'activine A est fortement induite dans un contexte d'obésité chez la souris *ob/ob* puisque les niveaux d'ARNm de son récepteur (*ActRII*) sont 50 à 100 fois plus élevés que chez les souris sauvages (Allen et al., 2008). En plus, des souris invalidées pour *ALK7* montrent une baisse de l'accumulation de gras et ne deviennent pas obèses quand elles sont sous un régime HFD (Andersson et al., 2008; Shen et al., 2009). Le potentiel de prolifération *in vitro* des PAs est corrélé avec les dépôts hyperplasiques chez la souris sous régime HFD (Joe et al., 2009; Macotella et al., 2012). De plus, chez les patients obèses, la population de PAs possède un taux de prolifération accrue et un potentiel de différenciation diminué (Isakson et al., 2009; Maumus et al., 2008; Permana et al., 2004). Des cellules souches isolées du TA de patients obèses montrent des modifications de leur profil transcriptomique. Ces modifications amènent à une perte de leur caractère souche et elles s'engagent vers la lignée adipocytaire (Oñate et al., 2013).

Notre laboratoire a récemment montré les effets du microenvironnement obèse sur la prolifération des PAs. Cette étude a pu établir qu'un milieu conditionné par des macrophages prélevés chez des patients obèses augmente l'expression d'*IER3*, protéine impliquée dans l'auto-renouvellement des PAs. L'hypoxie seule augmente l'expression d'*IER3*. La délétion d'*IER3* par siRNA entraîne la perte de la signalisation de la voie ERK1/2 ainsi que de la prolifération. La délétion d'*IER3* inhibe la phosphorylation de SMAD2, ce qui entraîne la différenciation

adipocytaire. L'expression d'*IER3* est augmentée chez les patients possédant un IMC supérieur à 30 comparativement aux patients minces ou en surpoids. Ces résultats ont permis de montrer l'importance d'*IER3* dans la prolifération des PAs dans un contexte d'obésité (Ravaud et al., 2015) (Figure 29). L'obésité induit des effets délétères à l'organisme par l'induction de la prolifération des PAs par l'hypoxie d'un côté et par la sécrétion d'activine A par les macrophages de l'autre.

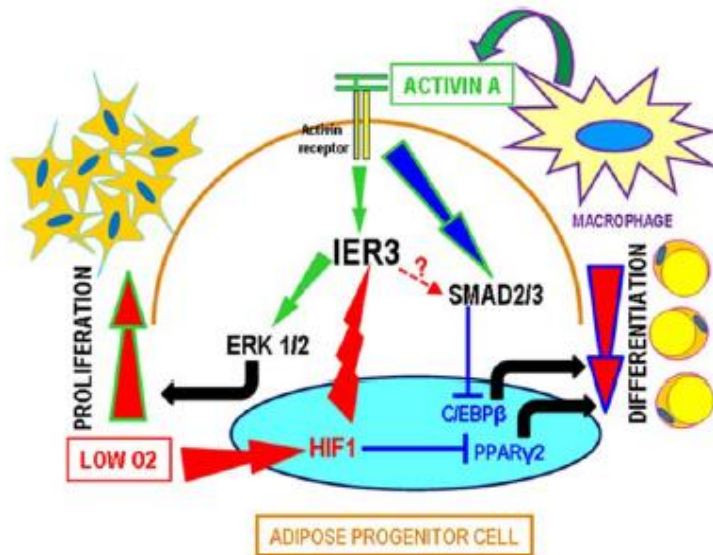


Figure 29 : Auto-renouvellement des progéniteurs adipeux en contexte d'obésité. L'activine A provenant des macrophages ainsi que la faible oxygénation du tissu augmentent l'expression d'*IER3*, cela entraîne l'augmentation de la prolifération cellulaire ainsi que la baisse de la différenciation adipocytaire. Illustration d'après Ravaud et *al.*, Stem Cell, 2015.

3.1.5 Morbidités reliées à l'obésité

L'obésité induit l'expansion du TA mais il existe des variations selon le sexe. Chez la femme, l'augmentation de la masse adipeuse va plutôt s'effectuer au niveau sous-cutané et donnera l'apparence d'une «poire». Cette expansion diminue les risques de développer certaines morbidités reliées à l'obésité (Snijder et al., 2003a, 2003b). Cependant chez l'homme, le stockage du gras se fait au niveau viscéral et donne la forme d'une «pomme» augmentant les risque de complications qui seront brièvement expliquées (Grauer et al., 1984).

a) Résistance à l'insuline et diabète de type 2

L'obésité est un fort prédicteur de la résistance à l'insuline retrouvée dans le diabète de type 2. Le TA obèse sécrète plusieurs composés perturbant la sensibilité à l'insuline. Il libère MCP-1 qui recrute les macrophages qui, à leur tour, vont sécréter du TNF α et l'IL-6. Ces deux molécules sont connues pour induire l'inflammation et inhiber l'action de l'insuline (Wellen et Hotamisligil, 2005). L'inflammation va réduire les capacités de stockage des AGL par le TA qui sont impliqués dans la résistance à l'insuline (Boden, 1997). Les AGL augmentent la formation de certains métabolites d'acides tels que le DAG/acyl-Coa/céramides qui vont activer des protéines telles que les PKC et la sous-unité régulatrice p85 α pouvant inhiber la signalisation de l'insuline (Bergeron et al., 2011; Dadke et al., 2000; Draznin, 2006). De plus, l'élévation de la leptine et de la résistine ainsi que de la baisse de l'expression d'adiponectine dans le TA favorise également la perte de sensibilité à l'insuline. Toutes ces perturbations du TA et la résistance à l'insuline systémique qui en résulte affectent différents organes tels que les muscles et le foie (Figure 30).

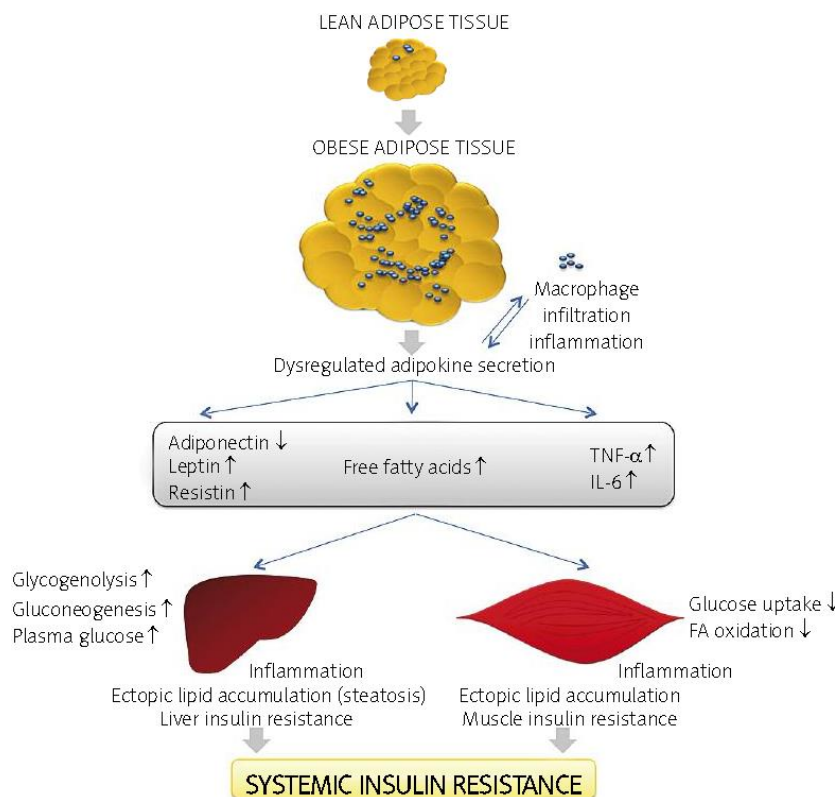


Figure 30 : Développement systémique de la résistance à l'insuline. L'expansion du tissu adipeux chez les obèses ainsi que le recrutement de macrophages induit la sécrétion de molécules inhibitrices de la sensibilité à l'insuline. Leurs effets perturbent les fonctions métaboliques de divers organes comme les muscles et le foie. Illustration d'après Coelho et al., Archives of Medical Science (AMS), 2013.

Afin de compenser cette perte de sensibilité, les cellules β du pancréas doivent sécréter une grande quantité d'insuline, processus que l'on appelle hyperinsulinémie. Avec le temps, cette surproduction induit un épuisement des cellules β ce qui entraîne une augmentation progressive de la glycémie et le développement du diabète de type 2 (Poitout et Robertson, 2008; Reaven, 1988).

b) Dyslipidémies

L'obésité s'accompagne d'une production accrue de TG, AGL et des VLDL/LDL (Low Density Lipoprotein) qui sont libérés dans la circulation entraînant une dyslipidémie au niveau du foie (Wang et Peng, 2011). Cette dyslipidémie résulte aussi par la baisse des HDL (high density lipoprotein) considérés comme étant le « bon cholestérol ». On constate une hausse des VLDL engendrant une hypertriglycéridémie qui empêche la dégradation de l'apolipoprotéine B au niveau du foie. L'insulino-résistance diminue l'activité de la LPL, et donc la clairance de LDL/VLDL (Després et al., 1990; Pouliot et al., 1991). La perturbation de la fonction endocrinienne du TA par l'obésité amplifie les effets mentionnés. Le TNF α , amplifié par l'inflammation du TA, diminue aussi la LPL et augmente la production de TG tandis que la perte d'adiponectine empêche la clairance des LDL/VLDL (Feingold et Grunfeld, 1987; Qiao et al., 2008).

c) Maladies cardiovasculaires

Les dyslipidémies causées par l'obésité augmentent considérablement la quantité de lipides dans la circulation sanguine, ce qui a des répercussions au niveau des vaisseaux sanguins. Il est bien connu que l'athérosclérose est causée par l'augmentation des LDL circulants qui sont captés par des protéoglycanes à la surface des CE (Morawietz et al., 1999). Par la suite, l'oxydation des LDL augmente l'inflammation et la perméabilité des ces cellules (Davies et al., 1988; Glass et Witztum, 2001). Ce qui permet aux LDL d'entrer dans la paroi des vaisseaux où ils seront

phagocytés par les macrophages pour former la plaque athéromateuse (Lewis et Rader, 2005). Lorsque la plaque est trop grande, il peut y avoir rupture et formation d'un caillot. Selon l'endroit où se logera le caillot, on assistera à un accident vasculaire cérébral, un infarctus du myocarde ou un blocage de la circulation des membres inférieurs (Naghavi et al., 2003). L'hyperglycémie associée au diabète favorise la formation de l'athérosclérose plus rapidement (Bucala et al., 1994; Hadi et Suwaidi, 2007; Triñanes et al., 2012). L'hypertension est causée par l'augmentation de la rigidité des vaisseaux sanguins, car le cœur doit fournir un effort plus intense et avec le temps une insuffisance cardiaque peut se développer. L'obésité et l'insulino-résistance sont des facteurs fortement impliqués dans le développement de ces deux complications (Huang et al., 1998b; Kenchaiah et al., 2002).

On observe aussi une association entre l'obésité et certains types de cancers (rein, thyroïde, utérus, colon et sein) (Adams et al., 2009; Renehan et al., 2008; Sjöström et al., 2009). La section 4.2 abordera plus en détails les interactions entre TA et cancer, principalement celui du sein. Un résumé des morbidités est représenté à la figure 31 ci-dessous.

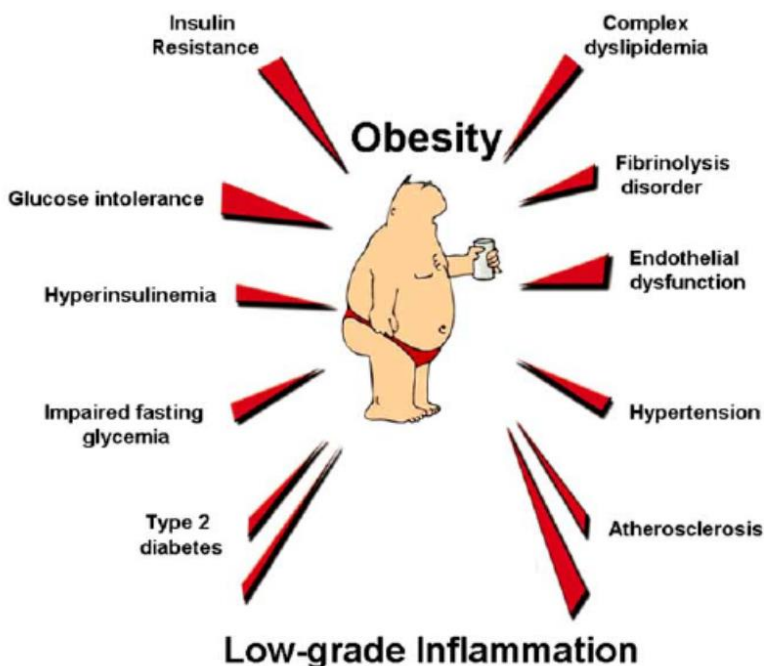


Figure 31 : Pathologies reliées à l'obésité. Illustration d'après Cani et al., Current pharmaceutical design, 2009.

3.2 Lipodystrophie et désordre métabolique

L'expansion du TA lors d'un contexte d'obésité entraîne des complications métaboliques tels que la résistance à l'insuline et les dyslipidémies. Cependant, les lipodystrophies peuvent induire des désordres métaboliques équivalents ou même plus sévères que l'obésité. Les lipodystrophies sont habituellement caractérisées comme étant une perte du TA (lipoatrophie) mais il existe certaines conditions où on observe une augmentation de certains dépôts (lipohypertrophie).

Il existe deux types de lipodystrophies : celles qui sont génétiques et celles qui sont acquises. Les lipodystrophies génétiques sont dues à la perte de la différenciation adipocytaire ou du fonctionnement des adipocytes. Les lipodystrophies acquises proviennent de perturbations du TA soit par une réaction du système immunitaire soit par des effets secondaires indésirables à des traitements médicamenteux.

3.2.1 Lipodystrophie génétique

Le nombre de personnes atteintes de lipodystrophie génétique serait de l'ordre de 1000 et la prévalence serait inférieure à 1 pour 1 million. Ces lipodystrophies sont classées en 2 catégories : les lipodystrophies congénitales généralisées et les lipodystrophies partielles familiales.

a) Lipodystrophies congénitales généralisées (LCG)

Les LCG sont dues à des mutations de nature autosomale récessive et furent découvertes par Berardinelli et Seip chez des familles consanguines (Berardinelli, 1954; Seip, 1959). Les deux principaux gènes mutés sont *AGPAT2* et *BSCL2* (Garg et al., 1999; Magré et al., 2001). *AGPAT2* est fortement exprimé dans le TA et synthétise l'acide phosphatidique qui deviendra du triglycéride au cours de la lipogénèse (Agarwal et Garg, 2003). *BSCL2*, aussi connu sous le nom de séipine, joue un rôle dans la formation des gouttelettes lipidiques et pourrait être impliqué dans la

différenciation adipocytaire (Payne et al., 2008; Szymanski et al., 2007). D'autres mutations affectent CAV-1 dont la fonction est de transloquer les AG vers les gouttelettes lipidiques ainsi que PTRF, impliquée dans la biogénèse de Cav-1 (Garg et Agarwal, 2008; Hayashi et al., 2009). BSCL2 est la mutation la plus sévère résultant de la perte totale de TA, autant celui qui a des propriétés «mécaniques» que celui qui est métaboliquement actif (Simha et Garg, 2003). Les autres mutations entraînent la perte du TA métabolique mais pas celui dit «mécanique» (Kim et al., 2008; Shastry et al., 2010; Simha et Garg, 2003).

b) Lipodystrophies partielles familiales (LPF)

Les LPF sont des mutations de nature autosomale dominante. La première mutation identifiée pour le syndrome de Dunnigan est le gène *LMNA* entraînant la perte des lamines A/C. Cette délétion perturbe l'enveloppe nucléaire des adipocytes et induit la mort de ces cellules (Caron et al., 2007). Une autre mutation est la perte de *PPAR γ* , régulateur majeur de la différenciation adipocytaire (Agarwal et Garg, 2002; Hegele et al., 2002). D'autres mutations affectent la signalisation de l'insuline (*AKT2*) ou bien la formation de gouttelettes lipidiques (*CIDEA* ou *PLIN1*) (Gandotra et al., 2011; George et al., 2004; Rubio-Cabezas et al., 2009). Chez ces patients, la distribution des dépôts adipeux est normale durant l'enfance. Cependant à l'adolescence, on remarque la perte des dépôts au niveau des membres. Le visage, le cou et les régions intra-abdominales sont épargnés tandis qu'il y a accumulation de gras dans les régions non lipodystrophiques (Garg et al., 1999). Le diabète et les complications métaboliques apparaîtront chez l'adulte et les femmes seront plus affectées que les hommes (Garg, 2000). Un résumé de ses mutations est représenté dans la figure 32.

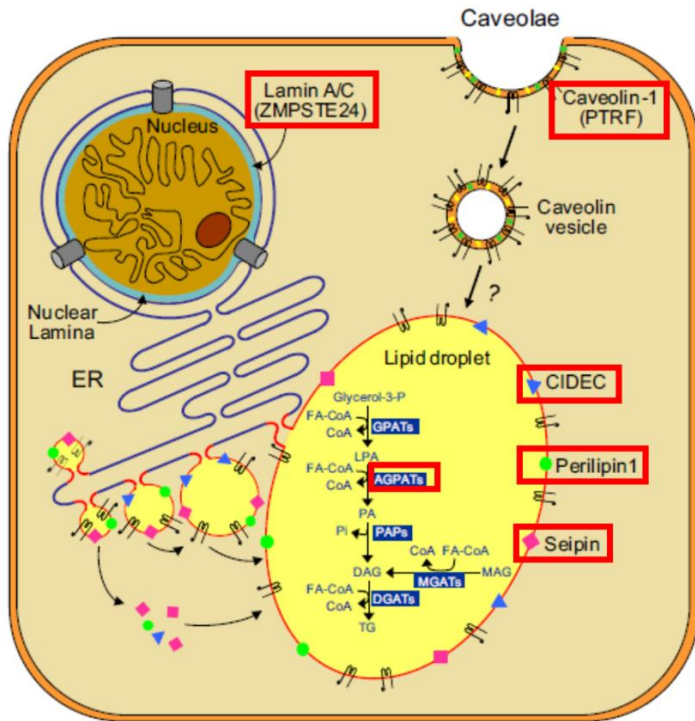


Figure 32 : Représentation des diverses mutations dans les lipodystrophies congénitales. Dans les encadrés en rouge, les mutations qui sont majoritairement reliées aux gouttelettes lipidiques. Certaines sont impliquées dans la formation des triglycérides et la stabilité de l'enveloppe nucléaire. Illustration adaptée de Garg, Journal of clinical endocrinology and Metabolism, 2011.

3.2.2 Lipodystrophie acquise

Ces lipodystrophies, contrairement aux génétiques, n'apparaissent pas dès la naissance mais se développent au cours du temps. Elles débutent pendant l'enfance ou à l'âge adulte et ne sont pas causées par des gènes mutés. Deux syndromes existent : le syndrome de Lawrence et de Barraquer-Simons qui représentent qu'une centaine de cas. Cependant, l'utilisation de la thérapie anti-rétrovirale contre le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) HAART (Highly-active antiretroviral therapy) représente la plus grande source de lipodystrophies acquises. Je m'attarderai principalement sur la thérapie HAART puisque mon projet de recherche ne se base ni sur la génétique des lipodystrophies ni sur les syndromes acquis.

a) Syndrome de Lawrence et syndrome de Barraquer-Simons

Le syndrome de Lawrence est une lipodystrophie généralisée qui conduit à la perte de scWAT habituellement durant l'enfance. Le syndrome de Barraquer-Simons apparaît vers l'âge de 15 ans. À ce moment, le syndrome entraîne la perte du TA au niveau du visage et descend graduellement en affectant le cou, puis les membres supérieurs et enfin le tronc. Néanmoins, les jambes et le bas de l'abdomen restent intactes. Pour compenser cette perte, les personnes accumulent la graisse au niveau des jambes et des hanches empêchant toute apparition de complications métaboliques (Misra et al., 2004). Le mécanisme d'action entraînant la diminution du TA n'est pas connu et les complications liées à ce syndrome sont la stéatose hépatique, la fibrose hépatique ainsi que le diabète et l'hypertriglycéridémie (Misra et Garg, 2003).

b) Lipodystrophies induites par la thérapie HAART

Après l'obésité, cette lipodystrophie est la deuxième maladie mondiale affectant le TA. Cela fait environ 20 ans qu'une lipodystrophie fut observée chez des patients recevant une combinaison médicaments pour lutter contre la propagation du VIH (Carr et al., 1998). Cette lipodystrophie est présente chez 40-70% des patients et apparaît habituellement après deux ans de traitement. Au départ, les effets étaient principalement reliés aux inhibiteurs de la protéase du VIH (IPs) (Mallewa et al., 2008; Nagy et al., 2003). Les patients perdent graduellement le scWAT au niveau des bras, des jambes et du visage ce qui induit à une apparence émaciée. Cependant, on observe une hypertrophie majoritairement au niveau abdominal et au niveau dorso-cervical résultant en une «bosse de bison». Plus la thérapie HAART dure longtemps, plus la perte ou le gain des différents dépôts s'aggrave et l'arrêt de la médication contrecarre partiellement ou pas du tout les effets observés, en fonction des dépôts. Plusieurs de ces patients développent une hypertriglycéridémie mais très peu manifestent un diabète (Chen et al., 2002). Cette lipodystrophie

augmente la prédisposition des patients de développer une insuffisance coronarienne (Grinspoon et Carr, 2005).

Avant de d'écrire les perturbations observées au niveau du TA, la réplication du VIH ainsi que les mécanismes d'action des molécules utilisées dans la thérapie HAART seront abordés.

3.3 Le VIH et SIDA

Le VIH est la cause de l'une des maladies infectieuses les plus désastreuses dans l'histoire de l'homme puisqu'elle a causé la mort de 35 millions de personnes dans le monde depuis son apparition et donc 36,7 millions de personnes sont atteintes. Deux souches de VIH existent : VIH-1 et VIH-2. La première est celle la plus répandue dans le monde tandis que la seconde est localisée en Afrique. Par le biais de plusieurs approches statistiques, des chercheurs ont émis plusieurs hypothèses concernant l'origine du virus, dont celle décrite dans paragraphe suivant.

a) Origine du VIH

Ce virus provient d'une souche présente chez les chimpanzés nommé virus de l'immunodéficience simienne. Il possède une forte similitude avec le VIH (Keele et al., 2006). On suppose que la transmission de ce virus à l'homme est intervenue par le contact avec du sang à la suite d'une domestication des singes ou au cours d'une chasse. La propagation du VIH s'est faite principalement par l'usage de seringues souillées par les toxicomanes, les relations sexuelles non protégées notamment *via* la prostitution (Pépin, 2012). Le temps de latence du virus est de plusieurs années, il faudra attendre plusieurs années avant l'apparition du SIDA (Syndrome de l'immunodéficience acquise). On remarquera alors un faible taux de lymphocytes T et B chez des patients décédés. L'étude sur les rétrovirus est en plein essor à cette époque et en 1983 l'équipe de Luc Montagnier fut capable d'isoler le virus du VIH. Deux ans après, le séquençage du VIH est

effectué (Wain-Hobson et al., 1985). En 1986, les premiers traitements sont utilisés afin de bloquer la formation de nouvelles particules virales avec la Zidovudine qui permet d'allonger la durée de vie des patients mais induit des effets secondaires. Il faut attendre dix ans avant d'utiliser la trithérapie, combinaison de trois médicaments bloquant la réplication du virus et permettant ainsi la restauration du système immunitaire (Gulick et al., 1997; Hammer et al., 1997). Cependant, l'utilisation de la trithérapie amène aussi au développement de plusieurs effets secondaires. Au fil des années, la recherche entraînera la production de composés tout aussi efficaces contre le virus mais en ayant moins d'effets secondaires. Seulement, ce n'est pas toutes les personnes infectées qui peuvent obtenir le traitement de pointe contre le VIH. Même si la thérapie permet d'empêcher le virus de se répliquer, aucun moyen existe pour éradiquer cette infection à fort impact à l'échelle mondiale.

b) Organisation génomique et physique du VIH

Afin de cibler spécifiquement le VIH, le séquençage de son génome fut effectué en 1985. Le VIH fait partie de la famille des rétrovirus, c'est-à-dire, qu'il possède un ARN simple brin positif et de haut poids moléculaire à partir duquel cet ARN simple brin va se transcrire en ADN double brin et s'intégrer dans le génome de la cellule hôte. La transcriptase inverse est l'enzyme qui va former le double brin d'ADN à partir de l'ARN.

Afin de pouvoir se répliquer, le virus a besoin de trois gènes primordiaux : *gag*, *pol* et *env* pour group-antigène, polymérase et enveloppe respectivement. Il existe aussi des gènes de régulations essentiels comme Tat et Rev ainsi que des gènes dit auxiliaires : Vif, Vpr, Vpu et Nef. (Wong-Staal, 1991). Chaque gène primordial donne plusieurs peptides après transcription et maturation. Après clivage enzymatique, les protéines suivantes seront produites:

- Protéine Gag : MA (Matrice-p17), CA (Capside-p24), NC (Nucléocapside-p7) et p6

- Protéine Pol : PR (Protéase-p11), RT (Reverse Transcriptase : Transcriptase Inverse-p66) et IN (Intégrase-p32)
- Protéine Env : SU (Glycoprotéine de surface : gp120) et TM (Protéine transmembranaire : gp41)

Les protéines provenant des précurseurs Env et Gag sont impliquées respectivement dans la formation de la membrane virale et de la nucléocapside tandis que les protéines de Pol permettent de former l'ADN double brin à partir de l'ARN simple brin ainsi que l'insertion du double brin dans le génome de la cellule hôte (Figure 33).

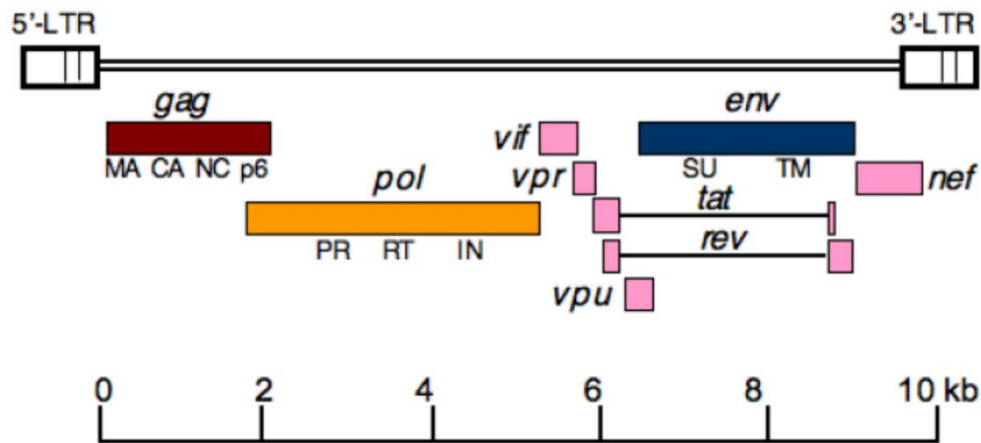


Figure 33 : Représentation du génome du VIH. Les gènes *gag* (rouge), *pol* (orange) et *env* (bleu) ainsi que les gènes régulateurs et auxiliaires (roses). Illustration d'après Waheeb et O. Freed, Viruses 2010.

Les particules virales du VIH possèdent un diamètre de 100nm et sont composées de 72 complexes glycoprotéines intégrés dans la membrane lipidique. Chaque complexe est muni d'un trimère de la glycoprotéine gp120 à l'extérieur combiné avec la protéine transmembranaire gp41. L'interaction entre ces deux protéines est d'origine non covalente et on peut alors mesurer l'expression de gp120 dans le sang pour détecter le VIH chez les patients infectés. Immédiatement ancrée dans la membrane lipidique se retrouve la matrice-p17 entourant la capsid-p24 qui

renferme les deux brins d'ARN du VIH. Les ARNs forment un complexe avec la nucléocapside-p7 ainsi que la transcriptase inverse-p66. Le virus possède les trois enzymes essentielles à sa réplication : la transcriptase inverse, l'intégrase-p32 et la protéase-p11. L'ensemble physique du virus est présenté à la figure 34.

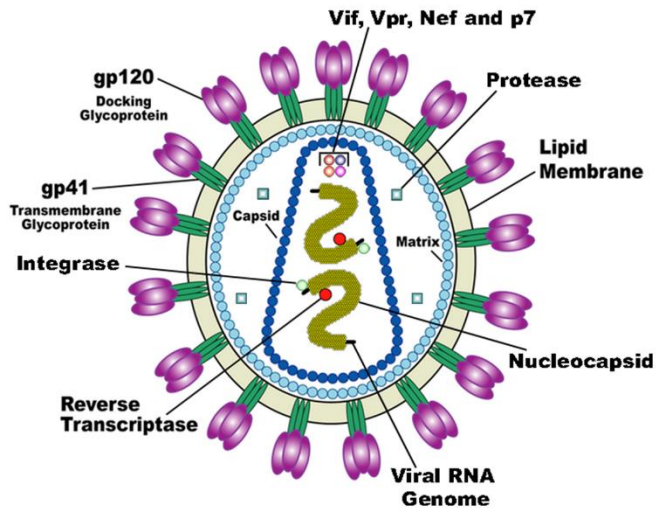


Figure 34 : Représentation structurelle de la particule virale du VIH. Illustration adaptée du US National Institute of Health.

c) Réplication du virus

Afin de pouvoir se répliquer, le virus doit en premier lieu s'incorporer dans une cellule hôte. Il utilise le récepteur CD4 retrouvé dans plusieurs cellules du système immunitaire (lymphocytes T, cellules T régulatrices, macrophages, monocytes, cellules dendritiques) (Dalglish et al., 1984). Les glycoprotéines gp120 à l'extérieur de la particule virale interagissent avec le récepteur CD4 puis utilisent un co-récepteur, soit CCR5 ou CXCR4, afin d'effectuer la fusion du virus et de la cellule (Deng et al., 1996; Feng et al., 1996). À l'intérieur de la cellule, la capsule est relarguée dans le cytoplasme et dégradée afin de libérer les brins d'ARNs et les enzymes virales.

L'ARN, par le biais de la transcriptase inverse, se convertit en ADN double brin. L'ADN va ainsi pouvoir pénétrer les pores nucléaires pour atteindre le noyau. L'intégrase permettra l'insertion de l'ADN dans le génome de la cellule, principalement dans des régions activement transcrites. Si l'intégration échoue, l'ADN devient circulaire et ne se réplique pas.

Dans le génome, le brin d'ADN du VIH pourra être transcrit permettant d'obtenir l'ARNm et l'ARN viral. Ce dernier sortira de la cellule tandis que l'ARNm sera traduit en protéines pour donner : le précurseur Gag seul possédant principalement les protéines de la matrice et capsid, un précurseur polyprotéique GagPol composé des précurseurs Gag et Pol pour les enzymes virales. La partie non clivée de Gag favorise le recrutement des glycoprotéines Env afin de former les virions (Ono, 2009). La protéine p6 formera la fission de la membrane lipidique afin de créer un bourgeonnement et incorporer tous les éléments du virus ainsi que le contenu protéique de la cellule hôte (Votteler et Sundquist, 2013). Après que le virion soit libéré, la protéase du VIH encodée dans GagPol clivera le précurseur Gag seul pour donner toutes les composantes de la matrice et de l'enveloppe permettant ainsi la maturation du virion (Freed, 2015). Le virion mature transfectera une autre cellule ou la même pour continuer la propagation. Les différentes étapes de réplication du VIH ainsi que les cibles des inhibiteurs pharmaceutiques sont décrites à la figure 35.

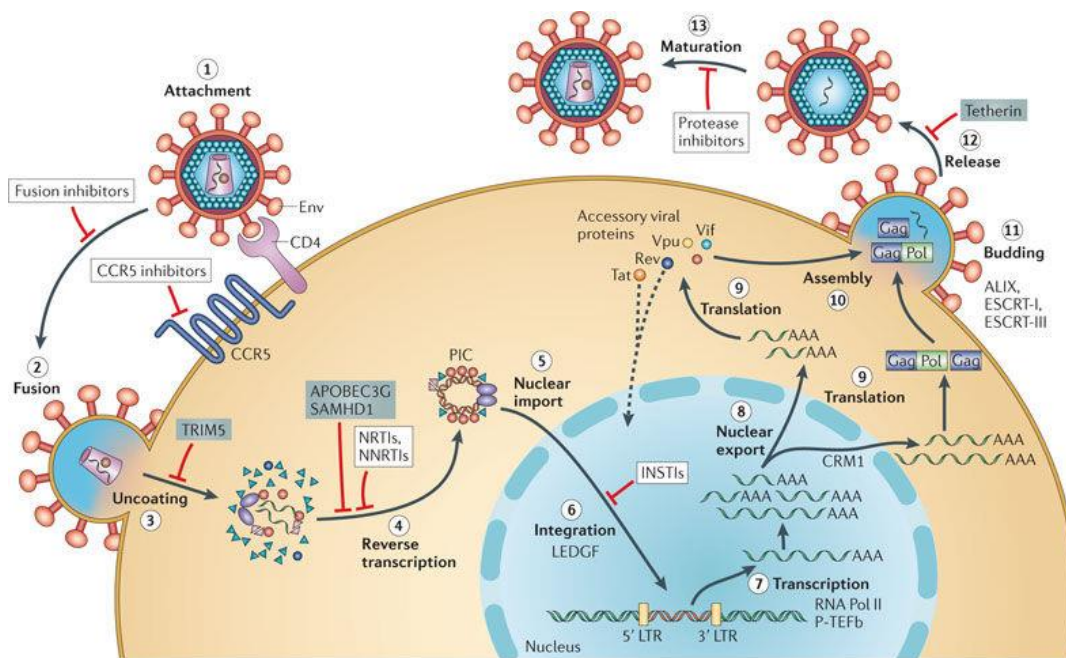


Figure 35 : Cycle de réplication du VIH. Différentes étapes de la réplication du VIH. Les inhibiteurs pharmaceutiques ciblant diverses protéines sont encadrés en blanc. Illustration d'après Musumeci et *al.*, Molecules 2015.

3.3.1 Traitement contre le VIH

Afin d'empêcher la réplication du virus, des molécules capables d'inhiber la transcriptase inverse ou la protéase du VIH ont été développés. Le premier traitement approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) fut la zidovudine. Ce composé fait partie de la famille des inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse du VIH (INTI). Par la suite, plusieurs autres NRTI ainsi que des inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse du VIH (INNTI) furent créés afin de combattre l'infection. Ces derniers sont activés plus rapidement lorsqu'ils arrivent dans la circulation sanguine comparativement aux INTI. Certains composés créés auront pour cible la protéase du VIH. Contrairement aux INTI/INNTI, les IPs ciblent l'étape de la maturation du virion et non l'étape de conversion du brin d'ARN en double brin d'ADN. Les IPs n'inhiberont pas l'infection du virus comparativement aux INTI/INNTI.

Néanmoins, la thérapie antivirale de 1986 à 1995 sera seulement en monothérapie, donc avec un seul composé. Cependant pour un même traitement, on constate beaucoup de variations entre les différents patients. On remarque qu'après des millions de cycles de réplication du virus, certaines mutations aléatoires apparaissaient et permettaient au virus de développer une résistance envers les médicaments. Pire encore, la résistance à une classe de médicaments a des effets croisés avec les autres médicaments de cette même classe. C'est alors qu'on décida de passer d'une monothérapie à une trithérapie par l'utilisation de molécules ciblant plusieurs étapes clés du cycle viral. Par exemple, une résistance face aux IPs ne permettra plus l'inhibition de la maturation du virion mais les INTI/INNTI pourront quand même inhiber la transcriptase inverse. Cette thérapie fut appelée HAART puisqu'elle est hautement active comparativement à la monothérapie.

Environ une trentaine de composés inhibent le cycle de réplication et sont répartis selon l'étape de la réplication ainsi que leur mécanisme d'action. Un ensemble présentant toutes ces molécules et leurs cibles est représenté en figure 36.

NRTIs

- Abacavir (ABC)
- Didanosine (ddI)
- Emtricitabine (FTC)
- Lamivudine (3TC)
- Stavudine (d4T)
- Tenofovir (TDF)
- Zidovudine (AZT, ZDV)

NNRTIs

- Delavirdine (DLV)
- Efavirenz (EFV)
- Etravirine (ETR)
- Nevirapine (NVP)
- Rilpivirine (RPV)

Protease inhibitors (PIs)

- Atazanavir (ATV)
- Darunavir (DRV)
- Fosamprenavir (FPV)
- Indinavir (IDV)
- Lopinavir (LPV)
- Nelfinavir (NFV)
- Ritonavir (RTV)
- Saquinavir (SQV)
- Tipranavir (TPV)

Integrase Inhibitors

- Raltegravir (RAL)
- Elvitegravir (EVG)
- Dolutegravir (DTG)

Fusion Inhibitor

- Enfuvirtide (ENF, T-20)

CCR5 Inhibitor

- Maraviroc (MVC)

PK Enhancer

- Cobicistat (COBI)

Figure 36 : Présentation des différentes cibles des inhibiteurs du cycle de réplication du VIH. Illustration d'après NEJM Journal Watch, 2015.

Ainsi la thérapie HAART permet, d'une part, de diminuer la quantité de virus dans le sang et d'autre part d'augmenter le nombre de cellules immunitaires exprimant CD4. Ces effets améliorent la réponse immunitaire face aux infections (Erb et al., 2000). Depuis le début de la thérapie HAART en 1996, le système immunitaire reste fonctionnel chez les patients infectés et la charge virale diminue avec la durée du traitement. La courbe de mortalité qui était à la hausse avant la thérapie baisse chez les patients ayant accès à la médication. ONUSIDA a pour objectif qu'en 2020, 90% des patients atteints du VIH soient diagnostiqués, 90% d'entre eux soient sous thérapie HAART et que pour les 90% sous thérapie, aucune charge virale ne sera détectée : c'est la règle du 90-90-90. Toutefois pour l'instant, on ne guérit pas du SIDA, le patient doit toujours être sous médication sinon la charge virale remonte en cas de prise discontinuée du traitement.

Mon projet de recherche porte en partie sur l'effet des inhibiteurs de la protéase du VIH. Je vais donc décrire leurs mécanismes d'action ainsi que ceux des autres types d'inhibiteurs.

a) INTI/INNTI

La cible de ces inhibiteurs est l'étape où le brin d'ARN simple brin viral sera converti en ADN double brin. Si cette étape est inhibée, l'incorporation dans le génome de la cellule hôte ne sera pas possible (Schmit et Weber, 1997). Néanmoins, ces inhibiteurs n'ont aucun effet sur les

cellules déjà infectées puisqu'elles ont déjà intégré l'ADN double brin. Selon le type d'inhibiteur, la cible sera différente entre ces deux classes. Les NRTI, ressemblant à des nucléosides triphosphates, s'incorporent au cours de la RT dans l'ADN viral. Ils agissent comme terminateurs de la transcription puisque, ne possédant pas d'extrémité 3'-OH, ceux-ci empêchent toute incorporation des nucléosides suivant. Les NRTI les plus connus sont Zidovudine et Stavudine. Les NNRTI, quant à eux, ne se fixent pas sur le brin d'ADN viral mais interagissent avec le site catalytique de la RT afin d'inhiber sa fonction enzymatique. L'Efavirenz et la Nevirapine font partie des NNRTI les plus connus.

b) Inhibiteur de l'intégrase

Les inhibiteurs de l'intégrase empêchent le transfert de l'ADN double brin dans le génome de la cellule infectée. Les inhibiteurs bloquent le site catalytique de l'enzyme et inactivent le complexe enzyme-ADN en démantelant l'extrémité 3'-OH de l'ADN viral (Hare et al., 2010). Habituellement, le Dolutegravir ou l'Elvitegravir sont utilisés chez les patients devenus résistants aux autres médicaments.

c) Inhibiteur de fusion du virus

Il existe différents inhibiteurs de fusion n'agissant pas sur les mêmes cibles. Par exemple, le maraviroc se fixe sur le corécepteur CCR5 ce qui provoque un changement conformationnel et empêche toute interaction avec le VIH. Ainsi, le VIH ne peut pas entrer dans la cellule (Dorr et al., 2005). Cependant, cela n'empêchera pas le virus d'utiliser CXCR4 comme autre corécepteur. D'autres inhibiteurs comme l'Enfuvirtide interagissent avec les protéines gp120 ou bien gp41 interdisant l'interaction avec le récepteur CD4.

d) Inhibiteur de protéase du VIH (IP)

La structure complète de la protéase du VIH fut établie 6 ans avant l'approbation clinique des IP ce qui a permis d'optimiser ces molécules (Lapatto et al., 1989). La protéase est primordiale pour la maturation du virion lors de l'infection. Cette enzyme est un homodimère et son mécanisme d'action implique les acides aspartiques situés en position 25 du monomère long de 99 acides aminés (Figure 37). Il s'agit donc d'un aspartyl protéase qui clive les protéines Gag et Gag-Pol sur 9 différents sites afin de donner les protéines impliquées dans la réplication du virus. Pour obtenir les enzymes du précurseur Pol, la protéase doit séparer en premier Gag et Pol afin de cliver Pol pour donner la protéase, la transcriptase inverse et l'intégrase. Le site actif de l'enzyme possède deux rabats flexibles permettant de ne pas laisser l'enzyme entièrement exposée. Les IPs iront directement bloquer le site actif au niveau des deux aspartates (Lv et al., 2015).

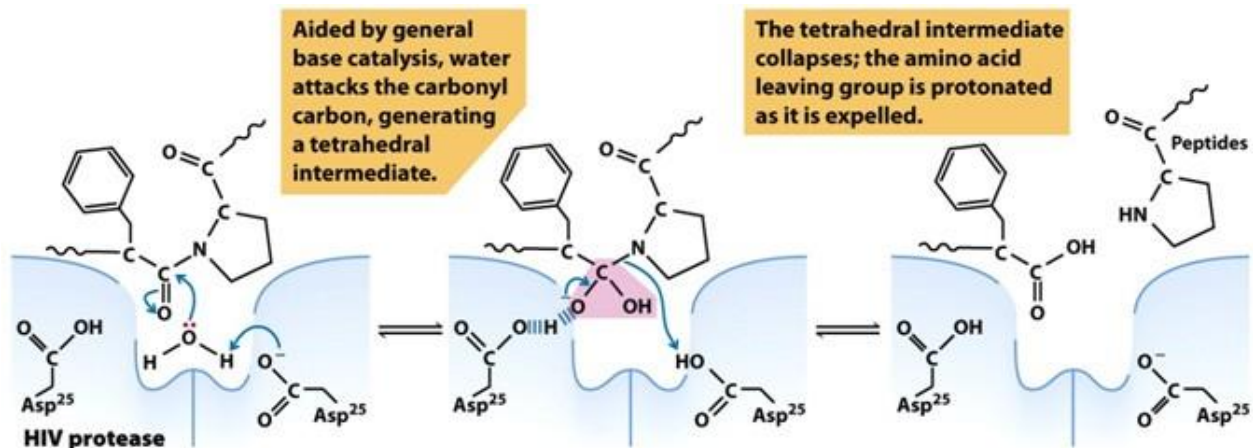


Figure 37 : Mécanisme catalytique de la protéase du VIH. La protéase du VIH nécessite une molécule d'eau pour induire le clivage des protéines par les deux aspartates en position 25 de chaque monomère. Illustration d'après Freeman et al., Lehninger Principles of biochemistry, 2008.

Les neuf liaisons peptidiques, permettant le clivage par la protéase, possèdent une séquence homologique. Cependant, la cristallographie de la protéase du VIH avec six de ses substrats montre un volume identique, impliquant que ce n'est pas la structure primaire mais bien la forme protéique du substrat qui prédit la fonctionnalité clé de l'enzyme (Prabu-Jeyabalan et al., 2002). De nos jours,

toutes ces analyses ont permis d'obtenir 10 inhibiteurs approuvés par la FDA contre la protéase virale (Figure 38). Par leur caractère hydrophobe, ces inhibiteurs peuvent facilement traverser la membrane lipidique des cellules afin d'inhiber la protéase du VIH dans les cellules. Cependant, ce caractère induit une accumulation de ces inhibiteurs au niveau des gouttelettes lipidiques retrouvées dans les adipocytes, ce qui peut altérer les fonctions de ceux-ci (Vernochet et al., 2005; Vigouroux et al., 1999). On observe que l'utilisation de ces inhibiteurs entraîne à long terme plusieurs effets secondaires. En effet, il existe plusieurs enzymes dans les cellules eucaryotes possédant une aspartyl protéase similaire à celle du VIH comme les rénines, cathepsines et les pepsines. Néanmoins, l'affinité de ces inhibiteurs pour la protéase du VIH est plus élevée comparativement aux protéases de la cellule hôte (Sham et al., 1998). Ces effets ne sont donc pas reliés à l'inhibition des protéases de la cellule. Il est donc primordial de découvrir les cibles de ces inhibiteurs qui provoquent des dyslipidémies, la résistance à l'insuline ainsi que l'apparition d'événements cardiovasculaires chez les patients utilisant la thérapie HAART (Bozzette et al., 2003). La partie qui suit discutera des effets secondaires causés par la thérapie HAART.

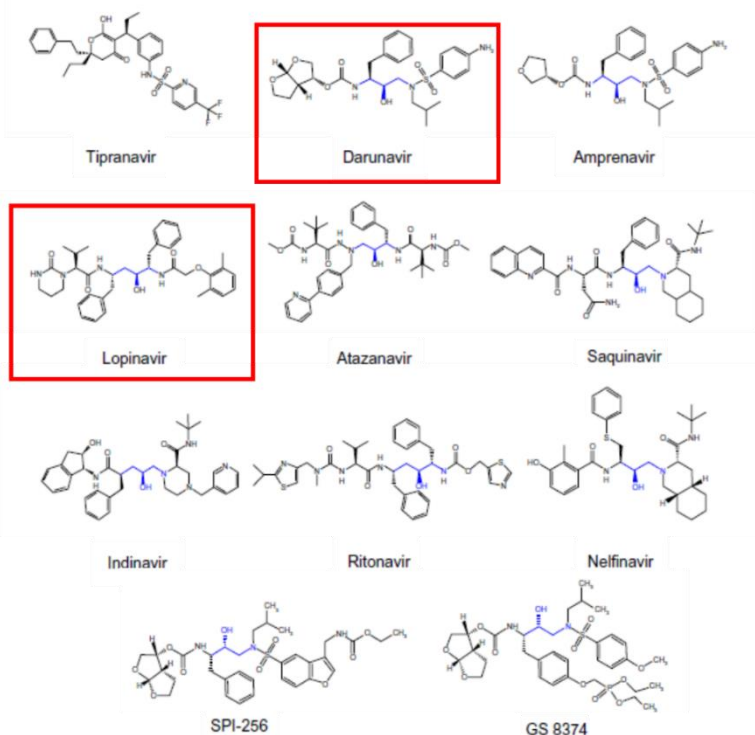


Figure 38 : Structure chimique des différents inhibiteurs de la protéase du VIH. La majorité d'entre eux possède un groupement OH (en bleu) visant le site actif de la protéase. Le Lopinavir et Darunavir encadrés en rouge sont les IP utilisés au cours de ma thèse. Illustration d'après Lv et al., HIV/AIDS, 2015.

3.3.2 Effets de la thérapie HAART sur le TA

La thérapie HAART a permis de diminuer considérablement la progression du virus ainsi que le taux de mortalité chez les personnes contaminées. Néanmoins, cette thérapie entraîne plusieurs lipodystrophies et engendre une multitude de complications métaboliques associées. Ces complications surviennent pour donner suite à la perte du scWAT ainsi qu'au gain du vWAT. Le remodelage des différents TA s'accompagne d'une production de cytokines pro-inflammatoires telles le TNF α et l'IL-6 ainsi que MCP-1, un chémoattractant capable d'augmenter l'infiltration des macrophages, principalement dans le vWAT (Rydén et Arner, 2007; Sevastianova et al., 2008). On constate aussi une augmentation de la lipolyse associée à la lipoatrophie qui accroît les acides gras libres circulants et provoque l'apparition d'une lipotoxicité (Hadigan et al., 2002). De plus, les niveaux plasmatiques de leptine et d'adiponectine sont diminués par la thérapie HAART (Addy et al., 2003; Nagy et al., 2003; Tong et al., 2003). La thérapie HAART augmente l'expression de PAI-1 menant à des risques de formation de caillot (He et al., 2005). Toutes ces perturbations vont favoriser le développement des complications métaboliques telles que la résistance à l'insuline qui évoluera en diabète, des dyslipidémies qui s'accompagnent d'hypertriglycéridémie, de maladies cardiovasculaires (Addy et al., 2003; Ceddia, 2005; Leow et al., 2003; Mynarcik et al., 2002; Villarroya et al., 2010). Ces complications métaboliques sont identiques à celles de l'obésité. Cependant, si l'obésité entraîne une forte hausse de masse adipeuse, les lipoatrophies, quant à elles, la diminuent (Figure 39).

Les lipodystrophies humaines ne peuvent pas être à l'identique avec des modèles murins. Les expériences avec des INTI avaient peu d'effets sur le TA ou bien les IPs diminuaient la masse du scWAT mais l'expression plasmatique des métabolites et adipokines ne correspondait pas aux changements observés chez les patients lipodystrophiques (Deveaud et al., 2005; Gaou et al., 2001).

La thérapie HAART entraîne des lipodystrophies mais l'altération des différents dépôts n'a pas les mêmes effets. Il est donc important de connaître les effets secondaires de deux groupes principaux de molécules dans la thérapie HAART : les INTI/INNTI ainsi que les IPs.

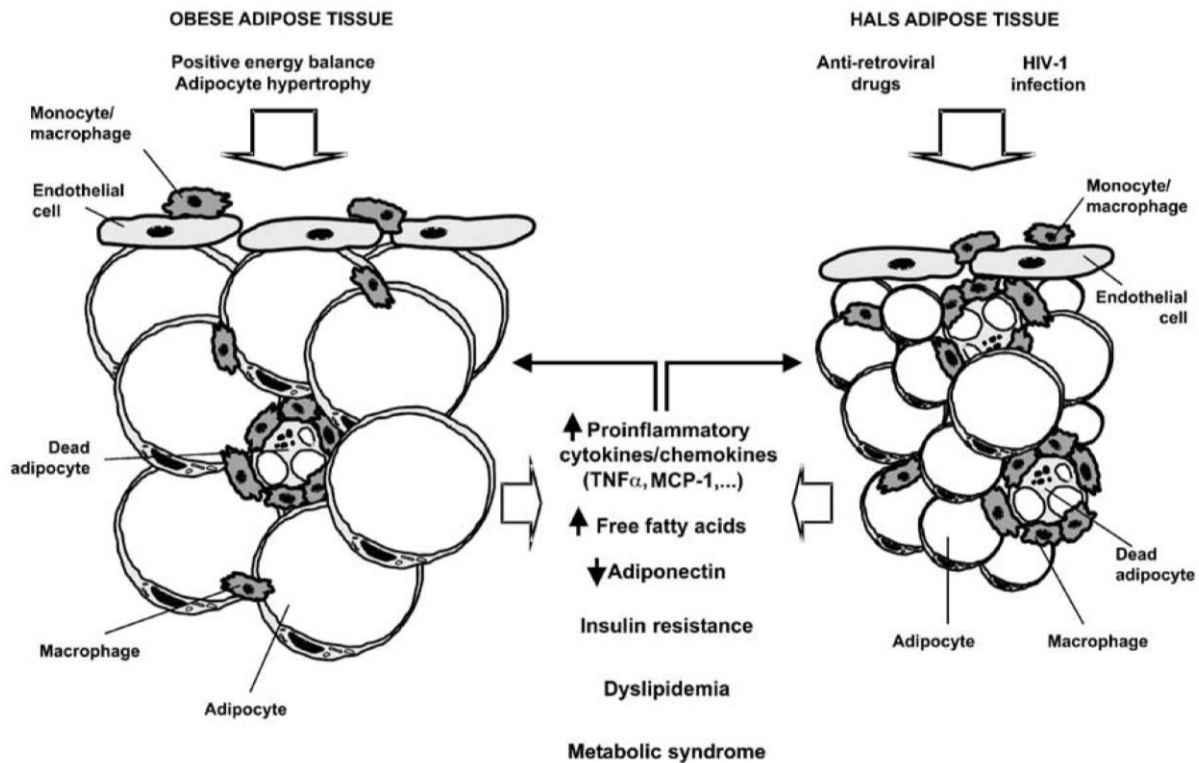


Figure 39 : Comparaison des effets entraînés par l'obésité et les lipodystrophies par la thérapie HAART. L'obésité augmente la masse du tissu adipeux (gauche) tandis que la thérapie HAART diminue cette masse (droite). Néanmoins, les complications métaboliques dues à l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires des acides gras libres et de la perte de l'adiponectine sont similaires. Illustration d'après Villaroya et al., International Journal of Obesity, 2007.

a) Effets des INTI/INNTI

Les INTI peuvent inhiber la différenciation adipocytaire et induire le stress oxydatif dans les cellules. Ce stress amène à la perte de production d'adipokines telles que l'adiponectine et la leptine tandis qu'elle augmente des cytokines pro-inflammatoires comme MCP-1 et IL-6 (Caron et al., 2008; Lagathu et al., 2007). Néanmoins, l'effet le plus délétère pour la cellule est l'induction de la toxicité mitochondriale. Ces molécules inhibent l'enzyme polymérase- γ qui est impliquée dans la réplication de l'ADN mitochondrial (ADNmt). Suite à la perte d'activité de cette enzyme,

on constate une diminution de l'ADNmt et aussi une modification de la morphologie des mitochondries (Divi et al., 2007; Maagaard et Kvale, 2009). Ces changements induisent à la baisse de la production d'énergie par la chaîne respiratoire et l'apoptose des cellules (Ben-Romano et al., 2006; McComsey et al., 2005). Néanmoins, l'interruption du traitement avec les INTI/INNTI améliore l'expression de l'ADNmt (Kim et al., 2007).

Il a aussi été observé que l'utilisation d'un INTI entraîne de la toxicité mitochondriale au niveau de la «bosse de bison» et induit l'expression d'UCP1 dans ce tissu seulement. Ces effets sont probablement dus à des INTI comme la stavudine qui imite des rétinoïdes pour induire l'expression d'UCP1 (Rodríguez de la Concepción et al., 2005; Urso et Gentile, 2001). Il est connu que les INTI inhibent la différenciation adipocytaire blanche et brune sur des PAs provenant de souris (Viengchareun et al., 2007). Cependant, aucune étude n'a été effectuée, à ma connaissance, sur la différenciation adipocytaire brune humaine.

b) Effets des inhibiteurs de protéases

- Différenciation adipocytaire

L'accumulation des inhibiteurs de la protéase du VIH dans le TA amène au développement d'une lipodystrophie chez l'homme accompagnée de résistance à l'insuline (Djedaini et al., 2009; Vernochet et al., 2005). *In vitro*, les IPs entraînent la perte de la différenciation cellulaire de plusieurs façons. Les IPs diminuent l'expression de gènes clés impliqués dans la différenciation tels que PPAR γ , CEBP α et SREBP-1c (Bastard et al., 2002; Pacenti et al., 2006). Les effets délétères sont reversés dans des cellules surexprimant CEBP α alors que l'utilisation de TZDs pour activer PPAR γ les atténue (Jones et al., 2005). En plus, certains IPs augmentent l'expression de Pref-1, inhibiteur de la différenciation autant en culture que chez les patients lipodystrophiques (Giralt et al., 2006; Mondal et al., 2001).

Au niveau de la fonction des adipocytes, les IPs induisent la diminution de SREBP-1c qui est fortement impliqué dans ce processus (Bastard et al., 2002; Giralt et al., 2006). Les IPs séquestrent le précurseur inactif de SREBP à la membrane nucléaire et empêche SREBP actif d'aller au noyau (Caron et al., 2001). En plus, la perte d'activation par SREBP diminue l'expression de l'adiponectine (Rahmouni et Sigmund, 2008).

- Résistance à l'insuline

Plusieurs effets indésirables de IPs amènent à l'induction de la résistance à l'insuline. Certains IPs altèrent la signalisation de l'insuline par le blocage du transporteur du glucose. GLUT4 est retrouvé dans des muscles et des adipocytes et les IPs se fixent sur le transporteur empêchant l'entrée du glucose dans les cellules (Murata et al., 2002). Notre laboratoire a démontré que le Lopinavir empêche la phosphorylation d'IRS-1 (Insulin receptor substrate 1) par l'insuline dans les cellules humaines et par conséquent, la signalisation en aval ne s'effectue pas. Ceci inhibe l'entrée du glucose dans les adipocytes (Djedaini et al., 2009). En plus d'inhiber la signalisation à l'insuline, les IPs induisent des ROS. Les ROS vont alors induire l'expression du TNF α et de l'IL-6 (Furukawa et al., 2004; Lagathu et al., 2007). On constate aussi une baisse de l'expression de la leptine et de l'adiponectine ainsi qu'un recrutement des macrophages qui vont favoriser l'inflammation dans le TA. Tous ses effets auront pour conséquence d'accélérer le développement de la résistance à l'insuline qui favorisera le diabète et les dyslipidémies (Lagathu et al., 2007; Mallewa et al., 2008).

- Inhibition du protéasome

Le protéasome est un régulateur de plusieurs de signalisations et n'est pas seulement un complexe de dégradation protéique. L'interaction directe entre sa sous-unité protéasomale 20s

et les IPs peut diminuer son activité (André et al., 1998) et conduire à plusieurs complications métaboliques. La dégradation de l'apolipoprotéine B est arrêtée, ce qui augmente le niveau plasmatique des lipides et induit une dyslipidémie (Liang et al., 2001). Les IPs peuvent aussi déréguler la voie de NF- κ B et favoriser l'apoptose cellulaire. Dans ce contexte, des IPs comme le nelfinavir, le ritonavir et le saquinavir entraînent l'inhibition de PKB et l'induction de l'apoptose cellulaire. Il a été démontré que l'atazanavir à faible dose induit l'autophagie des cellules tandis que l'apoptose est observée pour des doses plus fortes (He et al., 2005). De plus les IPs induisent un stress au niveau du réticulum endoplasmique. Ce stress active l'UPR (Unfolded protein response) qui induit l'augmentation de l'expression de la protéine Bip résultant de la phosphorylation d'eIF2 qui aggrave la résistance à l'insuline. Cette phosphorylation diminue la synthèse de protéine dans le réticulum et empêche aussi l'accumulation de protéines non repliées (Djedaini et al., 2009). La figure 40 résume les mécanismes des IPs dans les adipocytes.

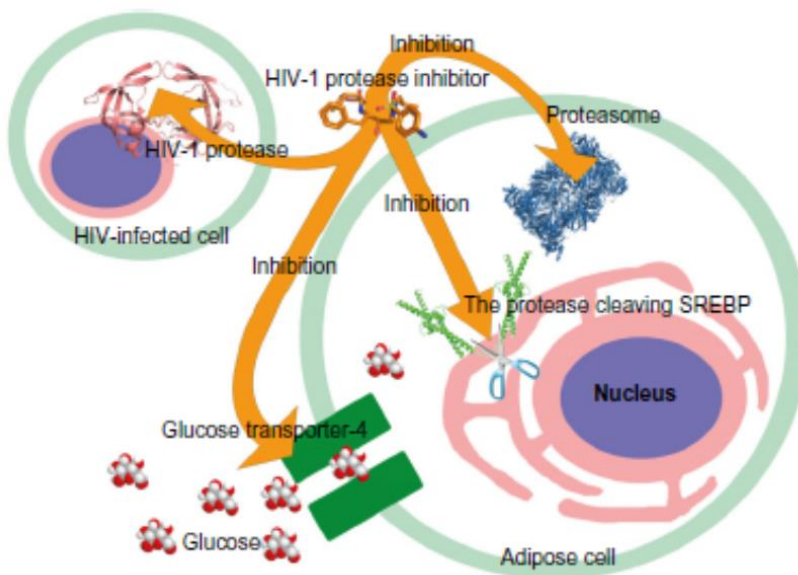


Figure 40 : Effets secondaires des IP dans les adipocytes. Les IPs entraînent l'inhibition du protéasome, de l'entrée du glucose par le transporteur GLUT4 ainsi que le clivage de SREBP dans le réticulum endoplasmique. Illustration d'après Lv et al., HIV/AIDS, 2015.

De nombreuses études ont analysé les effets des IPs sur la différenciation adipocytaire blanche, mais très peu d'entre elles ont abordé la différenciation brune ou bien l'auto-renouvellement des PAs puisque l'on observe des lipoatrophies ou lipodystrophies dépendamment

de la localisation de ces dépôts adipeux. Fait intéressant, la thérapie HAART entraîne un vieillissement prématuré affectant plusieurs tissus. Leur effets sur la dysfonction mitochondriale, le stress oxydatif et l'accumulation toxique de prélamine-A. A noter que ces processus sont observés dans des cellules en sénescence (Caron et al., 2007, 2008; Caron-Debarle et al., 2010).

Au cours de ma thèse, j'ai étudié l'effet des IPs principalement le Lopinavir (LPV) et le darunavir (DRV) sur la différenciation adipocytaire brune et sur l'auto-renouvellement des PA

Le LPV fut approuvé en 2000 par la FDA et fait partie des médicaments essentiels selon les classifications de l'OMS. La concentration nécessaire pour inhiber 50% (EC50) du virus est d'environ 17nM et celui-ci nécessite d'être associé avec le ritonavir, un autre inhibiteur de la protéase du VIH, en tant que booster et stabilisateur du LPV (van der Lugt et al., 2009). Cependant quelques années plus tard, les patients traités par du LPV développaient plusieurs effets secondaires indésirables. Le LPV agit sur plusieurs composantes pour empêcher la différenciation adipocytaire blanche (Caron et al., 2001; Vernochet et al., 2003) mais aussi pour induire la résistance à l'insuline dans les adipocytes (Djedaini et al., 2009). Il induit l'accumulation de ROS dans les mitochondries (Capel et al., 2012). Nous aborderons dans la partie résultats ses effets sur la différenciation brune.

Le DRV a été approuvé 6 ans après le LPV. Son EC50 est de 1-2nM contre le VIH et est donc 10 fois plus efficace que le LPV (Brower et al., 2008). Ce composé entraîne beaucoup moins d'effets secondaires comparativement au LPV (Molina et al., 2007). Il n'inhibe pas la différenciation adipocytaire blanche, ne perturbe pas la fonction mitochondriale et engendre très peu de ROS (Capel et al., 2012). Cependant, ses effets sur la différenciation brune ne sont pas étudiés à ce jour.

4 Cancer et tissu adipeux

Selon l'OMS en 2015, le cancer a causé la mort de plus de 8,8 millions de personnes et représente la deuxième cause de décès dans le monde. Le cancer est une pathologie multifactorielle. On note des causes physiques comme l'exposition aux rayons ultra-violet, chimiques comme l'inhalation de la fumée du tabac, biologiques comme certaines infections. Les dommages de l'ADN entraînent des mutations génétiques entraînant les cellules à proliférer de façon anarchique et menacer l'intégrité du tissu, de l'organe et même de l'individu. Ces cellules perdent leur fonctions biologiques, sont résistantes à l'apoptose, possèdent un fort pouvoir migratoire pour l'invasion et interagissent avec les cellules saines de leur microenvironnement. Dans cette partie, un type de cancer en particulier sera détaillé: le cancer du sein car c'est avec ce modèle que j'ai étudié les relations entre cellules tumorales et TA. D'autres types de cancers peuvent néanmoins être énoncés dans certaines sections principalement pour démontrer qu'ils causent des modifications ou altérations au TA de façon similaires au cancer du sein.

4.1 Le cancer du sein

Selon l'OMS en 2018, le cancer du sein est le plus fréquent des cancers chez la femme. On estime au total 2,1 millions de nouveaux cas diagnostiqués chaque année et le nombre de décès approche les 627,000, représentant 15% des morts causées par celui-ci (Figure 41). Le taux de survie varie dépendamment allant de 80% dans les pays à haut revenu, 60% pour ceux à revenu intermédiaire et 40% pour les pays à faible revenu.

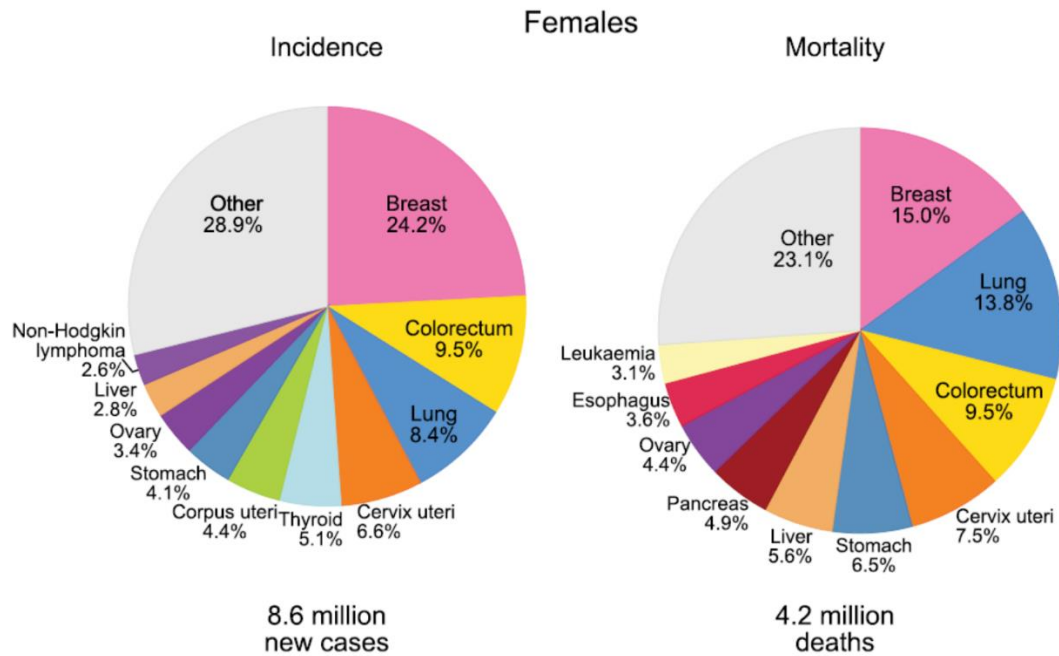


Figure 41 : Taux d'incidence et de mortalité du cancer du sein dans le monde en 2018. Illustration d'après Bray et *al.*, CA : a cancer journal for clinicians, 2018.

4.1.1 Facteurs de risque associés au cancer du sein

L'incidence du cancer du sein peut être augmentée par plusieurs facteurs de risques. Cependant, l'implication de certains de ces facteurs est difficile à prouver puisque l'incidence du cancer peut apparaître plusieurs années après l'exposition à ce dit facteur. Néanmoins, la connaissance de ces différents facteurs permet d'adapter les mesures de prévention et de dépistage.

- L'âge est important puisque l'apparition de ce cancer est rare en dessous de 30 ans et augmente entre 45 et 70 ans.

- L'hérédité compte pour 5 à 10% des cas. Elle se retrouve dans des familles où la mutation se transmet par mode autosomal dominant. Les risques sont élevés si plusieurs membres de la même famille sont atteints du cancer et le sont encore plus si le cancer est multigénérationnel. Trois

gènes sont principalement reliés à cette hérédité : BRCA1, BRCA2 et BRCA3 (Breast cancer type 1 susceptibility protein). Les deux premiers sont supprimeurs de tumeurs par leurs aptitudes à réparer les dommages à l'ADN tandis que le rôle de BRCA3 reste encore à définir (Liu et al., 2008). BRCA1 et BRCA2 sont exprimés dans plusieurs tissus dont le sein, les ovaires, la rate, le thymus et les testicules. Les mutations sur ces deux supprimeurs de tumeurs peuvent s'effectuer n'importe où sur leurs génomes entraînant la prolifération tumorale. La mutation de l'un de ces gènes augmente le risque de 40 à 85% de développer un cancer du sein alors que celui de la population générale est de 10% (Julian-Reynier, 2011).

- Des antécédents de pathologie mammaire tels que les kystes ou l'hyperplasie des canaux galactophores augmentent de 1,5 à 3 fois le risque de développer un cancer. Les foyers d'hyperplasie (4 à 20 fois) ainsi que des carcinomes canaux (8 à 10 fois) augmentent aussi les risques. Les femmes ayant déjà subi une chirurgie conservatrice ont 5 fois plus de risques de développer de nouveau un cancer dans le même sein comparativement à la population générale (Osako et al., 2014; Vogel, 2004).

Certains risques sont reliés à l'environnement ainsi qu'au mode de vie et sont considérés comme étant externes:

- L'exposition aux œstrogènes se fait de manière endogène ou exogène. La manière endogène peut provenir d'une puberté précoce, d'une ménopause tardive ou d'une grossesse tardive. La prise de contraceptifs oraux et de traitements hormonaux de substitution sont considérés comme étant exogène. La présence d'œstrogène favorise le développement du cancer du sein (Beaber et al., 2014).

- L'obésité augmente les risques de développer un cancer du sein. L'effet de l'obésité sur le cancer du sein sera vu en détails dans la section 4.3 – Tissu adipeux associé au cancer.

- Le tabagisme amène une forte source de carcinogènes causant des mutations génétiques et est associé à l'apparition de plusieurs maladies dont les cancers. Néanmoins, le tabac n'est pas établi comme étant un facteur de risque important pour le cancer du sein jusqu'à maintenant puisque la consommation d'alcool, favorisant la progression du cancer, est associé avec les fumeurs (Cotterchio et al., 2014). Certains cancers sont reconnus pour être associés directement au tabagisme comme le poumon, les tissus associés aux voies respiratoires, le foie, le pancréas, l'estomac.

Il existe d'autres facteurs qui peuvent favoriser l'incidence du cancer du sein comme l'alcool, l'alimentation, le diabète et plusieurs autres. Cependant, ceux présentés ci-dessus sont majoritairement pris en considération.

4.1.2 Structure du sein

L'intérieur du sein se compose de deux compartiments : le compartiment mésenchymateux contient des vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que des nerfs. L'autre compartiment est dit épithélial et comprend les canaux galactophores ainsi que les lobules contenant les alvéoles (Figure 42). Comme mentionné dans la section 1.2.3 - *Tissu adipeux du sein*, le TA de la glande mammaire possède une forte plasticité principalement durant la grossesse (Cinti, 2018). Au cours de la grossesse, les adipocytes vont se gorger de lipides qui seront transférés après l'accouchement dans les lobules pour que s'effectue la production du lait qui sera libéré en passant dans les canaux galactophores. On remarque que les lobules sont entourés du TA mammaire, ce qui permet

d'apporter les nutriments lipidiques dans le lait maternel au cours de la grossesse. Le sein est irrigué par des vaisseaux sanguins mais possède aussi des vaisseaux lymphatiques puisque l'on observe la présence de ganglions lymphatiques à proximité de la glande mammaire.

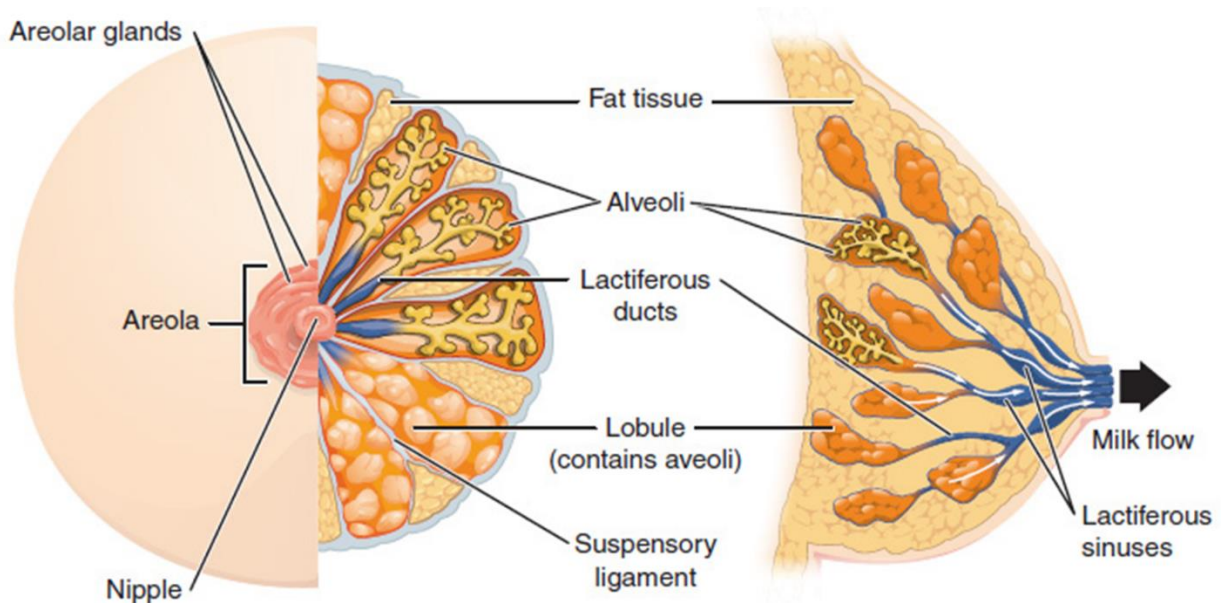


Figure 42 : Représentation schématique d'une coupe de sein. Illustration d'après <https://opentextbc.ca/anatomyandphysiology/>.

4.1.3 Développement du cancer

4.1.3.1 Initiation et prolifération cellulaire

Il existe dix principales altérations qui permettent à une cellule de devenir cancéreuse. Elles impliquent principalement la survie, la migration ou la prolifération cellulaire (Hanahan et Weinberg, 2011) (Figure 43). Selon l'OMS, ces mutations affectent principalement les cellules épithéliales de la glande mammaire et se retrouvent soit dans les cellules au niveau des lobules (10 à 15% des cas), soit dans celles dans les canaux galactophores (85 à 90%). Les carcinomes épithéliaux peuvent être non infiltrant ou *in situ*, c'est-à-dire qu'ils se développent au niveau de la lumière des lobules ou des canaux galactophores sans envahir les tissus autour. Les autres

carcinomes sont infiltrants et pourront envahir les tissus adjacents ainsi que les vaisseaux sanguins/lymphatiques.

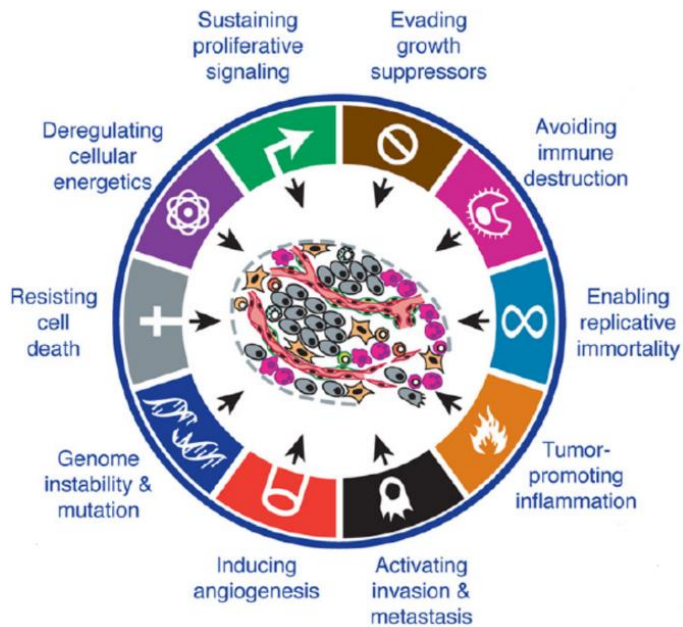


Figure 43 : Différentes mutations induisent les cancers. Une dizaine de types d'altérations permettent aux cellules cancéreuses de former des tumeurs, principalement par la survie, la migration et la prolifération cellulaire. Illustration adaptée de Hanahan et Weinberg, Cell, 2011.

Habituellement, les cellules cancéreuses accumulent plusieurs mutations pour former la tumeur dite primaire puisqu'elle se situe dans le tissu ou organe d'origine (Nowell, 1976). Il existe majoritairement 4 sous-types de cancer du sein caractérisés par l'expression de protéines distinctes permettant d'établir un pronostic de survie des patients (Dai et al., 2015).

- Luminal de type A

Ce sous-type est positif pour le récepteur à l'œstrogène (ER) et/ou pour celui à la progestérone (PR), il est négatif pour le récepteur de type 2 pour l'EGF (HER2) et possède un faible marquage pour Ki-67 (<20%), marqueur de prolifération cellulaire. Ce sous-type représente 50 à 60% des cancers du sein. La prolifération tumorale est lente et le pronostic est très favorable. Possédant des récepteurs hormonaux, ces cellules possèdent une forte sensibilité à l'hormonothérapie et une faible sensibilité à la chimiothérapie.

- Luminal de type B

Les cellules expriment le récepteur aux œstrogènes, celui à la progestérone est soit très peu ou non présents tandis qu'HER est absent. Elles possèdent un marquage Ki-67 élevé ($\geq 20\%$). Elles représentent 10% des cancers et sont caractérisées par une forte prolifération, leur pronostic est moins bon que celui des carcinomes luminaux de type A. L'hormonothérapie dépendra de l'expression des récepteurs mais la sensibilité à la chimiothérapie sera plus élevée cette fois.

- HER2 positif

Ce sous-type est habituellement caractérisé par la surexpression de HER2 et l'absence d'ER/PR mais dans certaines conditions, des cellules expriment modérément HER2 ainsi que des récepteurs hormonaux. Ce sous-type représente 15% des cancers. Ce sont des tumeurs agressives par leur forte prolifération tumorale qui sont associées à un mauvais pronostic. La meilleure méthode pour traiter ce cancer est la thérapie anti-HER2 ainsi que la chimiothérapie.

- Triple négatif

Ces cellules ne possèdent pas de récepteurs hormonaux ni HER2. Ce sous-type est le plus agressif de tous et est habituellement de très mauvais pronostic car il possède un fort taux de rechute. Il est présent dans 15 à 20% des cas et on observe majoritairement des dysfonctions associées à BRCA1, soit une inhibition par méthylation du promoteur *BRCA1*, une inactivation de sa transcription ou les deux (Matros et al., 2005; Turner et al., 2007). Le seul traitement disponible est par la chimiothérapie puisqu'il n'existe pour l'instant aucune thérapie spécifique.

Il est donc important de pouvoir définir correctement le sous-type de tumeur dont la patiente est atteinte afin de maximiser la thérapie antitumorale. La figure 44 présente les 4 sous-types avec leur caractéristiques ainsi que le pronostic de survie.

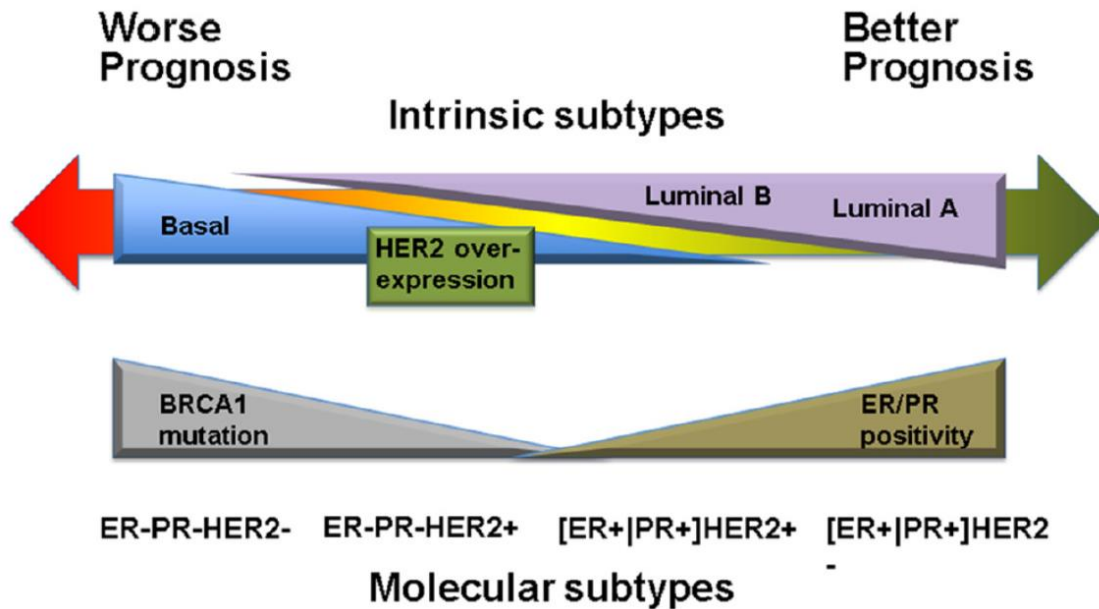


Figure 44 : Caractérisation des différents sous-types de cancer du sein. Illustration d'après Dai et *al.*, American journal of cancer research, 2015.

4.1.3.2 Transition épithélio-mésenchymateuse et invasion

Seulement 10% de la mortalité des cancers survient par la surcroissance de cette tumeur primaire. La majorité provient de la croissance de tumeurs dans des sites distants de la tumeur primaire (Boccaccio et Comoglio, 2006). Afin de former ces tumeurs secondaires appelées métastases, les cellules cancéreuses de la tumeur primaire vont en premier lieu induire un processus connu sous le nom de transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT : epithelial-mesenchymal transition). Le phénotype épithélial se caractérise par l'expression de plusieurs molécules extramembranaires ainsi que par des caractéristiques morphologiques empêchant les cellules de migrer. La E-cadhérine, qui maintient les interactions cellule-cellule, est impliquée dans ce processus. La perte de l'expression de cette protéine s'effectue et retire les interactions entre les

cellules tumorales et les cellules épithéliales environnantes. L'EMT change le phénotype épithélial des cellules vers un phénotype mésenchymateux. Ce phénotype permet aux cellules de devenir mobiles permettant d'envahir les tissus adjacents (Thiery, 2002). Il existe aussi des protéines comme EFA6B (Exchange factor for Arf6 B), faisant partie des échangeurs de nucléotides (guanine) de la superfamille de Ras Arf6, qui possède un rôle dans le maintien des jonctions étanches. Les jonctions étanches entre les cellules gardent la polarité cellulaire apico-basale (Zangari et al., 2014). La diminution de l'expression d'EFA6B entraîne la perte des jonctions étanches, la hausse de la EMT favorisant un phénotype mésenchymateux et l'apparition du caractère souche des cellules cancéreuses. Ces modifications sont associées à des tumeurs ayant un mauvais pronostic de guérison. Dans les cellules cancéreuses triple négatives extrêmement agressives et invasives, EFA6B est absente. On observe aussi une hausse de la N-cadhérine dans les cellules tumorales, ce qui augmente fortement leur interaction avec les cellules stromales (Mego et al., 2010; Wendt et al., 2011).

Afin de se déplacer plus librement, les cellules cancéreuses doivent se frayer un chemin à travers la matrice extracellulaire (ECM). La sécrétion de MMPs (Matrix métalloprotéinases) par divers types cellulaires (fibroblastes et macrophages) permet la dégradation de l'ECM, principalement la fibronectine, la ténascine, la laminine, le collagène et les protéoglycanes (Egeblad et Werb, 2002). De plus, les MMPs (1, 9, 11 et 12) sont fortement exprimées dans les cellules cancéreuses, principalement MMP9. L'expression de MMP9 est corrélée avec une diminution des chances de survie comparativement aux cellules possédant une faible expression de celle-ci (Merdad et al., 2014).

4.1.3.3 Angiogenèse/lymphangiogenèse et métastases

Afin d'apporter les nutriments et l'oxygène à la tumeur ainsi que de fournir une voie de dissémination pour la formation des métastases, la formation de nouveaux vaisseaux est primordiale. L'hypoxie au cœur de la tumeur augmente la stabilité d'HIF-1 α et l'expression du facteur de transcription HIF-1. Cette activation de la transcription de gènes cibles augmente la production de plusieurs facteurs induisant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins ou lymphatiques dont le VEGF (Dvorak, 2002). Si le VEGF active le récepteur de type 2 (VEGFR2), la formation de nouveaux vaisseaux s'effectue. S'il se lie avec le VEGFR3, il y aura alors formation de vaisseaux lymphatiques. Le VEGF peut également stimuler la prolifération, la migration et la survie des CE et augmenter la perméabilité des vaisseaux sanguins.

À proximité des nouveaux vaisseaux formés, les cellules cancéreuses vont pouvoir entrer dans la circulation par intravasation. Dans les vaisseaux, les cellules doivent résister à une mort cellulaire programmée appelée anoïkose puisqu'elles n'ont plus d'interaction avec d'autres cellules ou avec l'ECM. La dissémination des cellules cancéreuses de sein se fait principalement à partir des nouveaux vaisseaux lymphatiques. La migration des cellules cancéreuses vers les organes cibles se fera par chimiotactisme grâce aux récepteurs CXCR4. L'expression de son ligand (CXCL12) est importante au niveau des ganglions lymphatiques, des poumons, du foie et des os qui sont les principaux organes ciblés par les métastases (Borsig et al., 2014). Pour devenir métastatique, les cellules changent leur phénotype mésenchymateux pour devenir épithéliaux (MET pour mesenchymal-epithelial transition) et prolifèrent dans l'organe cible. Un résumé de la cascade de l'invasion-métastatique est présenté dans la figure 45.

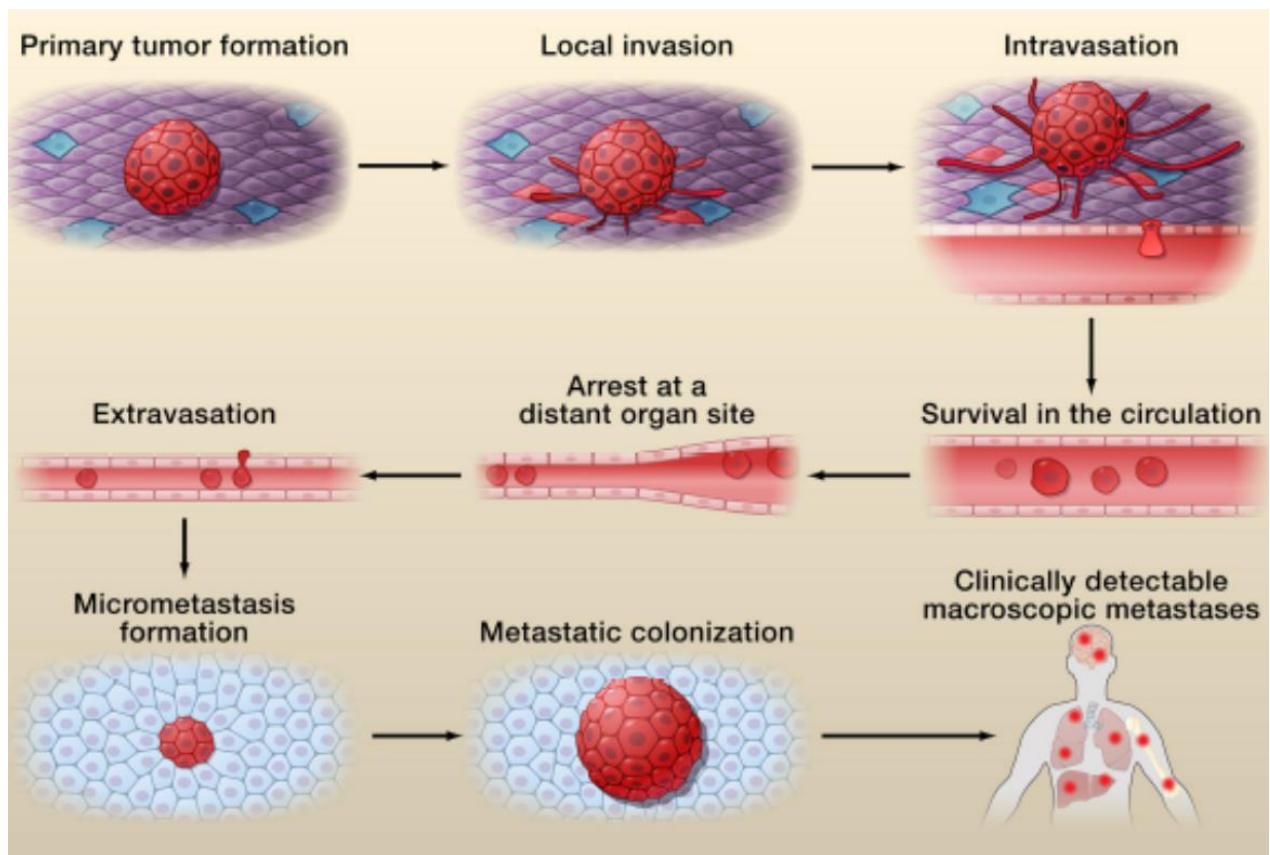


Figure 45 : Développement de la tumeur primaire et des métastases. Illustration d'après Faltas, *Frontiers in oncology*, 2012.

Il est à noter que la taille de la tumeur primaire augmente la probabilité de développer des métastases. Pour le cancer du sein, si la taille de la tumeur est entre 0 et 1 cm on a environ 22% de probabilité de développer des métastases tandis qu'elle est de 77% si elle dépasse plus de 8 cm. Entre 1 et 8 cm, la probabilité est proportionnelle par rapport à la taille de la tumeur primaire (Heimann et Hellman, 1998).

4.1.3.4 Hétérogénéité du cancer

Même si certaines cellules cancéreuses provenant de la tumeur primaire parviennent à former des métastases, ce n'est pas le cas pour la totalité de ces cellules tumorales. On constate une forte hétérogénéité de cellules cancéreuses dans les tumeurs. Dans les années 1950, une équipe a

isolé 129 lignées de cellules cancéreuses provenant d'un seul carcinome testiculaire de souris (Stevens, 1967; Stevens et Little, 1954). Par la suite, une seule de ces lignées cellulaires a permis de régénérer une tumeur possédant les caractéristiques de la tumeur originale lorsque transplantée chez une souris hôte. Ce fut la première fois où l'existence de cellules souches cancéreuses (CSC) capables d'auto-renouvellement et de différenciation cellulaire a été mise en évidence (Kleinsmith et Pierce, 1964). D'autres expériences utilisant des cellules cancéreuses provenant de différents organes (cellules myéloïdes de souris, poumon, ovaire, neuroblastome) permettent de montrer qu'un faible pourcentage (seulement 1% ou moins) de ces cellules sont capables de former des colonies (Hamburger et Salmon, 1977; Park et al., 1971). Ceci suggère que dans une population hétérogène tumorale, certaines cellules possèdent des caractéristiques d'auto-renouvellement, caractéristiques que l'on attribuait exclusivement aux cellules souches saines. Par la suite, les CSC de leucémies myéloïdes aiguës ont été identifiées sur la base de l'expression de CD34 et l'absence de CD38. Leur proportion dans une leucémie est de 100 cellules dans 1 millions et seulement 5000 de ces cellules suffisent pour induire une leucémie chez des souris immunodéficientes SCID (Lapidot et al., 1994). Cette expérience permet de remplacer l'ancien modèle stochastique du cancer où on supposait que toutes les cellules cancéreuses étaient homogènes et que chacune individuellement pouvait induire un cancer. Le nouveau modèle de «cellules souches» stipule qu'au sein de la tumeur, il existe une hiérarchie de cellules et que seulement les CSC sont impliquées de l'initiation et du maintien de la tumeur (Shipitsin et al., 2007) (Figure 46). Des cellules souches cancéreuses ont été identifiées dans des tumeurs solides pour la première fois à partir de carcinomes mammaires (Al-Hajj et al., 2003).

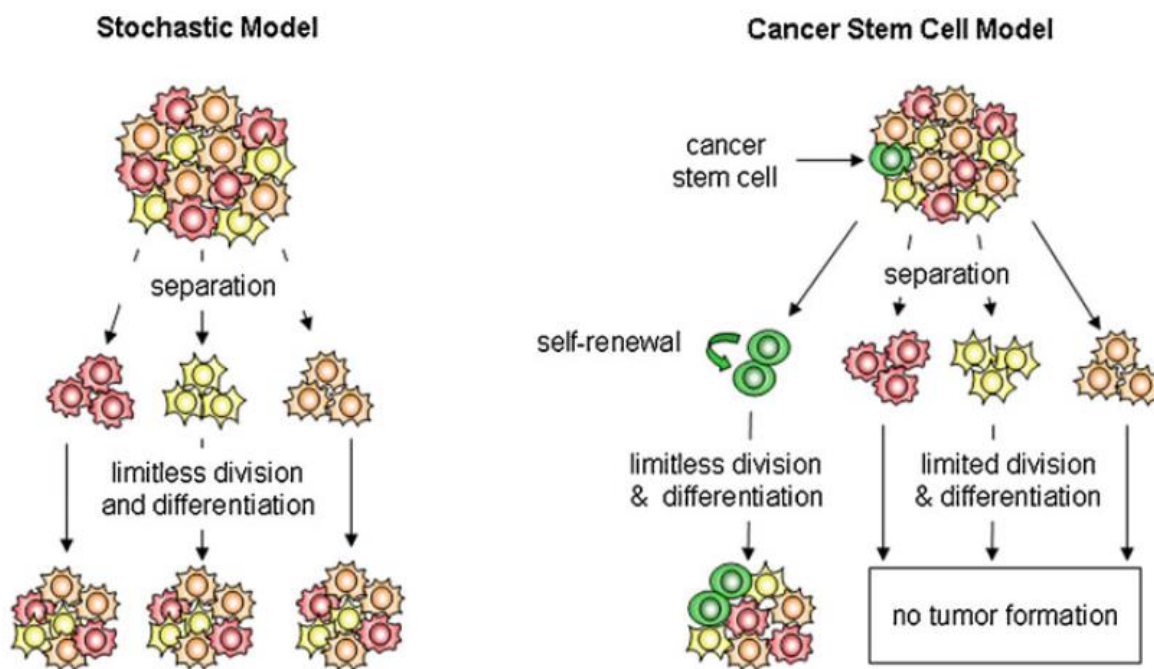


Figure 46 : Différences entre le modèle stochastique et celui de cellules souches. Dans le modèle de cellules souches, une infime partie est capable d’auto-renouvellement pour reformer une tumeur à partir d’une seule cellule. Illustration d’après van Verklen et *al.*, Journal of molecular medicine (Berlin, Germany), 2010.

4.1.3.5 Caractéristiques propres aux cellules souches cancéreuses

a) Niche cancéreuse

Le terme de niche cancéreuse est maintenant utilisé pour désigner une région distincte de l’environnement tumoral où les CSC sont localisées. Ces niches permettent de contrôler leur prolifération, de les protéger contre le système immunitaire, de faciliter leur potentiel métastatique, la migration et l’invasion ainsi que d’augmenter la résistance de ces CSC aux traitements anticancer (Plaks et al., 2015).

Une étude a montré le rôle primordial de la niche des cellules souches cancéreuses du sein dans un contexte de cancer de type luminal (Chapellier et al., 2015). En condition physiologique normale, BMP2 contrôle l’amplification et la différenciation des progéniteurs luminaux tandis que

BMP4 est plutôt impliquée dans le maintien des cellules souches. Ces deux BMPs permettent de créer un équilibre au niveau de la glande mammaire. Cependant, les cellules tumorales produisent BMP2 dans le microenvironnement. L'exposition des cellules épithéliales mammaires immatures (MCF10A) à des niveaux élevés de BMP2 induit une transformation vers des cellules luminales possédant un phénotype similaire aux cellules cancéreuses. Cette transformation s'effectue par l'activation du récepteur BMPRII par le BMP2 induisant la signalisation de SMAD5. De plus, il a été montré que des polluants environnementaux tels que les radiations, les bisphénols A et S ainsi que le benzoapyrène augmente la production de BMP2 dans les fibroblastes mammaires sains.

b) Marqueurs pour l'identification de CSC

Il n'existe pas de marqueur de surface spécifique pour les CSC comparativement aux cellules souches normales. Pour certains types de cancers, l'identification peut s'effectuer par une augmentation de l'expression de CD44 ou CD133, mais ces marqueurs sont exprimés dans une grande majorité de tumeurs solides. Cependant, ces marqueurs sont dits préférentiels mais non exclusifs puisqu'ils ne peuvent être généralisés pour tous les types de tumeurs (Collins et al., 2005). D'autres méthodes sont utilisées pour identifier les CSC. Par exemple, la mesure de l'activité enzymatique de l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH). Cette enzyme est impliquée dans la détoxification cellulaire par la production d'aldéhydes. L'ALDH est présente dans les cellules souches malignes ou non permettant la conversion du rétinaldéhyde en acide rétinoïque. L'acide rétinoïque induit la prolifération cellulaire et la différenciation (Ma et Allan, 2011). Les cellules cancéreuses possédant une forte activité ALDH1 ont un fort potentiel tumoral et sont plus résistantes face aux thérapies anticancer contrairement aux cellules n'ayant aucune activité ALDH (Ginestier et al., 2007; Tanei et al., 2009). De plus, ces CSC possèdent des traits communs avec les cellules souches embryonnaires (Thomson et al., 1998). Certains marqueurs embryonnaires sont

retrouvés dans les CSC, notamment Sox2, Klf4, Nanog, Lin28 et Oct4 (Bernhardt et al., 2012). Ceux-ci peuvent être impliqués dans l'auto-renouvellement, la pluripotence et le potentiel tumoral des CSC. Notre laboratoire a pu mettre en évidence que des CSC exprimant Oct4 possédait un potentiel tumoral et métastatique nettement supérieur à celles n'exprimant pas ce marqueur (Darini oncogene 2012). Les CSC de sein possèdent les marqueurs Sox2, Klf4, Lin28 et Oct4 (Foster et al., 2000; Liu et al., 2012a; Sanada et al., 2006; Viswanathan et al., 2009). Les CSC portent le marqueur extracellulaire CD44 tandis que le CD24 est absent (Al-Hajj et al., 2003). Néanmoins, ces deux marqueurs peuvent porter confusion puisque dans les cas de rechute, les CSC possèdent un très faible taux de CD44 (CD44^{low}) mais celui de CD24 est élevé (CD24^{high}) (Polyak, 2007). Cependant, l'activité ALDH présente chez des CSC de sein induit un fort pouvoir tumoral comparativement aux CSC n'en possédant pas (Charafe-Jauffret et al., 2010).

4.2 Interaction entre le cancer et le microenvironnement

Les cellules tumorales doivent proliférer afin d'envahir les tissus adjacents et former des métastases. Cependant, les cellules entourant les cellules cancéreuses sont saines et gardent toujours leurs fonctions biologiques. De plus en plus d'études se sont consacrées sur l'interaction entre le cancer et le microenvironnement tumoral. Dans certains cas, les cellules cancéreuses utilisent les cellules saines du microenvironnement à leur avantage ou bien inhibent leur activité afin de pouvoir entamer leur invasion. Dans cette section, le microenvironnement tumoral se portera sur le système immunitaire, les fibroblastes ainsi que sur la formation de nouveaux vaisseaux sanguins ou lymphatiques. Mon projet de recherche se concentre sur l'interaction entre le cancer et le TA qui aura sa propre section 4.3 - Tissu adipeux associé au cancer. Si le type de cancer n'est pas spécifié durant les descriptions, c'est qu'il s'agit du cancer du sein.

4.2.1 Cellules immunitaires

Le système immunitaire est la première ligne de défense contre les infections bactériennes et virales mais aussi face au développement des cellules tumorales. Néanmoins, les tumeurs inhibent le système immunitaire en 3 phases (Pardoll, 2012) :

1 - l'élimination des cellules cancéreuses par la reconnaissance du système immunitaire inné et adaptatif,

2 – la phase d'équilibre où le système immunitaire met les cellules cancéreuses dans un état de dormance. Lors de cette étape, les cellules cancéreuses induisent des modifications génétiques et épigénétiques pour résister à la reconnaissance immunitaire.

3 - l'évasion des cellules tumorales du système immunitaire. Ce processus implique la croissance de la tumeur, l'induction de l'angiogenèse mais aussi la suppression des réponses immunitaires.

Une forte infiltration de leucocytes est retrouvée dans certains cancers comme les mélanomes, le cancer du poumon ou colorectal comparativement au cancer du sein ou de la prostate (Beatty et Gladney, 2015). Cette variation de la réponse immunitaire provient de l'instabilité génétique et des niveaux élevés de mutations. Ces effets amènent à l'expression de nouveaux épitopes protéiques étrangers, ce qui active le système (Alexandrov et al., 2013; Shalapour et Karin, 2015). On retrouve des cellules faisant parties du système immunitaire inné ou adaptatif.

a) Système inné

- Neutrophiles : Les neutrophiles ont pour rôle principal de nettoyer les microorganismes au site d'une infection. Le microenvironnement tumoral sécrète de l'IL-8 afin de recruter des neutrophiles. La libération du G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) par le cancer augmente la production des neutrophiles et diminue celle des lymphocytes T par reprogrammation

de l'hématopoïèse vers la lignée myéloïde (Casbon et al., 2015). Des cellules immunosuppressives dérivées de cellules myéloïdes (MDSCs : Myeloid-derived suppressor cells) proviennent d'une sous-catégorie de neutrophiles présents dans le microenvironnement. Leur présence est corrélée à des stades avancés du cancer menant à un mauvais pronostic (Markowitz et al., 2013).

- Macrophages : Les macrophages associés aux tumeurs (TAMs : Tumor-associated macrophages) se retrouvent dans deux catégories : Le type M1 est pro inflammatoire et produit du TNF α et de l'IL-6 afin d'obtenir une réponse contre la tumeur (Tang, 2013). Ceux de type M2, par la sécrétion d'IL-4 et IL-10, inhibent la réponse immunitaire ce qui entraîne une croissance et invasion tumorale ainsi qu'un faible pronostic de survie (Mahmoud et al., 2012; Tiainen et al., 2015). Selon le sous-type de cancer, on remarque des variations au niveau des TAMs (Hollmén et al., 2015). Les tumeurs lumineales A ou B (ER positives) sont associées un phénotype M1 tandis que les lignées triple négatives induisent le phénotype M2. On constate la différenciation vers le phénotype M2 par la dérégulation du métabolisme de la citrulline causée par les triples négatives.

b) Système adaptatif

Les lymphocytes sont les cellules immunitaires les plus retrouvées dans le microenvironnement tumoral (TILs : Tumor-infiltrating lymphocytes). Leur présence est décrite pour 80% des patients (Denkert et al., 2010). Il existe deux catégories de TILs : ceux qui n'interagissent pas avec les cellules cancéreuses (sTILs) et qui sont présent dans le stroma et ceux intraépithéliaux qui sont en contact direct (iTILs) avec les cellules tumorales. On note que seul les sTILs sont associés à un pronostic sur la progression tumorale (Salgado et al., 2015). Un bon pronostic de survie est présent par leur présence dans les cancers triple négatifs tandis qu'on ne peut pas effectuer de corrélation avec les autres types de tumeurs (Loi et al., 2013).

- Lymphocytes T cytotoxique CD8⁺ : Les CD8⁺ sécrètent des enzymes telles que les perforines et les granzymes qui entraînent la mort des cellules cancéreuses par la destruction de la membrane cellulaire. Ils sont présents principalement dans les lignées tumorales HER2 et les triples négatives et reconnaissent de nouveaux épitopes liés aux mutations (Ali et al., 2014; Curtis et al., 2012; Liu et al., 2012b). La présence des CD8⁺ est corrélée positivement aux chances de survie (Ali et al., 2014). Les lymphocytes doivent être en contact direct avec les cellules cancéreuses pour les éliminer à travers leurs effets cytotoxiques. Cependant, une forte accumulation de collagène dans les cancers limite l'infiltration des lymphocytes dans les tumeurs (Winslow et al., 2015).

- Lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ : Plusieurs sous-types de lymphocytes CD4⁺ existent et possèdent des fonctions différentes. Les Th1 activent les CD8⁺ par la sécrétion d'interféron-gamma (IFN γ) et augmentent les chances de survie (Gu-Trantien et al., 2013).

Les cellules régulatrices T (T_{reg}) atténuent le système immunitaire afin de ne pas causer des dommages excessifs aux tissus sains. Ces cellules se retrouvent dans des cancers de haut grade, principalement ceux négatifs pour les récepteurs hormonaux (Liu et al., 2014; Mahmoud et al., 2011; West et al., 2013). Un ratio CD8⁺/T_{reg} élevé est associé avec un meilleur taux de survie (West et al., 2013).

Cependant, l'environnement tumoral épuise ces cellules par une stimulation chronique ce qui diminue la production des Th1 résultant en une baisse de la sécrétion d'IFN γ (Nguyen et Ohashi, 2015). De plus, la forte présence de marqueurs d'immunité antitumorale (immune checkpoint) tels CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) et PD-1 (Programmed cell death-1), qui sont des régulateurs négatifs de la fonction des lymphocytes T, participe à cet épuisement (Ghebeh et al., 2008; Sun et al., 2014). L'expression de CTLA-4 augmente dans les cancers, ce qui bloque l'activation des cellules T et réduit les chances de survie (Contardi et al.,

2005). PD-1 est présent sur les cellules T actives et son interaction avec son ligand (PD-L1 ou PD-L2) inhibe ses fonctions effectrices (Nguyen et Ohashi, 2015).

- Lymphocytes B : Les lymphocytes B sont connus pour produire des anticorps mais interagissent aussi avec les lymphocytes CD4+ par la présentation des antigènes (Nelson, 2010). La présence de lymphocytes B dans les tumeurs triples négatives est associé à un meilleur taux de survie (Mahmoud et al., 2012; Mohammed et al., 2013). Néanmoins, tBregs, une sous-catégorie de lymphocytes B, possèdent des activités immunosuppressives. Par la libération des cytokines IL-10 et TGF- β , ils convertissent les cellules TH1 en T_{reg} et favorisent la formation de métastases dans les poumons de souris (Olkhanud et al., 2011).

La figure 47 présente les différences entre le système immunitaire inactif et actif envers la tumeur.

c) Molécules immunosuppressives sécrétées par le cancer

Bien que les cellules immunitaires interagissent négativement sur la progression tumorale, le cancer peut sécréter des molécules capables d'induire une tolérance. La production de TGF- β par le cancer amène des effets immunosuppressifs permettant l'évasion des cellules tumorales qui échappent à la surveillance du système immunitaire. Un nouvel inhibiteur de la kinase du TGF- β inhibe la croissance des cellules cancéreuses et augmente l'efficacité de la réponse immunitaire contre le cancer (Uhl et al., 2004). D'autres molécules comme le lactate et l'indoléamine-2,3-dioxygénase (IDO) seront expliquées en détail.

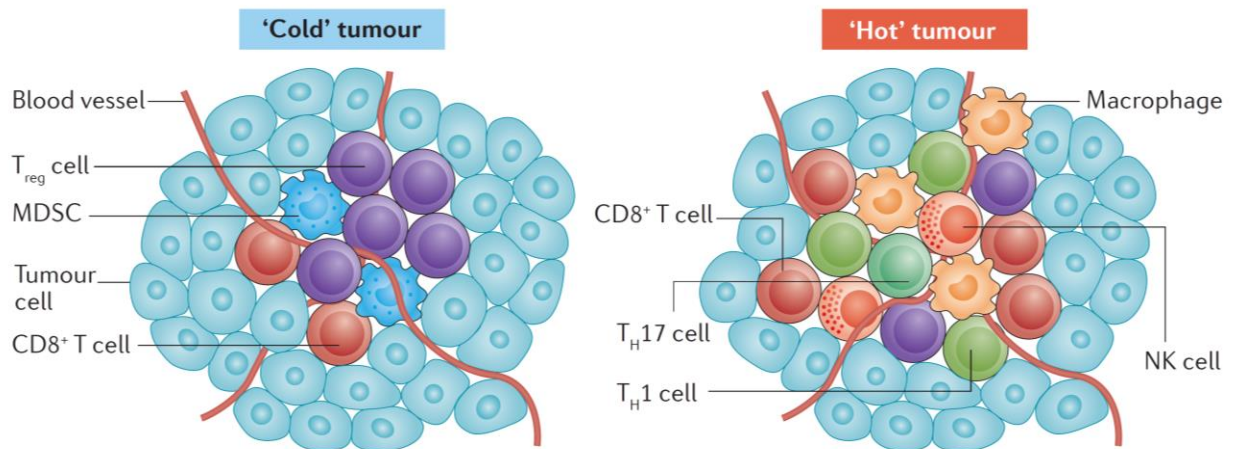


Figure 47 : Système immunitaire inactif et actif combattant la progression tumorale. Gauche : Le recrutement de plusieurs cellules immunosuppressives par la tumeur empêche le système immunitaire d'attaquer la tumeur. Droite : le système immunitaire activé permet d'interagir et d'attaquer les cellules cancéreuses. Illustration d'après Nagarsheth et al., Nature Reviews, 2017.

- Lactate : L'activité de plusieurs GLUT augmente dans les cellules tumorales pour incorporer une large quantité de glucose. Le glucose est transformé en pyruvate par la glycolyse. Cependant, au lieu d'entrer dans le cycle de Krebs pour former de l'énergie, il devient du lactate qui sera excrété hors de la cellule par les transporteurs de monocarboxylate (MTC : Monocarboxylate transporter). Ce composé acide est produit plus rapidement par la lactate déshydrogénase-A (LDH-A) en condition aérobie dans les cellules cancéreuses : on nomme ce phénomène «l'effet Warburg» (DeBerardinis et al., 2007; Warburg et al., 1927). L'effet Warburg augmente l'acidité du microenvironnement tumoral et on estime qu'une cellule tumorale produira 40 fois plus d'acide lactique comparativement à cellule saine (Holm et al., 1995; Husain et al., 2013a). L'acidité du milieu et la formation de ROS ont pour effet d'imiter un environnement hypoxique stabilisant ainsi l'expression d'HIF-1 α . Par la suite, la transcription induite par HIF-1 amplifie l'expression de LDH-A, de GLUT et de MCT (Husain et al., 2013b; Marchiq et al., 2015; Marcucci et al., 2014). MCT expulse le lactate du cytosol de la cellule pour éviter une accumulation qui deviendrait toxique (Palmieri Biochim Biophys acta 1996). Le lactate inhibe la réponse

immunitaire contre le cancer par recrutement des MDSCs qui activeront les T_{reg} (Husain et al., 2013b, 2013a). De plus, la libération du lactate ralentit la maturation des cellules présentatrices d'antigènes et empêche la reconnaissance des cellules T naïves face aux pathogènes.

Le traitement de cellules immunitaires par le lactate diminue l'expression de granzyme, la prolifération des cellules $CD4+$ ainsi que l'activité des $CD8+$. La délétion de la *LDH-A* dans les cellules tumorales suivie de leur injection dans des souris immunodéficientes diminue la taille des tumeurs comparativement aux cellules injectées contenant le vecteur vide (Husain et al., 2013a). On observe une hausse de la cytotoxicité produite par les $CD8+$ ainsi qu'une baisse de la quantité de MDSCs dans le microenvironnement. Le remplacement d'un régime normal chez la souris par un régime cétogénique diminue la consommation en glucides ainsi que la production du lactate. La taille des tumeurs ne varie pas entre les deux groupes. Cependant, on observe une hausse de $CD4+$ et $CD8+$ avec une baisse de MDSCs et Treg chez les souris sous régime cétogénique comparativement à celles sous régime normal (Husain et al., 2013b).

La délétion des MCT, principalement MCT1 et MCT4 pour le cancer, diminue la relargage du lactate hors de la cellule (Marchiq et al., 2015). Accumulé dans le cytoplasme, on suppose que le lactate induirait des dommages cytotoxiques à la cellule. Pour compenser cette accumulation, les cellules cancéreuses transfèrent le lactate et le pyruvate dans la phosphorylation oxydative au niveau des mitochondries. La délétion des MCT combinée avec l'inhibition de la phosphorylation oxydative induisent une mort nécrotique dans ces cellules tumorales.

- IDO : Cette enzyme convertit le tryptophane en kynurénine. Ce composé inhibe l'activation des cellules T au cours de la grossesse puisque le fœtus est considéré comme étant un corps étranger par le système immunitaire de la mère. L'utilisation d'un inhibiteur contre l'IDO chez la souris active la réponse immunitaire contre le fœtus pendant la gestation. Les cellules

cancéreuses bloquent le gène suppresseur de tumeur *Bin1* ce qui permet d'induire la transcription d'*IDO*. Dans les cellules dendritiques associées au cancer, l'expression d'*IDO* augmente, inactive les cellules T et transforme les Th en T_{reg}. De plus, la déplétion en tryptophane dans l'environnement tumoral empêche la prolifération des cellules T et active les T_{reg}. L'inhibition de l'*IDO* avec le 1-méthyl-tryptophane induit une régression de la croissance du cancer dans des modèles de souris seulement si on le combine avec la chimiothérapie (Prendergast, 2008).

4.2.2 Cellules endothéliales

L'hypoxie au cœur du tissu active l'angiogenèse afin de former de nouveaux vaisseaux pour acheminer l'oxygène afin de ramener le taux d'oxygénation à la normale et les nutriments. Le facteur de transcription HIF-1 induit la transcription des facteurs de croissance tels que le VEGF, le FGF et le HGF qui sont sécrétés. La tumeur va utiliser l'angiogenèse pour assurer son expansion et former des métastases. Dans ce contexte, le terme utilisé est plutôt «néoangiogenèse». La formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir du VEGFR2 permet la vascularization de la tumeur, sa croissance ainsi qu'une porte de sortie pour la formation de métastases. Néanmoins, la dissémination des cellules du cancer du sein se fait généralement à travers les vaisseaux lymphatiques par l'activation du VEGFR3 (Mandriota et al., 2001; Pepper et al., 2003). Ce récepteur est habituellement exprimé au niveau des CE des vaisseaux lymphatiques tandis que les vaisseaux sanguins possèdent VEGFR2. Cependant, les tumeurs entraînent des modifications autant chez les CE sanguines que lymphatiques : on observe l'apparition de ces deux récepteurs chez les deux types de CE (Hirakawa et al., 2005; Partanen et al., 1999). Les TAMs produisent une forte quantité de VEGF et favorisent la formation de nouveaux vaisseaux (Shojaei, 2012). L'IL-6 est augmentée dans les cancers et agit de manière indirecte sur la synthèse du VEGF (Cohen et al., 1996). L'utilisation de thérapies anti-VEGF associées à la chimiothérapie a montré en 2003 une augmentation de la survie pour les patients atteints des métastase du cancer colorectal (Kabbnavar

et al., 2003). Par la suite, d'autres composés anti-VEGFR ont vu le jour pour inhiber la prolifération des CE (Shojaei, 2012). Le composé ASA404 entraîne la destruction des vaisseaux sanguins de la tumeur (Baguley et McKeage, 2010). Néanmoins, on observe une résistance à ces traitements soit par l'augmentation de la production du VEGF et/ou de son récepteur soit par l'activation de voies alternatives comme Notch/Delta (Mahdi et al., 2019).

4.2.3 Fibroblastes associés au cancer

En conditions physiologiques normales, les fibroblastes participent à la construction de l'ECM *via* la sécrétion de molécules de structure telles que les protéoglycanes, le collagène, la vimentine et l'actine. Cependant, le microenvironnement tumoral sécrète du TGF- β et du PDGF ce qui transforme les fibroblastes locaux ainsi que des précurseurs de la moelle osseuse en CAFs (Cancer-associated fibroblasts) (Figure 48) (Gabrilovich et Nagaraj, 2009). Les CAFs modifient le microenvironnement pour permettre la croissance de la tumeur. Ils sécrètent des facteurs de croissance et peuvent même modifier les régulations épigénétiques dans les cellules saines (Shekhar et al., 2003). Les CAFs détoxifient les métabolites produits par la tumeur et, par la sécrétion de CXCL12 dans la circulation sanguine, recrutent d'autres fibroblastes. La libération d'autres chimiokines comme CXCL14 attire les TAMs de type 2, les MDSCs et les T_{reg} qui vont inhiber la réponse immunitaire (Ostman et Augsten, 2009). La sécrétion de la MMP2 par les CAFs amène à la dégradation de l'ECM permettant aux cellules cancéreuses d'exprimer un phénotype mésenchymateux et une augmentation de la motilité qui favorisera la formation de métastases. L'activation de la voie Notch dans les CAFs augmente le suppresseur de tumeur p53 dans les cellules saines, ce qui inhibe la mitose et augmente la sénescence des cellules saines. Les cellules tumorales peuvent infiltrer plus facilement le tissu environnant (Nwabo Kamdje et al., 2014). La

voie Notch libère du VEGF et du FGF qui favorisent la formation de nouveaux vaisseaux (Nwabo Kamdje et al., 2014; Ostman et Augsten, 2009; Shekhar et al., 2003; Sugimoto et al., 2006).

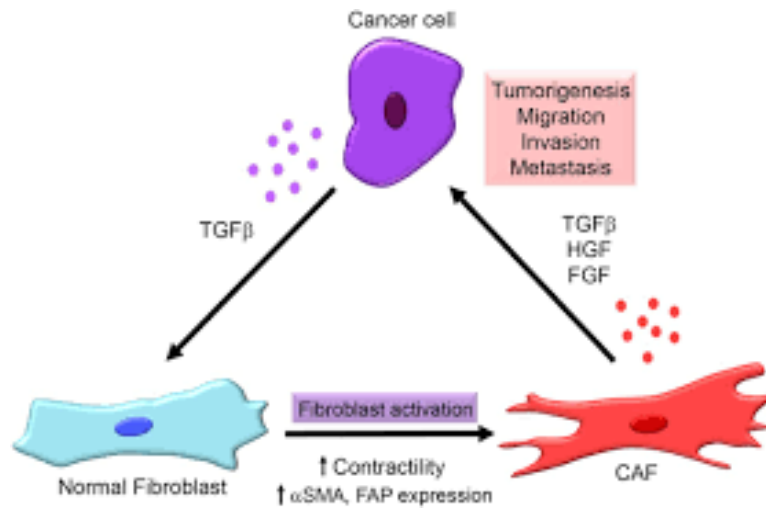


Figure 48 : Recrutement des fibroblastes par le cancer. Illustration d'après Erdogan et al., Biochemical society transactions, 2017.

Le cancer du sein va modifier plusieurs composantes de son microenvironnement afin de progresser. Les CE, par la formation de vaisseaux, apportent les nutriments à la tumeur ainsi qu'une voie de dissémination. Les CAFs aident les cellules tumorales à envahir les tissus ou organes à proximité par restructuration de l'ECM. Les cellules immunosuppressives sont recrutées afin d'empêcher les autres cellules immunitaires d'attaquer le cancer. La majeure partie des recherches ont considéré l'étude de ces trois types cellulaires sur le microenvironnement tumoral. Le TA fût ignoré puisque l'on supposait qu'il n'avait peu ou pas d'effets sur la progression tumorale. Néanmoins, on a découvert que ce tissu endocrinien sécrète plusieurs molécules qui favorisent la croissance des cellules cancéreuses. De plus, ces réservoirs de lipides peuvent servir d'énergie à la tumeur. Le terme de tissu adipeux associé au cancer (CAAT : Cancer-associated adipose tissue) est alors apparu et sera détaillé ci-dessous.

4.3. Tissu adipeux associé au cancer

L'interaction entre le TA et le cancer est de plus en plus étudiée. Les interactions peuvent se dérouler de deux façons : l'étude des effets du TA sur la progression du cancer ou celle des effets

du cancer sur le TA (Figure 49). Mon projet va porter principalement sur cette dernière puisque plusieurs études décrivent les effets du TA sur le cancer. Dans cette section, la première partie portera sur l'impact de l'obésité sur la progression tumorale tandis que la deuxième discutera des effets métaboliques du cancer sur le TA, principalement sur la lipolyse et le brunissage.

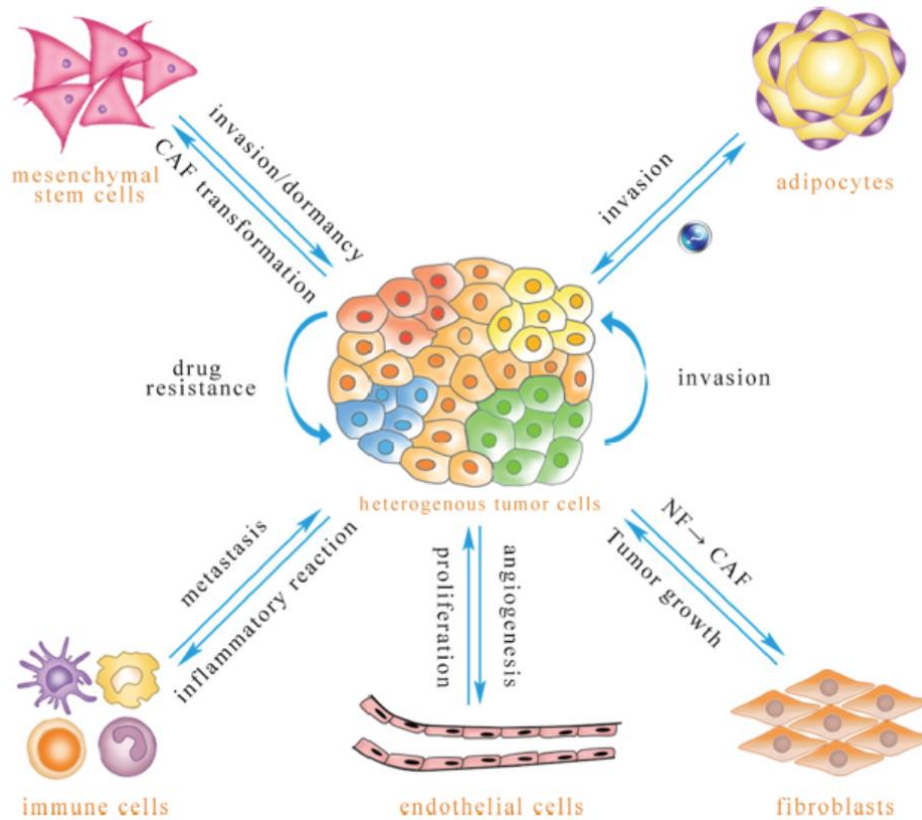


Figure 49 : Interaction du cancer avec son microenvironnement. Illustration d'après Jiang et al., Peer journal, 2017.

4.3.1 Impact de l'obésité sur la progression tumorale

Comme mentionné précédemment, l'obésité est un facteur de risque associé au cancer du sein, du colon, du rein, de l'œsophage, du pancréas et même des lymphomes et des leucémies, induisant l'incidence de mortalité des patients (Park et al., 2011). Le TA, renfermant beaucoup de lipides, fournit aux cellules cancéreuses une réserve énergétique permettant la division cellulaire (Nieman et al., 2011). Une étude montre que les adipocytes mammaires stimulent l'invasion des cellules cancéreuses de sein à travers un remodelage métabolique. Des milieux conditionnés

provenant de cellules cancéreuses induisent la lipolyse des cellules adipocytaires. On remarque une augmentation du contenu en TG dans les cellules cancéreuses. Les cellules cancéreuses produisent beaucoup d'ATP, habituellement à partir du glucose, afin de pouvoir proliférer. Cependant, on observe une augmentation de l'oxydation des AG pour former de l'acétyl-CoA. Fait intéressant, une diminution de la production d'ATP est associée à l'augmentation du découplage par l'augmentation de la protéine UCP2 dans les cellules cancéreuses. Ce remodelage métabolique augmente la migration et l'invasion des cellules cancéreuses ainsi que le nombre de métastases produites. La perte de formation d'ATP active l'AMPK et favorise la biogénèse mitochondriale ainsi que l'entrée des AGL dans la mitochondrie. Tout ceci crée une boucle positive pour l'oxydation des AGL ce qui favorise l'agressivité du cancer du sein (Wang et al., 2017).

Un milieu conditionné provenant d'adipocytes augmente la prolifération cellulaire des cellules cancéreuses (Lapeire et al., 2017). Les adipocytes ainsi que leurs précurseurs sont impliqués dans la progression tumorale, l'angiogenèse et le développement des métastases (Polyak, 2001). L'expression de différents gènes tels que la leptine et son récepteur, l'aromatase et le VEGF est augmentée dans les adipocytes matures de femmes ayant un IMC de 30 comparativement à celle en ayant un IMC de 20 (Bougaret et al., 2017). Le TA augmente la sécrétion de fibronectine et de collagène de type 1 permettant l'invasion métastatique (Bochet et al., 2013; Lapeire et al., 2014).

De plus, l'obésité est associée avec des tumeurs agressives favorisant le système lymphatique, le développement des métastases ainsi que l'augmentation des risques de rechutes du cancer (Calle et al., 2003). Des milieux conditionnés provenant de cellules cancéreuses seules ou en coculture avec du TA de patientes (IMC de 20 *versus* 30) furent utilisés pour mesurer leur impact

l'angiogenèse (Bougaret et al., 2017). Seulement le milieu conditionné de cellules cancéreuses avec le TA de patientes obèses augmente fortement la prolifération des CE, leur migration et la formation de tubules. Ces effets sont en partie dus à la présence du VEGF et de la leptine dans ce milieu puisque l'utilisation d'un anticorps envers l'une ou l'autre de ces molécules inhibe la croissance des CE. Une expérience similaire fut utilisée pour comparer la résistance envers la chimiothérapie des cellules tumorales (Bougaret et al., 2018). Les PAs provenant de patients obèses ou sains ont été différenciés puis ont servi à récupérer du milieu conditionné. Le milieu provenant de patientes obèses augmente la prolifération des cellules cancéreuses ainsi que leur résistance au tamoxifène. De plus, l'ajout seul d'IL-6, de leptine ou de TNF α à des concentrations retrouvées dans le sérum de patients obèses sur les cellules MCF7 inhibe les effets antiprolifératifs du métabolite actif majeur du tamoxifène (4-hydroxytamoxifène).

La progression tumorale due à l'obésité est reliée à l'inflammation chronique ainsi qu'à la sécrétion des adipokines. Les adipocytes à proximité d'une tumeur de sein surexpriment les cytokines inflammatoires (IL-6; IL-1 β) et protéases (MMP11; PAI-1) afin de remodeler l'ECM (Dirat et al., 2011). Les activines peuvent aussi jouer un rôle au niveau du développement du cancer. Selon le type de cancers, ces effets peuvent être bénéfiques ou délétères. La signalisation de l'activine A ou du TGF- β favorise l'EMT, l'invasion et la croissance métastatique des cellules tumorales. L'utilisation d'un anticorps contre l'activine A ou le TGF- β supprime la formation de métastases dans plusieurs cas de cancers, notamment celui du poumon, du foie et des os (Ehata et al., 2007; Ogino et al., 2008). L'utilisation d'inhibiteurs contre ALK, un des co-récepteurs de l'activine A, prévient le développement des tumeurs en inhibant l'angiogenèse, la migration tumorale, les fibroses et les métastases (Halder et al., 2005; Hjelmeland et al., 2004). La signalisation de l'activine B dans le cancer du sein a un effet inhibiteur pour la croissance tumorale.

L'utilisation d'anticorps ciblant Cripto ou d'un siRNA contre FLRG (follistatin-related gene), deux protéines inhibitrices de la signalisation de l'activine B, stoppe la prolifération des cellules cancéreuses humaines (Adkins et al., 2003; Razanajaona et al., 2007). Une mutation de plusieurs gènes impliqués dans la signalisation des activines tels que ActRII, ActRI, SMAD2 et SMAD4 est retrouvée dans des divers cancers (Hempfen et al., 2003; Matzuk et al., 1994; Su et al., 2001). En revanche, la surproduction d'activines ou la perte de son antagoniste inhibiteur, les inhibines, induisent des syndromes similaires à la cachexie ainsi qu'une nécrose au niveau du foie et des métastases (Leto et al., 2006; Li et al., 2007; Matzuk et al., 1994). Les patients obèses présentent des taux sanguins élevés en leptine (Dubois et al., 2013). Cette adipokine favorise la prolifération de cellules tumorales *in vitro* mais aussi l'angiogenèse car ses récepteurs sont exprimés sur les CE (Dubois et al., 2013; Jardé et al., 2009; Park et al., 2001). Les patientes atteintes d'une hyperleptinémie présentent un mauvais pronostic associé avec la formation de métastases et un faible taux de survie (Macciò et al., 2010; Ozet et al., 2001). L'hyperinsulinémie provoquée par l'obésité a des effets anti-apoptotiques pour les cellules cancéreuses (Nieman et al., 2011).

Un niveau élevé d'IMC augmente le risque de cancer du sein chez la femme ménopausée (Lahmann et al., 2004). À la suite de la ménopause, le TA devient la source principale d'oestrogènes (Lorincz et Sukumar, 2006). Les ASC possèdent un niveau élevé d'aromatase, enzyme impliquée dans la biosynthèse des oestrogènes tandis que les adipocytes n'en produisent pas (Bellemare et al., 2009; Strong et al., 2013). De plus, l'obésité augmente l'expression de PGE2 qui induit l'expression de l'aromatase (Subbaramaiah et al., 2019). L'augmentation des hormones stéroïdiennes sexuelles est impliquée dans la progression des cancers du sein et de l'endomètre (Khandekar et al., 2011).

Tous ces effets sont causés par l'obésité, pathologie dont l'origine n'est pas à proximité du cancer du sein. Il est important de déterminer si le tissu mammaire peut impacter directement la progression tumorale. Lors d'une co-culture d'adipocytes et de cellules de cancer de sein, on observe une baisse du nombre d'adipocytes ainsi que de leur contenu lipidique. On observe aussi une perte du marqueur CD36 permettant l'incorporation des lipides dans les adipocytes entourant les tumeurs (DeFilippis et al., 2012; Dirat et al., 2011). Comme mentionné précédemment, le tissu adipeux mammaire libère des lipides et sécrète des cytokines. Le relargage de lipides par la lipolyse mène à la captation des acides gras par les cellules tumorales. L'induction de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires altère le comportement des cellules cancéreuses. Il a aussi été démontré que les cancers du sein apparaissant pendant la grossesse, au début ou la fin de la phase de lactation deviennent plus agressifs et amènent un pauvre pronostic de survie. Ces effets comme indiqués précédemment sont principalement reliés au changement de la fraction stromale, de la matrice extracellulaire ainsi qu'aux cellules immunitaires (Bemis et Schedin, 2000; Callihan et al., 2013; Lyons et al., 2011; Martinson et al., 2015; McDaniel et al., 2006; Schedin et al., 2007). La figure 50 présente un résumé des effets du tissu adipeux obèse sur le développement tumoral.

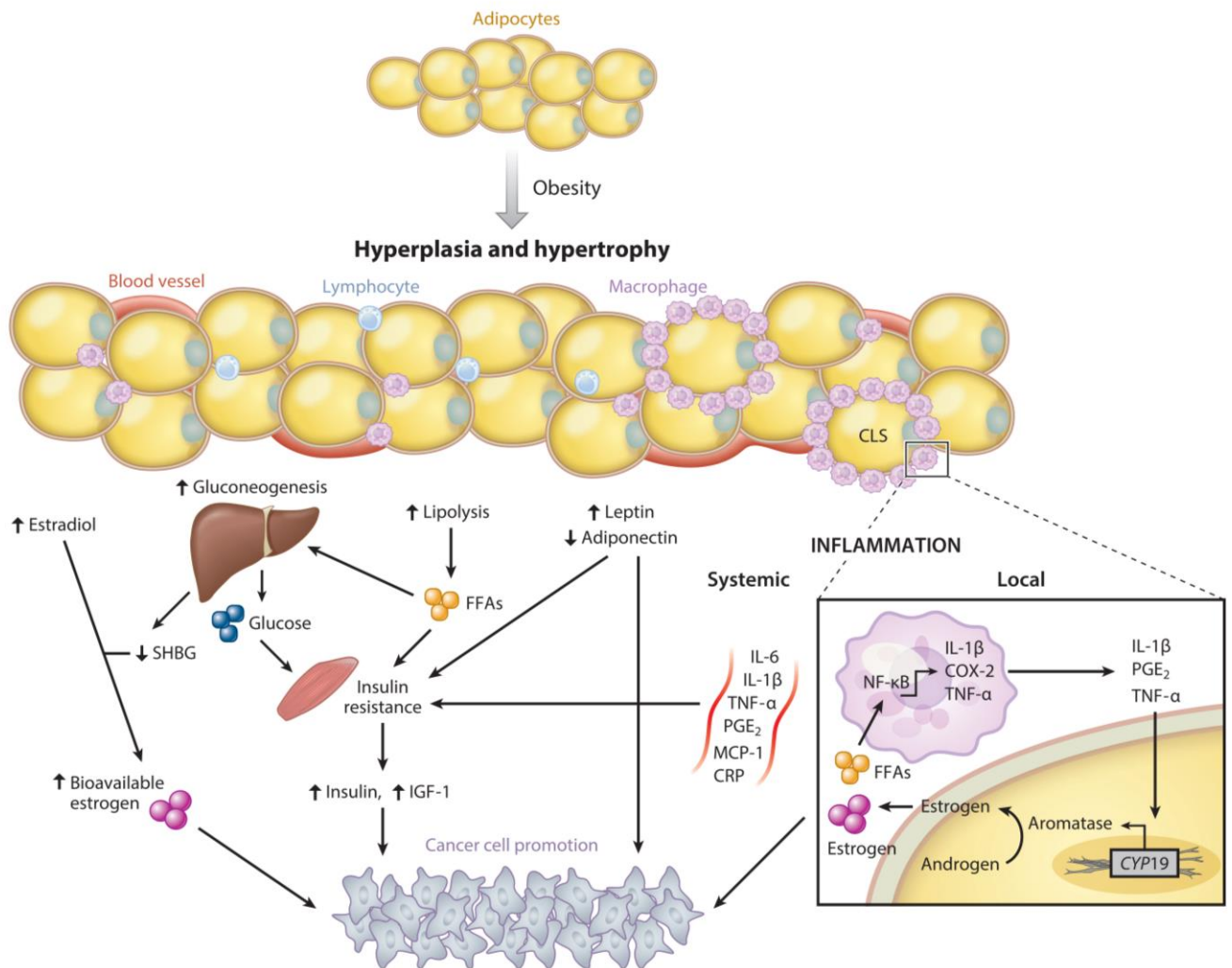


Figure 50 : Effet du tissu adipeux obèse sur la progression du cancer. Illustration d'après Iyengar et *al.*, Annual review of medicine, 2015.

4.3.2 Impact du cancer sur le tissu adipeux

Le TA peut libérer plusieurs facteurs pour promouvoir prolifération, invasion et métastase du cancer. Tout comme le système immunitaire, le système vasculaire et les fibroblastes, le cancer peut par divers signaux utiliser le TA à son avantage pour la progression tumorale.

- Concept de cachexie associée au cancer

La cachexie associée au cancer (CAC) est un processus d'inflammation systémique, de perte de poids corporel, d'atrophie du TA ainsi que la perte des muscles. Cependant, la perte du TA se déroule bien avant celle des muscles. Cette complication est observée dans les stades avancés du cancer et est responsable d'environ 20% des morts reliées au cancer (Fearon et al., 2013, 2012; Tisdale, 2002). La CAC peut alors affecter le TA de deux manières : soit un brunissage soit une lipolyse. Mon projet de recherche porte sur le brunissage du TA et la lipolyse mais en aucun sur la CAC.

- Lipolyse du TA

Les cellules cancéreuses pancréatiques à proximité des adipocytes augmentent la lipolyse permettant la libération d'AGL ce qui induit leur invasion tumorale. On remarque que la taille des adipocytes diminue fortement à proximité de la tumeur (Okumura et al., 2017). De plus, un milieu conditionné provenant de ces cellules cancéreuses permet d'induire une lipolyse par la phosphorylation de HSL (Sagar et al., 2016). Chez la souris, un modèle génétique spécifique a été développé afin d'induire une perte de poids de plus de 15% vers 6-8 mois d'âge (Petruzzelli et al., 2014). On observe de forts niveaux de glycérol et d'AGL libérés au niveau du TA ainsi que l'expression élevée d'enzymes impliquées dans la lipolyse, notamment ATGL et HSL.

- Brunissage du TA

Les phéochromocytomes humains furent les premiers cancers connus pour induire un brunissage du WAT par le relargage de catécholamines (Frontini et al., 2013; Ricquier et al., 1982). Dans le même modèle génétique de perte du TA, on constate une augmentation du marquage d'UCP1 dans le WAT ainsi que d'une forte diminution de la taille des gouttelettes lipidiques

(Petruzzelli et al., 2014). L'induction d'UCP1 est corrélée avec l'augmentation de plusieurs gènes reliées au brunissage tels que *Pgc1a*, *Ppar α* , *Cidea*, *Prdm16*, et avec l'augmentation de l'ADNmt ainsi qu'une hausse de la consommation en oxygène. Dans un modèle de cancer du poumon, l'injection de cellules LLC (Lewis lung cancer) chez la souris entraîne une perte de poids en 3 semaines similaire à celle observée chez les souris à 6-8 mois d'âge (Kir et al., 2014). Cette perte de poids touche la masse adipeuse de différents dépôts et on constate une augmentation des enzymes impliquées dans la lipolyse ainsi que les gènes induisant *UCP1*. Des xénogreffes chez la souris à partir de cellules épithéliales mammaires transformées par l'oncogène HRAS24 induisent aussi l'apparition de marqueurs bruns/bruns dans les adipocytes à proximité de la tumeur (Singh et al., 2016).

- Inducteurs du brunissage par les cancers

Les catécholamines furent les premières molécules identifiées pour induire le brunissage du TA. Cependant, cette molécule n'est pas seule sécrétée par les cancers. On retrouve FGF21, IL-6 et PTHrP dans le cancer du poumon qui sont des inducteurs du brunissage et de l'expression d'UCP1 dans les mitochondries (Hondares et al., 2014; Kir et al., 2014; Petruzzelli et al., 2014). Je me suis concentré sur l'étude d'un peptide sur le brunissage du TA : l'adrénomedulline.

4.3.3 Adrénomedulline

L'adrénomedulline (ADM) fut isolée à partir de phéochromocytomes, des tumeurs situées au niveau de la glande surrénale humaine (Kitamura et al., 1993). Ce peptide est reconnu comme étant le vasodilatateur le plus puissant. L'ADM est fortement exprimée chez les patients atteints du cancer et ce dans plusieurs types de cancers (Larráyo et al., 2014).

- Processus physiologiques impliquant l'ADM

Sa signalisation entraîne plusieurs effets biologiques : vasodilatation, angiogenèse, sécrétion d'hormones, prolifération et apoptose (Bunton et al., 2004). L'ADM permet d'induire la formation de vaisseaux lymphatiques par la forte présence de son récepteur au niveau des CE lymphatiques comparativement aux CE de vaisseaux sanguins (Fritz-Six et al., 2008). L'injection systémique d'ADM réduit la pression artérielle et la résistance vasculaire périphérique mais augmente le rythme cardiaque ainsi que l'angiogenèse (Nicholls, 2004). On observe l'augmentation des niveaux plasmatiques d'ADM afin renverser les effets délétères de certaines pathologies telles que l'insuffisance cardiaque, l'infarctus du myocarde, l'athérosclérose, l'hypertension et le choc septique (Chen et Li, 2013a, 2013b; Kobayashi et al., 1996; Kohno et al., 1996; Nakayama et al., 1999; Nishikimi et al., 2003).

- Structure et régulation

L'ADM fait partie de la famille des CGRP (Calcitonin gene-related peptide) incluant CGRP, amyline et l'interméline, cette dernière est aussi connue sous le nom d'adrénomedulline-2 (ADM2) (Roh et al., 2004; Takei et al., 2004). La forme mature de l'ADM dérive d'une forme pré-pro-adrénomedulline contenant 185 acides aminés chez l'humain (Figure 51). Ce peptide sera clivé pour donner les 21 résidus n-terminaux du peptide signal, la pro-adrénomedulline qui sera convertie en adrénomedulline mature (52 acides aminés) et en PAMP (Proadrenomedullin N-terminal 20-peptide), un autre peptide actif (Bełtowski et Jamroz, 2004). ADM est transcrit majoritairement par le stress oxydatif ainsi que par des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α et l'IL-1 (Hinson et al., 2000). L'hypoxie est un inducteur majeur de la transcription d'*Adm* via HIF-1 par les sites de réponses à l'hypoxie (Garayoa et al., 2000; Ladoux et Frelin, 2000). Chez l'homme, la concentration plasmatique d'ADM se situe entre 2 et 10 pM et son temps de demi-vie est de 20

minutes. La dégradation initiale d'ADM s'effectue par MMP2 suivie d'une aminopeptidase (Dupuis et al., 2005; Martínez et al., 2004).

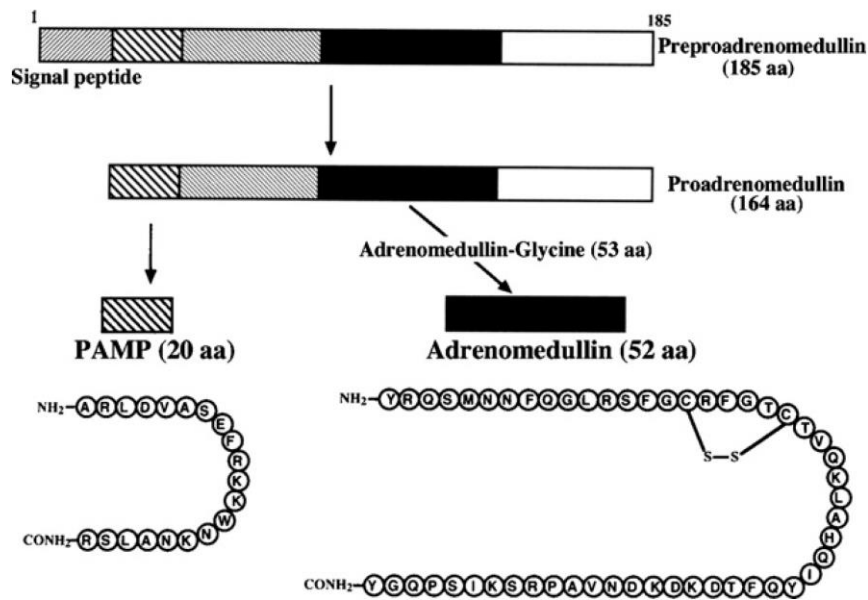


Figure 51 : Maturation de l'adrénomédulline et de la PAMP à partir du pré-pro-peptide. Illustration d'après Li et al., Peptides 2007.

- Récepteurs et signalisation de l'ADM

La partie C-terminale du peptide mature doit être amidée et posséder un anneau de 6 acides aminés reliés par un pont disulfure entre les résidus 16 et 21 afin d'interagir et d'activer son récepteur (Pérez-Castells et al., 2012). La signalisation de l'ADM s'effectue à travers CRLR (Calcitonin receptor-like receptor) qui fait partie de la famille des GPCR à 7 domaines transmembranaires (Poyner et al., 2002) (Figure 52). Cependant, CRLR seul n'est pas suffisant pour induire une réponse. Il doit s'associer avec une protéine modulatrice possédant un seul domaine transmembranaire appelée RAMP (Receptor activity modifying protein). Il existe trois isoformes (RAMP1, RAMP2 et RAMP3) qui se lient avec CRLR au niveau du réticulum endoplasmique afin d'être transportés à la membrane. La combinaison RAMP1-CRLR va donner un récepteur de haute affinité pour CGRP (nommé récepteur CGRP) (Qi et al., 2008). L'ADM se lie avec soit la combinaison RAMP2-CRLR ou soit RAMP3-CRLR (respectivement nommé

récepteur 1 et 2 de l'adrénomedulline : AMR₁ ou AMR₂). L'invalidation des gènes *Adm*, *Crlr* ou *Ramp2* chez la souris entraîne la mort embryonnaire due à un œdème causé par la malformation des vaisseaux (Dackor et al., 2006; Ichikawa-Shindo et al., 2008; Shindo et al., 2001). L'invalidation de RAMP3 n'entraîne pas la mort embryonnaire des souris mais leur poids diminue à partir de 9-10 mois comparativement aux souris sauvages (Dackor et al., 2007). Ceci prouve les différentes fonctions physiologiques des deux RAMP ainsi que de l'importance de la signalisation ADM-AMR₁ dans l'homéostasie vasculaire. En condition physiologique, RAMP2 est dominant. L'expression de ces isoformes varie dans certaines situations correspondant à des niveaux d'ADM élevées telles que la grossesse, la septicémie ou la défaillance cardiaque où l'expression de RAMP3 est plus élevée (Gibbons et al., 2007; Jacob et al., 2012; Nikitenko et al., 2013). La signalisation après liaison de l'ADM à son récepteur nécessite la protéine RCP (Receptor component protein) qui va permettre le couplage du complexe avec la sous-unité G α_s (Prado et al., 2002). Il existe trois voies de signalisation principales : la formation d'AMPc par l'AC, la voie PI3K/Akt et MAPK/ERK (Belowski et Jamroz, 2004). L'AMPc active sa voie de signalisation à travers PKA, ce qui augmente le calcium cytosolique et stimule la formation d'oxide nitrique. L'oxide nitrique induit la relaxation des cellules périvasculaires ainsi qu'une augmentation de la perméabilité des vaisseaux (Shimekake et al., 1995). L'oxide nitrique, par la suite, inhibe l'apoptose des CE (Sata et al., 2000). La voie PI3K/Akt dans les CE entraîne plusieurs effets dont la vasodilatation, la survie, la prolifération et la migration (Nishimatsu et al., 2001). L'angiogenèse des CE nécessite la stimulation en plusieurs étapes d'AMR₁ et d'AMR₂ (Fernandez-Sauze et al., 2004). ADM favorise la croissance et la survie des CE par la voie MAPK/ERK (Fritz-Six et al., 2008).

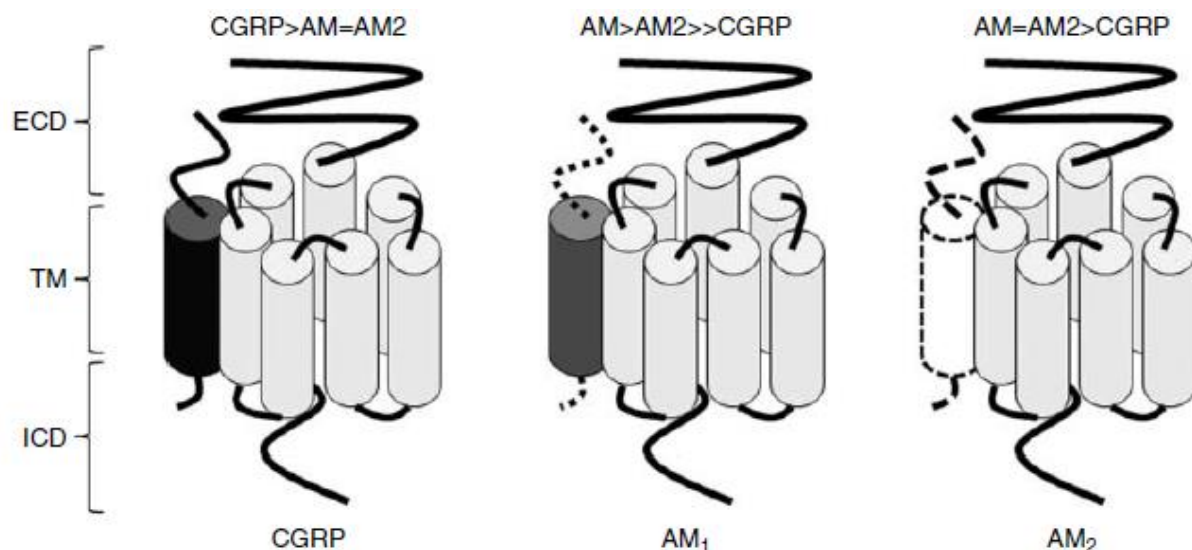


Figure 52 : Composition des différents récepteurs de l'adrénomédulline ainsi que leur affinité pour le peptide. Illustration d'après Hay et *al.*, *Endocrine-related cancer*, 2011.

- ADM et cancer

L'expression de l'ADM ainsi que celle de ses récepteurs se retrouvent dans plusieurs types de cancer tels que le sein, les poumons, prostate, colon et les ovaires (Hay et al., 2011; Miller et al., 1996; Zudaire et al., 2003). Généralement, le centre d'une tumeur contient une zone hypoxique et dans la lignée tumorale de sein MCF7, l'hypoxie augmente l'expression de l'ADM (Garayoa et al., 2000). La délétion d'HIF-1 α ou d'HIF-1 β dans différentes lignées a permis de valider cette hypothèse. L'ADM permet d'induire la prolifération tumorale, l'angiogenèse des CE, la résistance à l'apoptose ainsi que l'évasion des cellules cancéreuses face au système immunitaire (Larráyo et al., 2014; Martínez et al., 2002; Nakamura et al., 2006; Nikitenko et al., 2006; Zudaire et al., 2003). Chez 80% des patientes atteintes du cancer, on mesure une expression augmentée du peptide ainsi que 80% de risques de développer des métastases (Coleman, 2001; Siclari et al., 2006; Tubiana-Hulin, 1991). Ces métastases se situent au niveau des ganglions lymphatiques impliquant l'ADM dans le potentiel métastatique du cancer par la voie lymphatique (Oehler et al., 2003).

L'injection d'un inhibiteur compétitif de l'ADM diminue la croissance tumorale ainsi que la néovascularisation associée au cancer chez plusieurs lignées dont le sein, colon, pancréas, poumon (Ishikawa et al., 2003; Kaafarani et al., 2009; Miseki et al., 2007). La délétion de cette protéine augmente la sensibilité à la chimiothérapie chez les cellules cancéreuses ovariennes (Chen et al., 2012). L'inactivation de l'ADM chez la souris résulte en une diminution de la prolifération des cellules cancéreuses ainsi que du nombre de vaisseaux lymphatiques (Karpnich et al., 2013).

L'injection du peptide d'adrénomédulline n'augmente pas la prolifération des cellules tumorales ni de l'angiogenèse mais augmente significativement la lymphangiogenèse. La surexpression du peptide dans les souris augmente la taille des vaisseaux lymphatiques (Karpnich et al., 2013). La surexpression de l'ADM dans les cellules tumorales de sein n'altèrent pas la croissance cellulaire ni la sécrétion d'autres peptides *in vitro* (Siclari et al., 2014). Néanmoins, l'injection de ces cellules dans le TA mammaire de souris s'accompagne d'une accélération du processus métastatique reliée à une diminution des chances de survie comparativement à l'injection de cellules contrôles. Au niveau des métastases, la forte production de l'ADM augmente la résorption de la matrice osseuse par l'élévation du nombre d'ostéoclastes. Cependant, l'utilisation d'un antagoniste contre l'ADM réduit drastiquement la croissance tumorale au niveau des os. La figure 54 résume les effets de l'ADM sur la progression tumorale.

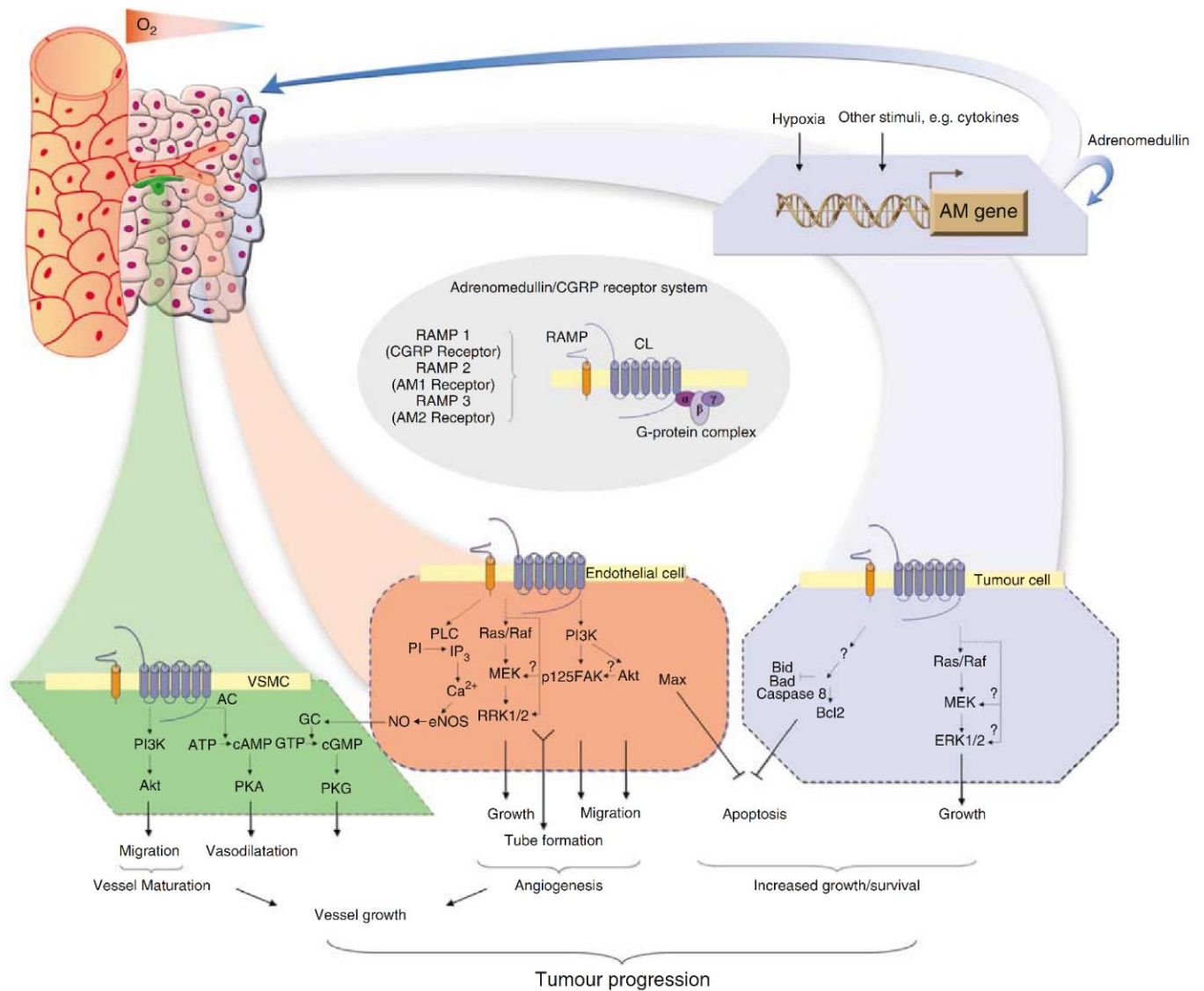


Figure 53 : Effets de l'adrénomédulline sur la progression tumorale. L'hypoxie causée par la tumeur augmente la production d'adrénomédulline qui favorisera le formation de vaisseaux, principalement sanguin, ainsi que la prolifération des cellules cancéreuses. Illustration d'après Nikitenko et *al.*, British journal of cancer, 2006.

Une seule étude a mis en évidence le rôle de l'ADM dans la lipolyse du TA par l'utilisation d'un milieu conditionné provenant de cellules pancréatiques (Sagar et al., 2016). Les cellules cancéreuses pancréatiques sécrètent des exosomes contenant de l'ADM ainsi que des cytokines pro-inflammatoires dans le milieu conditionné. Ce milieu induit la lipolyse par la phosphorylation de l'enzyme HSL mais on constate aussi une augmentation de la phosphorylation de p38. L'utilisation d'un inhibiteur spécifique (AS-60449) aux deux récepteurs de l'ADM inhibe

complètement la phosphorylation des protéines et de la lipolyse stimulées par le milieu conditionné. Cependant, aucune information sur le brunissage du TA par l'ADM sécrétée par le cancer n'a été fournie puisque la majorité des études de ce peptide a porté principalement sur son rôle dans le maintien cardiovasculaire.

Modèles cellulaires

1) hMADS

Mon projet de recherche utilise des cellules générées par mon laboratoire de puis plus de 10 ans : les cellules hMADS (human Multipotent Adipose-Derived Stem Cells) (Rodriguez et al., 2004). Ces cellules souches mésenchymateuses ont été prélevées à partir de tissu adipeux provenant de jeunes patients. Elles sont utilisées par de nombreux laboratoires dans le monde pour leurs capacités d'auto-renouvellement ainsi que leurs aptitudes à se différencier en plusieurs types cellulaires.

En effet, en plus d'être capables de se différencier en cellules adipocytaires, les hMADS peuvent se différencier en chondrocytes et ostéoblastes *in vitro* (Elabd et al., 2007; Rodriguez et al., 2004; Roux et al., 2013). La transplantation de ces cellules dans les muscles de souris dystrophiques (modèle *mdx*) permet l'apparition de la forme humaine de la dystrophine, une protéine musculaire (Rodriguez et al., 2005). Par l'expression ectopique de MyoD1, les hMADS ont la possibilité de former des myotubes *in vitro* et *in vivo* (Goudenege et al., 2009). Par leur forte capacité d'expansion et de différenciation en plusieurs types cellulaires, les hMADS peuvent être considérées comme un outil important dans l'étude de nouvelles thérapies ciblant les cellules souches du tissu adipeux.

L'utilisation d'un cocktail adipogénique établi par mon laboratoire permet différencier les hMADS en cellules possédant un fort potentiel adipogénique. Plus de 90% des cellules différenciés possèdent des gouttelettes lipidiques après coloration par l'Oil red O, qui marque les triglycérides et les lipides. La différenciation des cellules hMADS permet d'obtenir des cellules ayant les propriétés morphologiques et propriétés fonctionnelles des adipocytes blancs humains. Ces cellules peuvent sécréter de la leptine et de l'adiponectine, capter du glucose en réponse à l'insuline ainsi qu'induire une lipolyse après stimulation β -adrénergique (Rodriguez et al., 2004). La

différenciation adipocytaire en présence d'un agoniste spécifique de PPAR γ (rosiglitazone) sur ces cellules de manière chronique oriente la différenciation vers des cellules possédant la capacité thermogénique. Elles expriment alors UCP1 mais aussi CIDEA, PGC-1 α et DIO2 (Elabd et al., 2007). Ces cellules n'expriment pas le marqueur Myf5 et peuvent donc être considérées comme étant des adipocytes brites. De même un traitement court terme (2-4 jours) de ces cellules par la rosiglitazone est suffisant pour induire une transdifférenciation vers des adipocytes brites avec augmentation de la masse mitochondriale, expression d'UCP1 et découplage de la respiration (Elabd et al., 2007; Pisani et al., 2011). Ces cellules représentent l'un des meilleurs modèles humains pour étudier la conversion blanc-brite des adipocytes. D'autre part, leur propriété d'auto-renouvellement et de différenciation adipocytaire blanche ou brite permettent d'en faire un excellent modèle pour l'étude des effets des IPs ou du cancer sur ces mécanismes.

2) Progéniteurs de genou et menton

Mon laboratoire étudie, en parallèle, les caractéristiques et propriétés de différents PAs provenant de dépôts adipeux distincts dans un contexte d'utilisation des cellules pour la chirurgie réparatrice. Nous avons obtenu des PAs provenant de la SVF du genou (face postérieure) et du menton d'un même patient. Ces PAs seront identifiés sous les noms PAs-genou et PAs-menton. Ces deux types de PAs possèdent des marqueurs et des caractéristiques différents puisque l'expression de Pax3 qui est un marqueur neuro-ectodermique associée à la crête neurale, est retrouvé chez les PAs-Menton. Ces cellules différenciés expriment la protéine UCP1 et présentent des caractéristiques propres aux adipocytes bruns (Kouidhi et al., 2015). En revanche, les PAs-Genou différenciés n'expriment pas UCP1 et possèdent des niveaux très bas de Pax3 leur donnant des caractéristiques se rapprochant des adipocytes blancs. Ces PAs représentent des modèles

différents de cellules pour évaluer les effets des IPs sur la prolifération, l'auto-renouvellement ainsi que sur la différenciation adipocytaire blanche/brune.

3) Cellules tumorales

Ces cellules ont été utilisées pour la dernière partie de mon travail de thèse. Nous avons choisi deux types de cellules tumorales : les cellules MCF7 et MDA-MB-231. Ces lignées de cellules sont très utilisées car elles ont servi de modèle pour 2/3 des études sur le cancer du sein (Lacroix et Leclercq, 2004). La majorité de mes expériences sont faites sur les MCF7.

- MCF7 : Ces cellules proviennent chez une patiente caucasienne de 69 ans atteinte d'un adénocarcinome épithélial mammaire métastatique ductal et ont été mises en culture à partir d'une effusion pleurale (Lee et al., 2015). Son nom dérive de Michigan Cancer Foundation-7, le centre de recherche où la lignée fut établie en 1973 (Soule et al., 1973). Ces cellules sont classées comme étant une lignée tumorale de type Luminal A non invasive et possèdent plusieurs caractéristiques : formation de tumeur primaire, expression des récepteurs ER et PR et absence de HER2. Ces cellules prolifèrent en présence d'œstrogènes et forment des tumeurs chez la souris seulement en présence d'œstrogènes (Levenson et Jordan, 1997).

- MDA-MB-231: Cette lignée épithéliale provient aussi d'une effusion pleurale d'un carcinome chez une patiente de 53 ans au MD Anderson Center (Cailleau et al., 1978). Elles n'expriment pas ER, PR et HER2 la classant dans les cancers du sein triples négatifs très invasifs (Cailleau et al., 1974)). Ces cellules sont enrichies pour des marqueurs d'EMT ainsi que de CSC (Holliday et Speirs, 2011). Elles sont habituellement utilisées comme outil pour l'étude de la formation des métastases dans les os (Simmons et al., 2015).

Objectifs

Le tissu adipeux est un organe majeur dans l'homéostasie énergétique du corps humain. D'un côté, le WAT stocke et relargue des lipides alors que le BAT utilise les lipides afin de produire de la chaleur. Ces tissus possèdent des fonctions endocriniennes propres. Néanmoins, la simple perturbation de leurs fonctions dans diverses pathologies peut entraîner des désordres métaboliques ayant des conséquences graves pour l'individu. Au cours de ma thèse, j'ai étudié l'impact de deux pathologies sur la fonction et les propriétés des adipocytes : les lipodystrophies associées à la thérapie HAART pour contrer la propagation du VIH et le cancer du sein.

Dans la thérapie HAART, la combinaison des IPs et de l'INTI a permis de réduire considérablement la propagation du VIH avec une diminution de la charge virale ainsi qu'à l'augmentation de l'espérance des patients. Néanmoins, cette thérapie entraîne des effets secondaires, principalement au niveau du tissu adipeux. Elle induit une baisse de la masse de certains dépôts spécifiques et une hausse des lipides circulants, ce qui entraîne une résistance à l'insuline (Carr et Cooper, 2000). Les effets des IPs sur la différenciation adipocytaire blanche sont bien décrits (Caron et al., 2003). Cependant, l'impact des IPs sur les différents dépôts ainsi que la différenciation brune n'a pas été reportée. Très peu d'études se sont concentrées sur les effets des IPs sur les différents PAs, cellules importantes pour régénérer les adipocytes.

Le cancer modifie le tissu adipeux autour de son site de développement. Il induit une lipolyse pour produire des acides gras qu'il utilisera comme substrat énergétique. Certains types de cancer tels que les phéochromocytomes peuvent même induire une conversion des adipocytes blancs en adipocytes bruns. Certains inducteurs sécrétés par les cellules tumorales ont été identifiés comme l'adrénaline et la PTHrP mais les relations entre cellules tumorales et adipocytes ne sont pas toutes connues.

Ma thèse a consisté à analyser comment certaines molécules altèrent l'auto-renouvellement des PA du tissu adipeux ainsi que la conversion métabolique des adipocytes. En utilisant des PAs pouvant se différencier en cellules adipocytaires blanches ou brunes, j'ai abordé les points suivants :

- 4) Effets des IPs sur les PAs de différents dépôts dans l'auto-renouvellement.
- 5) Effets des IPs sur la différenciation adipocytaire brune et la signature thermogénique.
- 6) Identification d'une molécule produite par le cancer du sein entraînant le brunissage du tissu adipeux : l'adrénomedulline.

Résultats

1) Effets des IPs sur les PAs de différents dépôts dans l'auto-renouvellement.

- Introduction

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés aux effets des IPs sur l'auto-renouvellement des PAs. Comme vu dans l'introduction, le tissu adipeux est réparti dans différents dépôts qui possèdent des signatures spécifiques. Dans des contextes pathologiques comme l'obésité et les lipodystrophies, certains dépôts seront plus affectés que d'autres. L'expansion du tissu adipeux au cours de l'obésité fut précédemment étudiée dans mon laboratoire associée à l'augmentation d'IER3 (Ravaud et al., 2015). Dans les lipodystrophies associées à la thérapie HAART, il est connu que les IPs induisent la perte ou le gain dans des dépôts spécifiques. Puisque ces dépôts n'ont pas la même sensibilité pour diverses molécules pharmacologiques, il est important de pouvoir évaluer l'hétérogénéité des effets des IPs au niveau des différents PAs. Nous avons comparé les effets de deux IPs : le Lopinavir (LPV) et le Darunavir (DRV) sur ces progéniteurs. Le LPV fut le plus utilisé dans la thérapie HAART et ses effets secondaires ont déjà été étudiés dans mon laboratoire (Djedaini et al., 2009; Vernochet et al., 2005). Le DRV est un IP de dernière génération dont les effets indésirables sont moins bien connus. Nous avons utilisé ces deux molécules afin de comparer les effets sur l'auto-renouvellement des PAs ainsi que de découvrir de nouvelles cibles moléculaires affectées par ce traitement. Nous avons utilisé les cellules hMADS ainsi que les PAs- genou et les PAs-menton puisqu'ils ne possèdent pas la même «signature génétique».

- Article: **Impairment of the Activin A autocrine loop by lopinavir reduces self-renewal of distinct human adipose progenitors**

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

Impairment of the activin A autocrine loop by lopinavir reduces self-renewal of distinct human adipose progenitors

Christophe Ravaud¹, Martin Paré¹, Stéphane Azoulay², Christian Dani¹ & Annie Ladoux¹

Maintenance of the adipose tissue requires a proper balance between self-renewal and differentiation of adipose progenitors (AP). Any deregulation leads either to fat overexpansion and obesity or fat loss and consequent lipodystrophies. Depending on the fat pad location, APs and adipocytes are heterogeneous. However, information on the pharmacological sensitivity of distinct APs to drugs known to alter the function of adipose tissue, especially HIV protease inhibitors (PIs) is scant. Here we show that PIs decreased proliferation and clonal expansion of APs, modifying their self-renewal potential. Lopinavir was the most potent PI tested. Decrease in self-renewal was accompanied by a reduced expression of the immediate early response gene *IER3*, a gene associated with tissue expansion. It was more pronounced in chin-derived APs than in knee-derived APs. Furthermore, lopinavir lowered the activin A-induced ERK1/2 phosphorylation. Expressions of the transcription factor *EGR1* and its targets, including *INHBA* were subsequently altered. Therefore, activin A secretion was reduced leading to a dramatic impairment of APs self-renewal sustained by the activin A autocrine loop. All together, these observations highlight the activin A autocrine loop as a crucial effector to maintain APs self-renewal. Targeting this pathway by HIV-PIs may participate in the induction of unwanted side effects.

The adipose tissue (AT) represents the most adaptable tissue of an organism. It exists as functionally different depots that display opposite functions to fulfill the energy demand. In response to elevated calorie intake, white adipose tissue expansion allows energy storage as triglycerides. It represents the most abundant adipose tissue in adult humans. In contrast, brown adipose tissue is a key thermogenic organ able to produce heat from nutriment by uncoupling respiration from ATP synthesis. It surrounds the deepest organs¹ and represents the lesser part of adipose tissue. White AT is present all over the human body and is composed of distinct depots that are heterogeneous in terms of cellular composition, proliferation and differentiation^{2,3}.

The adipose progenitor (AP) pool hosted within the adipose tissues is crucial for AT development and to form new fat cells upon appropriated stimulus that induce adipocyte differentiation. This process is essential because like most mature and specialized healthy cells, adipocytes are generated through differentiation of progenitor cells as they do not divide *in vivo*. Thus, the AP pool is directly correlated with adipose tissue development and linked to fat mass⁴. Our lab has recently shown that the AP pools are derived from distinct embryonic origins. In rodents, while the intra-abdominal depots originate from mesoderm, those from the face display a neuro-ectodermal origin⁵. This feature is also encountered in humans since APs from chin and knee do not express the same homeobox genes (*HOX*) code. Indeed, they produce adipocytes displaying different phenotypes: upon adipose differentiation, chin APs give rise preferentially to cells with brown/brite adipocytes features while knee APs are prone to generate white adipocytes⁶. All these observations suggest that the different fat depots are not equal either in terms of structures but also for physiological and metabolic functions. As AP cells need to perpetuate all life long, this pool is located in niches that maintain their intrinsic properties and control the self-renewal throughout adult life. Many factors present in the adipose tissue microenvironment are involved in a proper regulation of the balance between self-renewal and differentiation of these cells, including activin A which maintains the AP pool through autocrine and paracrine mechanisms^{7,8}. In addition, we recently identified

¹Université Côte d'Azur, CNRS, INSERM, IBV, France. ²Université Côte d'Azur, CNRS, ICN, France. Christian Dani and Annie Ladoux contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to A.L. (email: ladoux@unice.fr)

the immediate early response 3 (*IER3*)⁹ as an important gene to control the activin A-induced expansion of this pool of cells⁷. *IER3* is induced in response to distinct microenvironmental effectors that are susceptible to be modulated by therapeutic treatments. However, information linking the sensitivity of the distinct AP pools to drugs that may affect fat depot development is limited. Individual responses of APs to distinct medicines are not well defined so far.

Treatment of AIDS patients with antiretroviral therapy (ART) dramatically improved the life of patients, their immune functions and has reduced morbidity and mortality resulting from AIDS-related complications. Several classes of antiretroviral drugs are used to treat HIV-infected patients. Among them, proteases inhibitors (PIs) prevent the HIV protease to cleave precursor proteins that are essential to form infectious viral particles. Unfortunately, this therapeutic class of molecules displays unwanted side effects which are prejudicial for adhesion of patients to the treatment. In various regimens, PIs have been associated with abnormal fat distribution and selective loss of fat depots, dyslipidemia, hypertriglyceridemia, insulin resistance and an increased risk of cardiovascular diseases^{10,11}. ART therapy has been responsible for the development of acquired lipodystrophies that represents the most predominant type in the population¹² as compared to genetically acquired disorders¹³. Despite the development of new and safer molecules¹⁴, these effects prevail as 57% of the 2–18 years-old HIV-positive population treated with ART displays lipodystrophy¹⁵.

ART therapy induces a loss of the subcutaneous fat, notably within the depots of the face, and an excess deposition in the neck and the abdomen, indicating that all the fat depots are not affected in a similar way¹⁶ and these differences in sensitivity were reported within the same person. The heterogeneity in these various responses may result from intrinsic differences within the precursor cells.

Several reports point out that PIs impair adipocyte differentiation reducing then the number of fat cells generated from APs¹⁷. Of note, the fat loss in AIDS patients worsens with ongoing ART therapy and discontinuation of the treatment neither inverted this situation nor its associated complications. This observation implies that not only the differentiation process is altered by ART therapy. Fewer reports describe the effects of PIs on AP cells issued from distinct fat depots and information on the process leading to a modification of the intrinsic properties of the AP pool in response to ART therapy is rather scant.

A better comprehension of the molecular alterations induced by HIV-ART molecules on APs represents a valuable approach to illustrate the specificity of the distinct depots and to identify the signaling pathways important for adipose tissue development. It also allows a better comprehension of PIs-induced lipodystrophy development that may be of interest to improve the panel of therapeutic options.

In this study, we used HIV-PIs to better understand how self-renewal and differentiation were regulated in APs of different origins. We show that, in addition to our reference model (hMADS cells¹⁸), AP cells isolated from distinct fat depots display heterogeneous sensitivities to HIV-PIs. Lopinavir (LPV) is a peptide mimetic HIV-protease inhibitor. It altered proliferation of APs, chin-derived APs being the most sensitive, and it diminished differentiation of some but not all APs. In contrast, darunavir (DRV), a nonpeptidic antiretroviral protease inhibitor very efficient to decrease the activity of the HIV protease, reduced APs differentiation at high doses and displayed more moderate effects on proliferation. The expression of *IER3* was altered by LPV treatment. In addition, the activinA-induced ERK 1/2 phosphorylation was blunted thus promoting an alteration of the downstream signaling pathway. It especially lowered the expression of the early growth response 1 gene *EGR1*, a transcription factor also known as NGFI-A, Krox-24, ZIF268 and TIS8 which is highly dependent on ERK phosphorylation in self-renewing stem cells^{19,20}. *EGR1* controls important cellular processes including survival, cell growth^{21,22} and appears as a determinant gene targeted by LPV. This cascade of events decreased activin A production and secretion impairing then its ability to maintain self-renewal, either in a paracrine or in an autocrine manner.

All together our results show that alterations of self-renewal properties occurred predominantly in the AP pool issued from the adipose depots of the face in response to LPV and they point out that LPV targets the activin A autocrine loop which is crucial to maintain the AP pool.

Results

Differentiation of APs derived from different adipose depots in presence of PIs is not equivalent.

Lopinavir but not darunavir, altered adipose progenitors differentiation. We measured the impact of DRV treatment on hMADS cells differentiation and compared it to LPV which is known to affect negatively the adipocyte maturation. We used concentrations in the range of those measured in the plasma of PI-treated patients. The therapeutic range for DRV was 10 μ M onwards²³ and it was comprised between 2–12 mg/ml, i.e. 3.2–19 μ M, for LPV²⁴. Indeed treatment of hMADS cells incubated with the differentiation cocktail in presence of 20 μ M DRV allowed the apparition of lipid droplets as shown by Oil Red O staining (Fig. 1A and B) indicating that DRV is a weak inhibitor of adipose differentiation. In contrast differentiation was dramatically affected by a 10 μ M LPV-treatment (Fig. 1C), indicating that the cells responded differently to these two drugs. Larger magnifications are presented in supplementary Fig. 1. These results were further confirmed by analysis of adipose differentiation markers. After 17 days of differentiation in hMADS cells, we observed that DRV significantly decreased the expression of genes important for adipocyte differentiation in a dose dependent manner, such as the transcription factors *C/EBP α* and *PPAR γ* (Fig. 1D–E). In addition, LPV reduced the protein expression of the adipose marker FABP4 (Fig. 1F). Note that LPV treatment led to stronger effect while using lower concentrations as compared to DRV.

APs from distinct fat depots displayed different sensitivity to LPV's effect. We determined the response of APs isolated from two distinct adipose depots from the same donor (chin and knee)⁶ to the inhibitory effect of PIs on the differentiation process.

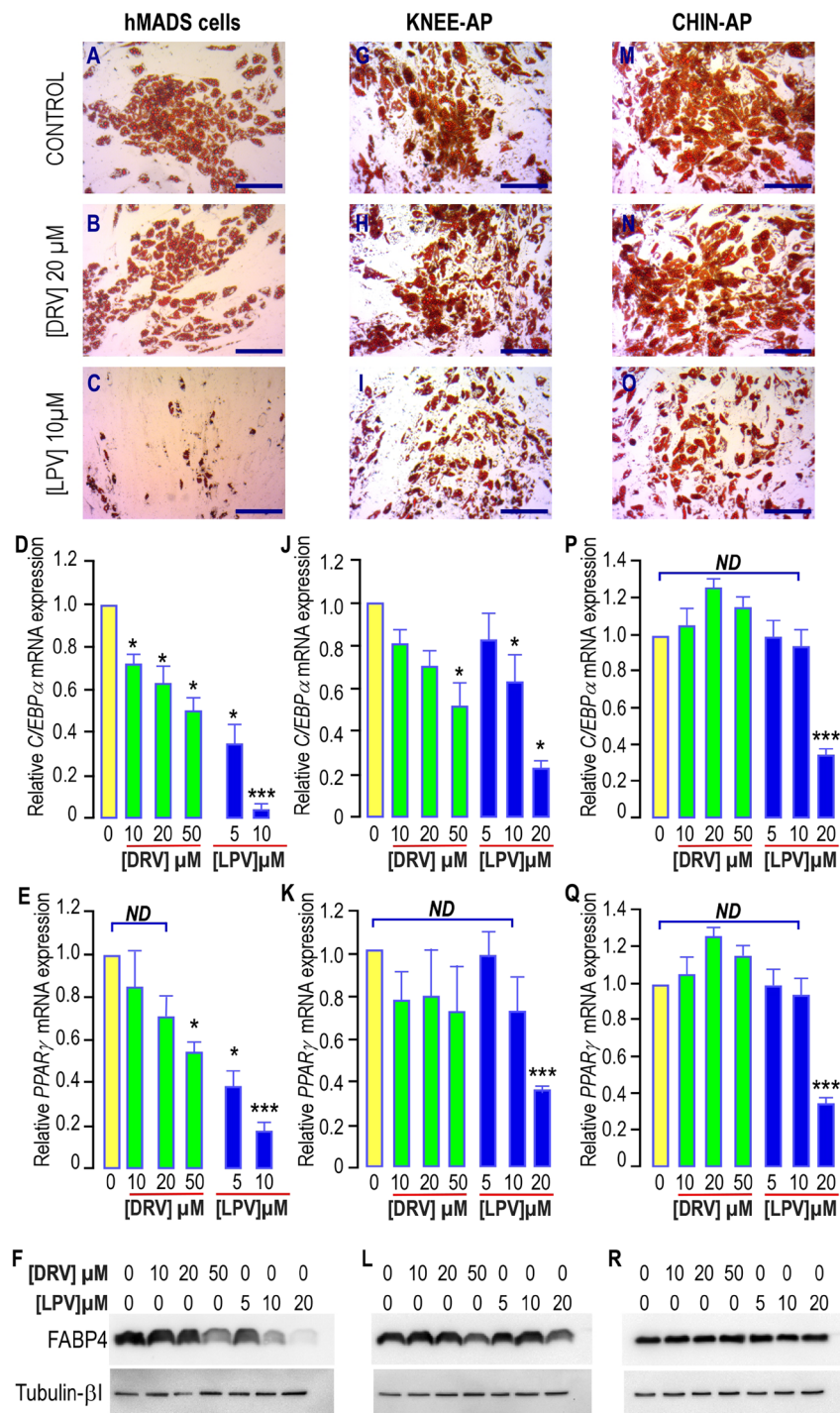


Figure 1. Effects of PIs treatment on differentiation of hMADS cells, chin and Knee APs. (A–C,G–I,M–O) Adipocyte differentiation in hMADS, knee or chin APs. After induction of differentiation for 17 days in absence or presence of PIs at the indicated concentrations, cells were fixed and further stained with Oil Red O. Differentiated cells displayed red staining within the lipid droplets. (D–E,J–K,P–Q) Expression of the adipogenic markers *C/EBPα* and *PPARγ* after 17 days of differentiation in absence or presence of increasing concentrations of PIs. Marker expression was assessed by real-time RT-PCR and normalized for the expression of *36B4* mRNA. Marker expression was measured in cells grown in the differentiation medium in absence of PIs (yellow bars) or in presence of DRV (green bars) or LPV (blue bars). The means \pm SEM. were calculated from 3 (hMADS and knee) and 5 (chin) independent experiments, with determinations performed in duplicate (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). (F,L,R) Expression of the adipogenic marker FABP4 after 17 days of differentiation in absence or presence of increasing concentrations of PIs. FABP4 expression was measured in cells grown in the differentiation medium in absence of PIs or in presence of increasing concentrations of DRV or LPV. Expression of Tubulin-β1 used as a loading control (lower panel) and of FABP4 (upper panel) was analyzed by Western blot using specific antibodies. A typical autoradiograph is shown.

We noted that adipose differentiation occurred in all APs cells treated or not with 20 μM DRV as shown by oil Red O staining (Fig. 1G,H,M,N) while LPV impacted this mechanism in a larger extent without abolishing it (Fig. 1I and O). In good correlation with our observations on hMADS cells, marker analysis revealed a dose-dependent impairment of differentiation when it was carried out in presence of DRV at concentrations higher than 20 μM in APs from knee (Fig. 1J). This result was further confirmed by protein analysis (Fig. 1I). In contrast, no effect was observed on APs derived from chin even at 50 μM DRV and at 10 μM LPV, a concentration that was detrimental for hMADS cells and knee-APs differentiation (Fig. 1D,P and Q). Here again, LPV did not prevent expression of FABP4 in chin-APs (Fig. 1R). Note that *C/EBP α* expression was more sensitive to PIs treatment in chin and knee APs than *PPAR γ* (Fig. 1J, K and P, Q), while these two genes were affected in a similar manner in hMADS cells (Fig. 1D,E).

All together these results indicated that depending on their origins, the different APs exhibit distinct sensitivities to the inhibitory effect of DRV or LPV on differentiation that may reflect the discrepancies observed in the antiretroviral-induced lipodystrophies.

Lopinavir but not darunavir, altered adipose progenitors proliferation. As a decrease in differentiation alone is not sufficient to explain the unwanted side effects of PIs observed in the face of patients treated with PIs, we analyzed the effects of PIs on APs self-renewal.

We first treated hMADS cells with LPV or DRV for 4 days (MTT assay) or 5 days (cell counts) to assess their impact on proliferation. While increasing doses of DRV did not cause a huge decrease in the cell number, LPV treatment significantly reduced proliferation by 25 to 75% for concentrations starting from 10 μM (Fig. 2A and B).

In addition LPV dramatically reduced their ability to grow at a single cell level while DRV did not display any effect. All together these results indicate that LPV, but not DRV, alters self-renewal of hMADS cells (Fig. 2C).

These results prompted us to analyze self-renewal of APs isolated from different sites of the same donor upon PIs treatment. APs derived from chin were significantly impacted mainly by LPV while those derived from knee were less sensitive to PIs treatment (Fig. 2D and E). These results were confirmed after measuring the effects of PIs on proliferation of chin and knee APs both coming from another distinct donor (Supplementary Fig. 2).

We investigated the cytotoxic effects of PIs on APs, as we previously showed that low doses of LPV (1 μM) induced apoptosis in cancer stem cells expressing an embryonic signature²⁵. After four days of culture in presence of LPV or DRV, cells were well attached to the tissue culture dish and more than 99.5% of cells were excluding trypan blue. We did not notice any induction of apoptosis by means of caspase 3 cleavage (Supplementary Fig. 3) indicating that the impairment of APs proliferation induced by HIV-PI did not result from cytotoxic effects.

Signaling pathways altered by PIs. *HIV-PIs' effect on IER3 mRNA expression.* To gain mechanistic insights on PIs' effect, we analyzed *IER3* expression in cells submitted to PIs treatment. In good correlation with the absence of inhibition of proliferation, a 5-day treatment with low doses of DRV did not impact significantly *IER3* expression either in hMADS cells or in the different APs used (Fig. 3A–C). In contrast LPV, which altered dramatically self-renewal, reduced *IER3* by 80% in hMADS cells and in chin APs (Fig. 3A and B). Knee APs were less sensitive as *IER3* expression was only reduced by 40% (Fig. 3C).

We analyzed *IER3* expression after a longer chronic treatment of APs with PIs, as short term outcomes are not always reflecting the changes occurring in life-long cures. Indeed this decrease in *IER3* expression was still observed and was significant when a 35-day treatment was achieved in hMADS cells (Fig. 4A).

This indicated that concomitantly with APs proliferation, LPV impaired *IER3* mRNA expression. Its effects depended on the original location of the distinct APs.

ERK activation was blunted by LPV. We next examined the effects of PIs on signaling pathways important for cell proliferation in hMADS cells grown for 35-days in presence or absence of PIs. We measured the ERK1/2 phosphorylation in response to activin A which is essential to maintain APs (hMADS) self-renewal^{7,8}.

While DRV did not significantly affect ERK 1/2 phosphorylation in response to activin A, LPV dose-dependently blunted the phosphorylation of ERK1/2 observed in response to this factor (Fig. 4B and C). In presence of LPV, we measured a phosphorylation level that was not significantly different from the non-stimulated control level (Fig. 4C).

Neither DRV, nor LPV affected the activin A-induced SMAD2 phosphorylation indicating that this pathway leading to inhibition of differentiation through a decrease in CEBP β -LAP expression is not targeted by PIs (Supplementary Fig. 4).

HIV-PIs modified the immediate early gene EGR1 expression: consequences for INHBA gene expression. To assess the consequences of the LPV-induced limitation in ERK1/2 phosphorylation on the ERK cascade, we measured *EGR1* expression in cells that received or not PIs treatment. We observed that neither a 5-day, nor a 35-day treatment with different concentrations of DRV significantly modified *EGR1* expression (Fig. 5A–D). In contrast, LPV strongly and significantly impaired *EGR1* expression irrespective of the length of the treatment (Fig. 5A–D). Inhibition was already reaching the maximum value at 5 μM LPV in chin-APs. A significant decrease was also observed at the protein level after 35 days of treatment with a 20 μM LPV concentration (Fig. 5E and F).

In addition, from RNA interference experiments with siRNAs to *IER3* that were previously validated⁷, we observed that *EGR1* expression was dependent on *IER3* expression (Fig. 5G), indicating that LPV may alter *IER3* prior to *EGR1*.

We measured the expression of *p53* which is directly controlled by *EGR1* at the transcriptional level²⁶ and of its direct target *p21*. We found that the LPV-induced decrease in *EGR1* expression after 35 days of treatment was accompanied by a significant reduction in the mRNA levels of both *p53* and *p21* (Fig. 5H and I). DRV which does not modify *EGR1* expression did not affect either the expression of *p53* or *p21*. This indicates that the decrease

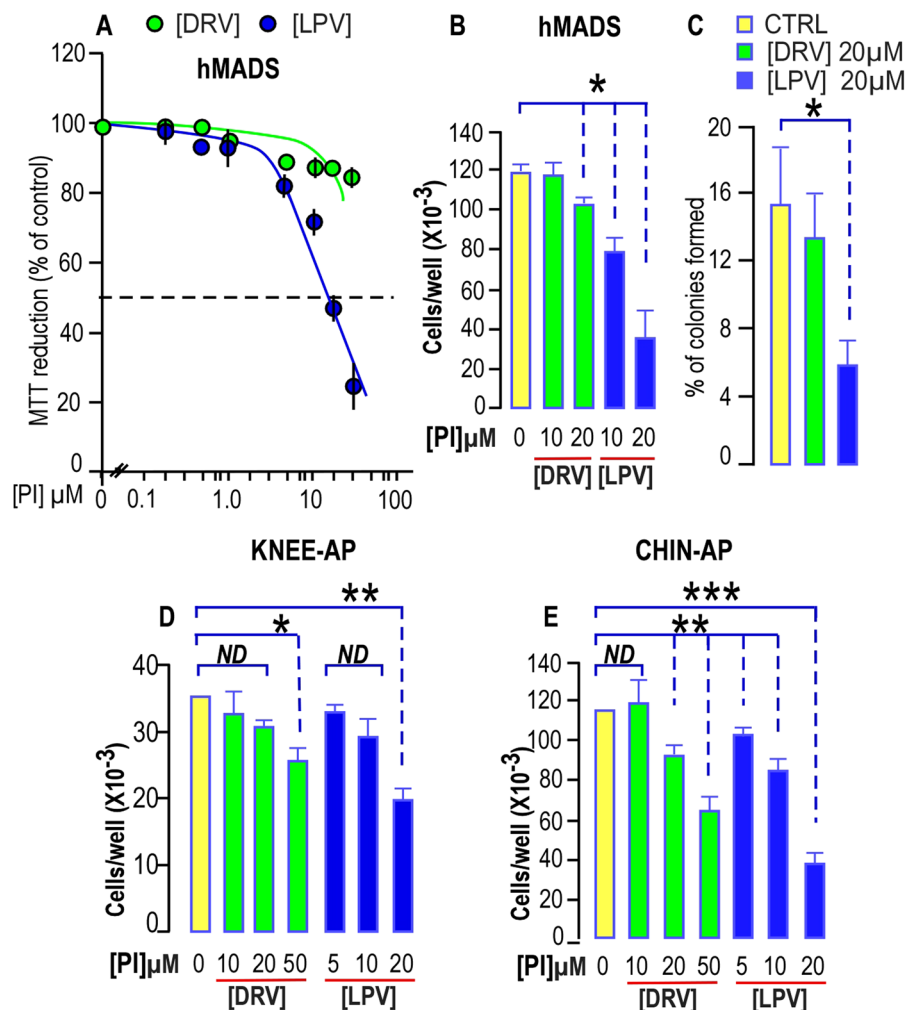


Figure 2. PIs impair proliferation and clonogenicity of hMADS cells, chin and Knee APs. (A) Dose response curve for DRV and LPV effect on hMADS cell proliferation. Proliferation was evaluated using the soluble tetrazolium salt MTT reduction assay after 4 days of proliferation in presence of DRV (green dots) or LPV (Blue dots). The results represent the mean \pm SEM of three experiments carried out in triplicate. Error bars were omitted when the SEM was smaller than the size of the symbol. (B) Dose dependent effects of DRV and LPV on hMADS cell proliferation. Cells were seeded in 12-well plates and grown for 5 days in complete culture medium and counted using a BeckmanZ1 coulter. The results represent the mean \pm SEM of three experiments carried out in triplicate (* $p < 0.05$). (C) Lopinavir but not Darunavir reduces clonogenicity of hMADS cells. After plating and growing 200 cells for 3 weeks in complete culture medium, the percentage of colonies obtained from hMADS cells was calculated. Mean \pm SEM was representative of three independent experiments (* $p < 0.05$). (D,E) Dose dependent effects of DRV and LPV on knee and chin APs cell proliferation respectively. Cells were seeded in 12-well plates and grown for 5 days in complete culture medium and counted using a BeckmanZ1 coulter. Experiment was carried out using APs derived from the same person. The results represent the mean \pm SEM of three experiments carried out in triplicate (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). ND means “no significant difference with the control condition”.

in *EGR1* expression is followed by functional consequences on the gene expression pattern of LPV-treated cells. Although a decreased expression of *p53* may favor cell growth, we did not observe such an event in LPV-treated cells.

In this regard, we focused on pathways important to sustain self-renewal in APs. *In silico* analysis revealed the presence of *EGR1* binding elements in the *INHBA* promoter. We further measured the effect of LPV on *INHBA* expression. After 35 days of treatment with PIs, we observed that LPV decreased significantly *INHBA* expression in hMADS cells while DRV had no effect (Fig. 5).

This observation prompted us to quantify *INHBA* expression in cells treated with PIs for a shorter period, i. e. 5 days. We observed that a short term treatment with LPV was sufficient to reduce *INHBA* expression in hMADS cells and in chin AP (Fig. 6A and B). To confirm these observations, we measured activin A secretion in PI-treated cells. Indeed we noticed that a four-day treatment with LPV reduced activin A secretion (Fig. 6C). All together, our results indicated that LPV altered self-renewal by both decreasing the production of activin A and impairing its signaling pathway, hindering then the autocrine loop sustaining the AP pool.

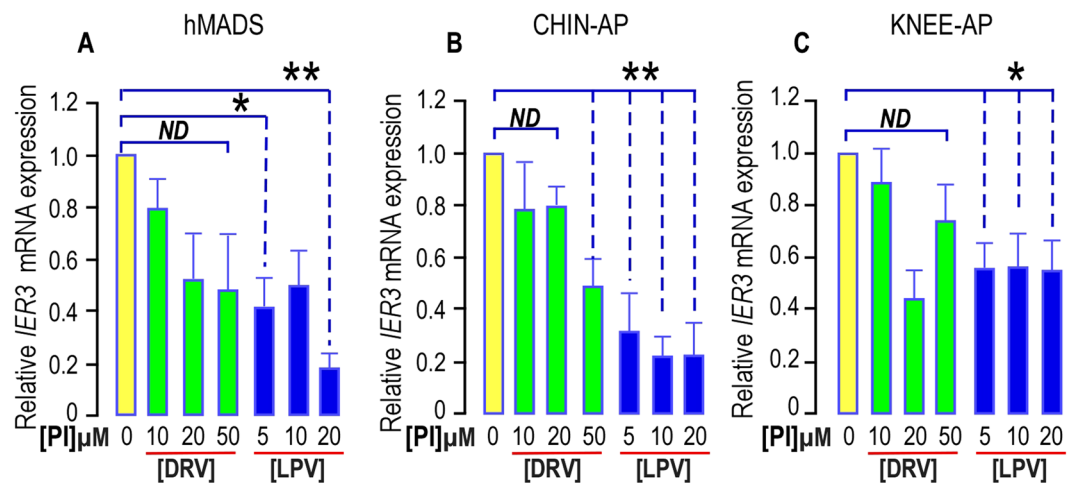


Figure 3. PIs impair *IER3* expression in hMADS cells, chin and Knee APs. *IER3* expression was determined in APs submitted or not to increasing doses of DRV (green bars) or LPV (blue bars) for 5 days. The analysis findings were assessed by real-time RT-PCR and normalized for the expression of *36B4* mRNA. Mean \pm SEM. was representative of three independent experiments. (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$). ND means “no significant difference”.

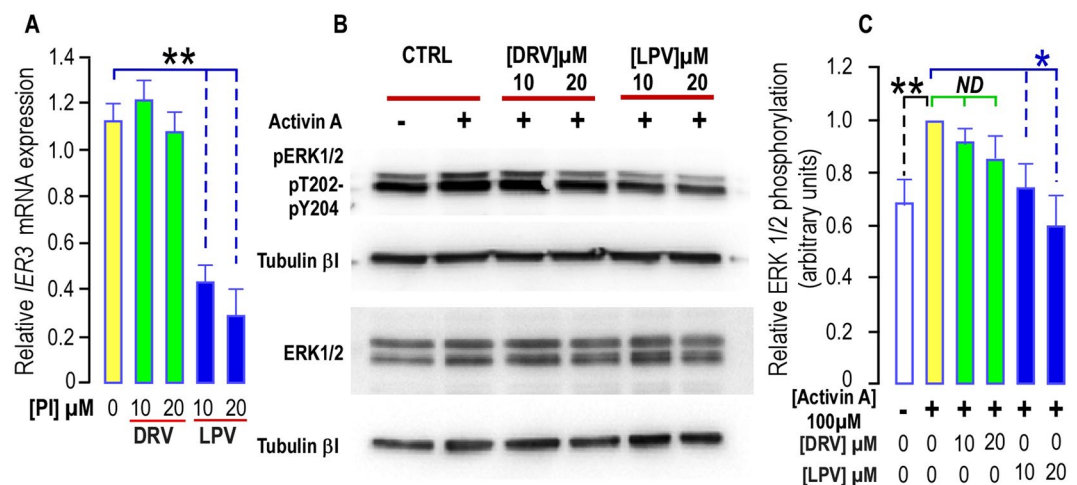


Figure 4. Long term treatment with PIs impairs *IER3* expression and ERK1/2 phosphorylation in hMADS cells. (A) Effect of PIs on *IER3* expression. *IER3* expression was determined in hMADS cells submitted or not to increasing doses of DRV (green bars) or LPV (blue bars) for 35 days. The analysis findings were assessed by real-time RT-PCR and normalized for the expression of *36B4* mRNA. Mean \pm SEM was representative of three independent experiments. (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$). (B) PIs alter Activin A -induced ERK1/2 phosphorylation. Thirty μg of proteins prepared from hMADS cells treated with DRV or LPV for 35 days were loaded onto a 10% acrylamide gel. Sub-confluent cells were stimulated or not with 100 ng/ml activin A after 3 days of serum deprivation. Total or phosphorylated forms of ERK1/2 were assessed with specific antibodies. Activin A induced an increased phosphorylation of ERK1/2 that was blunted in cells treated with LPV. Expression of Tubulin- β I used as a loading control (lower panel). A representative Western blot is shown. (C) Quantification of the signals. The activin A-induced phosphorylation of ERK1/2 was measured using the Quantity one Program and compared to the expression of Tubulin- β I. Four and six determinations were analyzed when cells were treated respectively with DRV and LPV. Analysis was performed taking the unstimulated control as reference (black stars) or the activin A stimulated condition (green and blue stars) (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$). ND means “no significant difference”.

To ensure that EGR1 was involved in this regulation, *INHBA* expression was measured in cells overexpressing *EGR1* after lentiviral transduction. Indeed, we observed that a 3-time increase in *EGR1* expression led to an enhanced expression of *INHBA* (Fig. 6D and E) indicating that expression of *INHBA* was dependent on the presence of EGR1.

The summary of the results and the pathway altered by HIV-PIs is presented in Fig. 7.

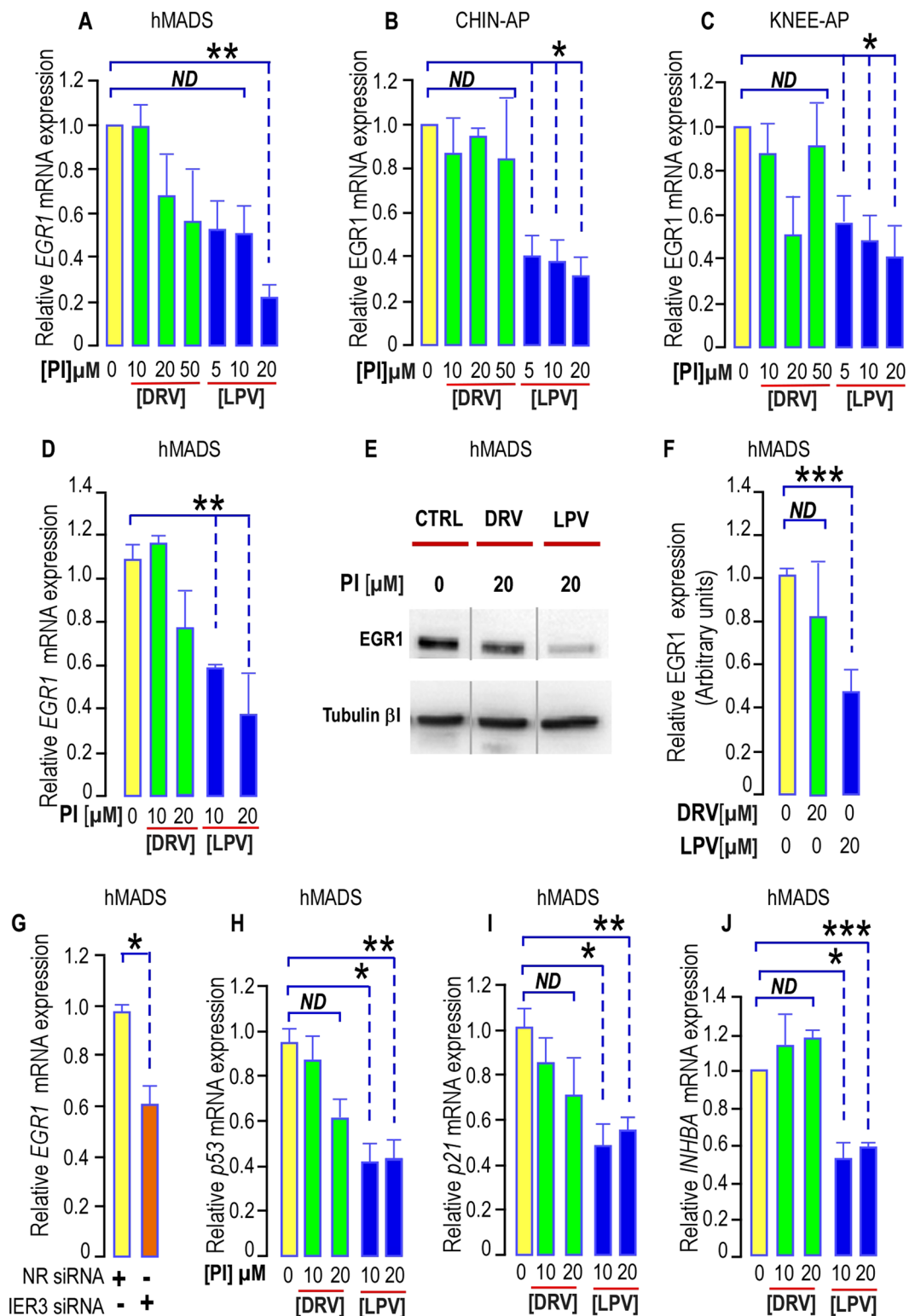


Figure 5. PIs impair EGR1 expression in hMADS cells, chin and Knee APs. (A–D) Effect of PIs on EGR1 expression. (A–C) EGR1 expression was determined in APs submitted or not to increasing doses of DRV (green bars) or LPV (blue bars) for 5 days. The analysis findings were assessed by real-time RT-PCR and normalized for the expression of 36B4 mRNA. Mean \pm SEM, was representative of three independent experiments. (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$). ND means “no significant difference”. (D) EGR1 expression was determined in hMADS cells submitted or not to increasing doses of DRV (green bars) or LPV (blue bars) for 35 days. The analysis findings were assessed by real-time RT-PCR and normalized for the expression of 36B4 mRNA. Mean \pm SEM, was representative of three independent experiments. (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$). (E) LPV decreases EGR1 expression. Thirty μg of proteins prepared from hMADS cells grown for 35 days with DRV or LPV were loaded onto a 10% acrylamide gel. A representative Western blot showing the expression of Tubulin- β i used

as a loading control (lower panel) and of *EGR1* (upper panel) is presented. All bands are issued from the same exposure of the blots. (F) Quantification of the signals. *EGR1* expression was measured using the Quantity one Program and compared to the expression of Tubulin- β L. Four independent determinations were analyzed (***p* < 0.001). ND means “no significant difference”. (G) *EGR1* expression was determined in hMADS cells transfected with non-relevant siRNA or with siRNA to decrease *IER3* expression for 3 days. The analysis findings were assessed by real-time RT-PCR and normalized for the expression of *36B4* mRNA. Mean \pm SEM. was representative of four independent experiments (*p* = 0.0107). (**p* < 0.05). (H,I,J) Expression of *EGR1* downstream genes. *p53*, *p21* and *INHBA* expressions were determined in hMADS cells submitted or not to increasing doses of DRV (green bars) or LPV (blue bars) for 35 days. The analysis findings were assessed by real-time RT-PCR and normalized for the expression of *36B4* mRNA. Mean \pm SEM. was representative of three independent experiments (ND = not significantly different, **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001).

Discussion

APs isolated from different depots display distinct molecular signatures which have been related to their embryonic origin^{5,6}. In this paper we aimed to point out the heterogeneity of APs derived from human distinct fat depots by means of their respective sensitivities to pharmaceutical treatments. We focused on drugs known to affect adipose tissue homeostasis: the PIs which are part of HIV-ART therapy. Among its deleterious side effects, this treatment influences adipose tissues repartition. It promotes lipodystrophy development, leading then to a paucity of fat that impairs energy homeostasis. This represents a relevant approach to pinpoint the specific features (self-renewal and differentiation) of distinct APs and to identify the pathways playing a crucial role in their perpetuation.

We used APs from different origins⁶ in addition to abundantly described models of APs^{17,18}. Ten years ago, the inhibition of adipose differentiation induced by PIs and NRTI was reported in murine as well as human models¹⁷. A lack of differentiation was the only designed culprit responsible for lipodystrophies -even lipoatrophies- and this mechanism appeared as sufficient to explain the evolution of this unwanted side effect. In good agreement with these results, we found here that adipose differentiation of hMADS and APs from knee was drastically impacted by LPV treatment in a dose-dependent manner. However, the chin-derived APs were only impacted significantly when 20 μ M LPV was used, thus pointing out important differences in sensitivity to LPV treatment among the distinct AP pools. This indicated that inhibition of differentiation may not be the major cause of lipoatrophy in the chin fat pad induced by HIV-ART. Indeed we found that proliferation of chin APs was dramatically reduced both by LPV and DRV, LPV being the most efficient molecule for doses as low as 5 μ M significantly impaired cell growth. Note that these molecules did not display cytotoxic effects in APs while low doses of LPV induced apoptosis in cancer stem cells expressing an embryonic signature²⁵, reflecting again huge differences in sensitivity between distinct cell types. In this regard, APs from different depots displayed proper sensitivities to DRV and LPV. We measured this effect in paired samples issued from different donors indicating that it was an unrestricted observation. Proliferation was also reduced in the other APs analyzed here, and this effect has to be considered in addition to the inhibition of differentiation, indicating that several processes may contribute all together to alteration of the fat pads expansion. Absence of differentiation efficiently reduces production of adipocytes when APs are present. In addition any reduction in the AP pool is susceptible to cause adipose tissue remodeling and to decrease fat depot development.

Our *in vitro* observations are in line with clinical reports revealing that different manifestations of the HIV-ART were observed in AIDS patients. As an example, lipoatrophy of the face and neck adipose tissues can be observed concomitantly with hypertrophy of the visceral adipose tissue. These two antagonistic situations could even be observed in the same patient indicating that all adipose depots do not display identical responses to HIV-PI *in vivo*¹⁶. Of note, PIs were reported as lipoatrophy-inducers in the face²⁷. Thus, any shrinkage of the AP pool may account for the irreversible HIV-ART-induced lipoatrophies that were observed.

We then aimed to decipher the molecular mechanisms altered by HIV-ART that underlie the adverse effects on APs self-renewal.

Several genes and signaling pathways control the balance between self-renewal and differentiation in stem cells. Recently, we focused on activin A and its crucial role to maintain self-renewal in adipose progenitors^{7,8}. We pointed out that activin A was involved in the preservation of AP pools by coordinating the balance between self-renewal and differentiation in an autocrine manner^{7,8}. Similarly, activin A also sustains self-renewal of human ES cells^{28,29} and its upregulation is required to maintain mesenchymal features of cancer stem-like cells in non-small cell lung cancer³⁰ indicating that its role is not restricted to APs.

The immediate early response gene *IER3* is expressed in a wide range of tissues³¹ and we recently showed that activin A controls its expression⁷. It has been reported to participate to several processes including cell survival, proliferation or apoptosis^{9,32}. Its pro-survival properties are relevant in a context of stem cells that need to perpetuate all life-long but also in a context of a tissue that needs to adapt to metabolic constraints³³⁻³⁵. Indeed, expression of *IER3* was crucial to maintain and expand the adipose progenitor pool in response to effectors present in the microenvironment, including activin A⁷. Although, an elevation of *IER3* expression was measured in the APs isolated from obese patients, information concerning its expression in lipodystrophic individuals is scant and difficult to reach due to ethical considerations. We noted that LPV treatment which altered self-renewal of APs lowered *IER3* expression in these cells. This indicated that this gene is closely linked to the self-renewal status of the AP pools. Interestingly, not all the APs responded in a similar manner. We observed a consequent LPV-induced diminution in *IER3* expression mainly in chin-derived APs, which is in line with the LPV-induced alteration of proliferation measured in these cells.

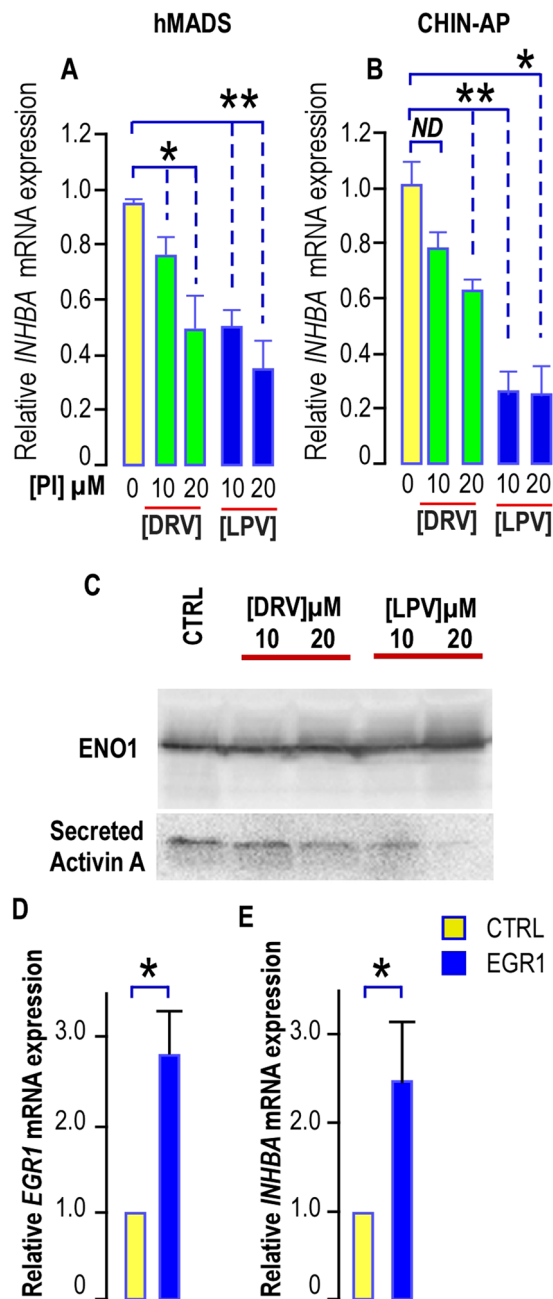


Figure 6. LPV impairs *INHBA* expression and activin A secretion. **(A,B)** Expression of *INHBA* in hMADS cells and in chin-AP treated with PIs. *INHBA* expression was determined in hMADS cells and chin APs submitted or not to increasing doses of DRV (green bars) or LPV (blue bars) for 5 days. The analysis findings were assessed by real-time RT-PCR and normalized for the expression of *36B4* mRNA. Mean \pm SEM was representative of four (hMADS) or three (chin-AP) independent experiments (ND = not significantly different, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). **(C)** Effects of HIV-PIs on activin A secretion. Culture media were collected after a 4-day treatment of hMADS cells with or without PIs, filtered on 0.45 μM membranes, and concentrated with Amicon ultra-15 columns (NMWL, three KDa; Millipore). Activin A secretion was analyzed by Western blot performed under non reducing conditions because anti-activin A antibody selectively binds to the dimeric form of activin A. A representative Western blot showing the expression of Enolase 1 (ENO1) used as a loading control (upper panel) and of activin A (Lower panel) is presented. **(D,E)** Effect of *EGR1* overexpression on *INHBA*. *EGR1* and *INHBA* expressions were determined in hMADS cells transduced with a lentivirus allowing *EGR1* expression. The analysis findings were assessed by real-time RT-PCR and normalized for the expression of *36B4* mRNA. Mean \pm SEM was representative of four independent experiments. (* $p < 0.05$)

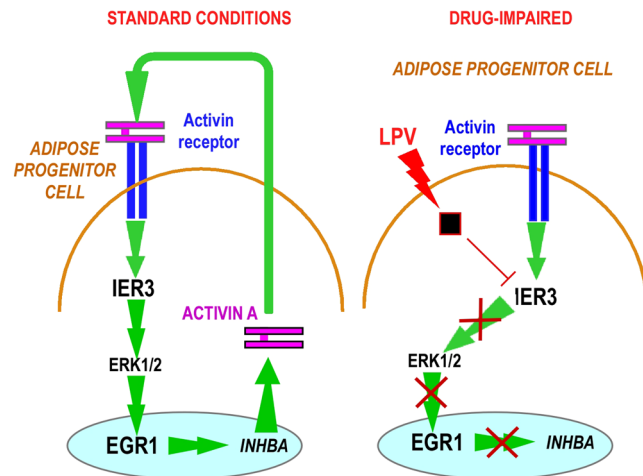


Figure 7. : Summary of the results found. Activin A sustains self-renewal through activation of IER3 expression. LPV impairs IER3 expression that impacts ERK1/2 phosphorylation and EGR1 expression. EGR1 downstream pathway is then affected. This implies a decrease in Activin A production and an impairment of the activin A autocrine signaling that alters proliferation and clonal expansion of APs.

From RNA interference experiments, we previously showed that IER3 supports activin A-induced self-renewal of APs through phosphorylation of ERK1/2 and activation of this regulatory network⁷. In good agreement, we observed that LPV, which reduces *IER3* expression, significantly blunted the activin A-induced phosphorylation of ERK1/2 in APs. The alteration of this key pathway involved in cell proliferation may account for the negative impact of LPV on proliferation. In addition, these results and those previously reported⁷ show that *IER3* expression is correlated with the expandability of the adipose tissue and reflects its adaptation to metabolic constraints in physiopathological conditions.

To further identify the cascade leading to a decrease in proliferation, we concentrated on the multifunctional transcription factor EGR1 which is highly dependent on ERK1/2 phosphorylation in self-renewing stem cells^{36,37}. Furthermore, *EGR1* has been identified as one of the positively regulated target genes by activin A in the murine gonadotrope-derived LBT2 cell line³⁸. EGR1 is a DNA binding protein able to regulate the expression of a large number of genes, then controlling important cellular processes such as survival, cell growth, differentiation, senescence, transformation or apoptosis. In addition to the three zinc finger motifs and two nuclear localization signals, the structural analysis reveal the presence of a strong activation followed by a repression domain while a weak activation domain is located at the C terminus, indicating that EGR1 can function as a positive or negative regulator of transcription³⁹. For instance, EGR1 promotes cell proliferation in some cancers cells^{40,41} and has also been associated with enhanced cell survival and tumor progression^{20,42}, while inhibition of EGR1 contributes to anti mitogenic effects in vascular smooth muscle cells⁴³ or cancer cells⁴⁴. EGR1 was shown to play an essential role in many differentiation processes leading to the production of functional cell types including B cells, macrophages, neuroblastoma cells and adipocytes⁴⁵. Its anti-adipogenic action is important to maintain appropriate levels of adipogenesis and/or a pool of resting APs able to undergo specialization upon appropriate stimulus in their microenvironment. In agreement with this finding, RNA interference experiments revealed that *EGR1* expression was depending on *IER3*, an important target in the activin A self-renewal signaling pathway in our model. Our results indicated that LPV negatively targeted *EGR1* expression as well as the expression of its downstream genes including *INHBA*, while *EGR1* overexpression promoted *INHBA* expression. All together, these observations are in line with a LPV-induced alteration of self-renewal of APs and they bring further evidences in the identification of the actors involved in the activin A autocrine loop that sustains APs self-renewal.

So far, the intracellular receptor or target for LPV remains unknown. Our results indicate that LPV, but not DRV, blunts the proliferation/self-renewal pathway activated by activin A. Note that LPV reduces also its production by lowering the transcription of *INHBA* gene and the secretion of activin A in APs. This contributes to turn down one of the autocrine loops critical to maintain the stemness properties of the AP pool. Note that any deterioration of this pathway is sufficient to dramatically alter self-renewal.

In conclusion, our work underlines the heterogeneity in the responses of distinct APs to HIV-PIs. While proliferation and self-renewal were preferentially impaired in APs derived from chin, differentiation was mostly impacted in APs derived from knee, indicating that all features of APs may account for lipodystrophy development. We identified a cascade of events that were important to sustain the self-renewal ability of APs. Cell autonomous regulation through activin A production appeared as an important, and somehow underestimated so far, pathway to perpetuate the AP pools. In this regard, the identification of *IER3* and *EGR1* as crucial genes to control self-renewal in physio-pathological conditions may give new insights to target and control the adipose tissue development and indeed for successful *de novo* adipogenesis in restoring facial defects.

Material and Methods

Reagents. Unless specified otherwise, all reagents were obtained from Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France).

Tissue culture media were obtained from LONZA (Levallois-Perret, France) and foetal calf serum (FCS) from Dutscher S.A. (Brumath, France). Protease Inhibitors were obtained by extraction from commercially available tablets and capsules and purified by silica gel column chromatography. Their purity was assessed by ¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance and mass spectroscopy. Pure molecules were dissolved in DMSO. The key intermediates used for structure-activity relationship studies were synthesized according to a previously reported procedure⁴⁶.

Cell culture. Human APs cells used for *in vitro* studies derived from distinct sources.

hMADS cells⁶ were isolated more than fifteen years ago from adipose tissue, as surgical scraps from surgical specimen of various surgeries of young donors, with the informed consent of the parents. All methods were approved and performed in accordance with the guidelines and regulations of the Centre Hospitalier Universitaire de Nice Review Board.

Chin and knee paired APs were derived from the stroma vascular fraction of Caucasians women who underwent elective liposuction procedures. Informed consent was obtained from all patients^{44,45}. APs were grown, maintained and differentiated according to experimental conditions previously described for each cell type^{6,45,47}.

For proliferation experiments. cells were seeded at 3 000 cells/cm². They were incubated in complete culture medium. The cells were counted using a Beckman Coulter Z1.

Proliferation based on MTT assay. Proliferation of human APs was evaluated using the soluble tetrazolium salt MTT reduction assay⁴⁸. Briefly, cells were seeded at 1500 cells/well in quadruplicate in 96-well plates and incubated at 37 °C for the indicated time. MTT (0.5 mg/ml) was added to each well and cells were further incubated for 4 h. Then the insoluble formazan was dissolved in isopropanol and DMSO (v/v) and the OD was determined spectrophotometrically at 562 nm and 630 nm for background correction.

A clonogenic assay. was carried out by plating 200 cells in a 100 mm-dia. dish in complete growth medium (containing 10% SVF) for 21 days. Colonies were scored after staining with crystal violet (1%). Each experiment was carried out in triplicate.

Adipocytic differentiation. was carried out as previously described and was assessed by Oil Red O staining^{6,47}.

Viral infection. Lentiviral particles were produced transfecting the 293 T cell line with the 2K7BSD-EGR1 constructs along with the packaging vectors. After lentiviral infection, cell lines stably expressing EGR1 were selected in appropriate blasticidin containing- medium (1 µg/mL) for at least 15 days. Two stable cell lines were developed from independent viral productions/infections and exhibited identical behaviors. Cells stably expressing the TOMATO-Fluorescent Protein (TOMATO) were obtained after 2K7BSD-Tomato lentiviral particles infection and were used as control.

Gene expression analysis. Total RNA was extracted using the TRI-Reagent kit (Euromedex, Soufflweyersheim, France) and reverse transcription (RT) was performed using MMLV reverse transcriptase (Promega, Charbonnières, France), as recommended by the manufacturers.

All primer sequences are described in supplementary section. Real-time PCR assays were run on an ABI Prism One step real-time PCR machine (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Normalization was performed using *36B4* as a reference gene. Quantification was performed using the comparative Ct method.

Protein expression. Cells were rinsed in ice-cold PBS and whole cell extracts were prepared as described⁷. Briefly, cells were lysed in the cell lysis buffer⁴⁹, sonicated for 10 s and centrifuged at 12000 g for 10 min.

Thirty micro grams of proteins were resolved by SDS-PAGE under reducing conditions and transferred to Immobilon-P membranes (Millipore, Molshiem, France). The detection antibodies listed in supplementary section were used according to the manufacturer's instructions.

The bound primary antibody was detected by horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody and visualized using an ECL detection kit (Millipore, Molsheim, France).

Chemiluminescence was observed using a molecular imager ChemiDoc XRS system (Bio-Rad, Marne la Coquette, France). The band intensity was quantified using Bio-Rad Quantity One software.

Activin A secretion. Activin A secretion was assessed as previously described⁸. Briefly, hMADS cells were maintained in 5 µg/ml insulin and 10 µg/ml transferrin medium in the absence or presence of LPV or DRV as indicated. Culture media were collected 4 days later, filtered on 0.45 µm membranes, and concentrated with Amicon ultra-15 columns (NMWL, three KDa; Millipore). Levels of activin A were analyzed by Western blot performed under nonreducing conditions because anti-activin A antibody selectively binds to the dimeric form of activin A. Secreted enolase one (ENO1) was used as a loading control⁵⁰.

Statistical analysis. The results are shown as mean ± standard error of the mean (SEM), with the number of experiments indicated. Statistical significance was determined by *t*-tests using Micrococcal Origin 6.0 (Micrococcal Software, Northampton MA). Probability values <0.05 were considered statistically significant and are marked with a single asterisk, <0.01 with double asterisks and <0.001 with triple asterisks.

References

- Enerback, S. Human brown adipose tissue. *Cell Metab* **11**, 248–252 (2010).
- Tchkonia, T. *et al.* Fat depot origin affects adipogenesis in primary cultured and cloned human preadipocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **282**, R1286–1296 (2002).
- Tchkonia, T. *et al.* Abundance of two human preadipocyte subtypes with distinct capacities for replication, adipogenesis, and apoptosis varies among fat depots. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **288**, E267–277 (2005).
- Maumus, M. *et al.* Evidence of *in situ* proliferation of adult adipose tissue-derived progenitor cells: influence of fat mass microenvironment and growth. *J Clin Endocrinol Metab* **93**, 4098–4106 (2008).
- Billon, N. *et al.* The generation of adipocytes by the neural crest. *Development* **134**, 2283–2292 (2007).
- Kouidhi, M. *et al.* Characterization of human knee and chin adipose-derived stromal cells. *Stem Cells Int* **2015**, Epub 2015 Feb 2013 (2015).
- Ravaud, C. *et al.* IER3 is a crucial effector promoting expansion of adipose progenitor cells in response to distinct micro-environmental effectors. *Stem cells* **33**, 2564–2573 (2015).
- Zaragosi, L. E. *et al.* Activin plays a critical role in proliferation and differentiation of human adipose progenitors. *Diabetes* **59**, 2513–2521 (2010).
- Arlt, A. & Schafer, H. Role of the immediate early response 3 (IER3) gene in cellular stress response, inflammation and tumorigenesis. *Eur J Cell Biol* **90**, 545–552 (2011).
- Caron-Debarle, M., Lagathu, C., Boccarda, F., Vigouroux, C. & Capeau, J. HIV-associated lipodystrophy: from fat injury to premature aging. *Trends Mol Med* **16**, 218–229 (2010).
- Carr, A. & Cooper, D. A. Adverse effects of antiretroviral therapy. *Lancet* **356**, 1423–1430 (2000).
- Nolis, T. Exploring the pathophysiology behind the more common genetic and acquired lipodystrophies. *J Hum Genet* **59**, 16–23 (2014).
- Huang-Doran, I., Sleigh, A., Rochford, J. J., O’Rahilly, S. & Savage, D. B. Lipodystrophy: metabolic insights from a rare disorder. *J Endocrinol* **207**, 245–255 (2010).
- Singhania, R. & Kotler, D. P. Lipodystrophy in HIV patients: its challenges and management approaches. *HIV AIDS (Auckl)* **3**, 135–143 (2011).
- Alam, N. *et al.* Body fat abnormality in HIV-infected children and adolescents living in Europe: prevalence and risk factors Fat abnormality in children. *J Acquir Immune Defic Syndr* **59**, 314–324 (2012).
- Giralt, M., Domingo, P. & Villarroya, F. Adipose tissue biology and HIV-infection. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **25**, 487–499 (2011).
- Vernochet, C. *et al.* Human immunodeficiency virus protease inhibitors accumulate into cultured human adipocytes and alter expression of adipocytokines. *J Biol Chem* **280**, 2238–2243 (2005).
- Rodriguez, A. M. *et al.* Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J Exp Med* **201**, 1397–1405 (2005).
- Min, I. M. *et al.* The transcription factor EGR1 controls both the proliferation and localization of hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* **2**, 380–391 (2008).
- Virolle, T. *et al.* Egr1 promotes growth and survival of prostate cancer cells. Identification of novel Egr1 target genes. *J Biol Chem* **278**, 11802–11810 (2003).
- Thiel, G. & Cibelli, G. Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1. *J Cell Physiol* **193**, 287–292 (2002).
- Zwang, Y. *et al.* Two phases of mitogenic signaling unveil roles for p53 and EGR1 in elimination of inconsistent growth signals. *Mol Cell* **42**, 524–535 (2011).
- Boffito, M. *et al.* Pharmacokinetics and antiretroviral response to darunavir/ritonavir and etravirine combination in patients with high-level viral resistance. *Aids* **21**, 1449–1455 (2007).
- Jackson, A. *et al.* Pharmacokinetics of plasma lopinavir/ritonavir following the administration of 400/100 mg, 200/150 mg and 200/50 mg twice daily in HIV-negative volunteers. *J Antimicrob Chemother* **66**, 635–640 (2011).
- Darini, C. Y. *et al.* Targeting cancer stem cells expressing an embryonic signature with anti-proteases to decrease their tumor potential. *Cell Death Dis* **4**, e706 (2013).
- Nair, P. *et al.* Early growth response-1-dependent apoptosis is mediated by p53. *J Biol Chem* **272**, 20131–20138 (1997).
- Carr, A. *et al.* Diagnosis, prediction, and natural course of HIV-1 protease-inhibitor-associated lipodystrophy, hyperlipidaemia, and diabetes mellitus: a cohort study. *Lancet* **353**, 2093–2099 (1999).
- Vallier, L., Alexander, M. & Pedersen, R. A. Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *J Cell Sci* **118**, 4495–4509 (2005).
- Xiao, L., Yuan, X. & Sharkis, S. J. Activin A maintains self-renewal and regulates fibroblast growth factor, Wnt, and bone morphogenic protein pathways in human embryonic stem cells. *Stem Cells* **24**, 1476–1486 (2006).
- Wamsley, J. J. *et al.* Activin upregulation by NF- κ B is required to maintain mesenchymal features of cancer stem-like cells in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* **75**, 426–435 (2015).
- Feldmann, K. A., Pittelkow, M. R., Roche, P. C., Kumar, R. & Grande, J. P. Expression of an immediate early gene, IEX-1, in human tissues. *Histochem Cell Biol* **115**, 489–497 (2001).
- Shen, L., Guo, J., Santos-Berrios, C. & Wu, M. X. Distinct domains for anti- and pro-apoptotic activities of IEX-1. *J Biol Chem* **281**, 15304–15311 (2006).
- Pawlikowska, P. *et al.* ATM-dependent expression of IEX-1 controls nuclear accumulation of Mcl-1 and the DNA damage response. *Cell Death Differ* **17**, 1739–1750 (2009).
- Steensma, D. P. *et al.* Rearrangements and amplification of IER3 (IEX-1) represent a novel and recurrent molecular abnormality in myelodysplastic syndromes. *Cancer Res* **69**, 7518–7523 (2009).
- Trouillas, M. *et al.* Three LIF-dependent signatures and gene clusters with atypical expression profiles, identified by transcriptome studies in mouse ES cells and early derivatives. *BMC Genomics* **10**, 73 (2009).
- Cook, P. J. *et al.* Cox-2-derived PGE2 induces Id1-dependent radiation resistance and self-renewal in experimental glioblastoma. *Neuro Oncol* **18**, 1379–1389 (2016).
- Sakakini, N. *et al.* A Positive Feed-forward Loop Associating EGR1 and PDGFA Promotes Proliferation and Self-renewal in Glioblastoma Stem Cells. *J Biol Chem* **291**, 10684–10699 (2016).
- Mazhawidza, W., Winters, S. J., Kaiser, U. B. & Kakar, S. S. Identification of gene networks modulated by activin in LbetaT2 cells using DNA microarray analysis. *Histol Histopathol* **21**, 167–178 (2006).
- Gashler, A. L., Swaminathan, S. & Sukhatme, V. P. A novel repression module, an extensive activation domain, and a bipartite nuclear localization signal defined in the immediate-early transcription factor Egr-1. *Mol Cell Biol* **13**, 4556–4571 (1993).
- Baron, V., Adamson, E. D., Calogero, A., Ragona, G. & Mercola, D. The transcription factor Egr1 is a direct regulator of multiple tumor suppressors including TGF β 1, PTEN, p53, and fibronectin. *Cancer Gene Ther* **13**, 115–124 (2006).
- Sun, T., Tian, H., Feng, Y. G., Zhu, Y. Q. & Zhang, W. Q. Egr-1 promotes cell proliferation and invasion by increasing beta-catenin expression in gastric cancer. *Dig Dis Sci* **58**, 423–430 (2013).
- Baron, V. *et al.* Inhibition of Egr-1 expression reverses transformation of prostate cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Oncogene* **22**, 4194–4204 (2003).

43. Kimura, T. E. *et al.* Inhibition of Egr1 expression underlies the anti-mitogenic effects of cAMP in vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* **72**, 9–19 (2014).
44. DeLigio, J. T. & Zorio, D. A. Early growth response 1 (EGR1): a gene with as many names as biological functions. *Cancer Biol Ther* **8**, 1889–1892 (2009).
45. Boyle, K. B. *et al.* The transcription factors Egr1 and Egr2 have opposing influences on adipocyte differentiation. *Cell Death Differ* **16**, 782–789 (2009).
46. Stoll, V. *et al.* X-ray crystallographic structure of ABT-378 (lopinavir) bound to HIV-1 protease. *Bioorg Med Chem* **10**, 2803–2806 (2002).
47. Rodriguez, A. M. *et al.* Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* **315**, 255–263 (2004).
48. Velasco-Velazquez, M. A. *et al.* 4-Hydroxycoumarin disorganizes the actin cytoskeleton in B16-F10 melanoma cells but not in B82 fibroblasts, decreasing their adhesion to extracellular matrix proteins and motility. *Cancer Lett* **198**, 179–186 (2003).
49. Peraldi, P., Xu, M. & Spiegelman, B. M. Thiazolidinediones block tumor necrosis factor- α -induced inhibition of insulin signaling. *J Clin Invest* **100**, 1863–1869 (1997).
50. Chiellini, C. *et al.* Characterization of human mesenchymal stem cell secretome at early steps of adipocyte and osteoblast differentiation. *BMC Mol Biol* **9**, 26 (2008).

Acknowledgements

We thank our colleagues for helpful suggestions and discussions. We are indebted to Drs. Pascal Peraldi for a careful reading of this manuscript and Thierry Virole for a generous gift of the lentiviral constructs used in this study and for helpful discussions. This work was supported by ANRS (French National Agency for Research on AIDS and viral hepatitis) (grant number #AO 2013-1 CSS3) and the French Government (National Research Agency, ANR) through the “Investments for the Future” LABEX SIGNALIFE: program reference #ANR-11-LABX-0028-01. CR is recipient of a pre-doctoral fellowship from ANRS and then from SIDACTION, M.P. is a pre-doctoral fellow from LABEX SIGNALIFE.

Author Contributions

C.R. design of experiments, data research and contributed to discussion. S.A. Chemical synthesis and purification and contributed to discussion. M.P. data research and contributed to discussion. C.D. design of experiments and contributed to discussion. A.L. design of experiments, data research, contributed to discussion and wrote the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at doi:[10.1038/s41598-017-02807-9](https://doi.org/10.1038/s41598-017-02807-9)

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

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



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

© The Author(s) 2017

- Résultats et discussion

Au cours de cette étude, nous avons montré que les PAs ne possédaient pas tous la même sensibilité pour le LPV. Les PAs de menton étaient les moins affectés par le LPV contrairement à ceux du genou pour l'induction de la différenciation adipocytaire. Ce résultat semble à l'opposé des observations faites sur les patients suivant une thérapie HAART puisqu'une forte lipoatrophie faciale est observée chez ces personnes. Néanmoins, l'auto-renouvellement des PAs du menton est beaucoup plus impacté par les IPs que celui du genou. Ce résultat expliquerait la lipoatrophie observée puisque le stock de PAs au niveau du menton est affecté ce qui ne permettra pas de renouveler les adipocytes. Cette perte d'auto-renouvellement fut associée à la perte d'IER3. IER3 fait partie de la boucle autocrine de l'activine A qui est un facteur crucial pour l'auto-renouvellement des PAs. Le facteur EGR1 est aussi diminué et comme il contrôle l'expression du gène *INHBA* qui produit l'activine A, la boucle autocrine de l'activine A est dérégulée.

L'ensemble des résultats montre que le LPV modifie la boucle autocrine de l'activine A au niveau des PAs ce qui entraîne une perte des cellules capables de se différencier en adipocytes et qui pourrait expliquer les lipoatrophies observées lors de la thérapie HAART.

Très peu d'études se sont consacrées aux effets des IPs sur les PAs humains. Une équipe a utilisé des souches mésenchymateuses mésodermiques provenant de la moelle osseuse ainsi que des cellules ectodermiques à partir de la pulpe dentaire (Gibellini et al., 2015). Cependant, leurs expériences ont montré une toxicité des IPs seulement à des doses supra-physiologiques. La différenciation des PAs de la moelle osseuse est plus fortement inhibée par les IPs que ceux de la pulpe dentaire. Les gènes de la différenciation adipocytaire cependant ne sont pas affectés. Pour la différenciation des cellules de la moelle osseuse, les adipocytes ont été obtenus après 21 jours de différenciation. Les cellules de la pulpe dentaire ont été différenciées seulement pendant 7 jours et

très peu de gouttelettes lipidiques sont détectables. Cependant, les effets des IPs sur l'auto-renouvellement de ces cellules n'ont pas été analysés. Dans notre étude, nous avons utilisé des PAs de genou et de menton provenant du même patient afin de comparer les effets des IPs sur la différenciation ainsi que sur l'auto-renouvellement. Nous avons montré que la perte de la boucle autocrine de l'activine A était causée par la perte de gènes importants tels que IER3 et EGR1 suite au traitement avec le LPV. Cependant, le mécanisme par lequel le LPV diminue l'expression d'IER3 reste à élucider puisque l'on connaît pas les cibles directes du LPV.

De plus, la thérapie HAART n'entraîne pas que des lipoatrophies du tissu adipeux mais aussi des lipohypertrophies, principalement au niveau viscéral et dorso-cervical. Il a été longtemps sous-entendu que les INTI induisaient la prolifération des PAs dans le tissu dorso-cervical. Sachant que l'auto-renouvellement des PAs implique la protéine IER3, il serait alors judicieux de mesurer l'expression d'IER3 suite à un traitement aux IPs dans ces dépôts hypertrophiés.

On remarque que la différenciation des PAs bruns du menton n'est pas altérée par les IPs mais seul l'auto-renouvellement est affecté. Cette perte du stock des PAs amène à l'atrophie des dépôts bruns par l'impossibilité de former de nouveaux adipocytes bruns. Le tissu adipeux brun est important pour maintenir l'homéostasie énergétique, non seulement par le processus thermogénique *via* la protéine UCP1 mais par des effets insulino-sensibilisateurs. Il est donc normal que la perte de formation de dépôts bruns par le LPV, qui s'ajoute à de nombreux autres effets indésirables, favorise la formation de désordres métaboliques tels que la résistance à l'insuline.

Nos résultats montrent que les différents PAs humains n'ont pas la même sensibilité aux IPs tant au niveau de la différenciation adipocytaire qu'au niveau du maintien de l'auto-renouvellement par la boucle autocrine de l'activine A.

2) Effets des IPs sur la différenciation adipocytaire brune et la signature thermogénique

- Introduction

Il a déjà été montré que les IPs induisent une perturbation de la différenciation adipocytaire blanche. Ces effets affectent non seulement la différenciation mais aussi la fonction des adipocytes par la perte de sécrétion d'adipokines et une diminution de la sensibilité à l'insuline (Caron et al., 2003; Djedaini et al., 2009; Vernochet et al., 2003, 2005). Cependant, très peu d'études ont été effectuées sur les effets secondaires des IPs sur la signature thermogénique des adipocytes. Une étude dans des adipocytes de souris a permis de montrer que l'accumulation de l'indinavir dans les mitochondries entraîne une toxicité autant pour les adipocytes blancs que bruns (Viengchareun et al., 2007). Étant présente dans les mitochondries afin de produire de la chaleur en découplant le gradient de protons, l'expression d'UCP1 peut être affectée par la toxicité des IPs. Comme mentionné dans mon introduction, il est connu que le vieillissement entraîne la perte de l'expression d'UCP1 chez la souris. De plus, les IPs induisent un vieillissement prématuré de certains tissus par l'altération de la fonction mitochondriale, le stress oxydatif et l'accumulation toxique de prélamine-A (Caron et al., 2007, 2008; Caron-Debarle et al., 2010). Dans ce contexte, il serait alors intéressant de vérifier si les IPs affectent la signature thermogénique des cellules adipocytaires. Pour ce faire, nous avons utilisé principalement les cellules hMADS et les PA-menton puisque ces deux lignées expriment la protéine UCP1 lors de la différenciation adipocytaire.

- Article: **Mechanistic insights in UCP1 expression in human adipocytes: Resveratrol counteracts the HIV-Protease inhibitors-induced adipocyte whitening**

MANUSCRIT SOUMIS POUR PUBLICATION

Mechanistic insights in UCP1 expression in human adipocytes: Resveratrol counteracts the HIV-Protease inhibitors-induced adipocyte whitening

Christophe RAVAUD ^{1,4[¶]}, **Martin PARE** ^{1[¶]}, **Xi YAO**¹, **Stéphane AZOULAY** ²,

Nathalie M. MAZURE ^{3,5}, **Christian DANI** ^{1#} and **Annie LADOUX** ^{1#*}

¹ Université Côte d'Azur, INSERM, iBV, France.

² Université Côte d'Azur, ICN, France.

³ Université Côte d'Azur, CNRS-UMR 7284-Inserm U1081, Centre Antoine Lacassagne, 33 Ave. de Valombrose, 06189 Nice, France.

⁴ Present address: University of Oxford, Department of Physiology Anatomy & Genetics, Sherrington Building, Parks Road, Oxford OX1 3PT, United Kingdom.

⁵ Present address: University of Côte d'Azur (UCA), INSERM U1065, C3M, 151 Route de St Antoine de Ginestière, BP2 3194, 06204 Nice Cedex 03, France.

[¶] equal contribution

[#] senior co-authors.

*** Corresponding author: Annie Ladoux, Ph D.**

iBV, Institut de Biologie Valrose, Univ. Nice Sophia Antipolis, Tour Pasteur ; UFR Médecine; 28, avenue de Valombrose, 06107 Nice Cedex 2, France.

Telephone: +33 4 93 37 77 04

FAX: +33 4 93 37 70 58

Email: ladoux@unice.fr

Running title: UCP1, HIV-Protease inhibitors and Resveratrol.

Keywords: Adipose tissue, brown adipocytes, white adipocytes, energy metabolism, UCP1, HIV protease inhibitors, resveratrol, sirtuin 1, p38 Mitogen-activated kinase, aging.

ABSTRACT

Brown and brown-like adipocytes (BBAs) control thermogenesis and are detected in adult humans. They express UCP1, which transforms energy into heat. They appear as promising cells to fight obesity. Deciphering the molecular mechanisms leading to the browning of human white adipocytes or the whitening of BBAs represents a goal to properly and safely control the pathways involved in this processes.

Here, we analyzed how drugs endowed with therapeutic potential affect the differentiation of human adipose progenitor-cells into BBAs and/or their phenotype.

We showed that HIV-protease inhibitors (PI) reduced UCP1 expression into BBAs modifying their metabolic profile and the mitochondria functionality. Lopinavir (LPV) was more potent than darunavir (DRV), a last generation PI. *PPAR γ* and *PGC-1 α* were decreased in a PI or cell-specific manner, thus altering *UCP1*'s constitutive expression. In addition, LPV altered p38-MAPK phosphorylation, blunting then the β -adrenergic responses. In contrast, low doses of resveratrol stimulated the activable expression of UCP1 in a p38-MAPK-dependent manner and counteracted the LPV-induced loss of UCP1. This effect was independent of the resveratrol-induced sirtuin-1 expression.

Altogether our results uncover how drugs impact crucial components of the networks controlling the thermogenic signature. They provide important information to control the relevant pathways involved in energy expenditure.

INTRODUCTION

Adipose tissue (AT) is composed of two distinct entities with opposite functions that play a crucial role in the control of energy balance. While white adipose tissue (WAT) consists in a safe energy-storing reservoir of lipids, brown/beige adipose tissue (BAT) promotes energy dissipation and produces heat. BAT was considered for long to be present exclusively in rodents and human neonates. Its presence was established in adult humans in 1972¹ and further confirmed thanks to positron-emission tomography^{2,3}. In adults, the major depots are localized in the cervical-supraclavicular region and in a region extending from the neck to the thorax. In addition to these brown adipocytes (BAs)^{4,5}, beige/brite adipocytes (BBAs) bearing brown properties were detected in WAT depots. BBAs display distinct molecular signatures with brown adipocytes⁶, but are metabolically active as they respond to cold stimulus or β 3-adrenergic stimulation⁷, contributing then to energy homeostasis. BAT depots and BBAs are reduced in obese humans or during aging. This is accompanied by defects that fetch up in metabolic disorders^{2,8-10}.

A better comprehension of the mechanisms involved in acquisition (browning) or the loss (whitening) of the thermogenic signature is of interest since an increase in the energy expenditure emerged as a possible strategy to treat obesity or to prevent metabolic disorders including those occurring in the elderly.

BBAs contain high amounts of mitochondria, which express the uncoupling protein-1 (UCP1) at their inner membrane. This protein dissipates the mitochondrial proton gradient and converts the energy of substrate oxidation into heat instead of ATP¹¹ and it represents the functional hallmark for these cells. In addition to UCP1, the thermogenic signature includes cell death activator CIDE-A (*CIDEA*), a protein that modulates the uncoupling action of UCP1 and lipolysis in adipocytes and two transcriptional coactivators: PR domain containing-16 (*PRDM16*) and PPAR γ coactivator-1 α (*PGC-1 α*)¹². Several transcription factors control *UCP1* expression: PPAR γ 2, a master transcriptional regulator of adipocyte differentiation¹³, *PGC-1 α* ¹², Retinoid-X-Receptor and Thyroid Receptor. A region located 3.9kb upstream of the transcription start of the human *UCP1* gene contains response elements for these nuclear hormone receptors¹⁴. Moreover, *UCP1* expression in response to cold exposure and catecholamines is triggered by an increase in intracellular cAMP and

phosphorylation of p38-MAPK, thus indicating the existence of an actionable pathway. In addition to these pathways, sirtuins (SIRT), the mammalian homologs of *sir2* (Silent information regulators), play a crucial role in the maintenance of AT, including BBAs. They belong to the third class of deacetylase enzymes that bind NAD⁺¹⁵. They are known to promote longevity in invertebrates¹⁶. Some members of the SIRT family are involved in AT biology, including BBAs. For instance, diet-induced obesity was accompanied by a loss of brown fat in SIRT1-deficient mice¹⁷, while gain of function of SIRT1 promotes murine WAT browning¹⁸. In parallel, SIRT1 controls UCP1 expression in murine immortalized brown adipocytes as it promotes deacetylation of PPAR γ ¹⁹. SIRT2, the most abundant sirtuin in adipocytes, regulates also adipose differentiation in rodents²⁰. Its expression decreases in the AT of obese individuals²¹ and increases in the AT of mice exposed to caloric restriction²². Note that resveratrol (5-[(E)-2-(4-hydroxyphenyl)ethenyl]benzene-1,3-diol) (RESV), a natural polyphenolic compound found in grapes, displaying anti-aging properties and which is able to activate SIRT1, was reported to display beneficial effect and to induce brown-like adipocytes formation in mice²³.

In contrast, some molecules are known to alter adipose tissue and mitochondria integrity. Besides its valuable efficiency in treating AIDS patients, the highly active antiretroviral therapy (ART) has been reported to display unwanted side effects, i.e. selective loss of fat depots, lipodystrophies, dyslipidemia, hypertriglyceridemia, insulin resistance, and premature aging²⁴⁻²⁶. This therapy is composed of several classes of antiretroviral drugs that hinder the formation of infectious viral particles, including inhibitors of the HIV protease (PI) and of the inverse transcriptase (NRTI). PIs were shown to alter adipose differentiation *in vitro* and to decrease the expression of white adipose markers as well as genes controlling this process (*C/EBP α* , *PPAR γ*)²⁷⁻³⁰. Information concerning PIs' effect on BBAs properties including mitochondrial dysfunction and aging is limited.

Hence, a properly controlled thermogenic signature remains a challenge for both treatment of obesity and prevention of metabolic disorders. To decipher the complex network that govern UCP1 expression, we

challenged BBAs obtained from human adipose progenitors (APs)^{31,32} with PIs and RESV and we further analyzed how these drugs impact BBAs' features. We focused on two PIs: lopinavir (LPV), one of the most widely used PI and darunavir (DRV), a new generation-PI renowned to display few secondary effects. The concentrations used are consistent with those measured in the plasma of AIDS-treated patients³³. In all BBAs models used here, chronic or short-term treatment with LPV dramatically repressed *UCP1* and *CIDEA* expressions, promoting their whitening; hMADS-adipocytes being more sensitive than chin-adipocytes. LPV, but not DRV, decreased the expression of *PPAR γ 2* and *PGC-1 α* in hMADS-adipocytes. LPV increased reactive oxygen species (ROS) production in mitochondria while it decreased super oxide dismutase-2 (SOD2). In addition, LPV blocked the β 3-adrenergic responses through p38-MAPK inhibition and it reduced the expression of sirtuins. RESV promoted UCP1 expression and browning. It partially reversed LPV's effects in a p38-MAPK-dependent but SIRT1-independent manner.

Our results pointed out that the thermogenic signature was controlled by both basal and actionable components that may be targeted in a cell-specific or drug-specific manner in human cells. Their relevance is discussed in the context of metabolic disorders.

RESULTS

LPV and DRV displayed distinct effects on UCP1 and the thermogenic signature expressions.

The time course for the thermogenic signature expression indicated that UCP1 was detected after 15 days of differentiation, in contrast to adipocyte structural proteins (PLIN1, FABP4) which appeared earlier (Supp.Fig.1). Thus, cells differentiated for at least 17 days were further used. We analyzed the impact of a chronic PI-treatment on this process using hMADS-adipocytes. Increasing concentrations of DRV up to 50 μ M had no significant effect on the expression of *PLIN1*, while LPV (10 μ M) reduced it significantly (Fig.1a).

In contrast, both PIs dose-dependently and significantly reduced the expression of the brown adipocyte markers, *UCP1* and *CIDEA* (Fig.1b-c), even at concentrations that did not impair *PLIN1* expression (10 μ M DRV and 5 μ M LPV, respectively) indicating that PIs preferentially affect the BBAs markers. In addition, DRV as well as LPV lowered *PPAR γ 2* expression in a dose-dependent manner in hMADS-adipocytes (Fig.1d). While DRV had no effect on *PGC-1 α* mRNA, low concentrations of LPV decreased significantly its expression (Fig.1e). Thus, LPV and DRV had distinct effects on genes controlling *UCP1*.

These results were further confirmed at the protein level. UCP1 expression was impaired at low doses of PIs while PLIN1 expression was only suppressed for the highest LPV concentration (Fig.1f).

These observations also applied to chin-adipocytes, which exhibited a preferential brown/beige phenotype. DRV (20-50 μ M) impaired brown markers expressions, while 5 μ M LPV was sufficient (Supp. Fig.2). *PPAR γ 2* expression was reduced only when differentiation was carried out in presence of 20 μ M LPV. PIs did not impact *PGC-1 α* expression. Thus, the decreased-UCP1 expression did not directly result from defects in *PPAR γ 2* and *PGC-1 α* expressions in chin-adipocytes. Note that PIs did not alter PRDM16 expression in both cell types (Supp. Fig.3).

We analyzed *UCP1* promoter activity using hMADS-adipocytes expressing a construct containing the firefly luciferase gene under the control of the *UCP1* promoter³⁶. A 4-day treatment of hMADS-adipocytes with DRV produced no significant change while LPV reduced the luciferase activity two times onwards (Fig.1g).

These results indicated that PIs altered the thermogenic signature and induced whitening in distinct cell models of BBAs.

PIs inhibited browning and UCP1 expression.

We then determined how PIs impacted the brown/beige phenotype in cells treated with 10 μ M PIs at late stages of differentiation i.e. from days 15 to 17 or from days 15 to 22 (Fig.2a-d). When DRV was applied from days 15-17 or 15-22, UCP1, PLIN1 and FABP4 expressions were not modified. In agreement with promoter analysis, LPV dramatically impaired UCP1, but not PLIN1 and FABP4 expressions, indicating that a short-term treatment was sufficient to modify the BBA phenotype. The impact of LPV was higher when cells were treated from days 15 to 22 compared to treatment from days 15 to 17 (Fig.2a-b). Similar results were observed in chin-adipocytes (Supp.Fig4).

Altogether these results showed that both DRV and mainly LPV induced whitening of BBAs by decreasing UCP1 expression through a reduced-expression of transcription factors, hMADS-adipocytes being more sensitive than chin-adipocytes.

LPV impaired forskolin-induced UCP1 expression.

As catecholamines induce browning, we measured p38-MAPK phosphorylation and UCP1 expression in hMADS-adipocytes treated or not with PIs and stimulated by forskolin to mimic the β -adrenergic response. DRV-treatment had no significant effect, while a 4-day treatment with LPV reduced forskolin-induced p38-MAPK phosphorylation two times onwards, compared to control (Fig.3a-b). *UCP1* mRNA expression was slightly reduced by DRV and LPV in absence of forskolin stimulation. A 4-hour forskolin-stimulation increased *UCP1* mRNA expression 10 times onwards in control cells. LPV treatment (20 μ M) blunted this effect hindering then the response to a β -adrenergic stimulation (Fig.3c).

Altogether these data indicated that LPV dramatically impaired expression of thermogenic genes by altering the actionable signaling pathway induced by elevated-cAMP levels.

Lopinavir impaired mitochondrial function and metabolism in different models of human BBAs.

We then analyzed the PI-induced oxidative damage in mitochondria with MtT-Orange. MtT-Green was used to label all mitochondria. Note that labeling was detected after 8 min of incubation and was more pronounced after 20 min in both control and PI-treated cells (Supp.Fig.5).

Qualitative analysis revealed a very weak red labeling in untreated or DRV-treated hMADS-adipocytes (Fig.4a & Supp.Fig.6a). A significant increase in the oxidative stress was measured after quantification of the fluorescent signals only in LPV-treated cells compared to control (Fig.4b, Supp.Fig.6b). In addition, LPV decreased significantly *SOD2* expression, a major enzyme involved in clearing superoxide ions. This may account for the observed-ROS accumulation (Fig.4 c-d & Supp. Fig.6c).

We then compared the oxygen consumption rates (OCR) in control cells or cells treated with PIs. A 72-hour DRV treatment had no significant effect compared to control (Supp. Fig.6d). Indeed, similar treatment with LPV produced a robust decrease of both basal and FCCP maximal mitochondrial respiration as compared to control or DRV-treated cells. ATP production measured with oligomycin (OLIGO), an inhibitor of the F₀F₁-ATP synthase, was similar in all cells. The spare mitochondrial capacity was 2.8 times lower in LPV-treated cells than in control cells. Rotenone/AntimycinA reduced oxygen consumption to a similar level in all cases. These results indicated that LPV altered the mitochondria and caused metabolic dysfunctions.

Lopinavir modulated the expression of anti-aging markers.

As expression of the thermogenic signature declines with age, we aimed to evaluate the effect of PIs on sirtuin expressions. Among the distinct sirtuins, *SIRT2* was the most expressed in both hMADS and chin-adipocytes (Supp.Fig7a-b). We focused on the expressions of *SIRT1*, *SIRT2* and *SIRT6* which are relevant for adipocytes and *SIRT3* since it localizes in mitochondria. A 2-day treatment with LPV but not DRV was sufficient to reduce significantly the expression of these all four sirtuins in hMADS-adipocytes (Fig.5a-d). Chronic treatment of hMADS cells with PIs during the differentiation process gave similar result (Fig.5e-h). Chin-adipocytes were less sensitive as *SIRT2* expression was only altered by the highest LPV dose (Supp.Fig7).

Altogether, these results indicate that, as observed during aging²⁶, PIs decrease the expression of anti-aging markers.

Effect of Resveratrol on UCP1 expression.

Distinct concentrations of resveratrol induced UCP1, *CIDEA* and *SIRT1* expressions

We analyzed the effects of RESV a commercially available SIRT1 inducer. In hMADS-adipocytes submitted to increasing doses of RESV, UCP1 expression was induced at doses comprised between 0.1 to 3 μ M (Fig.6a-b) with the maximum effect observed at 1 μ M (induction factor = 1.95 ± 0.33 (n=10, p=0.018)). Higher doses inhibited its expression (Fig.6a-b-c). While we noticed a slight increase for *UCP1* mRNA expression (Fig.6c), RESV had a more clear effect on protein expression (Fig.6a-b), suggesting that both transcriptional and post-transcriptional effects were involved. Low doses of RESV modulated *CIDEA* expression in a similar manner. Concentrations higher than 30 μ M induced *SIRT1* but robustly inhibited *UCP1* and *CIDEA* expressions (Fig.6c).

These results pointed out a clear discrepancy between the doses of RESV promoting the thermogenic signature and those fighting aging in human cells.

Inhibition of p38-MAPK activity blocked resveratrol-induced UCP1 expression

In search of common molecular targets to LPV and RESV, hMADS-adipocytes were treated with SB203580 (SB 5 μ M) to block the activity of p38-MAPK, previously identified as a LPV target. They were further challenged for 4 days with 1 μ M RESV. Inhibiting the activity of p38-MAPK prevented RESV to induce UCP1 expression (Fig.6d-e). This confirmed p38-MAPK as a common target to RESV and LPV.

Resveratrol partially reversed LPV's effect on UCP1 expression

A 4-day stimulation of hMADS-adipocytes with RESV (1 μ M) in presence of LPV (10 μ M) partially restored the LPV-reduced UCP1 expression. However it remained below the induction observed in control conditions (Fig.6f-g). This indicated that activation of p38-MAPK by RESV was sufficient to increase UCP1 expression through an actionable pathway.

These results are summarized in Fig.7

DISCUSSION

We aimed to decipher how the pathways that control the thermogenic signature can be modulated by drugs to promote either whitening or browning of BBAs. In human cells PIs decreased brown adipocyte differentiation, altered BBAs' functionality and affected their phenotype. In contrast, RESV a natural polyphenol with beneficial effects on metabolism, which is also able to induce SIRT1 expression, increased UCP1 expression and counteracted the LPV-induced loss of UCP1.

Adipose tissue is the main target for unwanted side effects of ART therapy. Indeed, an important remodeling of adipose tissue and lipodystrophies develop in AIDS patients treated with ART. Many studies conducted using murine or human models of adipose differentiation reproduced the impairments observed in AIDS patients in absence of HIV infection. For instance, PIs inhibit adipose differentiation of both murine and human adipose progenitors^{27,30}. These models allowed the identification of many pathways sensitive to ART. Chronic treatment of hMADS- and chin-adipocytes with LPV or DRV dramatically and dose-dependently decreased *UCP1* and *CIDEA* expressions while only high doses of LPV reduced the expression of *PLIN1*, an adipocyte structural protein. These observations unambiguously indicate that PIs preferentially hindered the formation of cells able to expend energy and favored the whitening of BBAs. They are in line with previously reported observations on the effects of indinavir in murine models³⁷. However, these two PIs harbored differences in the alteration of the thermogenic signature. DRV did not modify the expression of genes essential for the adipocyte function and higher doses were requested to reduce the expression of *UCP1* and *CIDEA* as compared to LPV. In hMADS-adipocytes, PIs decreased the mRNA expression of *PPAR γ 2* and *C/EBP α* ³⁸, while similar concentrations did not significantly lower the expression of these two genes in chin-adipocytes. LPV diminished *PPAR γ 2* and *PGC-1 α* expressions and this may account for the reduction of the thermogenic signature and the very weak ability for uncoupled respiration in hMADS-adipocytes. As the experiments were carried out in presence of rosiglitazone, one can assume that *PPAR γ 2* was not produced, precluding then any activation. Of note, PIs had no effect on *PRDM16* expression indicating that its presence was not sufficient to maintain *UCP1* expression in humans, unlike observed in murine models¹². LPV also impaired the expression of many sirtuins. Altogether these

observations are in line with those reported in mice indicating that *SIRT6* depletion decreases the expression of *PGC-1 α* and other thermogenic genes, as well as the mitochondrial respiratory capacity³⁹. Thus, PIs induced whitening of BBAs through inhibition of the *PPAR γ 2/PGC-1 α* and *SIRT* pathways upon transcriptional and putative epigenetic regulations.

Short-term treatment with LPV reduced the transcriptional activity of *UCP1* promoter and turned down *UCP1* without modifying *PLIN1* and *FABP4* protein expressions. It blunted the β -adrenergic/cAMP induction of *UCP1* mRNA. This processes occurred through an impairment of p38-MAPK phosphorylation. Transcriptional control of *UCP1* relies on regulatory regions present in the 5'-end of the gene, where a region immediately upstream of the transcription start site contains a CREB binding site. It likely up-regulates *UCP1* transcription in response to cAMP production⁴⁰. Note that in accordance with its lower unwanted side effects as compared to LPV, short-term treatment with DRV did not display any significant reduction of the forskolin-induced expression of *UCP1*. Thus LPV, but not DRV, promoted BBAs whitening by impeding the activable catecholamine pathway that produces cAMP, phosphorylates p38-MAPK and activates CREB.

Many studies have reported the pleiotropic effects of RESV and its efficiency especially to reverse metabolic disorders or to prevent some features of aging^{41,42}. Administration of RESV to mice increased the presence of BBAs in the inguinal WAT pointing out beneficial changes of the metabolic parameters²³. In parallel, concentrations of RESV higher than 10 μ M, reduced the differentiation of 3T3-L1 cells⁴³, while they elevated *SIRT1* expression in normal keratinocytes⁴⁴. In good agreement with these observations, we measured an increase in *UCP1* expression when lipid-laden cells were treated with RESV for 2 or 4 days at concentrations below 10 μ M. In contrast to RESV-reported effects in HIB-1B murine cells¹⁹, higher RESV concentrations strongly decreased *UCP1* and *CIDEA* expressions, reducing then the thermogenic ability of hMADS-adipocytes. *SIRT1* expression was induced in hMADS-adipocytes for RESV concentrations higher than 20 μ M as in others cell types. This underlines that in humans, the RESV-induced browning is likely independent of its anti-aging properties mediated through *SIRT1* expression, albeit this remains to be expressly established. Indeed

activation of SIRT1 was reported to inhibit white adipose differentiation in mice⁴⁵. Altogether these data sustained that SIRT1 impeded the acquisition of both white and brown/beige adipocyte features. In this regard, a recent study showing that caloric restriction does not induce WAT browning in obese humans is in line with our observations although no information on SIRT1 expression is provided⁴⁶.

In our model SB203580 was efficient to block RESV-induced UCP1 expression, pointing out the importance of an active p38-MAPK in this process. Thus, RESV activated an actionable pathway able to promote UCP1 expression. Indeed, RESV was reported to competitively inhibit cAMP-phosphodiesterases (PDE)⁴⁷, preventing then cAMP degradation. Elevation of cAMP levels activates PKA and p38-MAPK and increases UCP1 expression. In this regard, PDE inhibitors were shown to promote UCP1 expression *in vitro*⁴⁸ and the use of PDE inhibitors such as roflumilast unexpectedly and significantly lowers glucose in individuals with type 2 diabetes⁴⁹. Such a mechanism is suitable to account, at least in part, for the induction of UCP1 and further metabolic benefits of RESV.

While LPV inhibited UCP1 expression through basal and activable components, RESV displayed more limited potential in controlling UCP1 expression. When cells were incubated with RESV prior to LPV treatment, UCP1 expression was partially restored as RESV acted on the p38-MAPK activable pathway only. From this observation RESV displayed beneficial outcome to prevent some of the deleterious effects of PIs on adipose tissue. Thus, in addition to a cell-specific regulation, UCP1 was targeted in a drug-specific manner: PIs and RESV displaying opposite effects on its expression. LPV remains one of the recommended treatments by the World Health Organization for children exposed to HIV. Then, a RESV co-treatment may help to overcome the side effects. Of note, RESV was reported to attenuate the effects of PIs on rat body weight while improving the cardiac parameters⁵⁰. A putative role of UCP1 may account in part for these observations although no information regarding its expression is provided. The pertinence of the association of PIs with RESV remains to be evaluated for an *in vivo* use. In such a context, the impact of RESV on HIV replication and/or latency in infected individuals should also be clarified.

In conclusion, we show the importance of p38-MAPK to control the balance between browning and whitening of adipocytes. It is targeted by distinct drugs i.e. LPV and RESV which displayed opposite effects on UCP1 expression. While p38-MAPK was requested for RESV to induce UCP1, LPV reduced its phosphorylation, blunting then the activable component of the thermogenic response.

These observations may be relevant in the obesity context: a proper control of UCP1 induction is possible and may apply to propose safe anti-obesity therapies. They may also be of interest to restrain the loss of brown cells in the elderly. They may also apply to thwart systemic metabolic disorders characterized by an increased catabolism of stored nutrients such as cachexia. In this regard, an efficient reduction of UCP1 expression may consist in a therapeutic strategy with expected beneficial effects.

MATERIAL AND METHODS

Reagents

Unless specified otherwise, reagents were obtained from Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France), tissue culture media from LONZA (Levallois-Perret, France) and foetal calf serum from Dutscher (Brumath, France). PIs were obtained by extraction from commercially available tablets and capsules. Their purity was assessed by ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance and mass spectrometry.

Cell culture

hMADS cells were isolated more than fifteen years ago from adipose tissue, as surgical scraps from surgical specimen of various surgeries of young donors, with the informed consent of the parents. All methods were approved and performed in accordance with the guidelines and regulations of the Centre Hospitalier Universitaire de Nice Review Board. Chin APs were derived from the stroma vascular fraction of Caucasians women who underwent elective liposuction procedures. Informed consent was obtained from all patients

hMADS cells and chin-APs were grown, maintained and differentiated as previously described^{32,34}. They express a thermogenic signature upon appropriate differentiation conditions (referred as hMADS-adipocytes)³¹. Chin-derived adipocytes (referred as chin-adipocytes) express UCP1 after differentiation³². Cells were tested every other week for the absence of mycoplasma.

Gene expression analysis

Total RNA was extracted using the TRI-Reagent kit (Euromedex, Soufflweyersheim, France). Reverse transcription (RT) was performed using MMLV reverse transcriptase (Promega, Charbonnieres, France), as recommended by the manufacturer. Primer sequences are described in supplementary section. Real-time PCR assays were run on an ABI Prism One step real-time PCR machine (Applied-Biosystems, Courtaboeuf, France). Normalization was performed using *36B4* as a reference gene. Quantification was performed using the comparative Ct method.

Protein expression

Cells were rinsed in ice-cold PBS and whole cell extracts were prepared as described³⁵.

Thirty micrograms of proteins were resolved by SDS–PAGE under reducing conditions and transferred to Immobilon–P membranes (Millipore, Molshiem, France). The detection antibodies (see supplementary section) were used according to the manufacturer’s instructions.

The bound primary antibody was detected by horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody and visualized using an ECL detection kit (Millipore, Molsheim, France).

Chemiluminescence was observed using a molecular imager ChemiDoc XRS system (Bio-Rad, Marne la Coquette, France). The band intensity was quantified using Bio-Rad QuantityOne software.

UCP-1 promoter analysis

hMADS cells were infected with a lentivirus containing the plasmid, pLV.ExBi.P/Puro-hUCP1promoter-Luc(firefly)-T2A-hrGFP, which expresses luciferase and GFP driven by the human UCP1 promoter (4,148 bp)³⁶ and further selected upon puromycin resistance.

They were differentiated for 23 days in 12-well plates and further incubated or not in presence of 20µM DRV or LPV. Cells were rinsed with PBS and lysed. The luciferase activity was assessed using the luciferase assay system (Promega) and was normalized to the protein concentration of each sample.

Mitochondrial-specific dye staining

Differentiated cells were stained with MitoTracker dyes (MtT) for 25 min at 37°C in a humidified atmosphere containing 5%CO₂. MtT-Green (M7514, CMXRos, 200nM) and MtT-Orange (M7511, CMH2 TMRos, 1µM) solutions were added at time zero in presence or absence of PIs. Acquisitions were performed every 2 min. on 5 different fields for 25 min. Signals were quantified using the ImageJ software from three independent experiments.

Microscopic analysis

The spinning-disk experiments were done on an inverted IX81 Olympus microscope (Olympus, Center Valley, PA) at 37°C in a CO₂-controlled atmosphere. Separation of the emission signals was done using a GFP/mCherry filter cube containing a beam splitter 580 and two emission filters, BP 525/50 and LP 600 respectively. The LASER lines were at 405 nm (diode), 488 nm (DPSS), 561 nm (DPSS) and 640 nm (Diode)

(Andor technology, Belfast, UK). The system was controlled using MetaMorph software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Statistical analysis

The results are shown as mean \pm standard error of the mean (SEM), with the number of experiments indicated. Statistical significance was determined by *t*-tests using BiostaTGV (INSERM and Sorbonne University, PARIS, France). Probability values <0.05 were considered statistically significant and are marked with a single asterisk, <0.01 with double asterisks and <0.001 with triple asterisks.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank our colleagues for helpful suggestions and discussions. We are indebted to Dr. Pascal Peraldi for a careful reading of this manuscript.

The microscopy was done in the Prism facility, "Plateforme PRISM – IBV- CNRS UMR 7277- INSERM U1091-UNS». The help of Magali Mondin is acknowledged. The UCP1 construct was a gift from Pr. Y-H Tseng (Joslin Diabetes Center, USA).

This work was supported by ANRS (French National Agency for Research on AIDS and viral hepatitis) (grant number # AO 2013-1 CSS3) and the French Government (National Research Agency, ANR) through the "Investments for the Future" LABEX SIGNALIFE: program reference # ANR-11-LABX-0028-01.

C.R. is recipient of a pre-doctoral fellowship from ANRS and then from SIDACTION, **M.P.** is a pre-doctoral fellow from LABEX SIGNALIFE. **X. Y.** is recipient of a pre-doctoral fellow from the China Scholarship Council.

Conflict of interest.

The authors declare no conflict of interest.

Authors' Contributions:

C. R. design of experiments, data research and contributed to discussion

M. P. design of experiments, data research and contributed to discussion

X. Y. data research

S. A. Chemical synthesis and purification and contributed to discussion.

N. M. design of experiments and contributed to discussion

C. D. design of experiments and contributed to discussion

A. L. design of experiments, data research, contributed to discussion and wrote the manuscript

All authors approved the manuscript.

BIBLIOGRAPHY

- 1 Heaton, J. M. The distribution of brown adipose tissue in the human. *Journal of anatomy* **112**, 35-39 (1972).
- 2 Cypess, A. M. *et al.* Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *The New England journal of medicine* **360**, 1509-1517, (2009).
- 3 van Marken Lichtenbelt, W. D. *et al.* Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *The New England journal of medicine* **360**, 1500-1508, (2009).
- 4 Sanchez-Gurmaches, J. *et al.* PTEN loss in the Myf5 lineage redistributes body fat and reveals subsets of white adipocytes that arise from Myf5 precursors. *Cell metabolism* **16**, 348-362, (2012).
- 5 Seale, P. *et al.* Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell metabolism* **6**, 38-54 (2007).
- 6 Peirce, V., Carobbio, S. & Vidal-Puig, A. The different shades of fat. *Nature* **510**, 76-83, (2014).
- 7 Barbatelli, G. *et al.* The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **298**, E1244-1253, (2010).
- 8 Cunningham, S. *et al.* The characterization and energetic potential of brown adipose tissue in man. *Clinical science* **69**, 343-348 (1985).
- 9 Graja, A. & Schulz, T. J. Mechanisms of aging-related impairment of brown adipocyte development and function. *Gerontology* **61**, 211-217, (2015).
- 10 Lean, M. E., James, W. P., Jennings, G. & Trayhurn, P. Brown adipose tissue uncoupling protein content in human infants, children and adults. *Clinical science* **71**, 291-297 (1986).
- 11 Klingenberg, M. Uncoupling protein--a useful energy dissipator. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **31**, 419-430 (1999).
- 12 Cohen, P. & Spiegelman, B. M. Brown and Beige Fat: Molecular Parts of a Thermogenic Machine. *Diabetes* **64**, 2346-2351, (2015).
- 13 Tontonoz, P., Hu, E. & Spiegelman, B. M. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* **79**, 1147-1156 (1994).
- 14 Villarroya, F., Peyrou, M. & Giralt, M. Transcriptional regulation of the uncoupling protein-1 gene. *Biochimie* **134**, 86-92, (2017).
- 15 Landry, J. *et al.* The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 5807-5811, (2000).
- 16 Tissenbaum, H. A. & Guarente, L. Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **410**, 227-230, (2001).
- 17 Xu, F. *et al.* Diet-induced obesity and insulin resistance are associated with brown fat degeneration in SIRT1-deficient mice. *Obesity* **24**, 634-642, (2016).
- 18 Qiang, L. *et al.* Brown remodeling of white adipose tissue by SirT1-dependent deacetylation of Ppargamma. *Cell* **150**, 620-632, (2012).
- 19 Nohr, M. K., Bobba, N., Richelsen, B., Lund, S. & Pedersen, S. B. Inflammation Downregulates UCP1 Expression in Brown Adipocytes Potentially via SIRT1 and DBC1 Interaction. *International journal of molecular sciences* **18**, (2017).
- 20 Jing, E., Gesta, S. & Kahn, C. R. SIRT2 regulates adipocyte differentiation through FoxO1 acetylation/deacetylation. *Cell metabolism* **6**, 105-114, (2007).
- 21 Krishnan, J. *et al.* Dietary obesity-associated Hif1alpha activation in adipocytes restricts fatty acid oxidation and energy expenditure via suppression of the Sirt2-NAD+ system. *Genes & development* **26**, 259-270, (2012).
- 22 Wang, F., Nguyen, M., Qin, F. X. & Tong, Q. SIRT2 deacetylates FOXO3a in response to oxidative stress and caloric restriction. *Aging cell* **6**, 505-514, (2007).
- 23 Wang, S. *et al.* Resveratrol enhances brown adipocyte formation and function by activating AMP-activated protein kinase (AMPK) α 1 in mice fed high-fat diet. *Molecular nutrition & food research* **61**, 1600746 (1600741-1600711) (2016).
- 24 Caron-Debarle, M. *et al.* Adipose tissue as a target of HIV-1 antiretroviral drugs. Potential consequences on metabolic regulations. *Curr Pharm Des* **16**, 3352-3360 (2010).
- 25 Carr, A. & Cooper, D. A. Adverse effects of antiretroviral therapy. *Lancet* **356**, 1423-1430 (2000).
- 26 Torres, R. A. & Lewis, W. Aging and HIV/AIDS: pathogenetic role of therapeutic side effects. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **94**, 120-128, (2014).
- 27 Bastard, J. P. *et al.* Association between altered expression of adipogenic factor SREBP1 in lipotrophic adipose tissue from HIV-1-infected patients and abnormal adipocyte differentiation and insulin resistance. *Lancet* **359**, 1026-1031 (2002).
- 28 Gallego-Escuredo, J. M. *et al.* Differential effects of efavirenz and lopinavir/ritonavir on human adipocyte differentiation, gene expression and release of adipokines and pro-inflammatory cytokines. *Curr HIV Res* **8**, 545-553 (2010).

- 29 Kim, R. J., Wilson, C. G., Wabitsch, M., Lazar, M. A. & Stepan, C. M. HIV protease inhibitor-specific alterations in human adipocyte differentiation and metabolism. *Obesity* **14**, 994-1002, (2006).
- 30 Vernochet, C. *et al.* Human immunodeficiency virus protease inhibitors accumulate into cultured human adipocytes and alter expression of adipocytokines. *The Journal of biological chemistry* **280**, 2238-2243 (2005).
- 31 Elabd, C. *et al.* Human multipotent adipose-derived stem cells differentiate into functional brown adipocytes. *Stem cells* **27**, 2753-2760 (2009).
- 32 Kouidhi, M. *et al.* Characterization of human knee and chin adipose-derived stromal cells. *Stem cells international* **2015**, 592090, (2015).
- 33 Darini, C. Y. *et al.* Targeting cancer stem cells expressing an embryonic signature with anti-proteases to decrease their tumor potential. *Cell death & disease* **4**, e706, (2013).
- 34 Rodriguez, A. M. *et al.* Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue. *Biochemical and biophysical research communications* **315**, 255-263 (2004).
- 35 Ravaud, C. *et al.* IER3 Promotes Expansion of Adipose Progenitor Cells in Response to Changes in Distinct Microenvironmental Effectors. *Stem cells* **33**, 2564-2573, (2015).
- 36 Xue, R. *et al.* Clonal analyses and gene profiling identify genetic biomarkers of the thermogenic potential of human brown and white preadipocytes. *Nature medicine* **21**, 760-768, (2015).
- 37 Viengchareun, S. *et al.* Mitochondrial toxicity of indinavir, stavudine and zidovudine involves multiple cellular targets in white and brown adipocytes. *Antiviral therapy* **12**, 919-929 (2007).
- 38 Ravaud, C., Pare, M., Azoulay, S., Dani, C. & Ladoux, A. Impairment of the activin A autocrine loop by lopinavir reduces self-renewal of distinct human adipose progenitors. *Scientific reports* **7**, 2986, (2017).
- 39 Yao, L. *et al.* Cold-Inducible SIRT6 Regulates Thermogenesis of Brown and Beige Fat. *Cell reports* **20**, 641-654, (2017).
- 40 Cao, W. *et al.* p38 mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene. *Molecular and cellular biology* **24**, 3057-3067 (2004).
- 41 Chachay, V. S. *et al.* Resveratrol—pills to replace a healthy diet? *British journal of clinical pharmacology* **72**, 27-38, (2011).
- 42 Marchal, J., Pifferi, F. & Aujard, F. Resveratrol in mammals: effects on aging biomarkers, age-related diseases, and life span. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1290**, 67-73, (2013).
- 43 Chang, C. C., Lin, K. Y., Peng, K. Y., Day, Y. J. & Hung, L. M. Resveratrol exerts anti-obesity effects in high-fat diet obese mice and displays differential dosage effects on cytotoxicity, differentiation, and lipolysis in 3T3-L1 cells. *Endocrine journal* **63**, 169-178, (2016).
- 44 Wu, Z., Uchi, H., Morino-Koga, S., Shi, W. & Furue, M. Resveratrol inhibition of human keratinocyte proliferation via SIRT1/ARNT/ERK dependent downregulation of aquaporin 3. *Journal of dermatological science* **75**, 16-23, (2014).
- 45 Fang, J. *et al.* Sirt7 promotes adipogenesis in the mouse by inhibiting autocatalytic activation of Sirt1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **114**, E8352-E8361, (2017).
- 46 Barquissau, V. *et al.* Caloric Restriction and Diet-Induced Weight Loss Do Not Induce Browning of Human Subcutaneous White Adipose Tissue in Women and Men with Obesity. *Cell reports* **22**, 1079-1089, (2018).
- 47 Park, S. J. *et al.* Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases. *Cell* **148**, 421-433, (2012).
- 48 Kraynik, S. M., Miyaoka, R. S. & Beavo, J. A. PDE3 and PDE4 isozyme-selective inhibitors are both required for synergistic activation of brown adipose tissue. *Molecular pharmacology* **83**, 1155-1165, (2013).
- 49 Wouters, E. F. *et al.* Effect of the phosphodiesterase 4 inhibitor roflumilast on glucose metabolism in patients with treatment-naive, newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **97**, E1720-1725, (2012).
- 50 Symington, B., Mapanga, R. F., Norton, G. R. & Essop, M. F. Resveratrol Co-Treatment Attenuates the Effects of HIV Protease Inhibitors on Rat Body Weight and Enhances Cardiac Mitochondrial Respiration. *PloS one* **12**, e0170344, (2017).

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Effects of PIs treatment on differentiation of hMADS cells.

a-e. Expression of the adipogenic/thermogenic markers *PLIN1*, *UCP1*, *CIDEA*, *PPAR γ 2* and *PGC1 α* after 17 days of differentiation in absence or presence of increasing concentrations of PIs.

Expression of the markers was assessed by real-time RT-PCR and normalized for the expression of *36B4* mRNA. It was measured in cells grown in the differentiation medium in absence of PIs (white bar), in presence of DRV (green bars) or LPV (blue bars). The means \pm SEM were calculated from three independent experiments, with determinations performed in duplicate (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ND means “not significantly different”).

f. Expression of *PLIN1* and *UCP1* after 17 days of differentiation in absence or presence of increasing concentrations of PIs.

Expression of the proteins was measured in cells grown in the differentiation medium in absence or in presence of increasing concentrations of PIs. Expressions of *PLIN1* (upper panel) and *UCP1* (middle panel) and Tubulin β I used as a loading control (lower panel) were analyzed by Western blot using specific antibodies. Representative Western blots are shown. Thirty μ g of proteins were loaded in each lane.

g. Transcriptional inhibition of *UCP1* promoter in response to PIs.

The luciferase expression was driven by the human *UCP1* promoter. Luciferase activity was determined after 4 days of incubation with 20 μ M of PIs. The means \pm SEM were calculated from 4 independent experiments performed in triplicate. (* $p < 0.05$ as compared to untreated cells, ND means “not significantly different”).

Figure 2: PIs induced a blockade of *UCP1* expression in hMADS-adipocytes

a. Expression of *PLIN1*, *UCP1* and *FABP4* in cells treated with LPV or DRV.

Thirty μ g of proteins prepared from hMADS differentiated for the indicated period of time were treated during the last 2 days or more as indicated with 20 μ M of LPV or DRV and were loaded onto a 10% acrylamide gel to measure the expressions of *PLIN1* and *UCP1* and onto a 15 % acrylamide gel to measure the expression of *FABP4* expression. Expression of Tubulin- β I was used as a loading control (lower panel). A representative Western blot is shown.

b-d. Quantification of the signals.

Expression of the proteins was quantified using the Quantity One Program and compared to the expression of Tubulin β I. Two independent experiments performed in duplicate were analyzed.

Figure 3: Lopinavir treatment blocked β -adrenergic responses.

a. Forskolin-induced p38 phosphorylation in cells treated for 4 days with 20 μ M DRV or LPV.

Proteins were prepared from hMADS adipose progenitors differentiated for 21 days and further treated during 4 days with LPV or DRV and then submitted to a 15 min. stimulation with 10 μ M forskolin as indicated. Thirty μ g of proteins were loaded onto a 10 % acrylamide gel to measure the expressions of phosphorylated or total p38. Expression of Tubulin- β 1 was used as a loading control (lower panel). Representative Western blots are shown.

b, Quantification of the signals.

Expression of the proteins was quantified using the Quantity One Program and compared to the expression of Tubulin β 1. Two independent experiments performed in duplicate were analyzed.

c, UCP1 mRNA expression of differentiated hMADS cells, exposed or not to DRV or LPV at the indicated concentrations for 1 day prior forskolin stimulation.

UCP1 expression was assessed by real time RT-PCR and normalized to the expression of 36B4 mRNA. Comparison of the PI-induced alteration in control cells (yellow histograms) or in cells stimulated for 4 h with 1 μ M forskolin (orange histograms). Results are reported as the means \pm SEM calculated from 3 independent experiments, with determinations performed in duplicate (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, ND means “not significantly different”).

Figure 4: Lopinavir induced ROS production in differentiated hMADS cells.

a, LPV induced a significant and time dependent production of ROS.

hMADS-adipocytes were visualized during incubation with both MitoTracker Green and MitoTracker Orange, in presence or absence of PIs as indicated, using an IX81 Olympus microscope under brightfield, a GFP/mCherry filter cube. Cells showed cytoplasmic labeling and nuclear sparing, consistent with mitochondrial localization. Magnification 100X.

b, Quantification of the signals.

LPV induced a significant and time dependent ROS production as measured from the ratio of orange versus green fluorescence. The means \pm SEM were calculated from 3 independent experiments, with determinations performed in quintuplicate (*** $p < 0.001$, ND means “not significantly different”).

c-d, Effect of PIs treatment on SOD2 expression.

SOD2 expression was assessed by real-time RT-PCR and normalized for the expression of 36B4 mRNA. SOD2 expression was measured in cells treated for 2 days (c) or grown in the differentiation medium (d) in absence of PIs (white bar), in presence of DRV (green bars) or LPV (blue bars). The means \pm SEM were calculated from three independent experiments, with determinations performed in duplicate (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, ND means “not significantly different”).

Figure 5: PIs modified the expression of genes associated with senescence in adipocytes.

Sirtuins expression was measured after 17 days of differentiation in absence or presence of increasing concentrations of PIs. *SIRT* expressions were assessed by real-time RT-PCR and normalized for the expression of *36B4* mRNA. *SIRT* expressions were measured in cells treated for 2 days (a-d) or grown in the differentiation medium (e-h) in absence of PIs (white bar), in presence of DRV (green bars) or LPV (blue bars). The means \pm SEM were calculated from three independent experiments, with determinations performed in duplicate (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ND means “not significantly different”).

Figure 6: Resveratrol induces UCP1 in a p38 MAPK-dependent manner and counterbalance LPV’s effect.

a, RESV increased UCP1 expression in a dose dependent manner.

Protein expression was measured in hMADS-adipocytes grown in the differentiation medium in absence or in presence of increasing concentrations of RESV during the last four days. Expressions of UCP1 (lower panel), PLIN1 (upper panel) and Tubulin- β I used as a loading control (intermediate panel) were analyzed by Western blot using specific antibodies. Representative Western blots are shown.

b, Quantification of the signals.

Expression of the proteins was quantified using the Quantity one Program and compared to the expression of Tubulin- β I. The means \pm SEM were calculated from four independent experiments (* $p < 0.05$, ND means “not significantly different”).

c, RESV has opposite effects on UCP1 expression depending on its concentration

UCP1 (brown bars), *CIDEA* (yellow bars) and *SIRT1* (green bars) expressions were assessed by real-time RT-PCR and normalized for the expression of *36B4* mRNA. Expression was measured in cells grown in the differentiation medium in absence or in presence of increasing doses of RESV between days 17-21. The means \pm SEM were calculated from three independent experiments, with determinations performed in duplicate (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ND means “not significantly different”).

d, SB203580 blocks RESV-induced UCP1 expression.

Protein expression was measured in hMADS-adipocytes differentiated for 17 days. They were treated or not with SB203580 (5 μ M) and further incubated for 4 days in absence or in presence of RESV (1 μ M). Expression of UCP1 (lower panel), and Tubulin- β I used as a loading were analyzed by Western blot using specific antibodies. Representative Western blots are shown.

e, Quantification of the signals.

Expression of UCP1 was quantified using the Quantity One Program and compared to the expression of Tubulin β I. The means \pm SEM were calculated from six independent experiments (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

f, RESV partially restored the LPV-impaired UCP1 expression.

Protein expression was measured in hMADS-adipocytes differentiated for 17 days. They were treated or not with 1 μ M RESV and further incubated for 4 days in absence or in presence of LPV (10 μ M). Expressions of UCP1 (lower panel), Tubulin- β l used as a loading control (upper panel) were analyzed by Western blot using specific antibodies. Representative Western blots are shown.

g) Quantification of the signals.

Expression of the proteins was quantified using the Quantity One Program and compared to the expression of Tubulin β l. The means \pm SEM were calculated from three independent experiments (* p <0.05, ** p <0.01, ND means “not significantly different”).

Figure 7: Schematic representation of the mechanism by which resveratrol counteracts the repression of UCP1 induced by HIV-Protease inhibitors.

Lopinavir and resveratrol have a dual effect on UCP1 expression through phosphorylation of p38-MAPK. RESV also modulated the expression of the anti-aging protein SIRT1. However, increasing *SIRT1* expression decreased UCP1 expression, indicating that BBA phenotype unlikely depended on this protein.

FIGURE 1

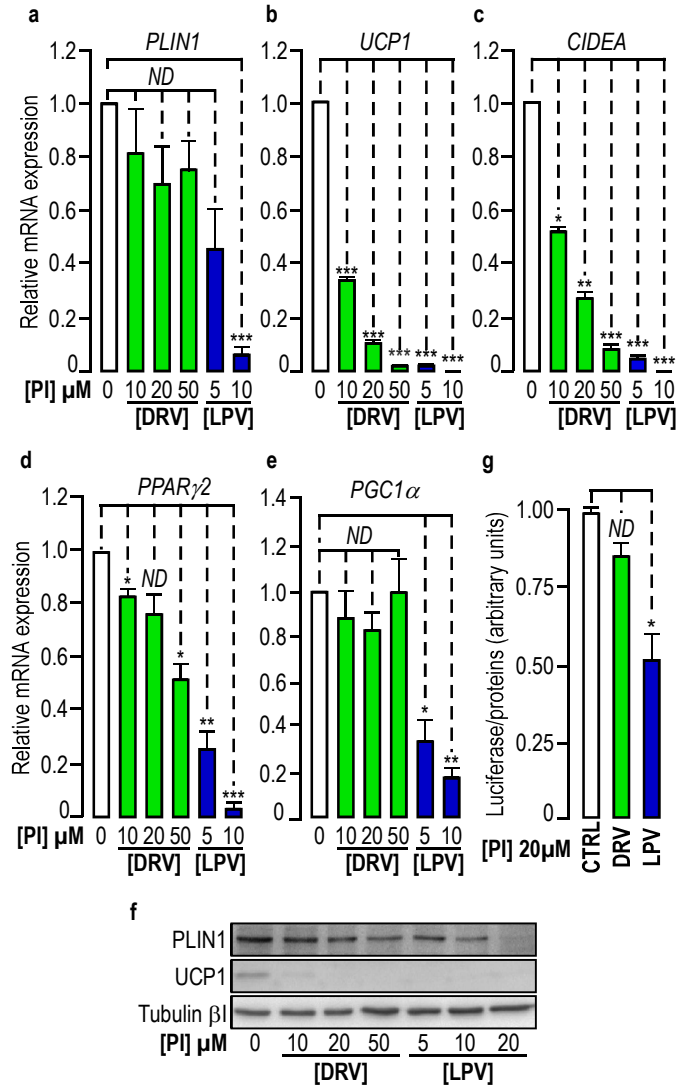


FIGURE2

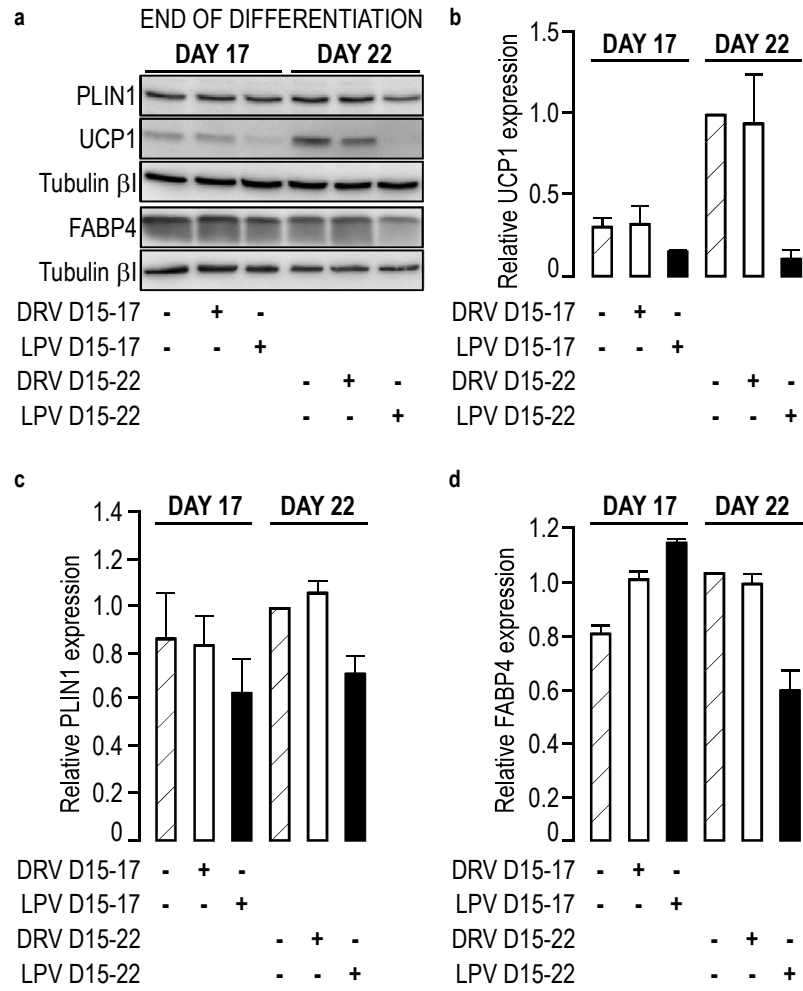


FIGURE 3

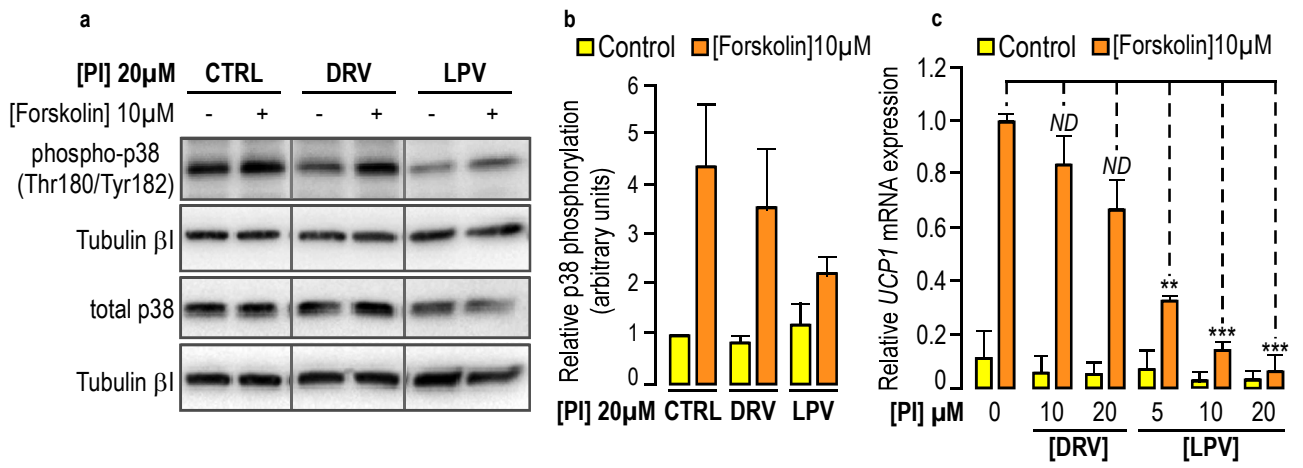


FIGURE 4

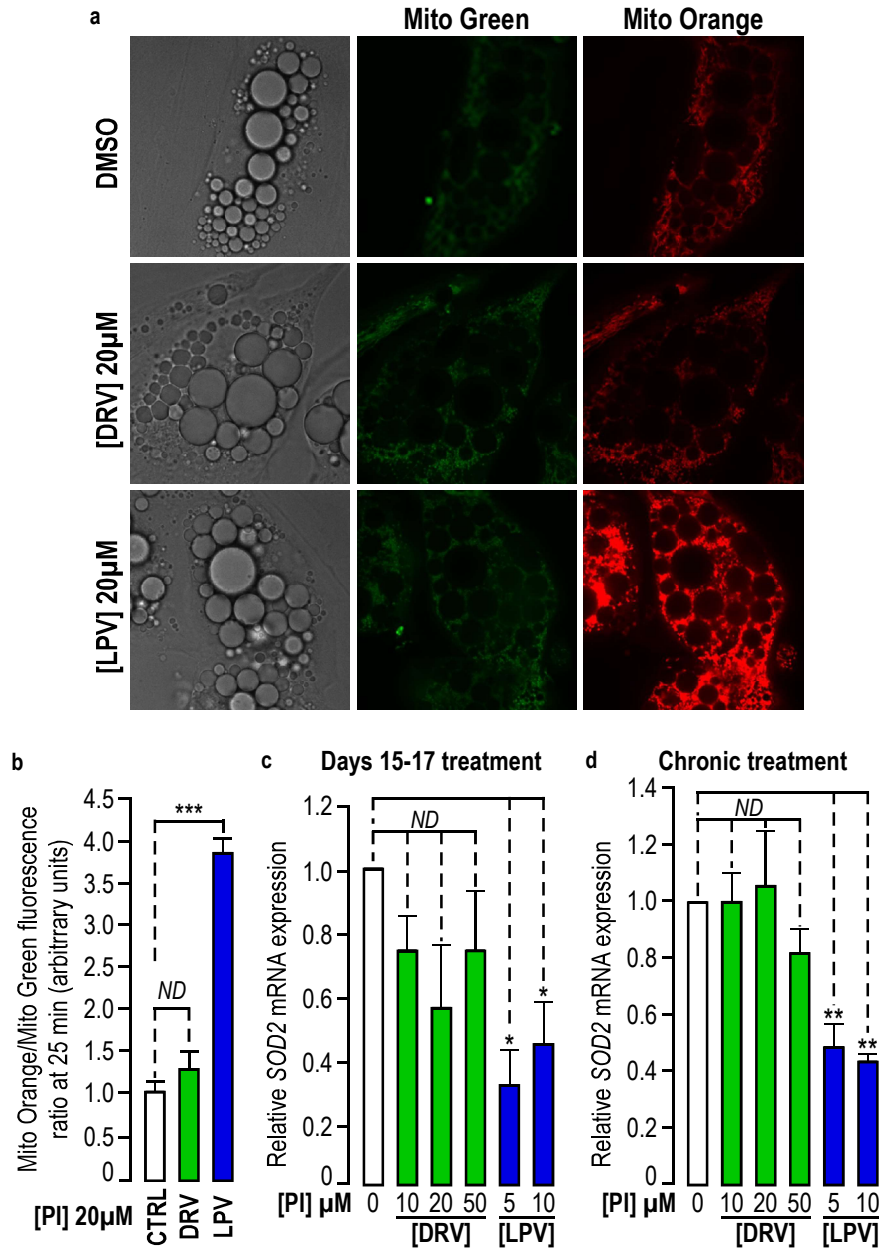


FIGURE 5

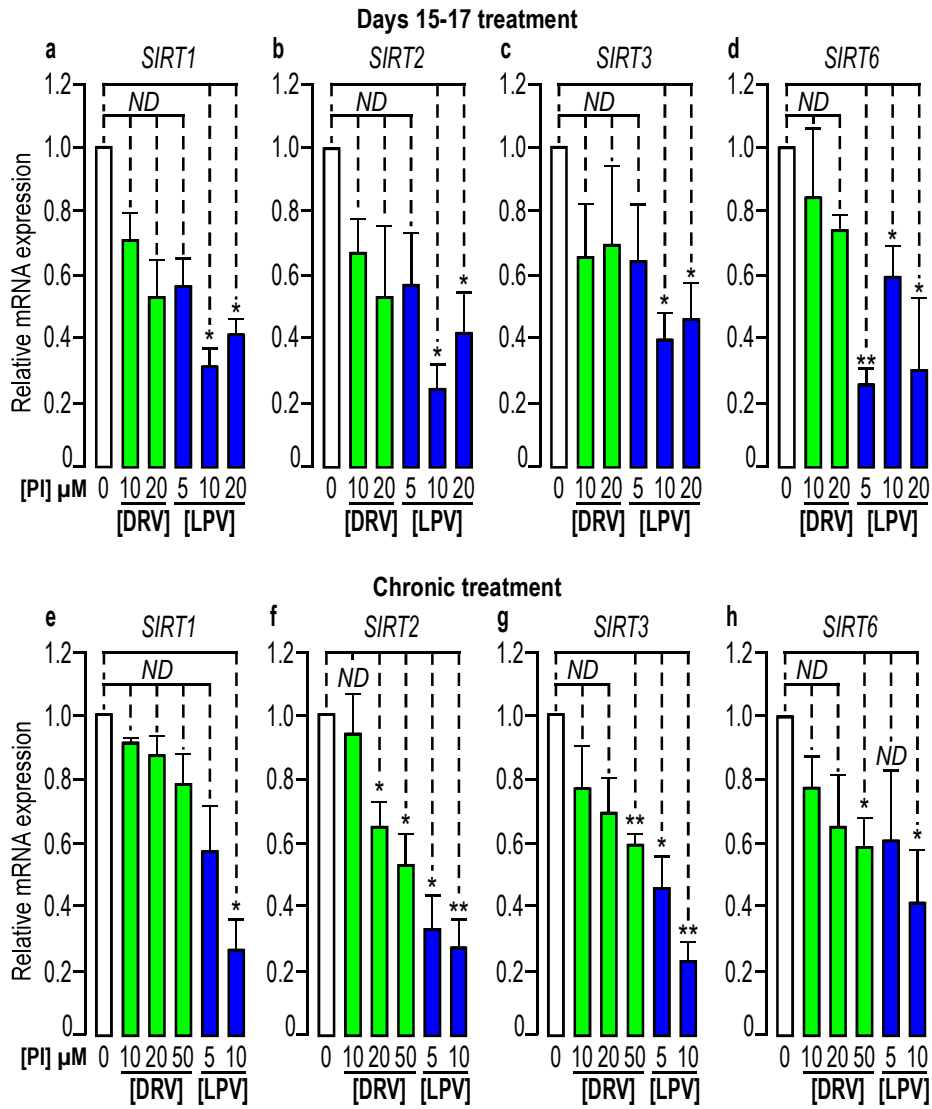


FIGURE 6

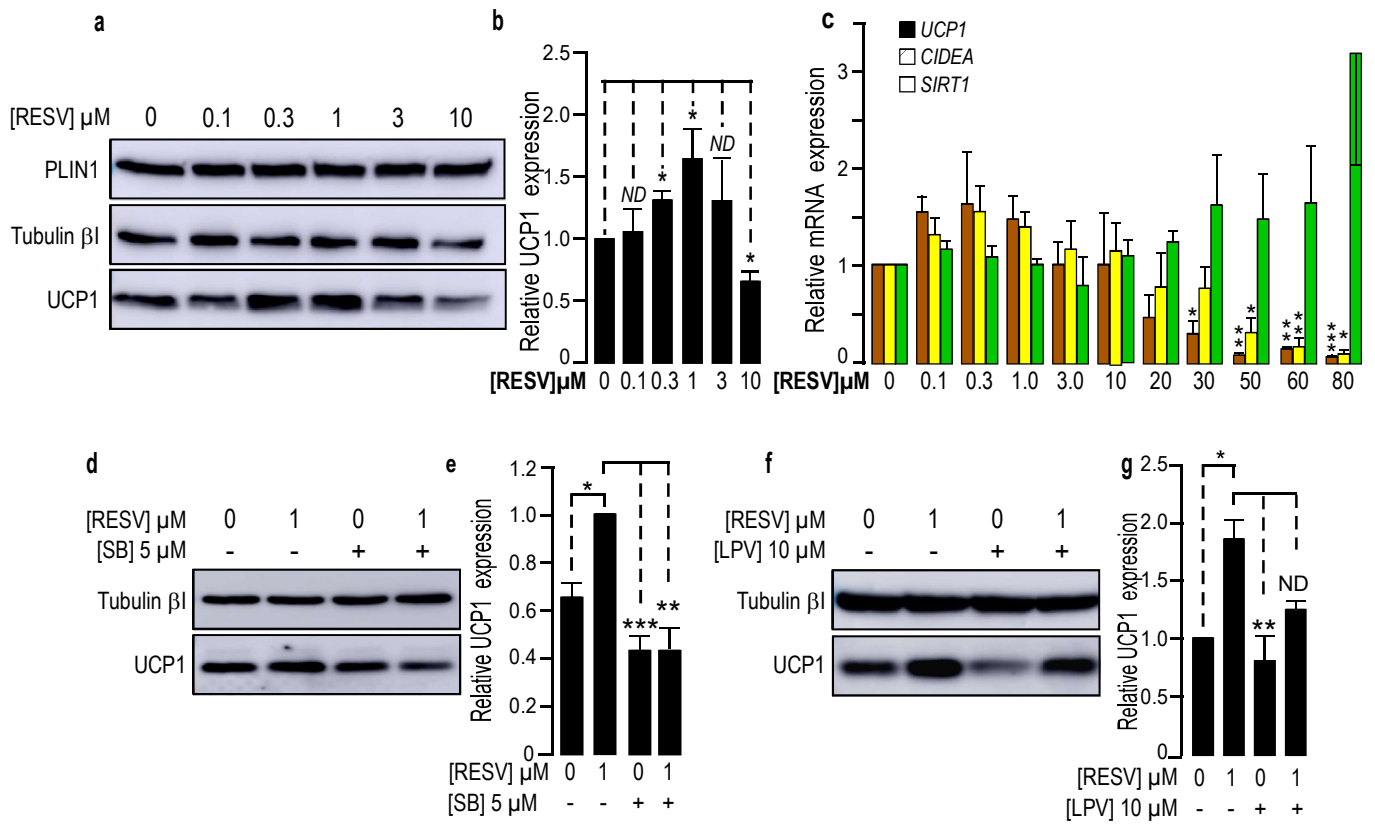
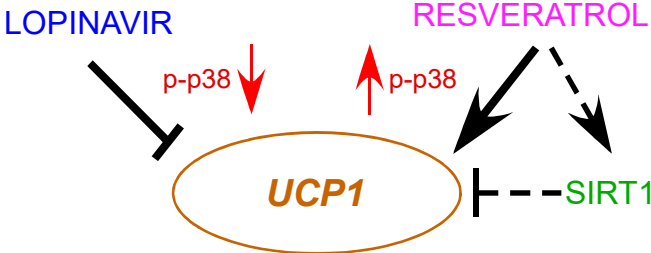


FIGURE 7



SUPPLEMENTARY INFORMATION

**Mechanistic insights in UCP1 expression in human adipocytes:
Resveratrol counteracts the HIV-Protease inhibitors-induced adipocyte whitening**

***Christophe RAVAUD*^{1,4*}, *Martin PARE*^{1*}, *Xi YAO*¹, *Stéphane AZOULAY*²,
Nathalie M. MAZURE^{3,5}, *Christian DANI*^{1#} and *Annie LADOUX*^{1#}**

SUPPLEMENTARY INFORMATION

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary information

Sequences for the primers used in this study

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>PLIN1</i>	5'-ACCATCTCCACCCGCTC-3'	5'-GATGGGAACGCTGATGCTGT-3'
<i>UCP1</i>	5'-GTGTGCCCAACTGTGCAATG-3'	5'-CCAGGATCCAAGTCGCAAGA-3'
<i>36B4</i>	5'-CTACAACCCTGAAGAAGTGCTTG-3'	5'-CAATCTGCAGACAGACTGG-3'
<i>CIDEA</i>	5'-GGCAGGTTACGTGTGGATA-3'	5'-GAAACACAGTGTGGCTCAAGA-3'
<i>PPARγ2</i>	5'-AAACCCTATTCCATGCTGTT-3'	5'-ATCAGTGAAGGAATCGCTTTC-3'
<i>FABP4</i>	5'-TGTGCAGAAATGGGATGGAAA-3'	5'-CAACGTCCCTTGCTTATGCT-3'
<i>PGC-1α</i>	5'-CTGTGTACCACCCAAATCCTTAT-3'	5'-TGTGTGCGAGAAAAGGACCTTGA-3'
<i>SOD2</i>	5'-ATCAGGATCCACTGCAAGGAA-3'	5'-CGTGCTCCCACACATCAATC-3'
<i>SIRT1</i>	5'-AGTGGCTGGAACAGTGAGAA-3'	5'-CAAGCCGCCTACTAATCTGC-3'
<i>SIRT2</i>	5'-CTGCTGGACGAGCTGACCTT-3'	5'-TGCCTGCGGATGTGGAGATT-3'
<i>SIRT3</i>	5'-TTCACGGCGTGGAAGCCTA-3'	5'-TGGTCCATCAAGCTTCCAGT-3'
<i>SIRT4</i>	5'-TCACTGCCTGGGAGAAGAAG-3'	5'-TGGGTCTATCAAAGGCAGCA-3'
<i>SIRT5</i>	5'-CTGGATCCTGCCATTCTGGA-3'	5'-CTGGGTACACCACAGAGGAA-3'
<i>SIRT6</i>	5'-TCTTCCAGTGTGGTGTCCA-3'	5'-CTCCTCCATGGTCCAGACTC-3'
<i>SIRT7</i>	5'-GCCGAAGCTTTACATCGTGA-3'	5'-TGACGTCATCACACTTCCCA-3'

Supplementary data: Table 1

References for the antibodies used in this study.

ANTIBODY	MANUFACTURER	CATALOG NUMBER	DILUTION
ANTI-UCP1	Millipore	#662045	1000
ANTI-PLIN1	ACRIS Gmbh	#BP5015	1000
ANTI-PRDM16	Santa Cruz Biothechnology	#SC130243	200
ANTI-Tubulin β 1	SIGMA ALDRICH	#T7816	5000
ANTI-FABP4	Millipore	# MABS172	1000
ANTI-p38 MAPK	Cell Signaling Technology	# 9212	1000
ANTI-phospho p38 MAPK	Cell Signaling Technology	#9211	1000

SUPPLEMENTARY FIGURES LEGENDS

Supplementary Figure 1: Time course for PLIN1, UCP1 and FABP4 expression during adipose differentiation of hMADS cells and chin APs.

a & e Time course for the expression of different markers in adipocytes.

Expressions of the proteins UCP1, PLIN1, and FABP4 were measured in hMADS or chin adipose progenitors differentiated for the indicated period of time. Expression of Tubulin- β I was used as a loading control (lower panel). A representative Western blot is shown.

b-d; f-h Quantification of the signals.

Expression of the proteins was quantified using the Quantity One Program and to the expression of Tubulin β I. Two independent experiments performed in duplicate were analyzed.

Supplementary Figure 2: Effects of PIs treatment on differentiation of Chin APs.

a-e Expression of the adipogenic/thermogenic markers *PLIN1*, *UCP1*, *CIDEA*, *PPAR γ 2* and *PGC1 α* after 17 days of differentiation in absence or presence of increasing concentrations of PIs.

Markers expressions were assessed by real-time RT-PCR and normalized for the expression of *36B4* mRNA. Markers expressions were measured in cells grown in the differentiation medium in absence of PIs (dashed bar), in presence of DRV (white bars) or LPV (black bars). The means \pm SEM were calculated from 5 independent experiments, with determinations performed in duplicate (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ND means "not significantly different").

f Expression of PLIN1 and UCP1 after 17 days of differentiation in absence or presence of increasing concentrations of PIs.

Proteins expressions were measured in cells grown in the differentiation medium in absence or presence of increasing concentrations of PIs. Expressions of PLIN1 (upper panel), UCP1 (middle panel) and Tubulin β I used as a loading control (lower panel) were analyzed by Western blot using specific antibodies. Representative Western blots are shown. Thirty μ g of proteins were loaded in each lane.

Supplementary Figure 3: Expression of PRDM16 after 17 days of differentiation in absence or presence of increasing concentrations of PIs.

Expression of the proteins was measured in hMADS (a) and Chin-AP (b) grown in the differentiation medium in absence or presence of increasing concentrations of PIs. Expression of PRDM16 (upper panel) and Tubulin β I used as a loading control (lower panel) were analyzed by Western blot using specific antibodies. Representative Western blots are shown.

Supplementary Figure 4: PI induced a blockade of UCP-1 expression in differentiated cells

a Expression of PLIN1, UCP1 and FABP4 in cells treated with LPV or DRV.

Proteins were prepared from hMADS differentiated for the indicated period of time and treated during the last 2 days or more as indicated with 20 μ M of LPV or DRV. Expressions of PLIN1, UCP1 and FABP4 were measured with Tubulin β I as a loading control. A representative Western blot is shown.

b-d Quantification of the signals.

Expression of the proteins was quantified using the Quantity One Program and adjusted to the expression of Tubulin β I. Two independent experiments performed in duplicate were analyzed.

Supplementary Figure 5: Time course for PIs induced ROS production in differentiated hMADS cells.

This time course represents the full recording of the images shown in Figure 4. hMADS adipocytes were visualized during incubation with both MtT Green and MtT Orange in presence or absence of PIs as indicated, using an IX81Olympus microscope under bright field with a GFP/mCherry filter cube. Cells showed cytoplasmic labeling and nuclear sparing, consistent with mitochondrial localization. The dark field and fluorescence at 25 minutes corresponded to the results presented in Figure4.

Supplementary Figure 6: Lopinavir modified the respiration of chin-derived adipocytes.

a LPV induced a significant production of ROS.

Chin-adipocytes were visualized during incubation with both MitoTracker Green and MitoTracker Orange, in presence or absence of PIs as indicated, using an IX81Olympus microscope under brightfield, a GFP/mCherry filter cube. Cells showed cytoplasmic labeling and nuclear sparing, consistent with mitochondrial localization. Magnification 100X.

b Quantification of the signals.

Ratio of orange versus green fluorescence measured after 25 minutes of treatment was performed in absence or presence of PIs. The means \pm SEM were calculated from 6 acquisitions performed in four independent experiments (* $p < 0.05$, ND means "not significantly different").

c Effect of PIs treatment on SOD2 expression.

SOD2 expression was assessed by real-time RT-PCR and normalized to the expression of 36B4 mRNA. SOD2 expression was measured in cells grown in the differentiation medium in absence of PIs (dashed bar), in presence of DRV (white bars) or LPV (black bars). The means \pm SEM were calculated from 3 independent experiments, with determinations performed in duplicate (** $p < 0.01$, ND means "not significantly different").

d Oxygen consumption rate was measured in chin APs differentiated for 17 days towards brown adipocytes in real time with a Seahorse XF containing 1g/l glucose and pyruvate 1 mM. Cells were treated with 10 μ M DRV or LPV for 3 days. Basal mitochondrial activity was evaluated by measurement of OCR in untreated cells (red

curve) or in cells treated with 10 μ M DRV (green curve) or LPV (blue curve) for 3 days prior analysis. Oligomycin (Oligo 1 μ M), carbonilcyanide-*p*-trifluoromethoxyphenylhydrazine (FCCP 0.5 μ M) and rotenone/antimycineA (1 μ M) were injected at the indicated times. One experiment carried out in quadruplicate is presented

Supplementary Figure 7: Expression of *Sirtuins* in hMADS-adipocytes and chin-adipocytes.

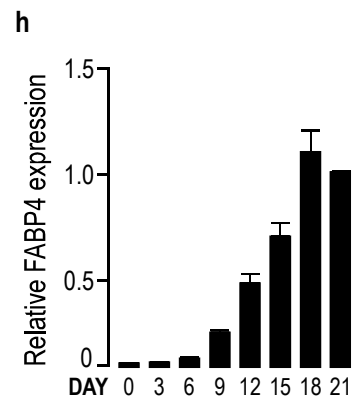
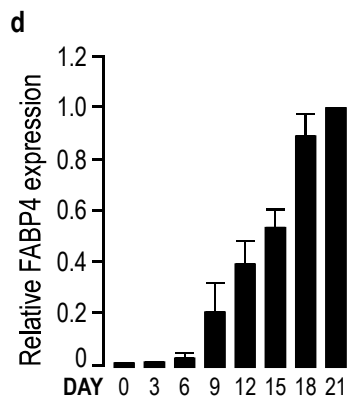
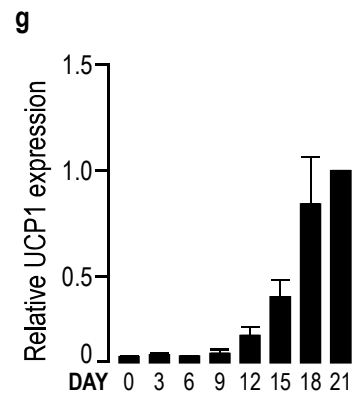
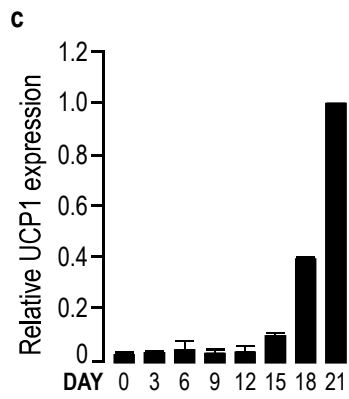
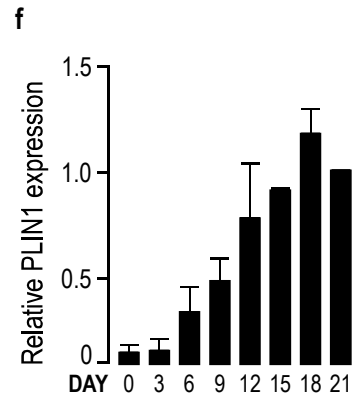
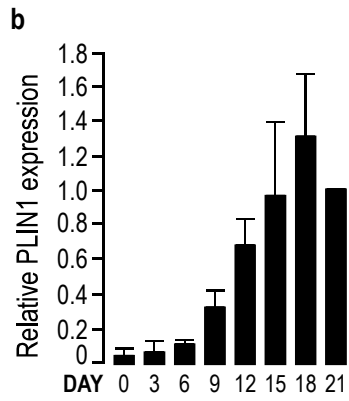
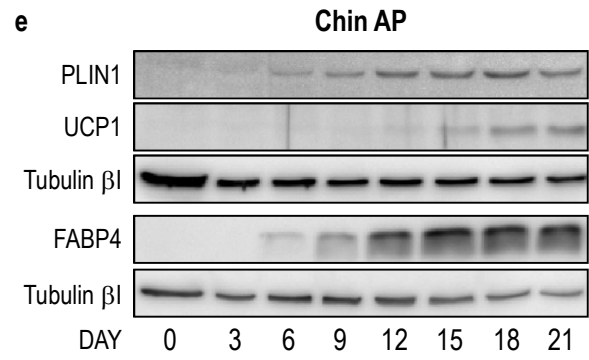
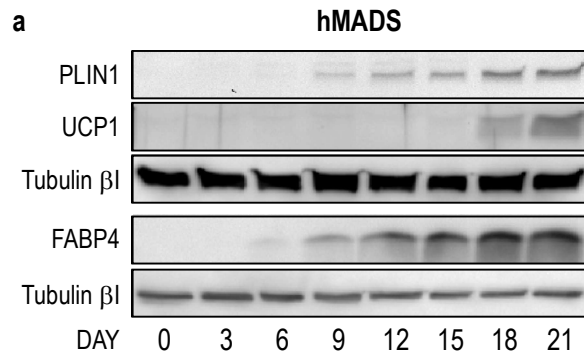
a-b -Comparison of *Sirtuins* expression in hMADS-adipocytes and chin-adipocytes.

SIRT expressions were assessed by real-time RT-PCR and normalized for the expression of *36B4* mRNA in hMADS and chin cells differentiated for 17 days. The means \pm SEM were calculated from 3 independent experiments for both cell types.

c-f Expression of *Sirtuins* in chin-adipocytes after 17 days of differentiation in absence or presence of increasing concentrations of PIs.

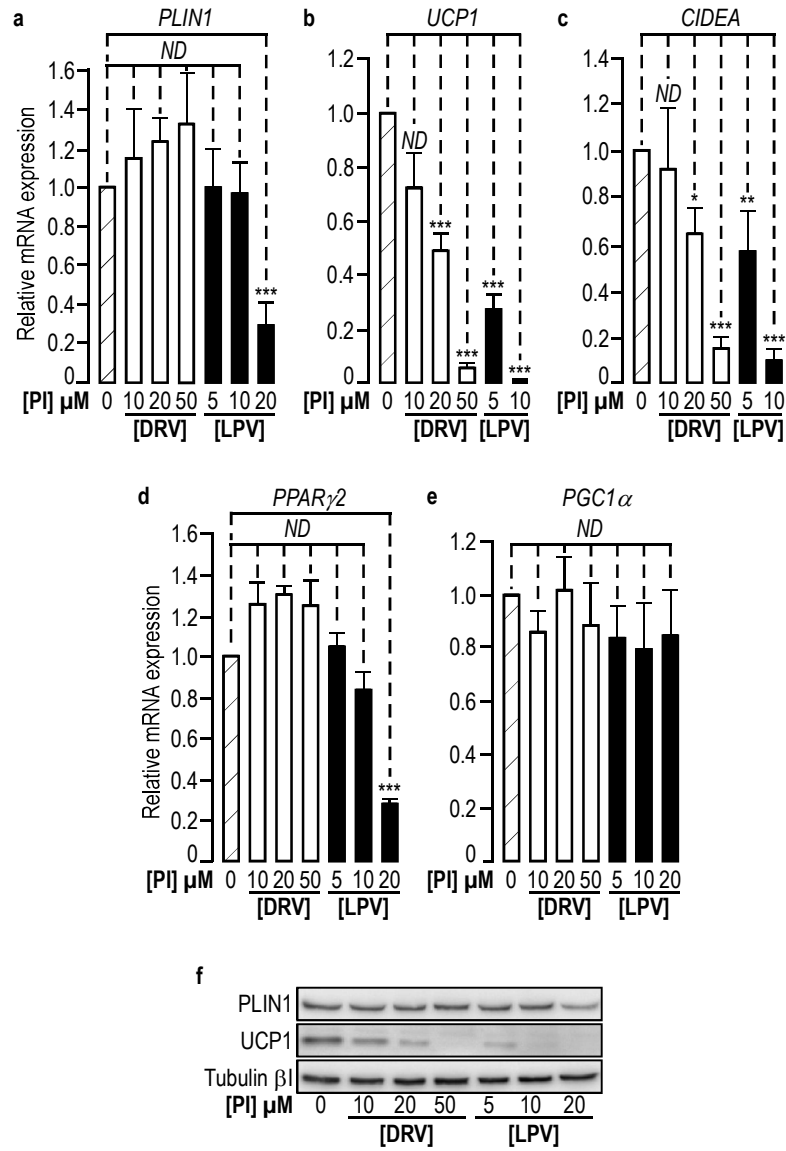
SIRT expressions were assessed by real-time RT-PCR and normalized for the expression of *36B4* mRNA in cells grown in the differentiation medium in absence of PIs (dashed bar), in presence of DRV (white bars) or LPV (black bars). The means \pm SEM were calculated from 3 independent experiments, with determinations performed in duplicate (* p <0.05, ND means "not significantly different").

SUPPLEMENTARY FIGURE 1

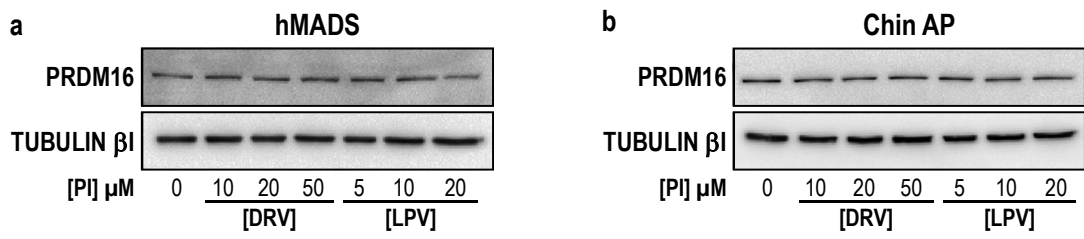


SUPPLEMENTARY FIGURE 2

CHIN AP

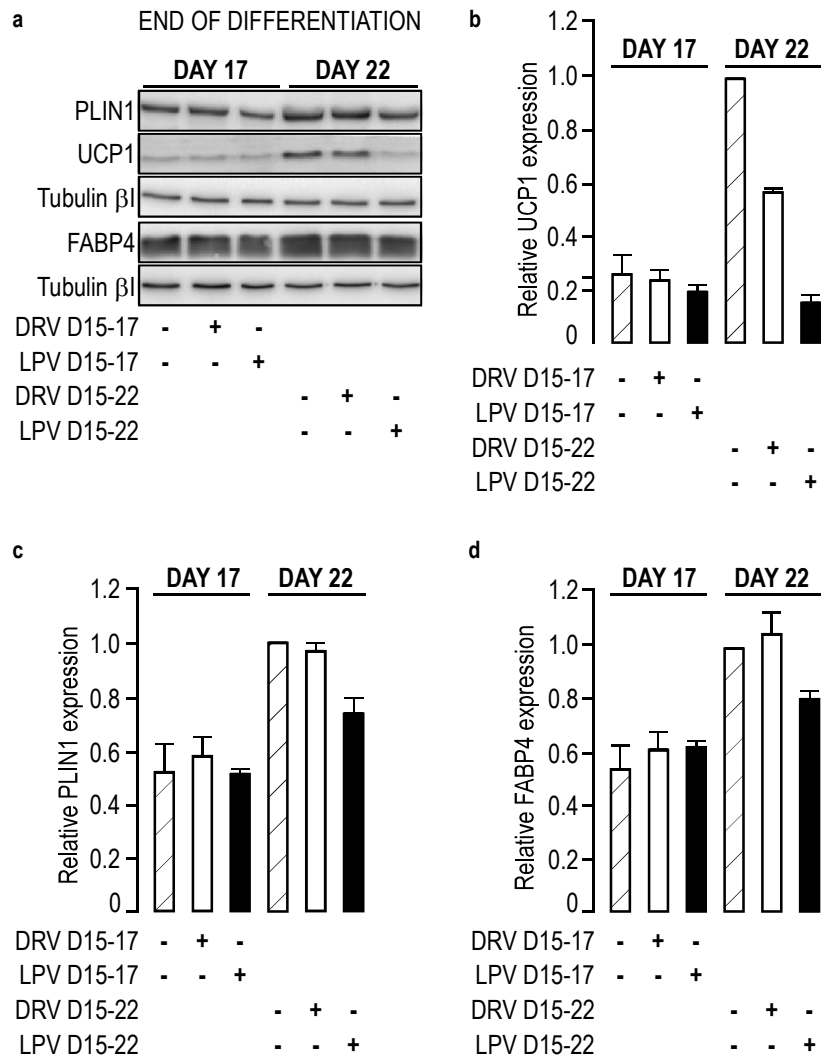


SUPPLEMENTARY FIGURE 3



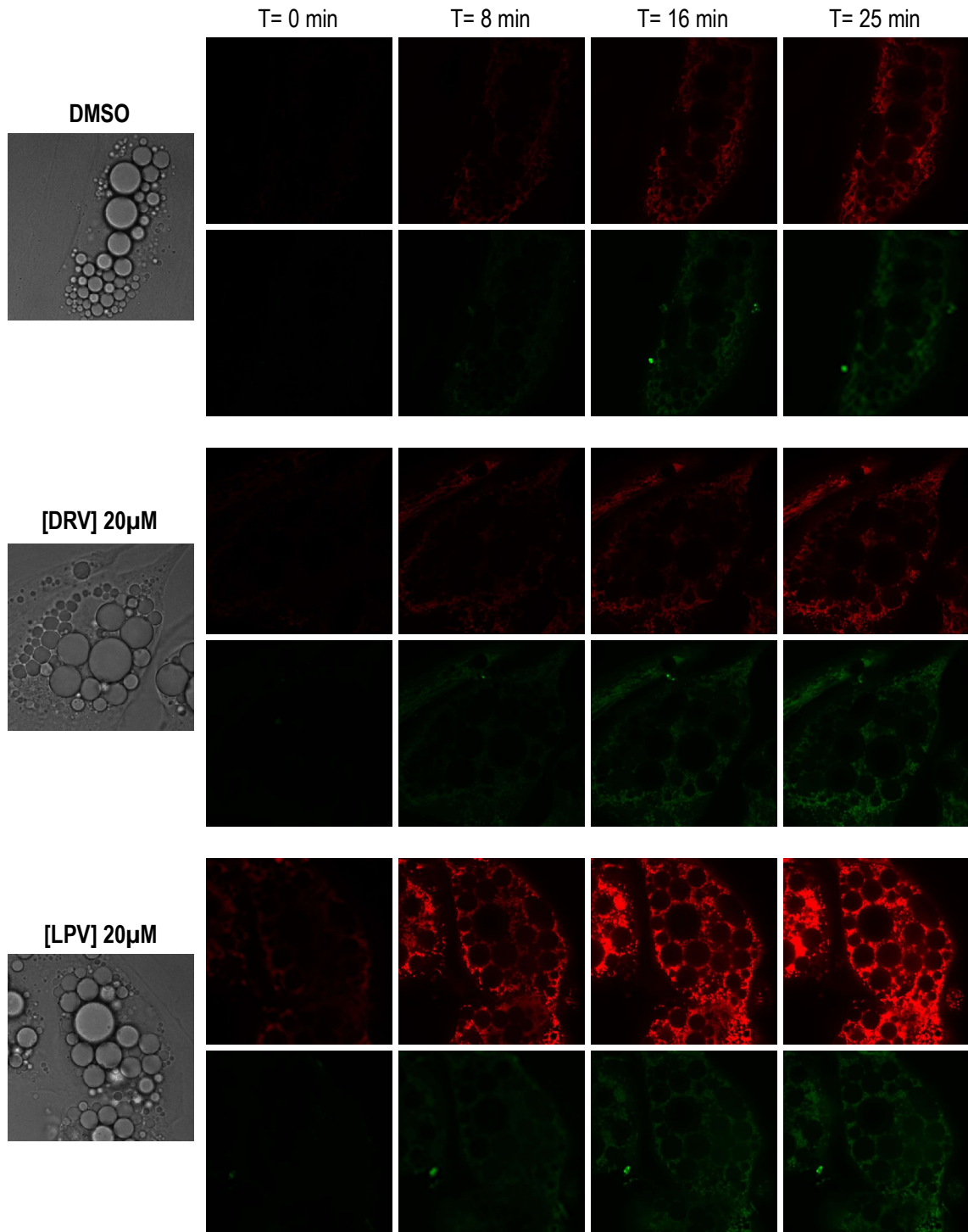
SUPPLEMENTARY FIGURE 4

Chin AP



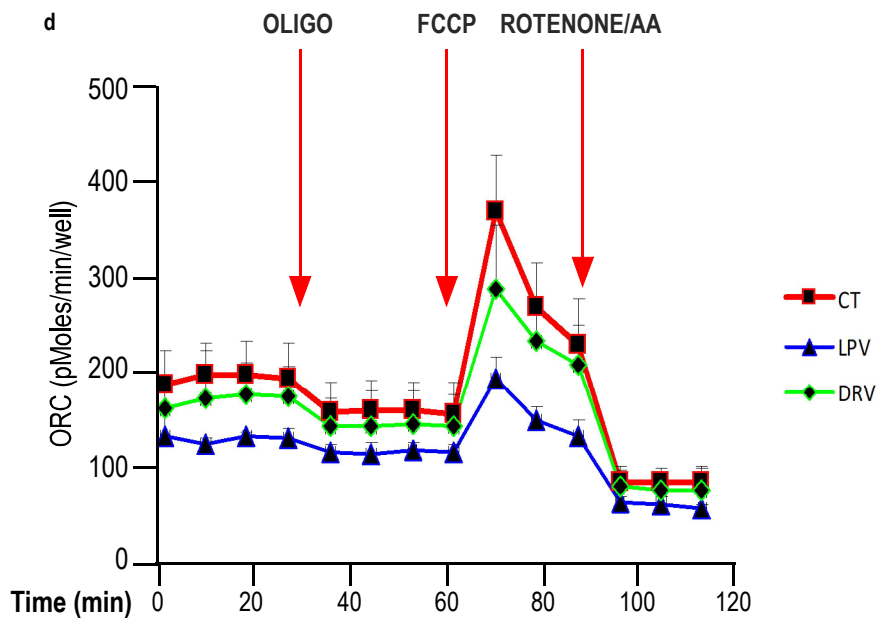
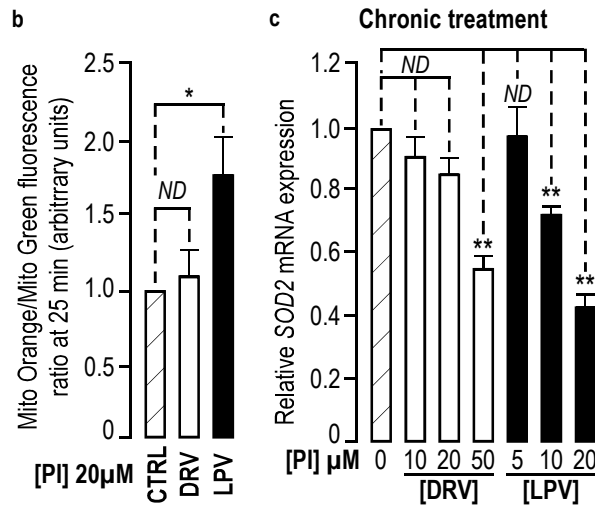
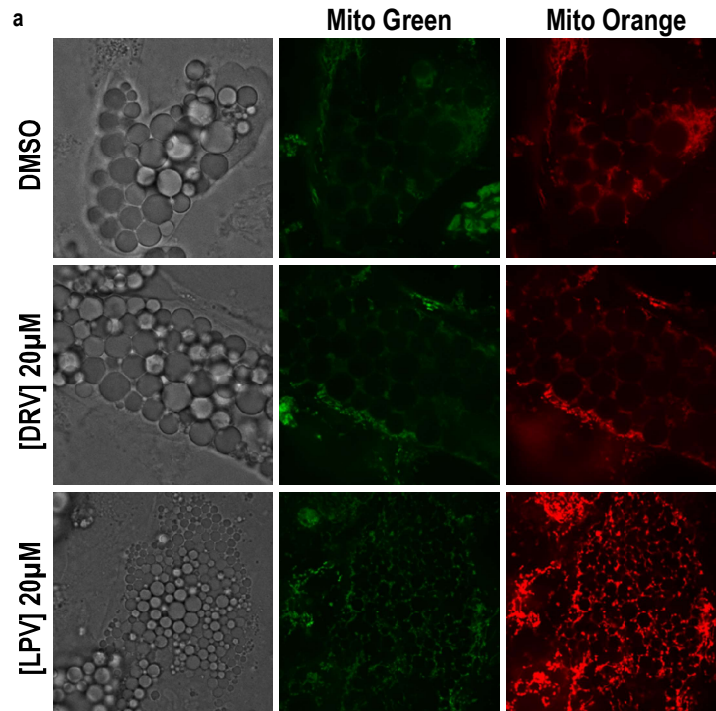
SUPPLEMENTARY FIGURE 5

hMADS

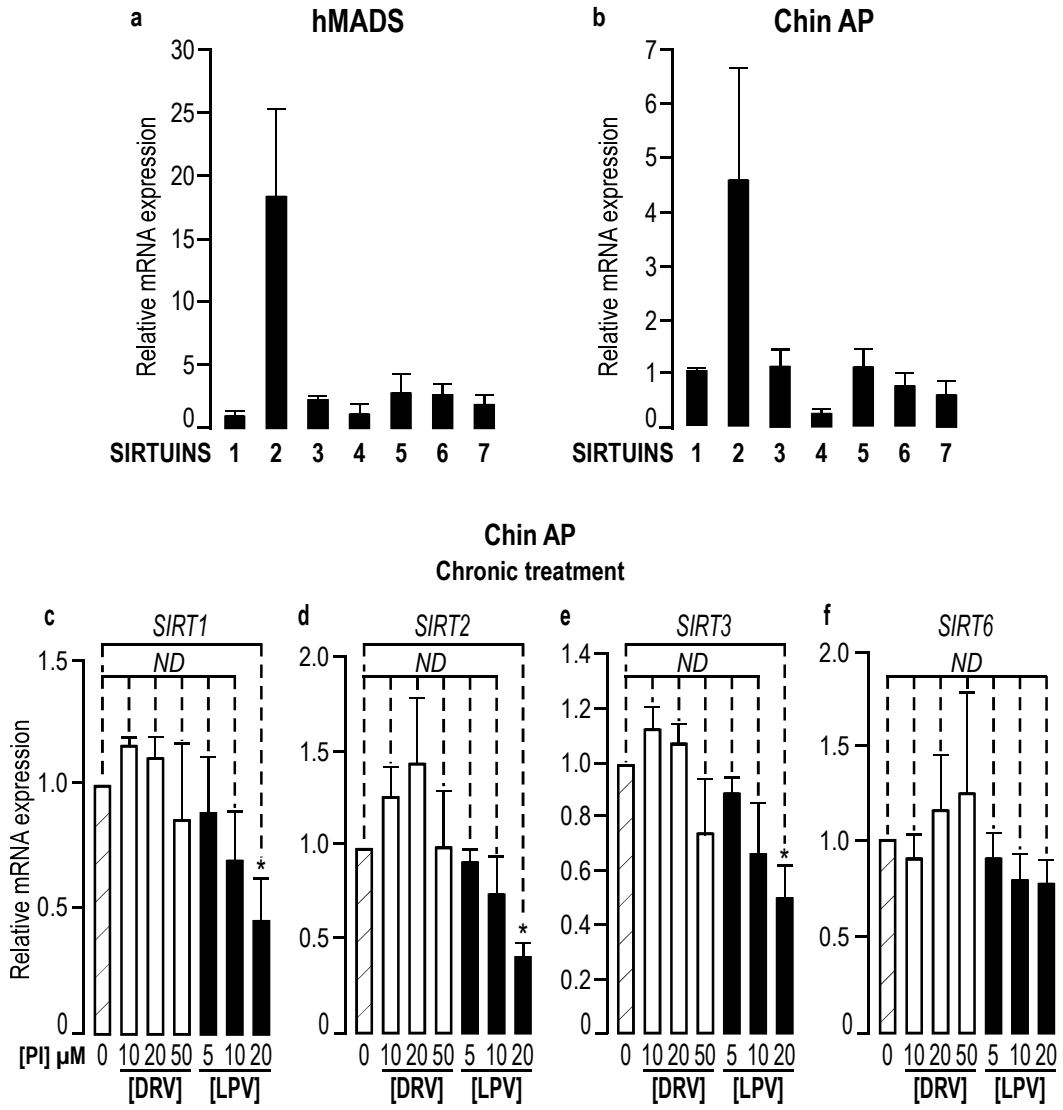


SUPPLEMENTARY FIGURE 6

Chin AP



SUPPLEMENTARY FIGURE 7



- Résultats et discussion

Cette étude nous a permis de constater qu'un traitement à long terme avec les IPs, le LPV en particulier, entraîne une baisse de la différenciation adipocytaire brune. Ces effets sont similaires à ceux observés lors de la différenciation adipocytaire blanche puisque les deux types d'adipocytes nécessitent des facteurs de transcription d'adipogénèse identiques. Cependant, les deux IPs ont diminué l'expression de gènes impliqués dans la signature thermogénique des adipocytes lors de cette différenciation, notamment *UCP1*, *CIDEA*, *PPAR γ 2* et *PGC-1 α* . Tout comme pour la différenciation cellulaire observée dans l'article précédent, les cellules hMADS possèdent une sensibilité plus élevée aux IPs que les PAs de menton ce qui cause une perte des marqueurs thermogéniques moins forte pour ces derniers. Lors d'un traitement à court terme par les IPs (2 jours), seul le LPV induit une baisse d'UCP1 ce qui inhibe le brunissage des cellules adipocytaires. Nous avons constaté que le LPV induit la formation d'un stress oxydatif qui est associé à la perte d'une enzyme détoxifiant les espèces réactives à l'oxygène. Ces effets sur les mitochondries sont similaires à ceux observés lors du vieillissement. La perte de la sirtuine 1, enzyme anti-âge, est diminuée par le LPV contrairement au DRV. L'utilisation d'un activateur de cette sirtuine, le resvératrol, augmente l'expression d'UCP1 par un mécanisme p38-dépendant et permet à la fois de contrecarrer les effets néfastes du LPV.

Ces résultats montrent que les IPs inhibent l'expression des gènes thermogéniques de différentes manières. Le LPV entraîne la baisse de *PPAR γ 2* et de son co-activateur *PGC-1 α* qui sont impliqués dans la transcription d'UCP1. Comme une stimulation par la forskoline dans des cellules traitées au LPV n'induit pas l'expression d'UCP1, nous hypothétisons que l'augmentation d'AMPc est insuffisante pour compenser la perte de *PPAR γ 2* et *PGC-1 α* qui maintiennent la transcription basale d'UCP1. Il existe d'autres molécules ciblées par le LPV. Le DRV n'a aucun impact sur l'expression de deux facteurs impliqués dans la transcription basale d'UCP1. Cependant, un traitement avec cet IP induit une diminution de l'expression d'UCP1. Ceci pourrait s'expliquer

par un ciblage de facteurs de transcription tels que les récepteurs aux hormones stéroïdiennes ou les récepteurs RXR qui seraient affectés par le traitement avec du DRV.

3) Identification d'une molécule produite par le cancer du sein entraînant le brunissage du tissu adipeux : l'adrénomédulline

- Introduction

Ces dernières années le regard sur le cancer a évolué. On ne considère plus que seules, les cellules tumorales sont importantes. Leur environnement, qui fournit des substrats nutritifs et des facteurs permettant l'expansion et la dissémination de la tumeur, joue un rôle majeur dans la pathologie. Les cellules tumorales le remanient de manière radicale pour favoriser l'expansion et la dissémination de la tumeur. Cet environnement, appelé stroma tumoral, est composé de fibroblastes, de cellules endothéliales et immunitaires, d'une matrice extracellulaire et d'adipocytes. Mais contrairement au stroma d'un tissu sain, les cellules cancéreuses modifient et contrôlent les cellules présentes dans le stroma tumoral pour répondre à leurs besoins. Ainsi, le TGF β va activer les fibroblastes du stroma tumoral pour devenir des CAF qui vont sécréter des protéines de la matrice extracellulaire comme, par exemple, le collagène de type I ou la fibronectine permettant aux cellules tumorales de progresser (Albregues et al., 2014; Polanska et Orimo, 2013). Les tumeurs vont aussi agir sur les cellules immunitaires. Par exemple, elles modifient les macrophages pour qu'ils diminuent la surveillance du système immunitaire en bloquant les lymphocytes cytotoxiques, et qu'ils favorisent l'angiogenèse.

Le tissu adipeux entoure pratiquement tous les organes et fait même partie intégrante de la glande mammaire. Le rôle des cellules qui la composent dans la progression tumorale a été très peu étudié par rapport aux autres types cellulaires de l'environnement tumoral. Pourtant, les adipocytes ne sont pas juste un réservoir pour stocker des lipides. Ils secrètent de nombreuses adipocytokines incluant des hormones, des facteurs de croissance et même des molécules pro-inflammatoires, ce qui en fait des cellules capables d'influencer le potentiel tumoral. Des études épidémiologiques indiquent que l'obésité est une cause aggravante de la mortalité par cancer, y

compris pour le cancer du sein (Calle et Kaaks, 2004; Parekh et al., 2012)(calle 2004, Parekh 2012). Ces études renforcent l'hypothèse selon laquelle les adipocytes peuvent participer activement au processus tumoral. Comme le tissu adipeux a une grande capacité d'adaptation pour répondre aux contraintes métaboliques, les adipocytes d'un individu obèse auront des caractéristiques distinctes de celles d'un individu mince. Ils seront plus gros, reffermeront plus d'acides gras et leur profil sécrétoire sera modifié. De plus, il a été observé dans plusieurs cas de cancers une augmentation soit de la lipolyse soit du brunissage du tissu adipeux. En effet, les adipocytes à proximité de la tumeur possèdent une taille réduite ainsi que l'apparition de plusieurs gouttelettes lipidiques. Si toutefois on sait que la lipolyse augmente les taux de lipides pouvant être utilisés par les cellules cancéreuses comme énergie, on ne sait pas si le brunissage est bénéfique ou non pour la progression tumorale.

Notre travail a pour but de mieux comprendre les interactions entre adipocytes et cellules tumorales. Nous avons choisi le cancer du sein comme modèle car le tissu adipeux fait partie intégrante de la glande mammaire saine. Au cours du processus de cancérisation, il subit un remodelage important et les adipocytes sont en contact direct avec les cellules tumorales. Nous avons recherché des conditions expérimentales qui permettraient de se rapprocher de la situation observée sur des coupes histologiques. Pour cela nous avons cultivé les lignées tumorales humaines de sein, sous forme de mammosphères afin d'avoir des structures en 3 dimensions pour reproduire les contacts entre cellules tumorales et avoir un environnement hypoxique décrit dans de nombreuses tumeurs. D'autre part, nous avons utilisé les cellules hMADS différenciées pour réaliser des cocultures avec des mammosphères. Il s'agit donc d'un modèle simplifié d'interactions entre cellules tumorales et cellules adipocytaires car il manque de nombreux types cellulaires présents dans le microenvironnement tumoral. Il permet cependant d'étudier les mécanismes d'interactions paracrines entre les mammosphères et les adipocytes, ce qui représente un avantage

pour identifier les molécules impliquées. Nous montrons que l'adrénomédulline est un peptide sécrété par les mammosphères tumorales dont les récepteurs sont présents sur les adipocytes. Il confère aux mammosphères la possibilité de modifier les adipocytes, c'est-à-dire d'activer la lipolyse et d'induire l'expression d'UCP1 dans les cellules adipeuses voisines des cellules tumorales. L'importance de ce processus est discutée.

- Article: **Breast cancer mammosphères secretes Adrenomedullin to induce lipolysis and browning of adjacent adipocytes**

**Breast cancer mammospheres secrete Adrenomedullin
to induce lipolysis and browning of adjacent adipocytes.**

Martin PARE, Xi YAO, Christian DANI and Annie LADOUX.

Université Côte d'Azur, CNRS, INSERM, iBV, France.

Corresponding author: Annie Ladoux, Ph D.

CNRS, iBV, Institute of Biology Valrose, University of Nice Sophia-Antipolis, 28 Avenue de Valombrose, 06107
Nice Cedex 2, France.

Telephone: +33 4 93 37 77 04

FAX: +33 4 93 37 70 58

Email: ladoux@unice.fr

Key words: adipocytes, breast cancer, adrenomedullin, lipolysis, UCP1,

SUMMARY

Cancer cells cooperate with the stromal cells composing their environment to promote tumor growth and invasion. Among them, adipocytes provide lipids that are used as a source of energy by cancer cells and adipokines that contribute to tumor expansion. However the mechanisms that support the dynamic interactions between cancer cells and stromal adipocytes remain unclear.

We set up a model of co-culture of breast cancer mammospheres with adipocytes. We observed that the size of the lipid droplets was reduced in adipocytes adjacent to the mammospheres. This was accompanied by the phosphorylation of the hormone sensitive lipase (HSL) and an increased-UCP1 expression. Mammospheres produced adrenomedullin (ADM), a multifactorial hypoxia-inducible peptide, while ADM receptors were present in adipocytes. Stimulation of adipocytes with ADM induced HSL phosphorylation. It also promoted the metabolic conversion of white into brite adipocytes. Invalidation of ADM in breast cancer cells reduced UCP1 expression in adipocytes.

Our results identify ADM as a cancer cell-derived peptide important to control the interactions between cancer cells and adipocytes. It was able to modify cancer-associated adipocytes through paracrine signaling. Further investigations are requested to clarify the impact of the ADM-induced modifications on tumor progression.

INTRODUCTION

The tumor microenvironment is crucial for cancer progression and dissemination. It provides nutrients, energy and growth factors to comply with the metabolic requirements of cancer cells. It includes fibroblasts, immune cells, blood vessels and adipocytes. Most studies describe the importance of cancer associated fibroblasts (CAF) or macrophages for tumor progression and invasion (Ruffell et al., 2012; Tao et al., 2017). Adipocytes represent a major cell population of the tumor microenvironment that has been neglected for long. In contrast to the situation in healthy tissue, they come in direct contact with tumor cells (Lengyel et al., 2018; Tan et al., 2011) and the interactions between adipocytes and tumor cells were shown to be essential for malignant development and to support malignant progression in invasive carcinomas such as breast, prostate or ovarian cancers (Duong et al., 2017).

Adipose tissue (AT) is widely distributed in the body and surrounds most of the organs. Two types of adipose tissue coexist in adults. The white adipose tissue (WAT) is specialized in energy storage and is an essential endocrine organ involved in the control of body weight (Kershaw and Flier, 2004), while the brown adipose tissue (BAT) is able to dissipate energy to properly maintain the body temperature. Recently a new class of adipocytes was observed in WAT. They were called brite (or beige) adipocytes as they share some of the properties of brown adipocytes such as the expression of the uncoupling protein 1 (UCP1), a protein that uses the mitochondrial proton gradient to produce heat instead of ATP (Giralt and Villarroya, 2017; Klingenberg, 1999; Peirce et al., 2014). In obese individuals, the AT is characterized by the hypertrophy of adipocytes, an increase in their number or hyperplasia and an alteration of the quality of AT. Hypertrophy leads to the development of hypoxic zones (Hodson, 2014; Ye et al., 2007) and to the release of pro-inflammatory cytokines that convert the AT in a low grade inflammatory organ (Gregor and Hotamisligil, 2011). Macrophage infiltration promotes TNF α and IL-6 production. Furthermore, adipocytokine secretion program is modified as adiponectin is decreased while leptin is increased. All these modifications constitute risk factors for cardiometabolic disorders, diabetes and cancer. Excess of body weight increases the incidence and worsens the outcomes of several types of cancer such as colorectal, endometrial, prostate, breast and others (Calle and Kaaks, 2004; Renehan et al., 2008). Adipocytes are able to provide energy from lipids, as well as growth factors and cytokines to sustain proliferation and aggressiveness of cancer cells (Blucher and Stadler, 2017; Tan et al., 2011). Note that an obese situation enhances the production of these molecules and worsens the malignancy of tumor cells. In addition “obese adipocytes” contain, and subsequently provide, more triglycerides and more FFAs to a developing tumor than adipocytes from a lean individual. So far, the intrinsic mechanisms involved in the interactions between cancer cells and adipocytes are not yet well established. Hence, a better knowledge of these interactions is of interest not only to understand how the adipocytes promote aggressiveness and invasion; but also to identify how cancer cells remodel the tumor environment to support their own expansion.

Breast cancer represents an appropriate model to study these interactions. The human mammary gland is composed of an epithelial compartment with ducts and lobules to produce milk during lactation which is

surrounded by connective tissue that comprises fat lobules (Visvader and Stingl, 2014). Thus, adipocytes represent an important cell type of the breast. In healthy adults, they are separated from the epithelial cell compartment by a basement membrane that restrains their interactions. However during the post weaning mammary gland involution, adipocytes and epithelial cells are mixed together (Watson and Kreuzaler, 2011). Such a situation is also observed when breast tumors develop. Of note, observations from histological sections show that adipocytes are generally absent in the core of breast tumor while those located at the invasive front exhibit a lower size as compared to the more distal ones. These modifications were also observed *in vitro* using co-culture models (Dirat et al., 2011). In addition, a decreased expression of adipocytes markers such as FABP4, adiponectin and the hormone-sensitive lipase were observed (Dirat et al., 2011; Nieman et al., 2011). These cancer-modified adipocytes were called cancer-associated adipocytes (CAA) and they displayed distinct characteristics compared to adipocytes that are not in contact with cancer cells. The mechanisms leading to tumor-induced adipocyte transformation remain still enigmatic. Among them, the reactivation of the Wnt/ β -catenin pathway by Wnt3a secreted by breast tumors may contribute to the development of CAA (Bochet et al., 2013).

Indeed breast tumors secrete many more compounds crucial to modify adipocytes phenotype. Out of them adrenomedullin (ADM) expression was observed in the serum of high grade breast cancer patients and was correlated with axillary lymph node metastasis (Oehler et al., 2003). ADM is a 52-amino acid peptide endowed with an extensive repertoire of biological functions such as vasodilation and strong hypotensive effects, cellular proliferation, apoptosis modulation or inflammatory regulation. It has been originally purified from human pheochromocytoma (Kitamura et al., 1993). These tumors are in general surrounded with fat displaying brown/beige phenotype, while more distal adipose sites are not modified (Ologun et al., 2017; Vergnes et al., 2016). Its expression was found in several other tumors (Miller et al., 1996) and tissues pointing out potential autocrine stimulation for tumor cells and paracrine effects for tumor surrounding cells. Depending on the cell type, ADM can promote or decrease cell proliferation of both malignant and normal cells (Miyashita et al., 2003; Ramachandran et al., 2007). This may result from the complexity of its receptors and their presence in distinct tissues. ADM belongs to the calcitonin gene-related peptide (CGRP) family and binds to a seven transmembrane domain receptor coupled to G protein: the calcitonin receptor-like-receptor (CRLR). The binding specificity is conferred by the receptor-activity-modifying proteins (RAMPs). CRLR selectively binds ADM when it is co-expressed with RAMP 2/3 while it binds CGRP when associated with RAMP1 (Hay et al., 2004; Maguire and Davenport, 2005). The adenylate cyclase activity is increased upon binding of ADM to the complex CRLR/RAMP2, leading to the production of cAMP and further activation of PKA and phosphorylation of p38. In addition to this pathway, CXCR7 acts as a decoy receptor for ADM and was shown to attenuate the ADM signaling during cardiovascular development (Klein et al., 2014). Its expression is strongly up-regulated upon hypoxic conditions through a HIF1-dependent process (Ladoux and Frelin, 2000). Giving that low oxygen tensions are found in the tumor environment, many cancer express and secrete ADM and this may account for the high levels found in breast cancer patients. ADM was proposed to promote tumor progression though the

control of angiogenesis (Nakamura et al., 2006) and to accelerate breast cancer bone metastasis (Siclari et al., 2014). However the impact of ADM on adipocytes has not been evaluated so far.

Here we show that breast cancer grown as mammospheres secreted ADM while ADM receptors were highly expressed in lipid-laden cells obtained after adipose differentiation as compared to adipose progenitors (AP). Treatment of differentiated APs *in vitro*, with ADM activated p38-MAPK and promoted lipolysis through the hormone-sensitive lipase (HSL) phosphorylation. UCP1 expression was also increased resulting in a beige phenotype of cells. This metabolic conversion was observed for most lipid-laden cells close to the tumor cells in co-culture experiments. Invalidation of ADM gene in MCF7 cells by CRISPR-Cas9 technology, reduced, but did not abolish completely this process.

Our results identify ADM as an important molecule for breast cancer cells to promote the CAA phenotype and to induce metabolic changes of adipocytes.

MATERIAL AND METHODS

Reagents

Unless specified otherwise, all reagents were obtained from Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France).

Tissue culture media were obtained from LONZA (Levallois-Perret, France) and foetal calf serum (FCS) from Dutscher S.A. (Brumath, France).

Cell culture

Human APs cells used for *in vitro* studies (hMADS cells) were isolated from patients in our lab and grown, maintained and differentiated as previously described (Rodriguez et al., 2004). hMADS cells were derived from pre-pubic adipose tissue of young donors (Rodriguez et al., 2005) and they were shown to express a thermogenic signature upon appropriate differentiation conditions (Elabd et al., 2009). They will be further referred as hMADS-adipocytes.

Adipocytic differentiation was carried out as previously described and was assessed by Oil red O staining (Rodriguez et al., 2004). Counter-staining with Crystal violet (0.1% w/v) for 10 minutes was performed.

Breast cancer cell lines (MCF7 and MDA-MB-231) were grown in DMEM Phenol red free supplemented with antibiotics, glutamine and fetal calf serum (10%).

Sphere formation was carried out on plates coated with agarose in PBS (1% w/v). Cell were plated at a density of 10 000 cells/ml in DMEM medium supplemented with B27 nutrient (Invitrogen), 20 ng/mL EGF and 20 ng/mL FGF2 (Ginestier et al., 2007). Mammospheres were collected by sedimentation and were further used in the experiments.

All cell lines were routinely tested for the absence of mycoplasma.

Gene expression analysis

Total RNA was extracted using the TRI-Reagent kit (Euromedex, Soufflweyersheim, France) and reverse transcription (RT) was performed using MMLV reverse transcriptase (Promega, Charbonnières, France), as recommended by the manufacturers.

All primer sequences are described in supplementary section. Real-time PCR assays were run on an ABI Prism One step real-time PCR machine (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Normalization was performed using *36B4* as a reference gene. Quantification was performed using the comparative Ct method.

Protein expression

Cells were rinsed in ice-cold PBS and whole cell extracts were prepared as described (Ravaud et al., 2015). Briefly, cells were lysed in the cell lysis buffer, sonicated for 10 s and centrifuged at 12 000 g for 10 min.

Thirty micrograms of proteins were resolved by SDS–PAGE under reducing conditions and transferred to Immobilon–P membranes (Millipore, Molshiem, France). The detection antibodies listed in supplementary section (table 1) were used according to the manufacturer’s instructions. The bound primary antibody was detected by horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody and visualized using an ECL detection kit (Millipore, Molsheim, France). Chemiluminescence was observed using a molecular imager ChemiDoc XRS system (Bio-Rad, Marne la Coquette, France). The band intensity was quantified using Bio-Rad Quantity One software.

UCP-1 expression analysis using a reporter system

hMADS cells were infected with a lentivirus containing the plasmid, pLV.ExBi.P/Puro-hUCP1promoter-Luc(firefly)-T2A-hrGFP, which expresses luciferase and GFP driven by the human UCP1 promoter (4,148 bp) (Xue et al., 2015) and further selected upon puromycin resistance.

Upon stimulation of the cells, GFP expression was quantified using ImageJ on images recorded in the very same conditions. GFP expression was compared to the one measured in unstimulated cells.

Immunocytochemistry

Cells were seeded on glass coverslips and treated as described in the text. Cells were rinsed twice with PBS and fixed with Roti-Histofix® (Roth, Lauterbourg, France) for 20 min at room temperature. Fixed-cells were permeabilized with triton X-100 (0.2% v/v) for 15 min. Blockade of non-specific sites was performed by an incubation in PBS containing 4% of normal goat serum (NGS) for 30 min at room temperature. Cells were then incubated with the appropriate antibodies in the same buffer over night at 4°C. After 3 washes in PBS containing 0.4% of NGS, cover slips were incubated with the appropriate secondary antibody coupled to Alexa Fluor (1:1000) for 45 min at room temperature. Unspecific signal was evaluated for each antibody using a control condition without primary antibody and a non-specific antibody. At least from six to ten representative fields were examined for each condition. Images were taken on a Zeiss Axio Observer microscope with a EC Plan Neofluar 40X (NA 1.3) oil objective using AxioVision 4.8.2 software. Analysis was performed using Fiji (Schindelin et al., 2012).

ADM gene invalidation

Cells were transfected with the PX330A-1X2 plasmid (pX330A-1x2 was a gift from Takashi Yamamoto (Sakuma et al., 2014) (Addgene plasmid # 58766 ; <http://n2t.net/addgene:58766> ; RRID:Addgene_58766) expressing the Cas9 and two guides RNA targeting the ADM gene after the U6 promoter (supplementary Fig.5), using lipofectamine 2000 Transfection Reagent (Thermofisher) according to the manufacturer's protocol. Briefly, the day before transfection, MCF-7 cells were seeded at 70% confluence in 12 well plates and cultured in growth medium without antibiotics for 24 h. The next day, cells were washed and transfection was performed in serum-free OPTIMEM medium without antibiotics. Transfected cells were left one week for recovery and seeded at one cell/well in 96 well plates and allowed to grow. Genomic DNA was extracted from the growing clones using the Nucleospin DNA RapidLyse kit (Macherey Nagel). The CRISPR/Cas 9 procedure induced a deletion of 584 base pairs in the genomic DNA accompanied by a shift in the open reading frame. The genomic region targeted by the

CRISPR/Cas 9 procedure was amplified by PCR. A 535 bp PCR product was expected for targeted clones while a 1119 bp amplicon was observed in WT genomic DNA. The crude PCR product was purified and sequenced for 10 clones. The deletion was further confirmed at the RNA level, by RT-PCR. In this case, a 366 bp amplicon was observed in modified clones while a 569 bp band was observed in WT clones.

Statistical analysis

The results are shown as mean \pm standard error of the mean (SEM), with the number of experiments indicated. Statistical significance was determined by *t*-tests using Micrococcal Origin 6.0 (Micrococcal Software, Northampton MA) or BiostaTGV (INSERM and Sorbonne University, PARIS, France). Probability values <0.05 were considered statistically significant and are marked with a single asterisk, <0.01 with double asterisks and <0.001 with triple asterisks.

RESULTS

Mammospheres modify peritumoral adipocytes.

Many studies on cancer are performed with cell lines grown as monolayers (2D cultures), which reflects poorly the *in vivo* situation. Indeed, some gene expression patterns and cell-cell interactions are compromised in classical 2D culture conditions. Thus, we chose to grow breast cancer cell lines as mammospheres, wishing to recapitulate some features of tumor growth which are absent from 2D cultures.

We co-cultured hMADS-adipocytes and MCF7-mammospheres to analyze the impact of cancer cells on adipocyte phenotype. Our first observation indicated that most of the adipocytes close to the mammospheres had small lipid droplets compared to more distal adipocytes and to hMADS-adipocytes that did not receive mammospheres (Fig 1a). This prompted us to analyze the MCF7-induced metabolic changes in hMADS-adipocytes. We repeated the experiment with hMADS-adipocytes expressing GFP under the control of *UCP1* promoter. We noticed that GFP was preferentially expressed close to the mammospheres. Indeed, most, but not all, the adipocytes in contact with the mammospheres were expressing both PLIN1 and GFP. The hMADS-adipocytes in a more distal position expressed PLIN1 only (Fig. 1b), indicating that cells in contact or cells present in a limited perimeter were able to receive signals inducing adipose browning. A similar observation was made when MAD-MB-231 mammospheres were used (Supp. Fig. 1).

Identification of ADM

As we observed the metabolic conversion when hMADS-adipocytes were incubated with MCF7 cells grown as mammospheres, we hypothesized that a molecule whose production may be linked to a hypoxic environment encountered in the center of mammospheres was involved in this phenomenon. Among the hypoxia-responding genes we focused our attention on ADM which elevates cAMP levels upon binding to its receptor (Ladoux and Frelin, 2000). We measured the ability of MCF7 cells to produce ADM in different culture conditions. Growing cells under hypoxia (i. e. 2% O₂) or as 3D mammospheres increased significantly *ADM* mRNA levels as compared to cells maintained in 2D and 21% oxygen (Fig. 2a). In parallel we measured an increased expression in carbonic anhydrase IX, a marker of hypoxic cells (Fig. 2b). Intermedin (also referred as ADM2) was preferentially expressed in MCF7 cells grown in 2D. Its expression declined in mammospheres and in hypoxic conditions (supp fig. 2). ADM expression was further confirmed in mammospheres by immunocytochemistry labeling using a specific antibody (Fig. 2c). It was more elevated in the center of the spheres which corresponded to the most hypoxic zones.

So, the culture of breast cancer cells as mammospheres allowed the expression of ADM, a hypoxia-inducible gene which is not expressed in 2D cultures.

Identification of ADM receptors in adipocytes

To comfort our hypothesis concerning ADM's effect on adipose metabolic modifications, we analyzed the expression of ADM receptors in hMADS-adipocytes during the time course of differentiation. ADM binds to class B GPCR associated with the receptor activity modifying protein 2 or RAMP2, able to recruit Gs and activate adenylate cyclase.

Our results indicated that both *CRLR* and *RAMP2* mRNA were hardly detectable in undifferentiated hMADS cells, but their expressions increased significantly during the time course of differentiation. After 18 days of differentiation the expression levels for both CRLR and RAMP2 were raised 40 times onwards as compared to undifferentiated cells (Fig. 3a). Note that RAMP1, which is also able to associate with CRLR to form a CGRP –but not ADM- receptor, was preferentially expressed in undifferentiated cells (Fig 3c). In addition the expression of the Receptor component protein (RCP) which associates with the complex CRLR-RAMP2 was detected similarly in both undifferentiated and differentiated cells (Fig. 3d), indicating that this complex can couple to Gs and activate the cAMP-dependent intracellular signaling pathway.

ADM induced lipolysis in hMADS-adipocytes.

To ascertain of the functionality of these receptors we treated hMADS-adipocytes with 100nM ADM and measured the time course for ADM-induced HSL phosphorylation which occurs upon PKA stimulation. Indeed a 10 minutes treatment of hMADS-adipocytes with 100 nM ADM induced a 2.5 fold increase onwards in HSL phosphorylation (Fig. 4a-b). In co-culture experiments, phosphorylation of HSL was observed in adipocytes located close to MCF7 (Fig. 4c) or MDA-MB-231 (Supp. Fig. 3) mammospheres. Phosphorylated HSL expression co-localized with PLIN1, a protein that compose the membrane of adipocyte lipid droplets. This observation is consistent with the translocation of the enzyme from the cytosolic compartment to the lipid droplet.

We then measured the time course of p38-MAPK phosphorylation which is able to stimulate CREB-mediated transcription and which also depends on PKA activation. Indeed a significantly increased p38-MAPK phosphorylation was detected after 5-10 min. and remained observable after 30 min of incubation (Supp. Fig.4).

Thus, ADM receptors were functional in hMADS-adipocytes as upon ADM treatment we observed the phosphorylations of HSL and p38-MAPK. This also indicated that ADM induced lipolysis in hMADS-adipocytes.

ADM induced UCP1.

We next challenged hMADS-adipocytes with increasing concentrations of ADM and measured UCP1 expression. We observed a significant increase in UCP1 expression when cells were treated with ADM concentrations comprised between 100 and 300 nM (Fig.5a-b). This result was further confirmed using cells expressing the UCP1-GFP reporter system. After 14 days of differentiation, cells were further treated for 4 days with increasing doses of ADM. While untreated cells expressed a weak GFP signal, GFP fluorescence was increased in a dose dependent manner (figure 5c-f). Quantification of the intensity of the signals revealed a 2.6

fold increase in fluorescence when cells were treated with 300nM ADM compared to cells that did not receive any treatment. Altogether our results indicate that ADM induced UCP1 expression in hMADS-adipocytes.

Invalidation of ADM in MCF7 cells.

To invalidate *ADM* gene in MCF7 cells, we set out to knock out the alleles of the gene using the CRISPR/Cas9 technology. Thus, after transfection of the RNA guide/Cas9 expressing construct that contained two guide RNAs after the U6 promoter, we first analyzed the genomic DNA of several pooled clones by PCR and genome sequencing. Pooled clones displaying a DNA amplification corresponding to the mutation were further grown at single cell levels in 96-well plates. Typical results for PCR screening on genomic DNA are shown in fig. 6a. Clones displaying ADM genomic DNA and mRNA expressions corresponding to the mutated form were selected. We analyzed 128 clones, obtained 14.8% of clones heterozygous clones (referred as ADM-HET) and only 1 clone displaying deletion on both alleles, further referred as ADM-KO. Comparison of the ADM-Het and ADM-KO sequences to the wild type sequence (Supp. Fig. 5) revealed that there was a single nucleotide insertion after the cutting site of the first guide RNA, leading then to a shift in the open reading frame associated with the deletion of the expected zone. The genomic sequence of the mutated allele(s) in ADM-Het and ADM-KO clones was identical, except for one ADM-Het clone (clone 6-C11) that had an additional 20 base-pairs deletion in the 5' region targeted by the first guide RNA. Analysis of the sequence revealed that for all selected clones, no functional ADM protein could be translated, due to the changes in the open reading frame (Supp fig. 5). In addition all the cleavage sites of pre-pro-ADM were lost precluding then the possibility to get a mature protein. The only residual homology was found for the signal peptide. Surprisingly, analysis of the *ADM* mRNA indicated that most of the ADM-HET clones displayed a monoallelic expression of the mutated allele that lasted with time (Fig 6b), indicating that they may behave as ADM-KO clones. In line with this surprising observation, note that monoallelic expression of the oestrogen receptor was also described in breast cancer (Schuur and Weigel, 2000). The absence of the protein was confirmed by ICC in the mammospheres from ADM-KO clones (Fig.6c).

Absence of ADM in MCF7 cells reduced adipocyte modification.

Wild type MCF7 cells, ADM-HET and ADM-KO clones were grown as mammospheres and we analyzed how they interacted with UCP1-GFP hMADS-adipocytes.

In presence WT MCF7 and CRISPR-WT clone that express ADM, GFP induction was detected in hMADS-adipocytes close to the mammospheres, as expected. Interactions of ADM-KO or monoallelic ADM-Het clone (6C11 clone) revealed that GFP was induced in a lower extend (Fig.7a-d). Quantification of the GFP signals with ImageJ indicated that the absence of ADM, reduced GFP signal by 70% in the ADM-KO clone and by 90% in the monoallelic ADM-HET clone 6C11 (Figure 7e). Thus a decrease in ADM expression reduced but did not completely abolish the mammosphere-induced browning of adjacent lipid-laden cells.

DISCUSSION

In this study, we analyzed the cross-talk between breast cancer cells and adipocytes. We showed that breast cancer mammospheres produced ADM which induced a metabolic modification of hMADS-adipocytes, accompanied by an increase in lipolysis and a shift towards a beige phenotype. This activation is consistent with a phenotype of CAA.

We set up an *in vitro* model of interactions between adipocytes and breast cancer cells grown as mammospheres since this type of culture is appropriate to maintain a more hypoxic environment, crucial for tumor progression. Indeed, we found a higher expression of CA IX which is a hallmark of hypoxic zones (Chiche et al., 2009). This allowed the expression of hypoxia-inducible factors which are secreted in the core of a tumor but which are absent from classical cultures when cells are grown as monolayers. In agreement with results obtained from 2D cultures we observed that tumor mammospheres modified adipocytes. However, a preferential effect on the lipid-laden cells adjacent to the tumor was noted, while more distant adipocytes were less affected. Such a situation mimicked the observations reported from histological analysis: morphological differences between the adipocytes present at the peritumoral border and those which are distal from the tumor were described (Duong et al., 2017). This may result from a direct contact between tumor cells and the adipocytes, but also from a gradient of concentration for molecules secreted by the tumor. Cancer cells were shown to promote lipolysis in the surrounding adipocytes and the triglycerides release serves as a source of energy to promote tumor growth and invasion (Dirat et al., 2011; Nieman et al., 2013). FFAs may serve to produce signaling lipids or to generate membranes of rapid growing malignant cells or even to produce energy through β -oxidation (Tan et al., 2011). We detected the phosphorylated form of HSL preferentially in the membranes of lipid droplets of adipocytes which are close to tumor cells. Surprisingly, a beige phenotype, through UCP1 expression, was also observed. It was mainly observed in CAA adjacent or close to tumor cells that displayed small lipid droplets. Thus our model was suitable to recapitulate some of the adipose modifications observed in breast cancer tissue sections. We also show that breast mammospheres alone are able remodel adipocytes.

The adult breast AT is composed of white adipocytes. However, the presence of brown/beige adipocytes within the breast fat pads was described during the early stages of murine mammary gland development (Gouon-Evans et al., 2002; Master et al., 2002). Multilocular adipose regions displaying a positive staining for UCP1, were observed in Brca1 mutant mice (Jones et al., 2011) and the presence of brown/beige adipocytes surrounding breast cancer cell lines and breast PDX xenografts was detected indicating that the tumor may favor/induce metabolic changes in the adipocytes. Although brown fat is not a normal constituent of human adult breast, human mammary hibernomas were described (Kapucuoglu et al., 2008; Martini et al., 2010). The presence of brown/beige adipocytes was proposed to be beneficial for tumor expansion as depletion of the UCP1 positive cells significantly reduced tumor growth (Singh et al., 2016). The tumor promoting effect of beige adipocytes may occur *via* an induction of the vascularization *in vivo*, or through reprogramming of lipid metabolism providing FFAs that cancer cells use as energy substrate. Tumor-induced browning was recognized as an important target to propose novel therapeutic strategies to control breast tumor progression. However the mechanisms underlying

these modifications are not yet well understood. It was proposed that beige adipocytes within xenografts might have been recruited as beige progenitors from an unidentified source and further differentiated into beige cells. Another possibility is the transdifferentiation of white adipocytes into UCP1-expressing cells. Both hypotheses include a specialization of cells to acquire beige characteristics. Wnt3a was already implicated in such a process. In addition, inflammatory cytokines produced by immune cells such as IL6 or TNF α may participate to this process. However their contribution is unlikely in our simplistic model as only tumor and hMADS-differentiated cells interact. Few others biological inducers of this process produced by cancer cells have been reported so far. In this regard, ADM appears as a specific inducer of beige adipocyte formation that is secreted by breast tumor mammospheres. In addition, ADM was able to activate HSL that promotes lipolysis.

ADM is involved in tumor initiation and progression by promoting cell proliferation, angiogenesis, change of phenotype, and the inhibition of apoptosis (Larrayoz et al., 2014; Nakamura et al., 2006; Nikitenko et al., 2006). Although its autocrine role to promote tumor growth through control of proliferation, or inhibition of apoptosis has been described in breast cancer cell lines (Martinez et al., 2002), its ability to change the tumor microenvironment via paracrine secretion was mainly reported in an angiogenic context. ADM promotes proliferation and migration of endothelial cells then its role in stimulating tumor angiogenesis has been studied using several *in vitro*, xenograft and knockout mouse models (Berenguer-Daize et al., 2013; Chen et al., 2012; Ramachandran et al., 2007). ADM has also been reported to reduce the activity of the immune system by reducing cytokine secretion (Larrayoz et al., 2014) which leads to a defective anti-tumor immunomonitoring. Thus, ADM is endowed with properties that can efficiently contribute to activation of distinct pathways promoting tumor growth.

In addition to these effects, we describe that ADM produced by MCF7 mammospheres is able to induce metabolic changes of adipocytes nearby tumor cells. They include lipolysis which has been described as a paramount process to fuel tumors and browning/beiging of the adipocytes. ADM-induced lipolysis has been described in response of human AT to inflammation (Linscheid et al., 2005). We show here that it involves activation of HSL through phosphorylation.

So far, intermedin (i.e. adrenomedullin2) which belongs to the same peptide family than ADM, was reported to induce beiging of white adipose tissue (Lv et al., 2016; Zhang et al., 2016). However, MCF7 mammospheres expressed less intermedin than ADM, restraining then its ability to activate ADM receptors. Similar expression profile was found for PTHrP which is reported to induce browning and cancer cachexia in mouse xenografts models (Kir et al., 2014).

ADM is known to be highly produced within a hypoxic environment in several tissues, including the adipose tissue (Geiger et al., 2011; Ladoux and Frelin, 2000; Nguyen and Claycomb, 1999). Note that ADM levels are significantly higher in the omental adipose tissue of obese as compared to lean women (Paulmyer-Lacroix et al., 2006) which is in line with the reduction of O₂ tension measured in obese AT (Hodson, 2014; Ye et al., 2007). Hypoxia is also a prevailing feature of many tumors and the hypoxic niches, located preferentially in the center of the tumor. Indeed, we observed that ADM immuno-labeling was higher in the center of MCF7 mammospheres. Besides the modification of adipocyte metabolism, the role of ADM in cancer progression may

be multifactorial. But, as brown adipocytes depletion reduces tumor growth, one may hypothesize that ADM effects, through browning of adipocytes, may promote carcinoma progression. Paracrine interactions between cancer cells and their environment including adipocytes may be stronger at the invasive front of tumors. This can explain why we preferentially observed the metabolic reprogramming of adipocytes in contact or very close to cancer cells. The presence of both the phosphorylated form of HSL and UCP1, in the same adipocyte, remains to be established. Preliminary results obtained with the UCP1-GFP reporter system indicate a discrepancy between the expression of the phosphorylated HSL and GFP. More experiments are needed to confirm this observation and to ascertain that it is not just due to distinct time courses for these two adipose modifications. Nevertheless, if these two processes are independent, we may hypothesize that they have distinct functions in tumor progression. Lipolysis certainly provides FFAs as an energy source for tumor cells as already reported. In this regard, the lipolysis-induced FFAs release may not just serve as “energy substrate”. FFAs may participate in remodeling the microenvironment. They were shown to facilitate breast cancer invasion through induction of plasminogen activator inhibitor -1 (PAI-1) and inhibition of fibrin degradation, facilitating then cancer invasion and metastasis (Byon et al., 2009). The precise role of the mammospheres-induced browning process remains to be elucidated and confirmed to understand how UCP1-expressing cells help tumor growth.

Altogether, our results bring new information on the complex interactions between adipocytes and breast tumor cells. One may propose to confine the pathways leading to FFA production, including the part resulting from ADM production, to reduce malignancy. However, further investigations are requested to properly understand the exact role and the importance of the adipose metabolic conversion induced by cancer cells in malignancy.

FIGURE LEGENDS.

Figure 1 hMADS-adipocytes are modified when cocultured with MCF7 mammospheres

a/ h-MADS adipocytes were cultured in the differentiation medium for 15 days. MCF7 cells were grown as mammospheres for 7 days. Co-culture of the 2 cell-types was performed during 2 days. Oil-Red O staining reveals that the lipid droplets are smaller in adipocytes adjacent to the mammospheres. Crystal violet was used to counterstain the cells. Magnification X20, scale bar 100 μ M.

b/ MCF7 cells were grown as mammospheres for 7 days. They were co-cultured on a monolayer of hMADS cells expressing GFP under the control of UCP1 promoter that have been differentiated for 14 days. Co culture of the 2 cell types lasted for 4 days.

PLIN1 (red) and E Cadherin (pink) expressions were visualized using specific antibodies. GFP expression was visualized in green. Dapi was used to label the nuclei (Blue). The fluorescence recorded for each channel is shown in separated pictures. The adipocytes adjacent to the mammospheres express both GFP and PLIN1, while those more distant express PLIN1 only. Magnification 40X, scale bar 20 μ M.

Figure 2: ADM expression in MCF7 cells

a-b, Expression of the *ADM* and *CA IX* in MCF7 cells cultured in different conditions.

Expression of the *ADM* and *CA IX* was assessed by real-time RT-PCR and normalized for the expression of *36B4* mRNA. It was measured in cells grown as 2D monolayers in presence of 21 or 2 % O₂ for 48 hours or as mammospheres for 7 days. The means \pm SEM were calculated from three independent experiments, with determinations performed in duplicate (*p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, ND means “not significantly different”).

c, Expression of ADM in mammospheres.

MCF7 cells were grown as mammospheres for 7 days. Expressions of ADM (green) and PLIN1 (red) are shown. Dapi was used to label the nuclei (Blue).The fluorescence recorded for each channel is shown in separated pictures.

Figure 3: ADM receptors are preferentially expressed in hMADS-adipocytes.

Time course for the expression of *CRLR*, *RAMP2*, *RAMP1* and *RCP* was assessed by real-time RT-PCR and normalized for the expression of *36B4* mRNA. It was measured in cells that received (red bars) or not (blue bars) the differentiation cocktail for the indicated number of days. The means \pm SEM

were calculated from three independent experiments, with determinations performed in duplicate (*p<0.05, ** p<0.01, ND means “not significantly different”).

Figure 4: ADM induces phosphorylation of HSL.

a, ADM increased phosphorylation of HSL.

Protein expression and phosphorylation were measured in hMADS-adipocytes grown in the differentiation medium. They were stimulated by ADM for the indicated time. Expressions of pHSL (upper panel) and Tubulin-β1 (lower panel) used as a loading control were analyzed by Western blot using specific antibodies. A positive control condition with cells stimulated for 4 hours with forskolin is shown. Representative Western blots are shown.

b, Quantification of the signals.

Expression of the proteins was quantified using the Quantity one Program and compared to the expression of Tubulin-β1. The means ± SEM were calculated from two independent experiments.

c, MCF7 mammospheres induce phosphorylation of HSL in hMADS- adipocytes close to the mammospheres.

MCF7 cells were grown as mammospheres for 7 days and co-cultured on a monolayer of hMADS cells differentiated for 14 days. Co culture of the 2 cell types lasted for 4 days.

Phosphorylation of HSL (white) and PLIN1 (red) expressions were visualized using specific antibodies. Dapi was used to label the nuclei (Blue). The yellow arrows indicate phospho- HSL expression. Magnification 40X. The recordings of fluorescence for PLIN1 and phospho-HSL are shown in grey.

Figure 5: ADM induces UCP1 expression.

a, ADM induces UCP1 in a dose dependent manner.

Protein expression was measured in hMADS-adipocytes grown in the differentiation medium for 17 days. They were stimulated by increasing doses of ADM for 24 hours. Expressions of UCP1 (upper panel) and Tubulin-β1 (lower panel) used as a loading control were analyzed by Western blot using specific antibodies. Representative Western blots are shown.

b, Quantification of the signals.

Expression of the proteins was quantified using the Quantity one Program and compared to the expression of Tubulin- β l. The means \pm SEM were calculated from four independent experiments (* $p < 0.05$, ND means “not significantly different”).

c-e, Transcriptional activation of *UCP1* promoter in response ADM.

The GFP expression was driven by the human UCP1 promoter in hMADS cells differentiated for 14 days. GFP fluorescence was determined after 4 more days of incubation with the indicated concentration of ADM. Control condition corresponds to cells that were not treated with ADM. All the images were recorded with the very same parameters. (Scale bar: 20 μ M)

f) Quantification of the signals.

The means were calculated from 2 independent experiments performed in duplicate on at least 6 distinct recording for each coverslip. The fluorescence signal measured as “raw integrated density” was divided by the number of nuclei present in the microscopic field.

Figure 6: Characterization of ADM mutated clones obtained by CRISPR Cas9 technology.

a-b) Clones were analysed as described in material and methods. The presence of WT or mutated alleles was measured by PCR from genomic DNA or reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) when analysed from RNA. For genomic DNA analysis: a 1119 base pairs band corresponds to the WT allele and a 535 bp band correspond the mutated allele. For RNA analysis: a 569 base pairs band corresponds to the WT allele and a 366 bp band correspond the mutated allele. Note that most of the heterozygous clones display a monoallelic expression of the mutated allele.

c) WT MCF7, ADM-Het and ADM-KO MCF7 cells were grown as mammospheres for 7 days. They were co-cultured on a monolayer of hMADS cells that have been differentiated for 14 days. Co culture of the 2 cell types lasted for 4 days. ADM (green) PLIN1 (red) and E Cadherin (white) expressions were visualized using specific antibodies. GFP expression was visualized in green. Dapi was used to label the nuclei (Blue). Images were recorded using the very same settings for ADM signal (i.e. 300 m sec.). Magnification 40X, scale bar 50 μ M.

Figure 7: WT MCF7 mammospheres induce UCP1 expression in hMADS- adipocytes

a-d) WT MCF7, ADM-Het and ADM-KO MCF7 cells were grown as mammospheres for 7 days. They were co-cultured on a monolayer of hMADS cells expressing GFP under the control of UCP1 promoter that have been differentiated for 14 days. Co culture of the 2 cell types lasted for 4 days.

PLIN1 (red) and E Cadherin (white) expressions were visualized using specific antibodies. GFP expression was visualized in green. DAPI was used to label the nuclei (Blue). Images were recorded using the very same settings. Magnification 40X, scale bar 50µM..

GFP signals were quantified using the ImageJ software and compared to the signals obtained in presence of WT MCF7 cells.

e) quantification of the signals.

The means were calculated from 2 independent experiments performed in duplicate on at least 3 distinct recording for each coverslip. The fluorescence signal measured as “raw integrated density” and compared to the signal obtained with WT-MCF7 cells.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank our colleagues for helpful suggestions and discussions. We are indebted to Frederic Luton for constructive discussions and to Pascal Peraldi for a careful reading of this manuscript.

The microscopy was done in the Prism facility, "Plateforme PRISM – IBV- CNRS UMR 7277- INSERM U1091-UNS». The great help of Simon Lachambre is acknowledged.

CRISPR Cas9 constructs were designed by the Molecular Biology facility of our Institute. The expertise of Virginie Virolle is acknowledged.

This work was supported by Fondation ARC (grant number 2016 1204713) and the French Government (National Research Agency, ANR) through the "Investments for the Future" LABEX SIGNALIFE: program reference # ANR-11-LABX-0028-01

M.P. is a pre-doctoral fellow from LABEX SIGNALIFE.

X.Y. is a pre-doctoral fellow supported by the China Scholarship Council.

Conflict of interest.

The authors declare no conflict of interest.

Authors' Contributions:

M.P. data research and contributed to discussion

X.Y. data research

C.D. design of experiments and contributed to discussion

A. L. design of experiments, data research, contributed to discussion and wrote the manuscript

All authors approved the manuscript.

BIBLIOGRAPHY

- Berenguer-Daize, C., Boudouresque, F., Bastide, C., Tounsi, A., Benyahia, Z., Acunzo, J., Dussault, N., Delfino, C., Baeza, N., Daniel, L., *et al.* (2013). Adrenomedullin blockade suppresses growth of human hormone-independent prostate tumor xenograft in mice. *Clin Cancer Res* 19, 6138-6150.
- Blucher, C., and Stadler, S.C. (2017). Obesity and Breast Cancer: Current Insights on the Role of Fatty Acids and Lipid Metabolism in Promoting Breast Cancer Growth and Progression. *Frontiers in endocrinology* 8, 293.
- Bochet, L., Lehuède, C., Dauvillier, S., Wang, Y.Y., Dirat, B., Laurent, V., Dray, C., Guiet, R., Maridonneau-Parini, I., Le Gonidec, S., *et al.* (2013). Adipocyte-derived fibroblasts promote tumor progression and contribute to the desmoplastic reaction in breast cancer. *Cancer Res* 73, 5657-5668.
- Byon, C.H., Hardy, R.W., Ren, C., Ponnazhagan, S., Welch, D.R., McDonald, J.M., and Chen, Y. (2009). Free fatty acids enhance breast cancer cell migration through plasminogen activator inhibitor-1 and SMAD4. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 89, 1221-1228.
- Calle, E.E., and Kaaks, R. (2004). Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer* 4, 579-591.
- Chen, P., Pang, X., Zhang, Y., and He, Y. (2012). Effect of inhibition of the adrenomedullin gene on the growth and chemosensitivity of ovarian cancer cells. *Oncology reports* 27, 1461-1466.
- Chiche, J., Ilc, K., Laferriere, J., Trottier, E., Dayan, F., Mazure, N.M., Brahimi-Horn, M.C., and Pouyssegur, J. (2009). Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX and XII promote tumor cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH. *Cancer Res* 69, 358-368.
- Dirat, B., Bochet, L., Dabek, M., Daviaud, D., Dauvillier, S., Majed, B., Wang, Y.Y., Meulle, A., Salles, B., Le Gonidec, S., *et al.* (2011). Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer Res* 71, 2455-2465.
- Duong, M.N., Geneste, A., Fallone, F., Li, X., Dumontet, C., and Muller, C. (2017). The fat and the bad: Mature adipocytes, key actors in tumor progression and resistance. *Oncotarget* 8, 57622-57641.
- Elabd, C., Chiellini, C., Carmona, M., Galitzky, J., Cochet, O., Petersen, R., Penicaud, L., Kristiansen, K., Bouloumie, A., Casteilla, L., *et al.* (2009). Human multipotent adipose-derived stem cells differentiate into functional brown adipocytes. *Stem cells* 27, 2753-2760.
- Geiger, K., Leiherer, A., Muendlein, A., Stark, N., Geller-Rhomberg, S., Saely, C.H., Wabitsch, M., Fraunberger, P., and Drexel, H. (2011). Identification of hypoxia-induced genes in human SGBS adipocytes by microarray analysis. *PLoS one* 6, e26465.
- Ginestier, C., Hur, M.H., Charafe-Jauffret, E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., Jacquemier, J., Viens, P., Kleer, C.G., Liu, S., *et al.* (2007). ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* 1, 555-567.
- Giralt, M., and Villarroya, F. (2017). Mitochondrial uncoupling and the regulation of glucose homeostasis. *Current diabetes reviews* 13, 386-394.
- Gouon-Evans, V., Lin, E.Y., and Pollard, J.W. (2002). Requirement of macrophages and eosinophils and their cytokines/chemokines for mammary gland development. *Breast Cancer Res* 4, 155-164.
- Gregor, M.F., and Hotamisligil, G.S. (2011). Inflammatory mechanisms in obesity. *Annual review of immunology* 29, 415-445.
- Hay, D.L., Conner, A.C., Howitt, S.G., Smith, D.M., and Poyner, D.R. (2004). The pharmacology of adrenomedullin receptors and their relationship to CGRP receptors. *Journal of molecular neuroscience : MN* 22, 105-113.
- Hodson, L. (2014). Adipose tissue oxygenation: Effects on metabolic function. *Adipocyte* 3, 75-80.
- Jones, L.P., Buelto, D., Tago, E., and Owusu-Boaitey, K.E. (2011). Abnormal Mammary Adipose Tissue Environment of Brca1 Mutant Mice Show a Persistent Deposition of Highly Vascularized Multilocular Adipocytes. *Journal of cancer science & therapy*.
- Kapucuoglu, N., Percinel, S., and Angelone, A. (2008). Adenohibernoma of the breast. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 452, 351-352.
- Kershaw, E.E., and Flier, J.S. (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 89, 2548-2556.
- Kir, S., White, J.P., Kleiner, S., Kazak, L., Cohen, P., Baracos, V.E., and Spiegelman, B.M. (2014). Tumour-derived PTH-related protein triggers adipose tissue browning and cancer cachexia. *Nature* 513, 100-104.
- Kitamura, K., Kangawa, K., Kawamoto, M., Ichiki, Y., Nakamura, S., Matsuo, H., and Eto, T. (1993). Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochemical and biophysical research communications* 192, 553-560.
- Klein, K.R., Karpnich, N.O., Espenschied, S.T., Willcockson, H.H., Dunworth, W.P., Hoopes, S.L., Kushner, E.J., Bautch, V.L., and Caron, K.M. (2014). Decoy receptor CXCR7 modulates adrenomedullin-mediated cardiac and lymphatic vascular development. *Dev Cell* 30, 528-540.
- Klingenberg, M. (1999). Uncoupling protein--a useful energy dissipator. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 31, 419-430.
- Ladoux, A., and Frelin, C. (2000). Coordinated up-regulation by hypoxia of adrenomedullin and one of its putative receptors (RDC-1) in cells of the rat blood-brain barrier. *The Journal of biological chemistry* 275, 39914-39919.
- Larrayoz, I.M., Martinez-Herrero, S., Garcia-Sanmartin, J., Ochoa-Callejero, L., and Martinez, A. (2014). Adrenomedullin and tumour microenvironment. *Journal of translational medicine* 12, 339.
- Lengyel, E., Makowski, L., DiGiovanni, J., and Kolonin, M.G. (2018). Cancer as a Matter of Fat: The Crosstalk between Adipose Tissue and Tumors. *Trends in cancer* 4, 374-384.

- Linscheid, P., Seboek, D., Zulewski, H., Keller, U., and Muller, B. (2005). Autocrine/paracrine role of inflammation-mediated calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin expression in human adipose tissue. *Endocrinology* 146, 2699-2708.
- Lv, Y., Zhang, S.Y., Liang, X., Zhang, H., Xu, Z., Liu, B., Xu, M.J., Jiang, C., Shang, J., and Wang, X. (2016). Adrenomedullin 2 Enhances Beiging in White Adipose Tissue Directly in an Adipocyte-autonomous Manner and Indirectly through Activation of M2 Macrophages. *The Journal of biological chemistry* 291, 23390-23402.
- Maguire, J.J., and Davenport, A.P. (2005). Regulation of vascular reactivity by established and emerging GPCRs. *Trends Pharmacol Sci* 26, 448-454.
- Martinez, A., Vos, M., Guedez, L., Kaur, G., Chen, Z., Garayoa, M., Pio, R., Moody, T., Stetler-Stevenson, W.G., Kleinman, H.K., *et al.* (2002). The effects of adrenomedullin overexpression in breast tumor cells. *J Natl Cancer Inst* 94, 1226-1237.
- Martini, N., Londero, V., Machin, P., Travaini, L.L., Zuiani, C., Bazzocchi, M., and Paganelli, G. (2010). An unusual breast lesion: the ultrasonographic, mammographic, MRI and nuclear medicine findings of mammary hibernoma. *The British journal of radiology* 83, e1-4.
- Master, S.R., Hartman, J.L., D'Cruz, C.M., Moody, S.E., Keiper, E.A., Ha, S.I., Cox, J.D., Belka, G.K., and Chodosh, L.A. (2002). Functional microarray analysis of mammary organogenesis reveals a developmental role in adaptive thermogenesis. *Mol Endocrinol* 16, 1185-1203.
- Miller, M.J., Martinez, A., Unsworth, E.J., Thiele, C.J., Moody, T.W., Elsasser, T., and Cuttitta, F. (1996). Adrenomedullin expression in human tumor cell lines. Its potential role as an autocrine growth factor. *The Journal of biological chemistry* 271, 23345-23351.
- Miyashita, K., Itoh, H., Sawada, N., Fukunaga, Y., Sone, M., Yamahara, K., Yurugi, T., and Nakao, K. (2003). Adrenomedullin promotes proliferation and migration of cultured endothelial cells. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* 26 Suppl, S93-98.
- Nakamura, M., Han, B., Nunobiki, O., and Kakudo, K. (2006). Adrenomedullin: a tumor progression factor via angiogenic control. *Current cancer drug targets* 6, 635-643.
- Nguyen, S.V., and Claycomb, W.C. (1999). Hypoxia regulates the expression of the adrenomedullin and HIF-1 genes in cultured HL-1 cardiomyocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 265, 382-386.
- Nieman, K.M., Kenny, H.A., Penicka, C.V., Ladanyi, A., Buell-Gutbrod, R., Zillhardt, M.R., Romero, I.L., Carey, M.S., Mills, G.B., Hotamisligil, G.S., *et al.* (2011). Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nature medicine* 17, 1498-1503.
- Nieman, K.M., Romero, I.L., Van Houten, B., and Lengyel, E. (2013). Adipose tissue and adipocytes support tumorigenesis and metastasis. *Biochim Biophys Acta* 1831, 1533-1541.
- Nikitenko, L.L., Fox, S.B., Kehoe, S., Rees, M.C., and Bicknell, R. (2006). Adrenomedullin and tumour angiogenesis. *Br J Cancer* 94, 1-7.
- Oehler, M.K., Fischer, D.C., Orlowska-Volk, M., Herrle, F., Kieback, D.G., Rees, M.C., and Bicknell, R. (2003). Tissue and plasma expression of the angiogenic peptide adrenomedullin in breast cancer. *Br J Cancer* 89, 1927-1933.
- Ologun, G.O., Patel, Z.M., Rana, N.K., Trecartin, A., Shen, A., Trostle, D., and Bertsch, D. (2017). Large Unilateral Adrenal Mass with Surrounding Brown Fat: A Case Report. *Cureus* 9, e1552.
- Paulmyer-Lacroix, O., Desbriere, R., Poggi, M., Achard, V., Alessi, M.C., Boudouresque, F., Ouafik, L., Vuaroqueaux, V., Labuhn, M., Dutourand, A., *et al.* (2006). Expression of adrenomedullin in adipose tissue of lean and obese women. *European journal of endocrinology* 155, 177-185.
- Peirce, V., Carobbio, S., and Vidal-Puig, A. (2014). The different shades of fat. *Nature* 510, 76-83.
- Ramachandran, V., Arumugam, T., Hwang, R.F., Greenson, J.K., Simeone, D.M., and Logsdon, C.D. (2007). Adrenomedullin is expressed in pancreatic cancer and stimulates cell proliferation and invasion in an autocrine manner via the adrenomedullin receptor, ADMR. *Cancer Res* 67, 2666-2675.
- Ravaud, C., Esteve, D., Villageois, P., Bouloumie, A., Dani, C., and Ladoux, A. (2015). IER3 Promotes Expansion of Adipose Progenitor Cells in Response to Changes in Distinct Microenvironmental Effectors. *Stem cells* 33, 2564-2573.
- Renehan, A.G., Tyson, M., Egger, M., Heller, R.F., and Zwahlen, M. (2008). Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet* 371, 569-578.
- Rodriguez, A.M., Elabd, C., Delteil, F., Astier, J., Vernochet, C., Saint-Marc, P., Guesnet, J., Guezennec, A., Amri, E.Z., Dani, C., *et al.* (2004). Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue. *Biochemical and biophysical research communications* 315, 255-263.
- Rodriguez, A.M., Pisani, D., Dechesne, C.A., Turc-Carel, C., Kurzenne, J.Y., Wdziekonski, B., Villageois, A., Bagnis, C., Breittmayer, J.P., Groux, H., *et al.* (2005). Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J Exp Med* 201, 1397-1405.
- Ruffell, B., Affara, N.I., and Coussens, L.M. (2012). Differential macrophage programming in the tumor microenvironment. *Trends in immunology* 33, 119-126.
- Sakuma, T., Nishikawa, A., Kume, S., Chayama, K., and Yamamoto, T. (2014). Multiplex genome engineering in human cells using all-in-one CRISPR/Cas9 vector system. *Scientific reports* 4, 5400.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., *et al.* (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9, 676-682.
- Schuur, E.R., and Weigel, R.J. (2000). Monoallelic amplification of estrogen receptor-alpha expression in breast cancer. *Cancer Res* 60, 2598-2601.

- Siclari, V.A., Mohammad, K.S., Tompkins, D.R., Davis, H., McKenna, C.R., Peng, X., Wessner, L.L., Niewolna, M., Guise, T.A., Suvannasankha, A., *et al.* (2014). Tumor-expressed adrenomedullin accelerates breast cancer bone metastasis. *Breast Cancer Res* 16, 458.
- Singh, R., Parveen, M., Basgen, J.M., Fazel, S., Meshesha, M.F., Thames, E.C., Moore, B., Martinez, L., Howard, C.B., Vergnes, L., *et al.* (2016). Increased Expression of Beige/Brown Adipose Markers from Host and Breast Cancer Cells Influence Xenograft Formation in Mice. *Molecular cancer research : MCR* 14, 78-92.
- Tan, J., Buache, E., Chenard, M.P., Dali-Youcef, N., and Rio, M.C. (2011). Adipocyte is a non-trivial, dynamic partner of breast cancer cells. *Int J Dev Biol* 55, 851-859.
- Tao, L., Huang, G., Song, H., Chen, Y., and Chen, L. (2017). Cancer associated fibroblasts: An essential role in the tumor microenvironment. *Oncology letters* 14, 2611-2620.
- Vergnes, L., Davies, G.R., Lin, J.Y., Yeh, M.W., Livhits, M.J., Harari, A., Symonds, M.E., Sacks, H.S., and Reue, K. (2016). Adipocyte Browning and Higher Mitochondrial Function in Periadrenal But Not SC Fat in Pheochromocytoma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 101, 4440-4448.
- Visvader, J.E., and Stingl, J. (2014). Mammary stem cells and the differentiation hierarchy: current status and perspectives. *Genes & development* 28, 1143-1158.
- Watson, C.J., and Kreuzaler, P.A. (2011). Remodeling mechanisms of the mammary gland during involution. *Int J Dev Biol* 55, 757-762.
- Xue, R., Lynes, M.D., Dreyfuss, J.M., Shamsi, F., Schulz, T.J., Zhang, H., Huang, T.L., Townsend, K.L., Li, Y., Takahashi, H., *et al.* (2015). Clonal analyses and gene profiling identify genetic biomarkers of the thermogenic potential of human brown and white preadipocytes. *Nature medicine* 21, 760-768.
- Ye, J., Gao, Z., Yin, J., and He, Q. (2007). Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293, E1118-1128.
- Zhang, S.Y., Lv, Y., Zhang, H., Gao, S., Wang, T., Feng, J., Wang, Y., Liu, G., Xu, M.J., Wang, X., *et al.* (2016). Adrenomedullin 2 Improves Early Obesity-Induced Adipose Insulin Resistance by Inhibiting the Class II MHC in Adipocytes. *Diabetes* 65, 2342-2355.

FIGURE 1

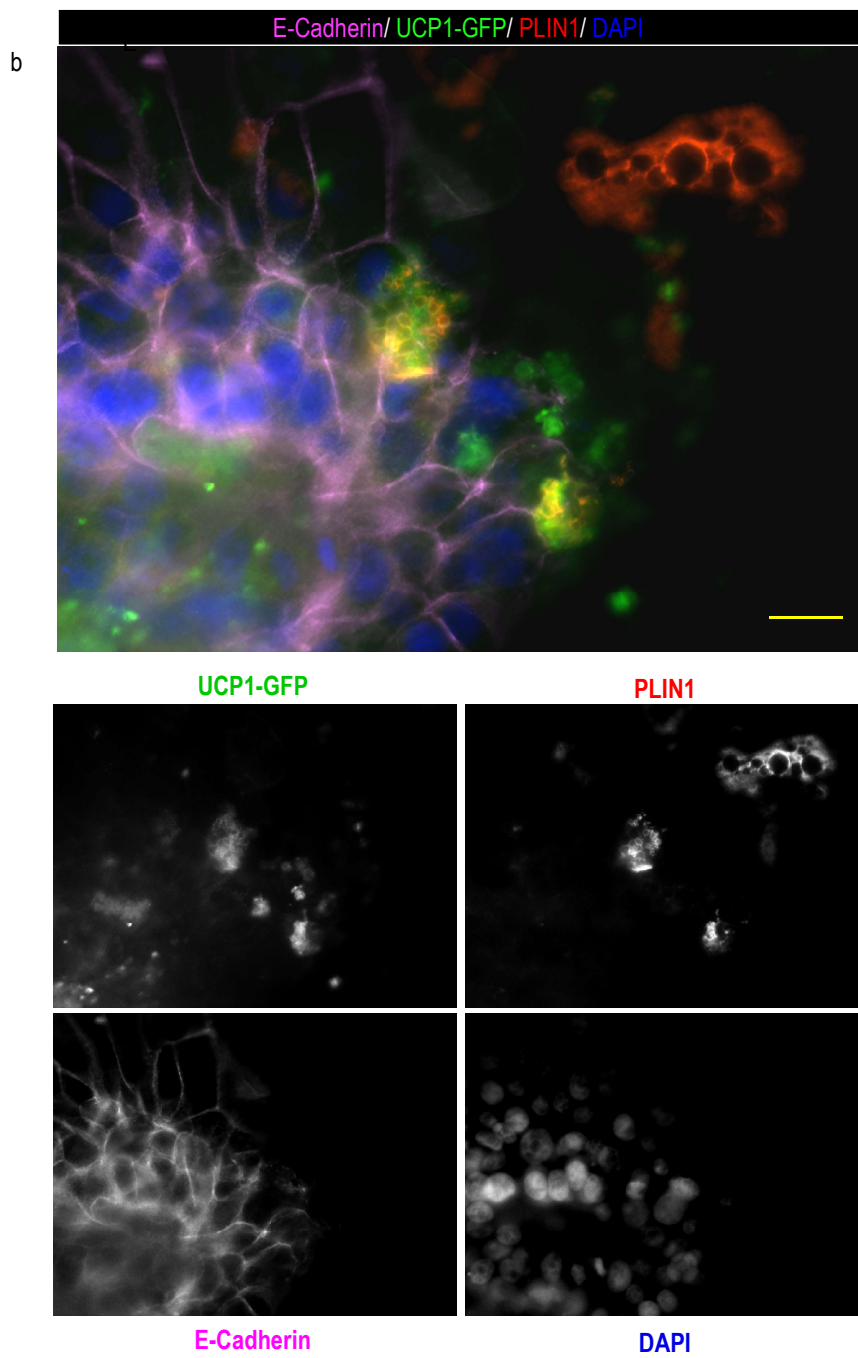
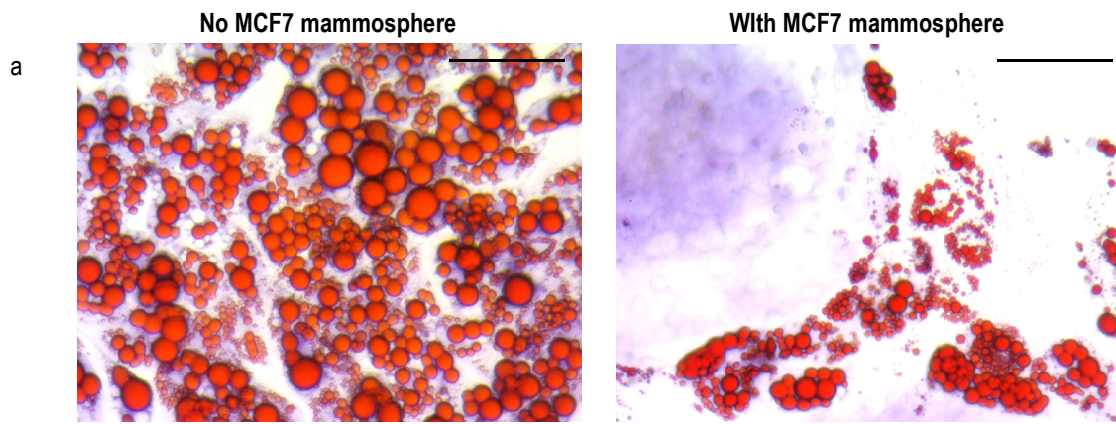


FIGURE 2

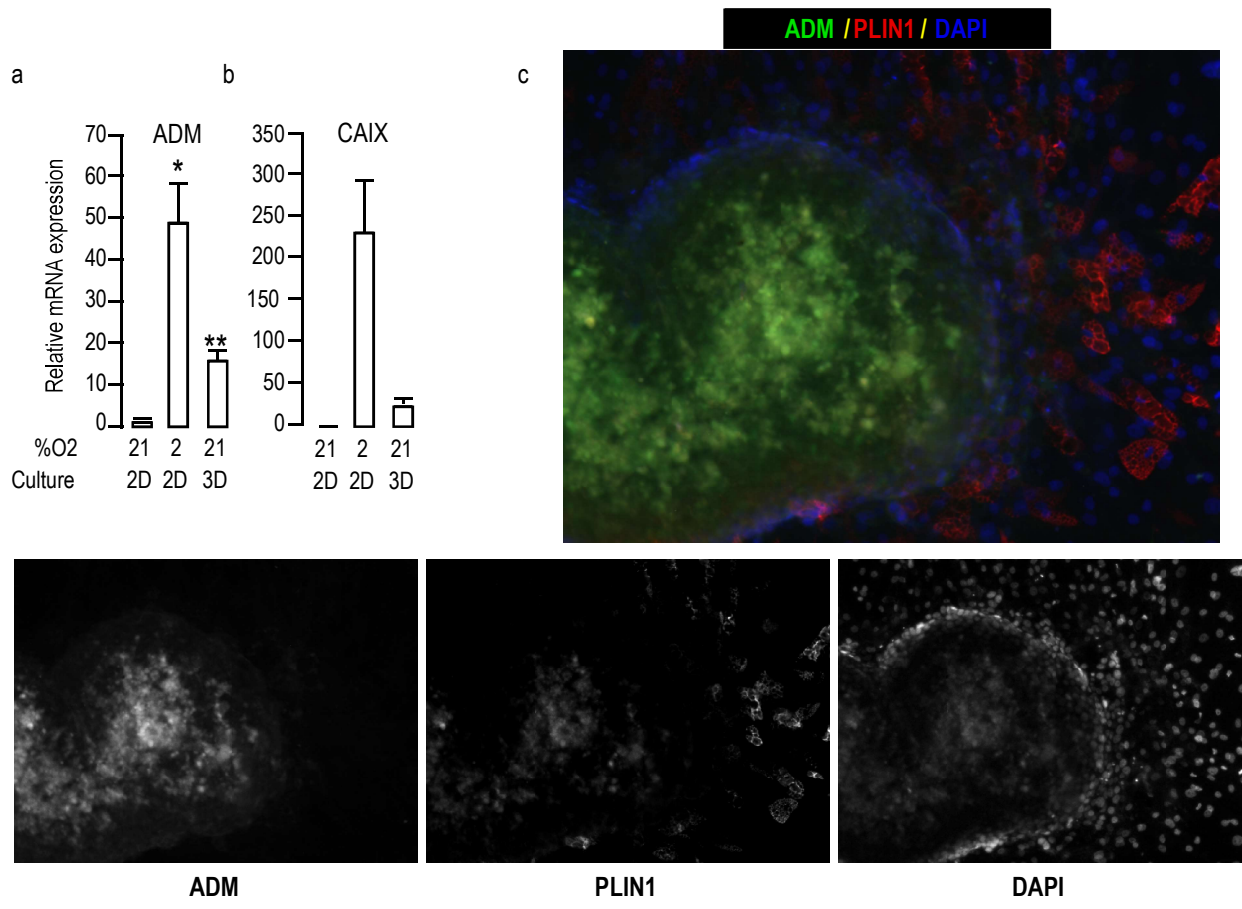


FIGURE 3

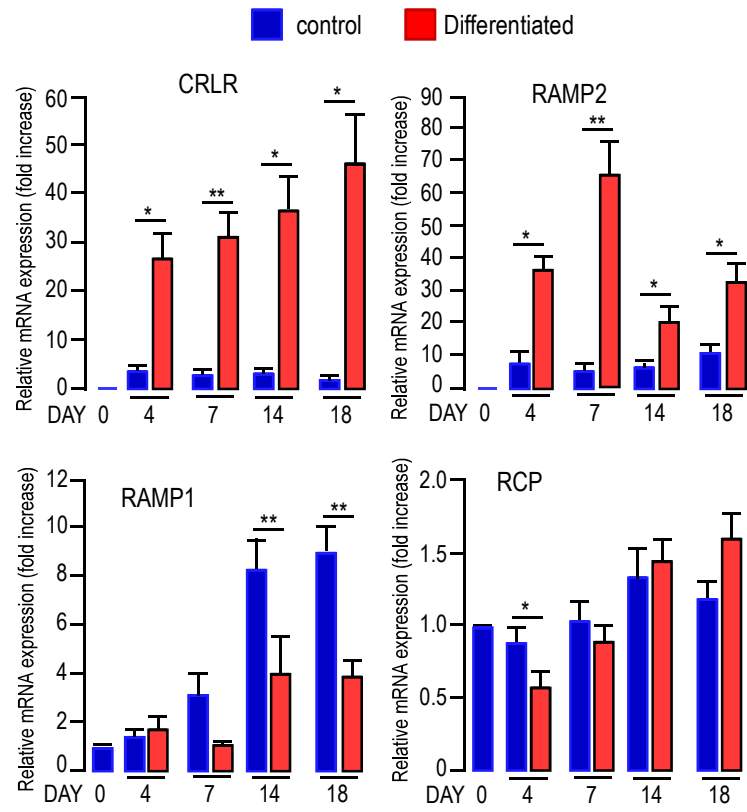


FIGURE 4

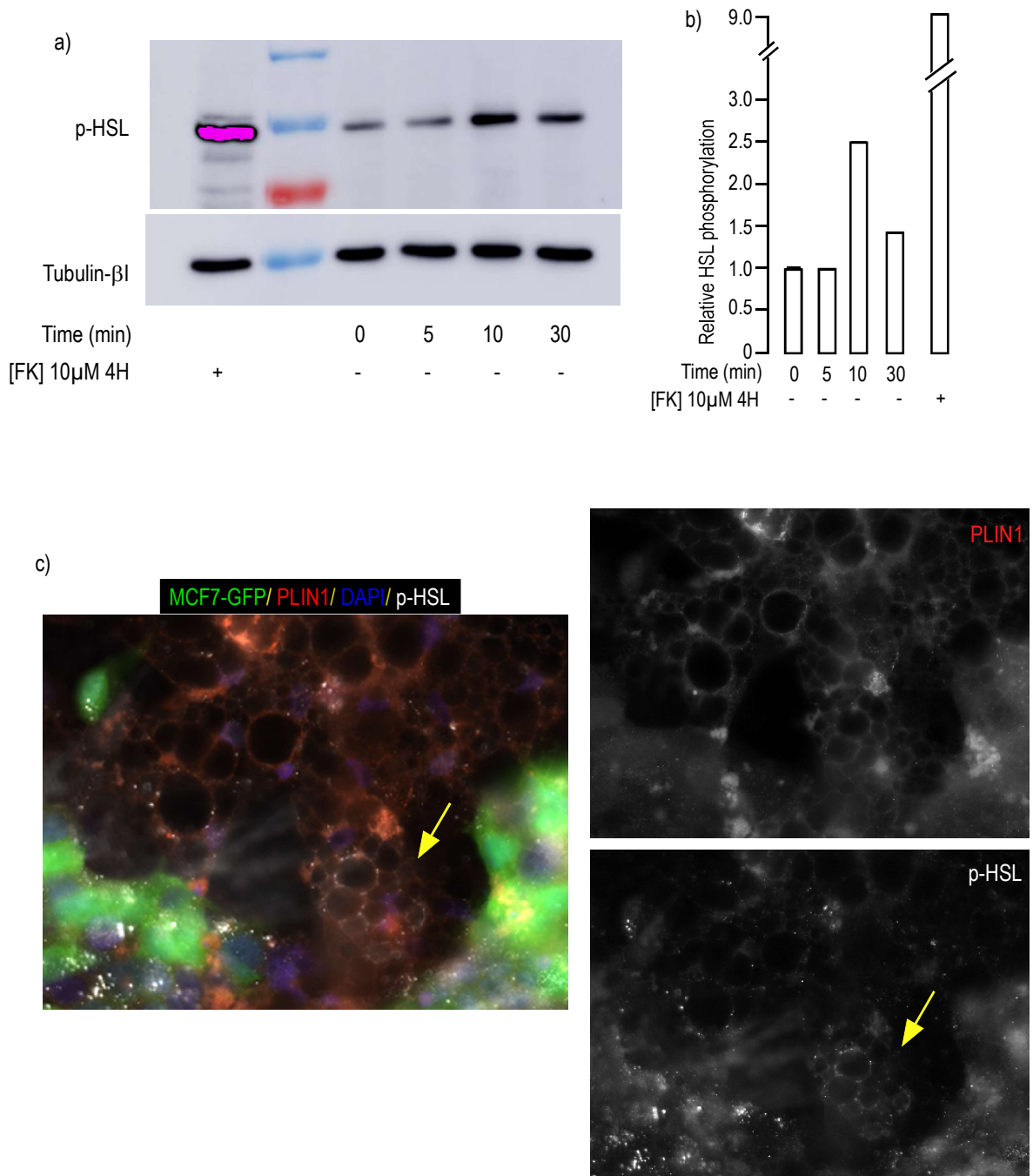


FIGURE 5

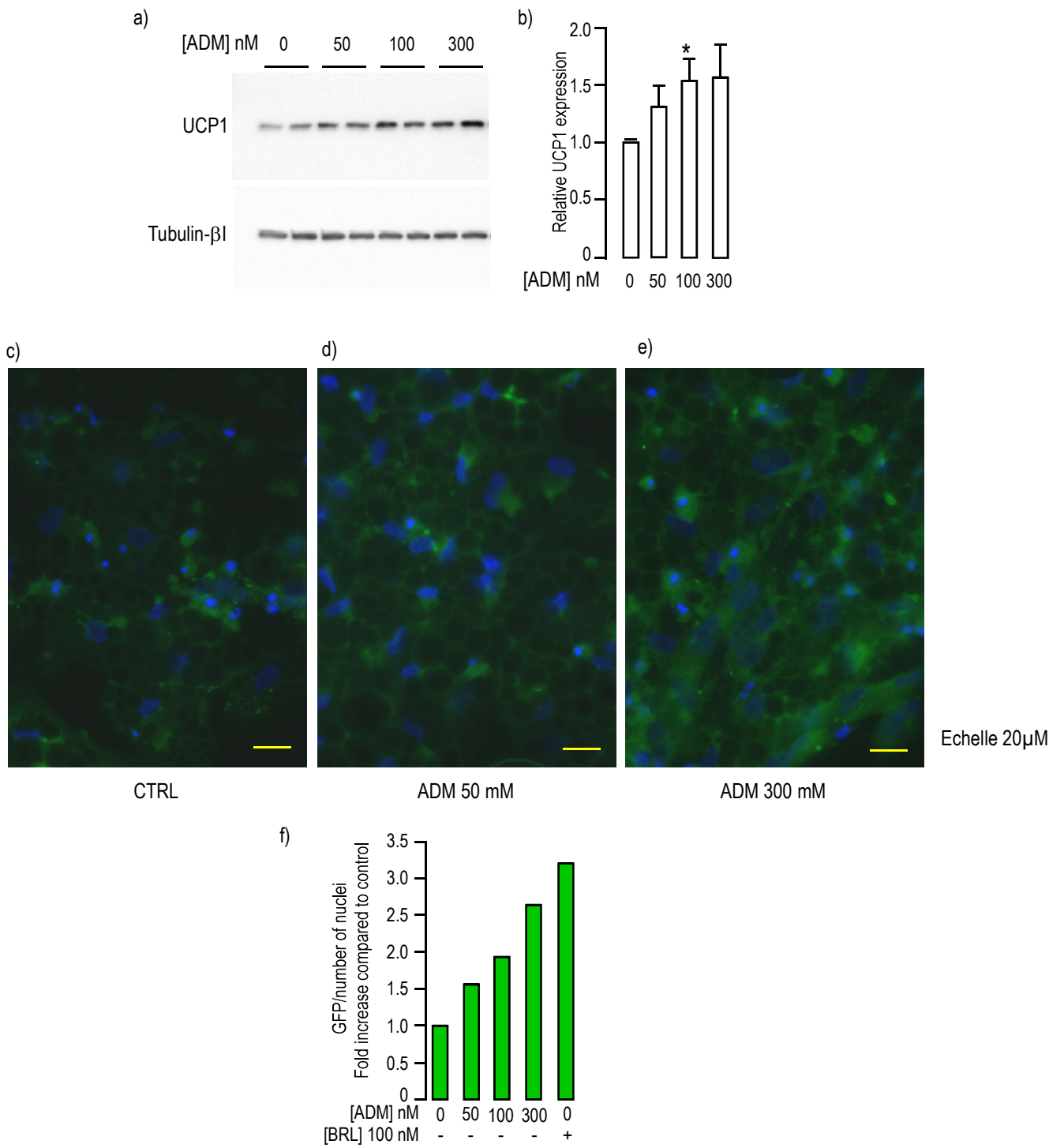


FIGURE 6

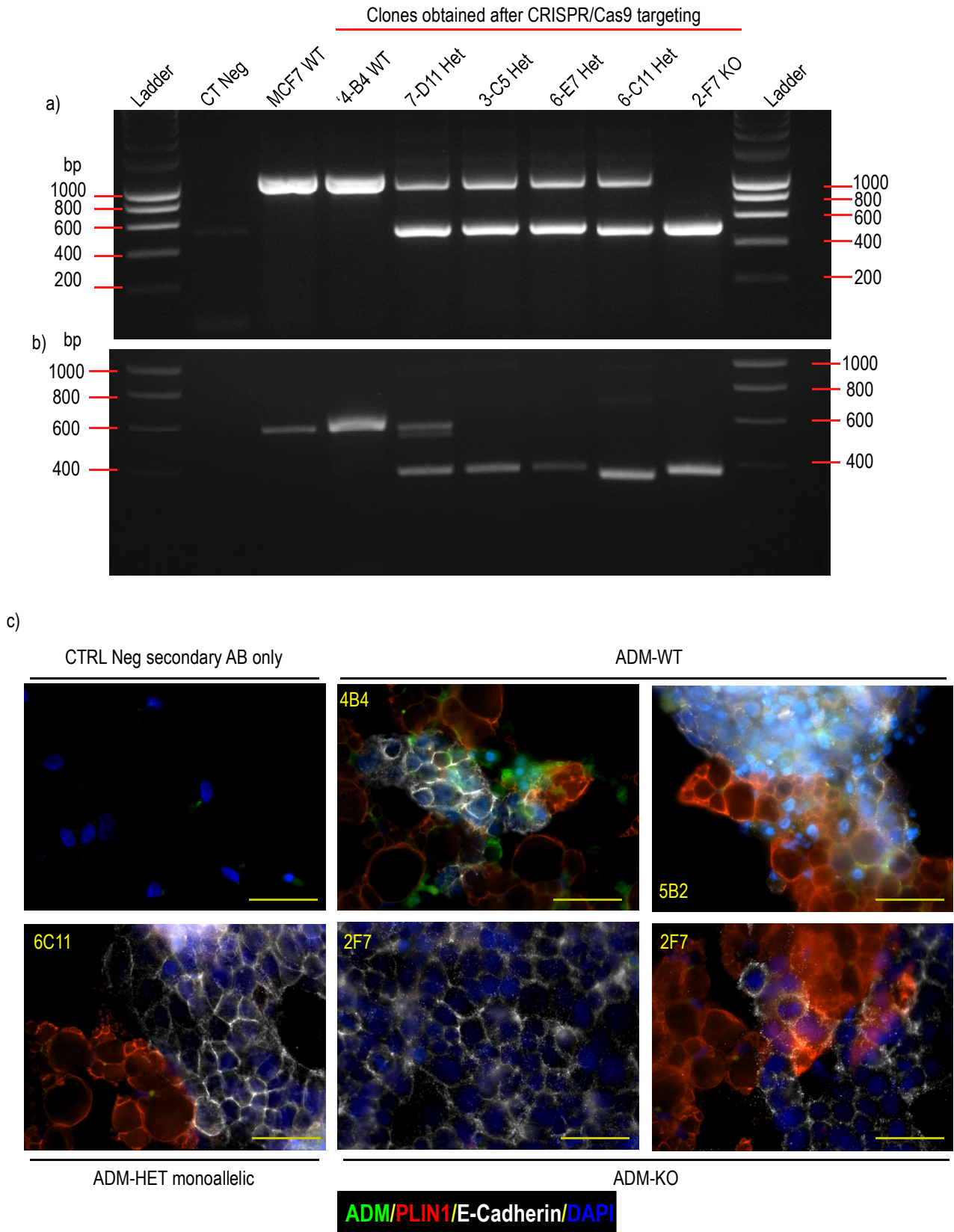
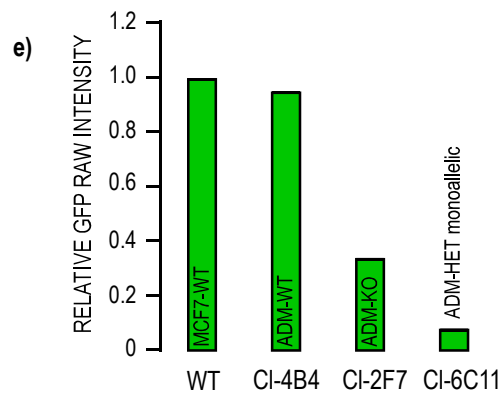
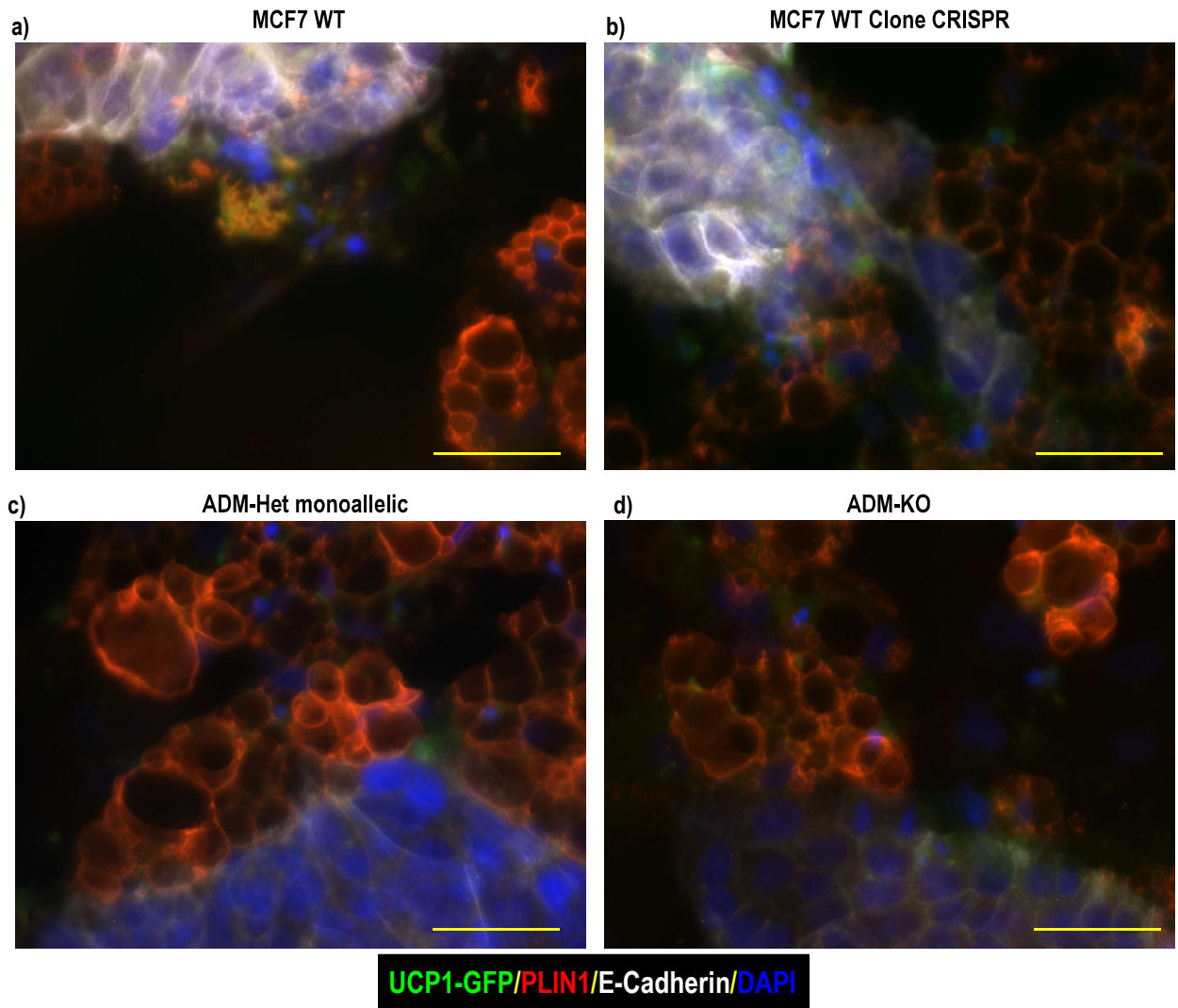


FIGURE 7



SUPPLEMENTARY INFORMATION

**Breast cancer mammospheres secrete Adrenomedullin
to induce lipolysis and browning of adjacent adipocytes.**

*Martin PARE, Xi YAO ,
Christian DANI and Annie LADOUX*

Supplementary Information

Sequences for the primers used in this study

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>ADM</i>	5'- CCAGAGCATGAACAACCTCC -3',	5'- GTCCTTGCCTTATCTGTGAAC -3',
<i>CRLR</i>	5'- CACCCACGAGAAAAGTGAAG -3'	5'- TGCCAAGCGAGATAAGCAG -3'
<i>RAMP1</i>	5'- CTGGCACATGGCGGAGAAG-3'	5'- CTGAAGTAGCGGCCATGCAC -3'
<i>RAMP2</i>	5'- GCGACTGGGCCATGATTAGC -3'	5'- CCAGGGAGCAGTTGGCAAAG -3'
<i>RAMP3</i>	5'- CGCAACTTCTCCCGTTGCTG -3'	5'- GCGAAAGCCTTCCCACACAG -3'
<i>CAIX</i>	5'-AGTGCCTATGAGCAGTTGCT -3'	5'-TGCTTAGCACTCAGCATCAC -3'
<i>RCP</i>	5'-TGAGGTTCTTTGTCTGCTGGC -3'	5'- CGCAGAATTGGCATCCTTCAC-3'

Primers used to screen for mutated clones obtained with CRISPR Cas9 procedure.

Genomic DNA amplification

5'- CGGAGGGAGATAAGCGTCT-3'

5'-AGCCCCCCCGAGTGGAAGTGC -3'

cDNA Amplification

5'- CCAGGGTCTGCGCTTCGCA -3'

5'- AGCCCCCCCGAGTGGAAGTGC-3'

References for the antibodies used in this study

ANTIBODY	MANUFACTURER	CATALOG NUMBER	DILUTION
ANTI-UCP1	Millipore	#662045	1000
ANTI-PLIN1	ACRIS GmbH	#BP5015	1000
ANTI-Tubulin β 1	SIGMA ALDRICH	#T7816	5000
ANTI-ADM	Santa Cruz Biotechnology	#SC 80462	500
ANTI-FABP4	Millipore	# MABS172	1000
ANTI-p38 MAPK	Cell Signaling Technology	# 9212	1000
ANTI-phospho p38 MAPK	Cell Signaling Technology	#9211	1000
Anti E-Cadherin (24E10)	Cell Signaling Technology	#3195	500
Anti human ADM	Phoenix Pharmaceuticals Inc	H-010-28	500
Anti HSL	Cell Signaling Technology	#18381	500
Anti phospho-HSL	Cell Signaling Technology	#4139	500

Supplementary data: Table 1

References for the antibodies used in this study.

Legends for Supplementary figures

Supplementary Figure 1: MDA-MB-231 mammospheres induce GFP expression controlled by UCP1 promoter in hMADS-adipocytes.

MDA-MB-231 cells were grown as mammospheres for 7 days. They were co-cultured on a monolayer of hMADS cells expressing GFP under the control of UCP1 promoter that have been differentiated for 14 days. Co culture of the 2 cell types lasted for 4 days.

PLIN1 (red) expression was visualized using a specific antibody. GFP expression was visualized in green. Dapi was used to label the nuclei (Blue). The adipocytes adjacent to the mammospheres express both GFP and PLIN1. Magnification 40X.

Supplementary Figure 2: Comparison of the ADM and intermedin expressions in MCF7 cells

MCF7 cells were grown as a monolayer under normoxia or hypoxia (2%O₂) or mammospheres. Expression of intermedin (green bars) or ADM (red bars) was assessed by real-time RT-PCR and normalized for the expression of *36B4* mRNA.

Supplementary Figure 3: MDA-MB-231 mammospheres induce phosphorylation of HSL in hMADS-adipocytes close to the mammospheres.

MDA-MB-231 cells were grown as mammospheres for 7 days and co-cultured on a monolayer of hMADS cells differentiated for 14 days. Co culture of the 2 cell types lasted for 4 days.

Phosphorylation of HSL (white) and PLIN1 (red) expressions were visualized using specific antibodies. Dapi was used to label the nuclei (Blue). The yellow arrows indicate phospho- HSL expression. Magnification 40X. The recording of the channels for PLIN1 and phospho-HSL are shown in grey.

Supplementary Figure 4: ADM induces phosphorylation of p38 MAPK.

a, ADM increased phosphorylation of p38 MAPK.

Protein expression and phosphorylation were measured in hMADS-adipocytes grown in the differentiation medium. They were stimulated by ADM for the indicated time. Expressions of P38 MAPK (upper panel) and Tubulin- β 1 (lower panel) used as a loading control as well as total P38 MAPK were analyzed by Western blot using specific antibodies. Representative Western blots are shown.

b, Quantification of the signals.

Expression of the proteins was quantified using the Quantity one Program and compared to the expression of Tubulin- β l. The means \pm SEM were calculated from four independent experiments (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ND means “not significantly different”).

Supplementary Figure 5: Analysis of the sequences of the MCF7 clones obtained after ADM invalidation.

1/ Localization of the guide RNAs to target the ADM gene. Sequence of the ADM gene: The introns are in black and the exons in the translated part of the gene are in blue capitals. Localizations of the two guide RNAs are highlighted in yellow and pink.

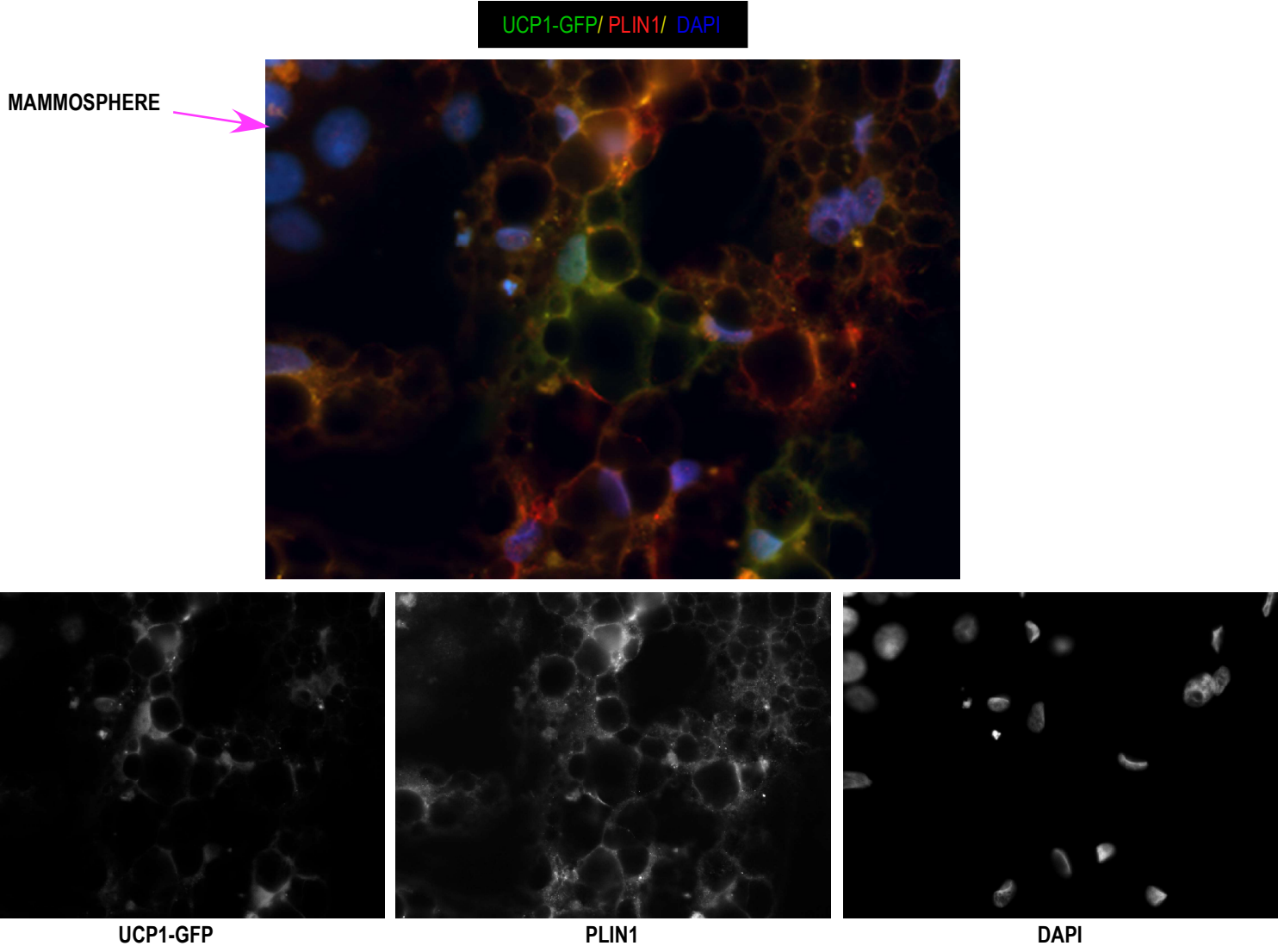
2/ Alignment of the wild type and mutated clones.

Sequence is shown for clone 2F7 which corresponds to the ADM-KO clone. All mutated clones displayed the same sequence except the 6-C-11 clone.

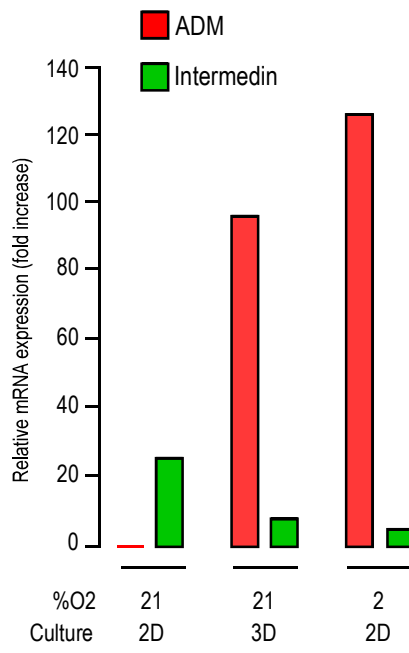
3/ Alignment of the proteins produced after translation.

The sequence of pre-pro ADM is shown and the highlighted zones indicate the position of the signal peptide, PAMP peptide and ADM peptide. The cleavage sites are indicated in red. None of the clones was able to produce functional full length pre-pro-ADM as the shift in the open reading frame modified the ADM sequence. In addition all cleavage sites to produce a functional ADM peptide were lost.

SUPPLEMENTARY FIGURE 1



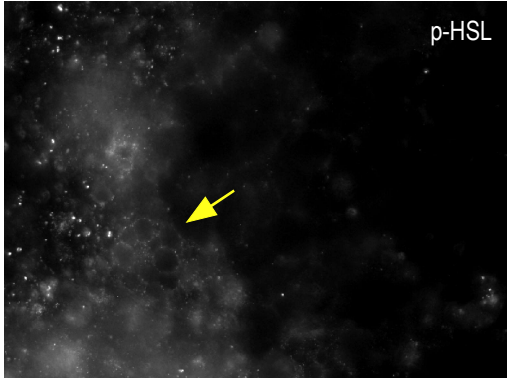
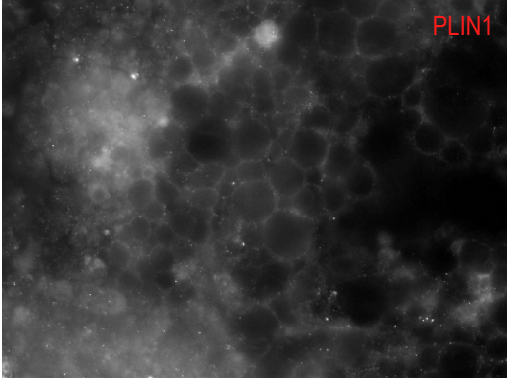
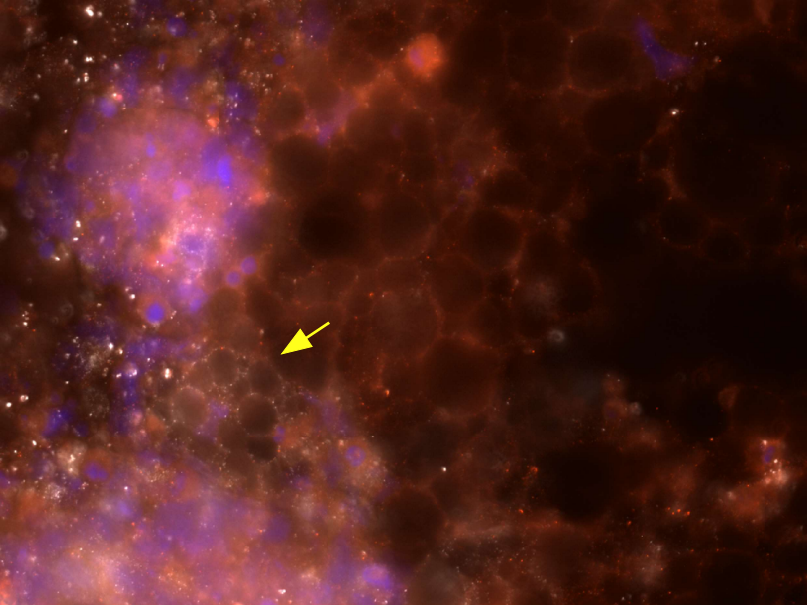
SUPPLEMENTARY FIGURE 2



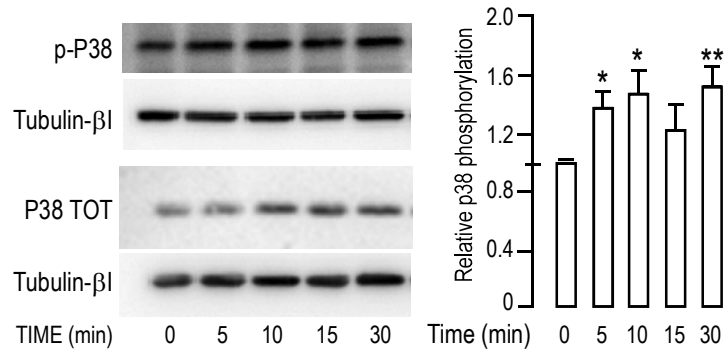
SUPPLEMENTARY FIGURE 3

MDA-MB-231

Phospho HSL/PLIN1/ DAPI



Supplementary Figure 4



Supplementary Figure 5: Analysis of the sequences of the MCF7 clones obtained after ADM invalidation.

1/ Localization of the guide RNAs to target the *ADM* gene (genomic sequence). The introns are in black and the exons within the translated part of the sequence are in blue capital letters.

The localization of the guide RNAs is underlined in yellow and in pink.

GGCCGGCGCGTGCAAACGCCTCTGGCGCCTCTCTGCGCGGAGGGAGATAAGCGTCTGAGCCAGGGAAAG
CGCGGGCTAAACCCGCCTCGCCGGGGCCCCTGCCGCCCCTCCGTGCCCGCCCGGGCGGTGCAGCTGGC
CCGGGTGCTCACGCTCGACTCTTTCTTTCTTTCCAGGGTCTGCGCTTCGCAGCCGGGATGAAGCTGGTTT
CCGTGCCCCTGATGTACCTGGGTCGCTCGCCTTCTAGGCGCTGACACCGCTC/GGTTGGATGTGCGCTC
GGAGTTTCGAAAGAAgtgagtcgggagcgcctccccctgtctgttacctggcaggcaaggggaactgacctgtgtcccgaaggtctagaagt
gaatgggagcaggacagccctggcgctcacctgaacgcacgcgaatcgggtctgcttgtgtttccagGTGGAATAAGTGGGCTCTGAGTC
GTGGGAAGAGGGAACTGCGGATGTCCAGCAGCTACCCACCGGGCTCGCTGACGTGAAGGCCGGGCCTG
CCCAGACCCTTATTCGGCCCCAGGACATGAAGGGTGCCTCTCGAAGCCCCGAAGACAGgtaactacgcctgtgctgt
ccagggacgggaggaaggaaggtgtcgggaggagtctctgtctccactcccctggccggggatcgtcgggctggaccgagctcagatggcgcg
agcagttccagctccctctggctctagaatggctcccgtcccgggttggggccaaagctctgcttgcgatgggtctcaagttgctttctccccctcccccgccc
gcagCAGTCCGGATGCCGCCGCA/TCCGAGTCAAGCGCTACCGCCAGAGCATGAACAATTCCAGGGCCTC
CGGAGCTTTGGCTGCCGCTTCGGGACGTGCACGGTGCAGAAGCTGGCACACCAGATCTACCAGTTCACAGA
TAAGGACAAGGACAACGTCGCCCCAGGAGCAAGATCAGCCCCAGGGCTACGGCCGCCGGCGCCGGCG
CTCCCTGCCCGAGGCCGGCCGGGTCGGACTCTGGTGTCTTCTAAGCCACAAGCACACGGGGCTCCAGCC
CCCCGAGTGGAAGTGCTCCCCACTTTCTTAGGATTTAGGCGCCCATGGTACAAGGAATAGTCGCGCAAG
CAT

2/ : Sequences of the sequenced PCR products covering the ADM genomic region targeted by the CRISPR gRNA in clone 2F7 showing the 2 mutated alleles.

Nucleotide alignment compared to WT sequence

```

ADM-Wt      ATGAAGCTGGTTTCCGTCGCCCTGATGTACCTGGGTTTCGCTCGCCTTCCTAGGCGCTGAC
Clone 2F7   ATGAAGCTGGTTTCCGTCGCCCTGATGTACCTGGGTTTCGCTCGCCTTCCTAGGCGCTGAC
Clone 6C11   ATGAAGCTGGTTTCCGTCGCCCTGATGTACCTGGGTTTCGCTCGCCTT
*****

ADM-Wt      ACCGCTCGGTTGGATGTTCGCGTCGGAGTTTCGAAAGAAGTGAGTCCGGGCAGCGCCTTCC
Clone 2F7   ACCGCTCG-----
Clone 6C11   -----

ADM-Wt      CCCTTGCTGGTACCTGGCAGGCAAGGGAACTGACCGTTGGTCCCGAAGGTCTAGAAGTG
Clone 2F7   -----
Clone 6C11   -----

ADM-Wt      AATGGGAGCAGGGACAGGCCTGGGCGTCACCTGAACGCACGCGAATCGGGTCTGCTTGTG
Clone 2F7   -----
Clone 6C11   -----

ADM-Wt      TTTTCCAGGTGGAATAAGTGGGCTCTGAGTCGTGGGAAGAGGGAAGTGC GGATGTCCAGC
Clone 2F7   -----
Clone 6C11   -----

ADM-Wt      AGCTACCCACCGGGCTCGCTGACGTGAAGCCGGGCCTGCCAGACCCTTATTCGGCCC
Clone 2F7   -----
Clone 6C11   -----

ADM-Wt      CAGGACATGAAGGGTGCCCTCTCGAAGCCCCGAAGACAGGTAAGTACGCCCTGTGCTGTCC
Clone 2F7   -----
Clone 6C11   -----

ADM-Wt      AGGGACGGGAGGGAAGGAAGGTGTGCGGGAGGAGTTCTCTGTCTCCACTCCCCTGCCCCG
Clone 2F7   -----
Clone 6C11   -----

ADM-Wt      GGGGATCGTCGGGGCTGGACCGCAGCTCAGATGGCGCGAGCAGTTTCCAGCTCCCTCTGG
Clone 2F7   -----
Clone 6C11   -----

ADM-Wt      CTCTAGAATGGCTCCCGTTCCCGGTGTTGGGGCCAAAGCTCTGCTTGATGGGGTCTCAAG
Clone 2F7   -----
Clone 6C11   -----

ADM-Wt      TTGCCTTTCTTCCCCCTCCCCCGCCCGCAGCAGTCCGGATGCCGCCCGCATTCCGAGTCA
Clone 2F7   -----TCCGAGTCA
Clone 6C11   -----TCCGAGTCA
*****

ADM-Wt      AGCGCTACCGCCAGAGCATGAACAACCTCCAGGGCCTCCGGAGCTTTGGCTGCCGCTTCG
Clone 2F7   AGCGCTACCGCCAGAGCATGAACAACCTCCAGGGCCTCCGGAGCTTTGGCTGCCGCTTCG
Clone 6C11   AGCGCTACCGCCAGAGCATGAACAACCTCCAGGGCCTCCGGAGCTTTGGCTGCCGCTTCG
*****

ADM-Wt      GGACGTGCACGGTGCAGAAGCTGGCACACCAGATCTACCAGTTCACAGATAAGGACAAGG
Clone 2F7   GGACGTGCACGGTGCAGAAGC-----
Clone 6C11   GGACGTGCACGGTGCAGAAGCTGGCACACCAGATCTACCAGTTCACAGATAAGGACAAGG
*****

```

3/ Pre-pro adrenomedullin protein sequence alignment of WT and mutated clones of ADM.

```

WT          MKLVSVALMYLGSLAFLGADTARLDVASEFRKKWKNWALSRCRRELRMSSSYPTGLADVK 60
2F7         MKLVSVALMYLGSLAFLGADTAR-----PSQALPP-EHEQL 35
6C11        MKLVSVALMYLGSLAF-----PSQALPP-EHEQL 28
            *****                               *.: *. :

WT          AGPAQTLIRPQDMKGASRSPEDSSPDAARIRVKRYRQSMNMQGLRSFGCRFGTCTVQKL 120
2F7         PGPPPELWLPPLRDVHGAEAGTPDLP--VHR*----- 62
6C11        PGPPPELWLPPLRDVHGAEAGTPDLP--VHR*----- 55
            .**.: : :*:**.. * . . *

WT          AHQIYQFTDKDKDNVAPRSKISPQGYGRRRRRSLPEAGPGRTLVSSKPAHGAPAPPSGS 180
2F7         -----
6C11        -----

WT          APHFL 185
2F7         -----
6C11        -----

```

LEGEND

Signal peptide

PAMP peptide

ADM peptide

Clivage sites **KR** & **RR**

MR-Pro ADM: inactive peptide

- Résultats et discussion

Nous avons visualisé les modifications que les cellules tumorales engendrent sur les adipocytes à l'aide de systèmes rapporteurs générés au laboratoire. Nous constatons une diminution de la taille des gouttelettes lipidiques des cellules adipocytaires à proximité des mammosphères ainsi qu'une augmentation de l'expression d'UCP1. Nos résultats indiquent qu'un peptide sécrété par la tumeur, l'adrénomedulline ou ADM, est capable d'induire des modifications métaboliques dans les cellules adipocytaires. Les cellules adipocytaires expriment les récepteurs et co-récepteurs de l'adrénomedulline tandis que ceux-ci sont absents chez les PAs. La stimulation des cellules différenciées induit la voie de la lipolyse par la phosphorylation d'HSL ainsi que l'induction d'UCP1 par la voie p38-MAPK. La délétion de l'adrénomedulline par le système CRISPR-Cas9 diminue, mais n'inhibe pas complètement l'expression d'UCP1 dans les cellules adipocytaires à proximité des mammosphère. Cela signifie que d'autres molécules sécrétées induisent le brunissage de ces cellules.

Ce travail représente la première étape de l'étude des interactions entre adipocytes et tumeurs du sein. Il devra être complété et poursuivi en étudiant les effets des mammosphères tumorales sur des adipocytes de sein. En effet notre modèle de cellules hMADS est approprié pour étudier les différenciations adipocytaires blanches et brunes. Comme le tissu adipeux du sein contient des adipocytes blancs, il est important de vérifier si les mammosphères tumorales sont capables d'induire une lipolyse dans les adipocytes de sein mais aussi un processus de brunissage. Si nous confirmons que les adipocytes de sein sont capables de « brunir » nous devons analyser ce processus plus en détail pour déterminer s'il favorise la progression tumorale et de quelle manière. Enfin l'identification des interactions entre adipocytes et cancer favorisant la progression tumorale pourra faire l'objet d'un ciblage thérapeutique. Il serait intéressant de proposer des thérapies antitumorales modifiant ces interactions comme c'est le cas actuellement avec l'immunothérapie antitumorale ou les thérapies anti-angiogéniques venant en complément des

thérapies conventionnelles. Cela permettrait certainement de diminuer les résistances aux thérapies antitumorales induites par les adipocytes (Duong et al., 2017).

Conclusions et perspectives

L'homéostasie de l'organisme par le tissu adipeux s'effectue de manière contrôlée et dépend de la présence des progéniteurs adipeux, de leur différenciation et de leur fonction. Les modifications de ces diverses composantes, soit de façon médicamenteuse, soit de façon pathologique entraînent des répercussions métaboliques graves.

Mon travail de thèse a permis de mettre en évidence que les progéniteurs adipeux issus de dépôts distincts répondent de manière différente à la thérapie HAART tant pour l'auto-renouvellement que pour la différenciation adipocytaire brune. . La régulation de l'expression d'UCP1 peut être modifiée en conditions physiopathologiques soit par des médicaments soit au cours d'une maladie. Néanmoins, nous avons trouvé une unique cible pour ces deux conditions qui est altérée de manière opposée: la stimulation de p38. Le LPV diminue la phosphorylation de p38 induite par la forskoline tandis que l'adrénomédulline sécrétée par le cancer du sein induit cette phosphorylation après activation de son récepteur présent sur les adipocytes. Ces observations peuvent avoir des retombées dans le domaine médical, soit pour fabriquer des médicaments anti-SIDA qui ont peu d'effets secondaires sur le tissu adipeux, soit pour modifier les interactions entre les cellules tumorales et les adipocytes pour améliorer les traitements anti-cancer.

Bibliographie

- Abassi, Z., Karram, T., Ellaham, S., Winaver, J., and Hoffman, A. (2004). Implications of the natriuretic peptide system in the pathogenesis of heart failure: diagnostic and therapeutic importance. *Pharmacol. Ther.* *102*, 223–241.
- Adams, T.D., Stroup, A.M., Gress, R.E., Adams, K.F., Calle, E.E., Smith, S.C., Halverson, R.C., Simper, S.C., Hopkins, P.N., and Hunt, S.C. (2009). Cancer incidence and mortality after gastric bypass surgery. *Obesity (Silver Spring)* *17*, 796–802.
- Addy, C.L., Gavrila, A., Tsiodras, S., Brodovicz, K., Karchmer, A.W., and Mantzoros, C.S. (2003). Hypoadiponectinemia is associated with insulin resistance, hypertriglyceridemia, and fat redistribution in human immunodeficiency virus-infected patients treated with highly active antiretroviral therapy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *88*, 627–636.
- Adkins, H.B., Bianco, C., Schiffer, S.G., Rayhorn, P., Zafari, M., Cheung, A.E., Orozco, O., Olson, D., De Luca, A., Chen, L.L., et al. (2003). Antibody blockade of the Cripto CFC domain suppresses tumor cell growth in vivo. *J. Clin. Invest.* *112*, 575–587.
- Agarwal, A.K., and Garg, A. (2002). A novel heterozygous mutation in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene in a patient with familial partial lipodystrophy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *87*, 408–411.
- Agarwal, A.K., and Garg, A. (2003). Congenital generalized lipodystrophy: significance of triglyceride biosynthetic pathways. *Trends Endocrinol. Metab.* *14*, 214–221.
- Ahima, R.S., and Flier, J.S. (2000). Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol. Metab.* *11*, 327–332.
- Ailhaud, G., Grimaldi, P., and Nègre, R. (1992). Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu. Rev. Nutr.* *12*, 207–233.
- Albregues, J., Meneguzzi, G., and Gaggioli, C. (2014). Carcinoma-associated fibroblasts in cancer: the great escape. *Med Sci (Paris)* *30*, 391–397.
- Alexandrov, L.B., Nik-Zainal, S., Wedge, D.C., Aparicio, S.A.J.R., Behjati, S., Biankin, A.V., Bignell, G.R., Bolli, N., Borg, A., Børresen-Dale, A.-L., et al. (2013). Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* *500*, 415–421.
- Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 3983–3988.
- Ali, H.R., Provenzano, E., Dawson, S.-J., Blows, F.M., Liu, B., Shah, M., Earl, H.M., Poole, C.J., Hiller, L., Dunn, J.A., et al. (2014). Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12,439 patients. *Ann. Oncol.* *25*, 1536–1543.
- Allen, D.L., Cleary, A.S., Speaker, K.J., Lindsay, S.F., Uyenishi, J., Reed, J.M., Madden, M.C., and Mehan, R.S. (2008). Myostatin, activin receptor IIb, and follistatin-like-3 gene expression are altered in adipose tissue and skeletal muscle of obese mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *294*, E918–927.
- Alvarez, R., de Andrés, J., Yubero, P., Viñas, O., Mampel, T., Iglesias, R., Giralt, M., and Villarroya, F. (1995). A novel regulatory pathway of brown fat thermogenesis. Retinoic acid is a transcriptional activator of the mitochondrial uncoupling protein gene. *J. Biol. Chem.* *270*, 5666–5673.
- Andersson, O., Korach-Andre, M., Reissmann, E., Ibáñez, C.F., and Bertolino, P. (2008). Growth/differentiation factor 3 signals through ALK7 and regulates accumulation of adipose tissue and diet-induced obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 7252–7256.

André, P., Groettrup, M., Klenerman, P., de Giuli, R., Booth, B.L., Cerundolo, V., Bonneville, M., Jotereau, F., Zinkernagel, R.M., and Lotteau, V. (1998). An inhibitor of HIV-1 protease modulates proteasome activity, antigen presentation, and T cell responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *95*, 13120–13124.

Anthonsen, M.W., Rönstrand, L., Wernstedt, C., Degerman, E., and Holm, C. (1998). Identification of novel phosphorylation sites in hormone-sensitive lipase that are phosphorylated in response to isoproterenol and govern activation properties in vitro. *J. Biol. Chem.* *273*, 215–221.

Aquila, H., Link, T.A., and Klingenberg, M. (1985). The uncoupling protein from brown fat mitochondria is related to the mitochondrial ADP/ATP carrier. Analysis of sequence homologies and of folding of the protein in the membrane. *EMBO J.* *4*, 2369–2376.

Arany, Z. (2008). PGC-1 coactivators and skeletal muscle adaptations in health and disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *18*, 426–434.

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

Arner, P. (2005). Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* *19*, 471–482.

Ashe, H.L. (2005). BMP signalling: synergy and feedback create a step gradient. *Curr. Biol.* *15*, R375–377.

Baguley, B.C., and McKeage, M.J. (2010). ASA404: a tumor vascular-disrupting agent with broad potential for cancer therapy. *Future Oncol* *6*, 1537–1543.

Baker, M. (2011). Animal models: inside the minds of mice and men. *Nature* *475*, 123–128.

Baldo, A., Sniderman, A.D., St-Luce, S., Avramoglu, R.K., Maslowska, M., Hoang, B., Monge, J.C., Bell, A., Mulay, S., and Cianflone, K. (1993). The adipsin-acylation stimulating protein system and regulation of intracellular triglyceride synthesis. *J. Clin. Invest.* *92*, 1543–1547.

Bao, Y.L., Tsuchida, K., Liu, B., Kurisaki, A., Matsuzaki, T., and Sugino, H. (2005). Synergistic activity of activin A and basic fibroblast growth factor on tyrosine hydroxylase expression through Smad3 and ERK1/ERK2 MAPK signaling pathways. *J. Endocrinol.* *184*, 493–504.

Barak, Y., Nelson, M.C., Ong, E.S., Jones, Y.Z., Ruiz-Lozano, P., Chien, K.R., Koder, A., and Evans, R.M. (1999). PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol. Cell* *4*, 585–595.

Barbera, M.J., Schluter, A., Pedraza, N., Iglesias, R., Villarroya, F., and Giralt, M. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activates transcription of the brown fat uncoupling protein-1 gene. A link between regulation of the thermogenic and lipid oxidation pathways in the brown fat cell. *J. Biol. Chem.* *276*, 1486–1493.

Barker, D.J.P. (2004). Developmental origins of adult health and disease. *J Epidemiol Community Health* *58*, 114–115.

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

Bartholin, L., Maguer-Satta, V., Hayette, S., Martel, S., Gadoux, M., Corbo, L., Magaud, J.-P., and Rimokh, R. (2002). Transcription activation of FLRG and follistatin by activin A, through Smad proteins, participates in a negative feedback loop to modulate activin A function. *Oncogene* *21*, 2227–2235.

Bastard, J.P., Caron, M., Vidal, H., Jan, V., Auclair, M., Vigouroux, C., Luboinski, J., Laville, M., Maachi, M., Girard, P.M., et al. (2002). Association between altered expression of adipogenic factor SREBP1 in lipotrophic adipose tissue from HIV-1-infected patients and abnormal adipocyte differentiation and insulin resistance. *Lancet* *359*, 1026–1031.

Beaber, E.F., Buist, D.S.M., Barlow, W.E., Malone, K.E., Reed, S.D., and Li, C.I. (2014). Recent oral contraceptive use by formulation and breast cancer risk among women 20 to 49 years of age. *Cancer Res.* *74*, 4078–4089.

Beatty, G.L., and Gladney, W.L. (2015). Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy. *Clin. Cancer Res.* *21*, 687–692.

Becker, M., Siems, W.-E., Kluge, R., Gembardt, F., Schultheiss, H.-P., Schirner, M., and Walther, T. (2010). New function for an old enzyme: NEP deficient mice develop late-onset obesity. *PLoS ONE* *5*.

Bellemare, V., Laberge, P., Noël, S., Tchernof, A., and Luu-The, V. (2009). Differential estrogenic 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity and type 12 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase expression levels in preadipocytes and differentiated adipocytes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *114*, 129–134.

Beltonski, J., and Jamroz, A. (2004). Adrenomedullin--what do we know 10 years since its discovery? *Pol J Pharmacol* *56*, 5–27.

Bemis, L.T., and Schedin, P. (2000). Reproductive state of rat mammary gland stroma modulates human breast cancer cell migration and invasion. *Cancer Res.* *60*, 3414–3418.

Ben-Romano, R., Rudich, A., Etzion, S., Potashnik, R., Kagan, E., Greenbaum, U., and Bashan, N. (2006). Nelfinavir induces adipocyte insulin resistance through the induction of oxidative stress: differential protective effect of antioxidant agents. *Antivir. Ther. (Lond.)* *11*, 1051–1060.

Berardinelli, W. (1954). An undiagnosed endocrinometabolic syndrome: report of 2 cases. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *14*, 193–204.

Bergeron, S., Dubois, M.-J., Bellmann, K., Schwab, M., Larochelle, N., Nalbantoglu, J., and Marette, A. (2011). Inhibition of the protein tyrosine phosphatase SHP-1 increases glucose uptake in skeletal muscle cells by augmenting insulin receptor signaling and GLUT4 expression. *Endocrinology* *152*, 4581–4588.

Bernhardt, M., Galach, M., Novak, D., and Utikal, J. (2012). Mediators of induced pluripotency and their role in cancer cells - current scientific knowledge and future perspectives. *Biotechnol J* *7*, 810–821.

Berry, R., and Rodeheffer, M.S. (2013). Characterization of the adipocyte cellular lineage in vivo. *Nat. Cell Biol.* *15*, 302–308.

Betz, M.J., and Enerbäck, S. (2015). Human Brown Adipose Tissue: What We Have Learned So Far. *Diabetes* *64*, 2352–2360.

Bianco, A.C., and Silva, J.E. (1988). Cold exposure rapidly induces virtual saturation of brown adipose tissue nuclear T3 receptors. *Am. J. Physiol.* *255*, E496-503.

Billon, N., and Dani, C. (2012). Developmental origins of the adipocyte lineage: new insights from genetics and genomics studies. *Stem Cell Rev* *8*, 55–66.

Billon, N., Iannarelli, P., Monteiro, M.C., Glavieux-Pardanaud, C., Richardson, W.D., Kessar, N., Dani, C., and Dupin, E. (2007). The generation of adipocytes by the neural crest. *Development* *134*, 2283–2292.

Birkenmeier, E.H., Gwynn, B., Howard, S., Jerry, J., Gordon, J.I., Landschulz, W.H., and McKnight, S.L. (1989). Tissue-specific expression, developmental regulation, and genetic mapping of the gene encoding CCAAT/enhancer binding protein. *Genes Dev.* *3*, 1146–1156.

Birsoy, K., Berry, R., Wang, T., Ceyhan, O., Tavazoie, S., Friedman, J.M., and Rodeheffer, M.S. (2011). Analysis of gene networks in white adipose tissue development reveals a role for ETS2 in adipogenesis. *Development* *138*, 4709–4719.

Bjørbaek, C., and Kahn, B.B. (2004). Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog. Horm. Res.* *59*, 305–331.

Björntorp, P., and Sjöström, L. (1978). Carbohydrate storage in man: speculations and some quantitative considerations. *Metab. Clin. Exp.* *27*, 1853–1865.

Björntorp, P., Carlgren, G., Isaksson, B., Krotkiewski, M., Larsson, B., and Sjöström, L. (1975). Effect of an energy-reduced dietary regimen in relation to adipose tissue cellularity in obese women. *Am. J. Clin. Nutr.* *28*, 445–452.

- Boccaccio, C., and Comoglio, P.M. (2006). Invasive growth: a MET-driven genetic programme for cancer and stem cells. *Nat. Rev. Cancer* 6, 637–645.
- Bochet, L., Lehuédé, C., Dauvillier, S., Wang, Y.Y., Dirat, B., Laurent, V., Dray, C., Guet, R., Maridonneau-Parini, I., Le Gonidec, S., et al. (2013). Adipocyte-derived fibroblasts promote tumor progression and contribute to the desmoplastic reaction in breast cancer. *Cancer Res.* 73, 5657–5668.
- Boden, G. (1997). Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* 46, 3–10.
- Bokarewa, M., Nagaev, I., Dahlberg, L., Smith, U., and Tarkowski, A. (2005). Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. *J. Immunol.* 174, 5789–5795.
- Bordicchia, M., Liu, D., Amri, E.-Z., Ailhaud, G., Dessi-Fulgheri, P., Zhang, C., Takahashi, N., Sarzani, R., and Collins, S. (2012). Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. *J. Clin. Invest.* 122, 1022–1036.
- Børghlum, J.D., Pedersen, S.B., Ailhaud, G., Négrel, R., and Richelsen, B. (1999). Differential expression of prostaglandin receptor mRNAs during adipose cell differentiation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 57, 305–317.
- Borsig, L., Wolf, M.J., Roblek, M., Lorentzen, A., and Heikenwalder, M. (2014). Inflammatory chemokines and metastasis--tracing the accessory. *Oncogene* 33, 3217–3224.
- Boström, P., Wu, J., Jedrychowski, M.P., Korde, A., Ye, L., Lo, J.C., Rasbach, K.A., Boström, E.A., Choi, J.H., Long, J.Z., et al. (2012). A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* 481, 463–468.
- Botolin, S., and McCabe, L.R. (2007). Bone loss and increased bone adiposity in spontaneous and pharmacologically induced diabetic mice. *Endocrinology* 148, 198–205.
- Bougaret, L., Delort, L., Billard, H., Lequeux, C., Goncalves-Mendes, N., Mojallal, A., Damour, O., Vasson, M.-P., and Caldefie-Chezet, F. (2017). Supernatants of Adipocytes From Obese Versus Normal Weight Women and Breast Cancer Cells: In Vitro Impact on Angiogenesis. *J. Cell. Physiol.* 232, 1808–1816.
- Bougaret, L., Delort, L., Billard, H., Le Huede, C., Boby, C., De la Foye, A., Rossary, A., Mojallal, A., Damour, O., Auxenfans, C., et al. (2018). Adipocyte/breast cancer cell crosstalk in obesity interferes with the anti-proliferative efficacy of tamoxifen. *PLoS ONE* 13, e0191571.
- Bouloumié, A., Lafontan, M., and Langin, D. (2006). Les cellules de la fraction stroma-vasculaire du tissu adipeux humain: caractérisation et rôles. *Obes* 1, 79–86.
- Bowers, R.R., Kim, J.W., Otto, T.C., and Lane, M.D. (2006). Stable stem cell commitment to the adipocyte lineage by inhibition of DNA methylation: role of the BMP-4 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 13022–13027.
- Bozzette, S.A., Ake, C.F., Tam, H.K., Chang, S.W., and Louis, T.A. (2003). Cardiovascular and cerebrovascular events in patients treated for human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med.* 348, 702–710.
- Bragdon, B., Moseychuk, O., Saldanha, S., King, D., Julian, J., and Nohe, A. (2011). Bone morphogenetic proteins: a critical review. *Cell. Signal.* 23, 609–620.
- Brasaemle, D.L., Barber, T., Wolins, N.E., Serrero, G., Blanchette-Mackie, E.J., and Londos, C. (1997). Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. *J. Lipid Res.* 38, 2249–2263.
- Brasaemle, D.L., Dolios, G., Shapiro, L., and Wang, R. (2004). Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 279, 46835–46842.
- Braun, T., and Gautel, M. (2011). Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 349–361.
- Brower, E.T., Bacha, U.M., Kawasaki, Y., and Freire, E. (2008). Inhibition of HIV-2 protease by HIV-1 protease inhibitors in clinical use. *Chem Biol Drug Des* 71, 298–305.

Bucala, R., Makita, Z., Vega, G., Grundy, S., Koschinsky, T., Cerami, A., and Vlassara, H. (1994). Modification of low density lipoprotein by advanced glycation end products contributes to the dyslipidemia of diabetes and renal insufficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *91*, 9441–9445.

Bunton, D.C., Petrie, M.C., Hillier, C., Johnston, F., and McMurray, J.J.V. (2004). The clinical relevance of adrenomedullin: a promising profile? *Pharmacol. Ther.* *103*, 179–201.

Burýsek, L., and Houstek, J. (1997). beta-Adrenergic stimulation of interleukin-1alpha and interleukin-6 expression in mouse brown adipocytes. *FEBS Lett.* *411*, 83–86.

Cai, L., Johnstone, B.H., Cook, T.G., Liang, Z., Traktuev, D., Cornetta, K., Ingram, D.A., Rosen, E.D., and March, K.L. (2007). Suppression of hepatocyte growth factor production impairs the ability of adipose-derived stem cells to promote ischemic tissue revascularization. *Stem Cells* *25*, 3234–3243.

Cailleau, R., Young, R., Olivé, M., and Reeves, W.J. (1974). Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J. Natl. Cancer Inst.* *53*, 661–674.

Cailleau, R., Olivé, M., and Cruciger, Q.V. (1978). Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro* *14*, 911–915.

Calle, E.E., and Kaaks, R. (2004). Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat. Rev. Cancer* *4*, 579–591.

Calle, E.E., Rodriguez, C., Walker-Thurmond, K., and Thun, M.J. (2003). Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N. Engl. J. Med.* *348*, 1625–1638.

Callihan, E.B., Gao, D., Jindal, S., Lyons, T.R., Manthey, E., Edgerton, S., Urquhart, A., Schedin, P., and Borges, V.F. (2013). Postpartum diagnosis demonstrates a high risk for metastasis and merits an expanded definition of pregnancy-associated breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* *138*, 549–559.

Canello, R., Henegar, C., Viguerie, N., Taleb, S., Poitou, C., Rouault, C., Coupaye, M., Pelloux, V., Hugol, D., Bouillot, J.-L., et al. (2005). Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes* *54*, 2277–2286.

Cannon, B., and Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.* *84*, 277–359.

Cao, W., Medvedev, A.V., Daniel, K.W., and Collins, S. (2001). beta-Adrenergic activation of p38 MAP kinase in adipocytes: cAMP induction of the uncoupling protein 1 (UCP1) gene requires p38 MAP kinase. *J. Biol. Chem.* *276*, 27077–27082.

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

Cao, Z., Umek, R.M., and McKnight, S.L. (1991). Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev.* *5*, 1538–1552.

Capel, E., Auclair, M., Caron-Debarle, M., and Capeau, J. (2012). Effects of ritonavir-boosted darunavir, atazanavir and lopinavir on adipose functions and insulin sensitivity in murine and human adipocytes. *Antivir. Ther. (Lond.)* *17*, 549–556.

Carey, G.B. (1998). Mechanisms regulating adipocyte lipolysis. *Adv. Exp. Med. Biol.* *441*, 157–170.

Carey, A.L., Steinberg, G.R., Macaulay, S.L., Thomas, W.G., Holmes, A.G., Ramm, G., Prelovsek, O., Hohnen-Behrens, C., Watt, M.J., James, D.E., et al. (2006). Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase. *Diabetes* *55*, 2688–2697.

Caron, M., Auclair, M., Vigouroux, C., Glorian, M., Forest, C., and Capeau, J. (2001). The HIV protease inhibitor indinavir impairs sterol regulatory element-binding protein-1 intranuclear localization, inhibits preadipocyte differentiation, and induces insulin resistance. *Diabetes* *50*, 1378–1388.

Caron, M., Auclair, M., Sterlingot, H., Kornprobst, M., and Capeau, J. (2003). Some HIV protease inhibitors alter lamin A/C maturation and stability, SREBP-1 nuclear localization and adipocyte differentiation. *AIDS* 17, 2437–2444.

Caron, M., Auclair, M., Donadille, B., Béréziat, V., Guerci, B., Laville, M., Narbonne, H., Bodemer, C., Lascols, O., Capeau, J., et al. (2007). Human lipodystrophies linked to mutations in A-type lamins and to HIV protease inhibitor therapy are both associated with prelamin A accumulation, oxidative stress and premature cellular senescence. *Cell Death Differ.* 14, 1759–1767.

Caron, M., Auclair, M., Vissian, A., Vigouroux, C., and Capeau, J. (2008). Contribution of mitochondrial dysfunction and oxidative stress to cellular premature senescence induced by antiretroviral thymidine analogues. *Antivir. Ther. (Lond.)* 13, 27–38.

Caron-Debarle, M., Lagathu, C., Boccara, F., Vigouroux, C., and Capeau, J. (2010). HIV-associated lipodystrophy: from fat injury to premature aging. *Trends Mol Med* 16, 218–229.

Carr, A., and Cooper, D.A. (2000). Adverse effects of antiretroviral therapy. *Lancet* 356, 1423–1430.

Carr, A., Samaras, K., Burton, S., Law, M., Freund, J., Chisholm, D.J., and Cooper, D.A. (1998). A syndrome of peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia and insulin resistance in patients receiving HIV protease inhibitors. *AIDS* 12, F51-58.

Cartwright, M.J., Tchkonina, T., and Kirkland, J.L. (2007). Aging in adipocytes: potential impact of inherent, depot-specific mechanisms. *Exp. Gerontol.* 42, 463–471.

Casbon, A.-J., Reynaud, D., Park, C., Khuc, E., Gan, D.D., Schepers, K., Passequé, E., and Werb, Z. (2015). Invasive breast cancer reprograms early myeloid differentiation in the bone marrow to generate immunosuppressive neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, E566-575.

Cases, S., Smith, S.J., Zheng, Y.W., Myers, H.M., Lear, S.R., Sande, E., Novak, S., Collins, C., Welch, C.B., Lusis, A.J., et al. (1998). Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 13018–13023.

Cases, S., Stone, S.J., Zhou, P., Yen, E., Tow, B., Lardizabal, K.D., Voelker, T., and Farese, R.V. (2001). Cloning of DGAT2, a second mammalian diacylglycerol acyltransferase, and related family members. *J. Biol. Chem.* 276, 38870–38876.

Caso, G., McNurlan, M.A., Mileva, I., Zemlyak, A., Mynarcik, D.C., and Gelato, M.C. (2013). Peripheral fat loss and decline in adipogenesis in older humans. *Metab. Clin. Exp.* 62, 337–340.

Cassard-Doulier, A.M., Gelly, C., Bouillaud, F., and Ricquier, D. (1998). A 211-bp enhancer of the rat uncoupling protein-1 (UCP-1) gene controls specific and regulated expression in brown adipose tissue. *Biochem. J.* 333 (Pt 2), 243–246.

Castan, I., Valet, P., Larrouy, D., Voisin, T., Remaury, A., Daviaud, D., Laburthe, M., and Lafontan, M. (1993). Distribution of PYY receptors in human fat cells: an antilipolytic system alongside the alpha 2-adrenergic system. *Am. J. Physiol.* 265, E74-80.

Cawthorn, W.P., Scheller, E.L., and MacDougald, O.A. (2012). Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: going back to the future. *J. Lipid Res.* 53, 227–246.

Cawthorn, W.P., Scheller, E.L., Learman, B.S., Parlee, S.D., Simon, B.R., Mori, H., Ning, X., Bree, A.J., Schell, B., Broome, D.T., et al. (2014). Bone marrow adipose tissue is an endocrine organ that contributes to increased circulating adiponectin during caloric restriction. *Cell Metab.* 20, 368–375.

Cawthorne, M.A., Sennitt, M.V., Arch, J.R., and Smith, S.A. (1992). BRL 35135, a potent and selective atypical beta-adrenoceptor agonist. *Am. J. Clin. Nutr.* 55, 252S-257S.

Ceddia, R.B. (2005). Direct metabolic regulation in skeletal muscle and fat tissue by leptin: implications for glucose and fatty acids homeostasis. *Int J Obes (Lond)* 29, 1175–1183.

Chakraborty, D., Bhattacharya, A., and Mittal, B.R. (2015). Patterns of brown fat uptake of 18F-fluorodeoxyglucose in positron emission tomography/computed tomography scan. *Indian J Nucl Med* 30, 320–322.

Chaldakov, G.N., Stankulov, I.S., Hristova, M., and Ghenev, P.I. (2003). Adipobiology of disease: adipokines and adipokine-targeted pharmacology. *Curr. Pharm. Des.* *9*, 1023–1031.

Chapellier, M., Bachelard-Cascales, E., Schmidt, X., Clément, F., Treilleux, I., Delay, E., Jammot, A., Ménétrier-Caux, C., Pochon, G., Besançon, R., et al. (2015). Disequilibrium of BMP2 levels in the breast stem cell niche launches epithelial transformation by overamplifying BMPR1B cell response. *Stem Cell Reports* *4*, 239–254.

Charafe-Jauffret, E., Ginestier, C., Iovino, F., Tarpin, C., Diebel, M., Esterni, B., Houvenaeghel, G., Extra, J.-M., Bertucci, F., Jacquemier, J., et al. (2010). Aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer. *Clin. Cancer Res.* *16*, 45–55.

Chartoumpakis, D.V., Habeos, I.G., Ziros, P.G., Psyrogiannis, A.I., Kyriazopoulou, V.E., and Papavassiliou, A.G. (2011). Brown adipose tissue responds to cold and adrenergic stimulation by induction of FGF21. *Mol. Med.* *17*, 736–740.

Chase, H.B., Montagna, W., and Malone, J.D. (1953). Changes in the skin in relation to the hair growth cycle. *Anat. Rec.* *116*, 75–81.

Chatzipanteli, K., Rudolph, S., and Axelrod, L. (1992). Coordinate control of lipolysis by prostaglandin E2 and prostacyclin in rat adipose tissue. *Diabetes* *41*, 927–935.

Chen, Y.-X., and Li, C.-S. (2013a). Prognostic value of adrenomedullin in septic patients in the ED. *Am J Emerg Med* *31*, 1017–1021.

Chen, Y.-X., and Li, C.-S. (2013b). The predictive value of adrenomedullin for development of severe sepsis and septic shock in emergency department. *Biomed Res Int* *2013*, 960101.

Chen, D., Misra, A., and Garg, A. (2002). Clinical review 153: Lipodystrophy in human immunodeficiency virus-infected patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *87*, 4845–4856.

Chen, D., Zhao, M., and Mundy, G.R. (2004). Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* *22*, 233–241.

Chen, L., Song, J., Cui, J., Hou, J., Zheng, X., Li, C., and Liu, L. (2013a). microRNAs regulate adipocyte differentiation. *Cell Biol. Int.* *37*, 533–546.

Chen, P., Pang, X., Zhang, Y., and He, Y. (2012). Effect of inhibition of the adrenomedullin gene on the growth and chemosensitivity of ovarian cancer cells. *Oncol. Rep.* *27*, 1461–1466.

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

Chinetti, G., Fruchart, J.C., and Staels, B. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm. Res.* *49*, 497–505.

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

Christ, G., Seiffert, D., Hufnagl, P., Gessl, A., Wojta, J., and Binder, B.R. (1993). Type 1 plasminogen activator inhibitor synthesis of endothelial cells is downregulated by smooth muscle cells. *Blood* *81*, 1277–1283.

Christy, R.J., Yang, V.W., Ntambi, J.M., Geiman, D.E., Landschulz, W.H., Friedman, A.D., Nakabeppu, Y., Kelly, T.J., and Lane, M.D. (1989). Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes: CCAAT/enhancer binding protein interacts with and activates the promoters of two adipocyte-specific genes. *Genes Dev.* *3*, 1323–1335.

Cianflone, K., Lu, H., Smith, J., Yu, W., and Wang, H. (2005). Adiponectin, acylation stimulating protein and complement C3 are altered in obesity in very young children. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* *62*, 567–572.

Cinti, S. (2009). Transdifferentiation properties of adipocytes in the adipose organ. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *297*, E977-986.

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

- Clifford, G.M., Londos, C., Kraemer, F.B., Vernon, R.G., and Yeaman, S.J. (2000). Translocation of hormone-sensitive lipase and perilipin upon lipolytic stimulation of rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* *275*, 5011–5015.
- Coe, N.R., Simpson, M.A., and Bernlohr, D.A. (1999). Targeted disruption of the adipocyte lipid-binding protein (aP2 protein) gene impairs fat cell lipolysis and increases cellular fatty acid levels. *J. Lipid Res.* *40*, 967–972.
- Cohen, P., and Spiegelman, B.M. (2015). Brown and Beige Fat: Molecular Parts of a Thermogenic Machine. *Diabetes* *64*, 2346–2351.
- Cohen, A.W., Razani, B., Schubert, W., Williams, T.M., Wang, X.B., Iyengar, P., Brasaemle, D.L., Scherer, P.E., and Lisanti, M.P. (2004). Role of caveolin-1 in the modulation of lipolysis and lipid droplet formation. *Diabetes* *53*, 1261–1270.
- Cohen, P., Levy, J.D., Zhang, Y., Frontini, A., Kolodin, D.P., Svensson, K.J., Lo, J.C., Zeng, X., Ye, L., Khandekar, M.J., et al. (2014). Ablation of PRDM16 and beige adipose causes metabolic dysfunction and a subcutaneous to visceral fat switch. *Cell* *156*, 304–316.
- Cohen, T., Nahari, D., Cerem, L.W., Neufeld, G., and Levi, B.Z. (1996). Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* *271*, 736–741.
- Coleman, R.E. (2001). Metastatic bone disease and the role of biochemical markers of bone metabolism in benign and malignant diseases. *Cancer Treat. Rev.* *27*, 133–135.
- Collins, A.T., Berry, P.A., Hyde, C., Stower, M.J., and Maitland, N.J. (2005). Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res.* *65*, 10946–10951.
- Colucci, W.S., Elkayam, U., Horton, D.P., Abraham, W.T., Bourge, R.C., Johnson, A.D., Wagoner, L.E., Givertz, M.M., Liang, C.S., Neibaur, M., et al. (2000). Intravenous nesiritide, a natriuretic peptide, in the treatment of decompensated congestive heart failure. Nesiritide Study Group. *N. Engl. J. Med.* *343*, 246–253.
- Considine, R.V., Sinha, M.K., Heiman, M.L., Kriauciunas, A., Stephens, T.W., Nyce, M.R., Ohannesian, J.P., Marco, C.C., McKee, L.J., and Bauer, T.L. (1996). Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N. Engl. J. Med.* *334*, 292–295.
- Contardi, E., Palmisano, G.L., Tazzari, P.L., Martelli, A.M., Falà, F., Fabbi, M., Kato, T., Lucarelli, E., Donati, D., Polito, L., et al. (2005). CTLA-4 is constitutively expressed on tumor cells and can trigger apoptosis upon ligand interaction. *Int. J. Cancer* *117*, 538–550.
- Cornelius, P., MacDougald, O.A., and Lane, M.D. (1994). Regulation of adipocyte development. *Annu. Rev. Nutr.* *14*, 99–129.
- Coskun, T., Bina, H.A., Schneider, M.A., Dunbar, J.D., Hu, C.C., Chen, Y., Moller, D.E., and Kharitonov, A. (2008). Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. *Endocrinology* *149*, 6018–6027.
- Cotterchio, M., Mirea, L., Ozcelik, H., and Kreiger, N. (2014). Active cigarette smoking, variants in carcinogen metabolism genes and breast cancer risk among pre- and postmenopausal women in Ontario, Canada. *Breast J* *20*, 468–480.
- Couldrey, C., Moitra, J., Vinson, C., Anver, M., Nagashima, K., and Green, J. (2002). Adipose tissue: a vital in vivo role in mammary gland development but not differentiation. *Dev. Dyn.* *223*, 459–468.
- Cummins, T.D., Holden, C.R., Sansbury, B.E., Gibb, A.A., Shah, J., Zafar, N., Tang, Y., Hellmann, J., Rai, S.N., Spite, M., et al. (2014). Metabolic remodeling of white adipose tissue in obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *307*, E262–277.
- Cunningham, S., Leslie, P., Hopwood, D., Illingworth, P., Jung, R.T., Nicholls, D.G., Peden, N., Rafael, J., and Rial, E. (1985). The characterization and energetic potential of brown adipose tissue in man. *Clin. Sci.* *69*, 343–348.
- Curtis, C., Shah, S.P., Chin, S.-F., Turashvili, G., Rueda, O.M., Dunning, M.J., Speed, D., Lynch, A.G., Samarajiwa, S., Yuan, Y., et al. (2012). The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* *486*, 346–352.

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

Cypess, A.M., White, A.P., Vernochet, C., Schulz, T.J., Xue, R., Sass, C.A., Huang, T.L., Roberts-Toler, C., Weiner, L.S., Sze, C., et al. (2013). Anatomical localization, gene expression profiling and functional characterization of adult human neck brown fat. *Nat. Med.* *19*, 635–639.

Dackor, R., Fritz-Six, K., Smithies, O., and Caron, K. (2007). Receptor activity-modifying proteins 2 and 3 have distinct physiological functions from embryogenesis to old age. *J. Biol. Chem.* *282*, 18094–18099.

Dackor, R.T., Fritz-Six, K., Dunworth, W.P., Gibbons, C.L., Smithies, O., and Caron, K.M. (2006). Hydrops fetalis, cardiovascular defects, and embryonic lethality in mice lacking the calcitonin receptor-like receptor gene. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 2511–2518.

Dadke, S.S., Li, H.C., Kusari, A.B., Begum, N., and Kusari, J. (2000). Elevated expression and activity of protein-tyrosine phosphatase 1B in skeletal muscle of insulin-resistant type II diabetic Goto-Kakizaki rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *274*, 583–589.

Dai, X., Li, T., Bai, Z., Yang, Y., Liu, X., Zhan, J., and Shi, B. (2015). Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am J Cancer Res* *5*, 2929–2943.

Dalglish, A.G., Beverley, P.C., Clapham, P.R., Crawford, D.H., Greaves, M.F., and Weiss, R.A. (1984). The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* *312*, 763–767.

Dani, C., Smith, A.G., Dessolin, S., Leroy, P., Staccini, L., Villageois, P., Darimont, C., and Ailhaud, G. (1997). Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro. *J. Cell. Sci.* *110 (Pt 11)*, 1279–1285.

Davies, M.J., Woolf, N., Rowles, P.M., and Pepper, J. (1988). Morphology of the endothelium over atherosclerotic plaques in human coronary arteries. *Br Heart J* *60*, 459–464.

DeBerardinis, R.J., Mancuso, A., Daikhin, E., Nissim, I., Yudkoff, M., Wehrli, S., and Thompson, C.B. (2007). Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 19345–19350.

DeFilippis, R.A., Chang, H., Dumont, N., Rabban, J.T., Chen, Y.-Y., Fontenay, G.V., Berman, H.K., Gauthier, M.L., Zhao, J., Hu, D., et al. (2012). CD36 repression activates a multicellular stromal program shared by high mammographic density and tumor tissues. *Cancer Discov* *2*, 826–839.

Dempersmier, J., Sambeat, A., Gulyaeva, O., Paul, S.M., Hudak, C.S.S., Raposo, H.F., Kwan, H.-Y., Kang, C., Wong, R.H.F., and Sul, H.S. (2015). Cold-inducible Zfp516 activates UCP1 transcription to promote browning of white fat and development of brown fat. *Mol. Cell* *57*, 235–246.

Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Di Marzio, P., Marmon, S., Sutton, R.E., Hill, C.M., et al. (1996). Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* *381*, 661–666.

Denkert, C., Loibl, S., Noske, A., Roller, M., Müller, B.M., Komor, M., Budczies, J., Darb-Esfahani, S., Kronenwett, R., Hanusch, C., et al. (2010). Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* *28*, 105–113.

Després, J.P., Moorjani, S., Pouliot, M.C., Tremblay, A., Nadeau, A., Lupien, P.J., and Bouchard, C. (1990). Correlates of plasma very-low-density lipoprotein concentration and composition in premenopausal women. *Metab. Clin. Exp.* *39*, 577–583.

Deveaud, C., Beauvoit, B., Hagry, S., Galinier, A., Carrière, A., Salin, B., Schaeffer, J., Caspar-Bauguil, S., Fernandez, Y., Gordien, J.-B., et al. (2005). Site specific alterations of adipose tissue mitochondria in 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT)-treated rats: an early stage in lipodystrophy? *Biochem. Pharmacol.* *70*, 90–101.

Di Franco, A., Guasti, D., Squecco, R., Mazzanti, B., Rossi, F., Idrizaj, E., Gallego-Escuredo, J.M., Villarroja, F., Bani, D., Forti, G., et al. (2016). Searching for Classical Brown Fat in Humans: Development of a Novel Human Fetal Brown Stem Cell Model. *Stem Cells* *34*, 1679–1691.

- Díez, J.J., and Iglesias, P. (2003). The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur. J. Endocrinol.* *148*, 293–300.
- Dirat, B., Bochet, L., Dabek, M., Daviaud, D., Dauvillier, S., Majed, B., Wang, Y.Y., Meulle, A., Salles, B., Le Gonidec, S., et al. (2011). Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer Res.* *71*, 2455–2465.
- Divi, R.L., Haverkos, K.J., Humsi, J.A., Shockley, M.E., Thamire, C., Nagashima, K., Olivero, O.A., and Poirier, M.C. (2007). Morphological and molecular course of mitochondrial pathology in cultured human cells exposed long-term to Zidovudine. *Environ. Mol. Mutagen.* *48*, 179–189.
- Djedaini, M., Peraldi, P., Drici, M.-D., Darini, C., Saint-Marc, P., Dani, C., and Ladoux, A. (2009). Lopinavir co-induces insulin resistance and ER stress in human adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *386*, 96–100.
- Dong, Z., Peng, Z., Chang, Q., and Lu, F. (2013). The survival condition and immunoregulatory function of adipose stromal vascular fraction (SVF) in the early stage of nonvascularized adipose transplantation. *PLoS ONE* *8*, e80364.
- Dorr, P., Westby, M., Dobbs, S., Griffin, P., Irvine, B., Macartney, M., Mori, J., Rickett, G., Smith-Burchnell, C., Napier, C., et al. (2005). Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* *49*, 4721–4732.
- Draznin, B. (2006). Molecular mechanisms of insulin resistance: serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and increased expression of p85alpha: the two sides of a coin. *Diabetes* *55*, 2392–2397.
- Driskell, R.R., Jahoda, C.A.B., Chuong, C.-M., Watt, F.M., and Horsley, V. (2014). Defining dermal adipose tissue. *Exp. Dermatol.* *23*, 629–631.
- Du, M., Liu, X., Liu, X., Yin, X., Han, S., Song, Q., and An, S. (2015). Glycerol-3-phosphate O-acyltransferase is required for PBAN-induced sex pheromone biosynthesis in *Bombyx mori*. *Sci Rep* *5*, 8110.
- Dubois, V., Delort, L., Billard, H., Vasson, M.-P., and Caldefie-Chezet, F. (2013). Breast cancer and obesity: in vitro interferences between adipokines and proangiogenic features and/or antitumor therapies? *PLoS ONE* *8*, e58541.
- Dulloo, A.G., and Miller, D.S. (1984). Energy balance following sympathetic denervation of brown adipose tissue. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* *62*, 235–240.
- Duong, M.N., Geneste, A., Fallone, F., Li, X., Dumontet, C., and Muller, C. (2017). The fat and the bad: Mature adipocytes, key actors in tumor progression and resistance. *Oncotarget* *8*, 57622–57641.
- Dupuis, J., Caron, A., and Ruël, N. (2005). Biodistribution, plasma kinetics and quantification of single-pass pulmonary clearance of adrenomedullin. *Clin. Sci.* *109*, 97–102.
- Dushay, J., Chui, P.C., Gopalakrishnan, G.S., Varela-Rey, M., Crawley, M., Fisher, F.M., Badman, M.K., Martinez-Chantar, M.L., and Maratos-Flier, E. (2010). Increased fibroblast growth factor 21 in obesity and nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* *139*, 456–463.
- Dvorak, H.F. (2002). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J. Clin. Oncol.* *20*, 4368–4380.
- Egeblad, M., and Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 161–174.
- Ehata, S., Hanyu, A., Fujime, M., Katsuno, Y., Fukunaga, E., Goto, K., Ishikawa, Y., Nomura, K., Yokoo, H., Shimizu, T., et al. (2007). Ki26894, a novel transforming growth factor-beta type I receptor kinase inhibitor, inhibits in vitro invasion and in vivo bone metastasis of a human breast cancer cell line. *Cancer Sci.* *98*, 127–133.
- Elabd, C., Chiellini, C., Massoudi, A., Cochet, O., Zaragosi, L.-E., Trojani, C., Michiels, J.-F., Weiss, P., Carle, G., Rochet, N., et al. (2007). Human adipose tissue-derived multipotent stem cells differentiate in vitro and in vivo into osteocyte-like cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *361*, 342–348.

Ellis, J.M., Li, L.O., Wu, P.-C., Koves, T.R., Ilkayeva, O., Stevens, R.D., Watkins, S.M., Muoio, D.M., and Coleman, R.A. (2010). Adipose acyl-CoA synthetase-1 directs fatty acids toward beta-oxidation and is required for cold thermogenesis. *Cell Metab.* *12*, 53–64.

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

Engeli, S., and Sharma, A.M. (2000). Role of adipose tissue for cardiovascular-renal regulation in health and disease. *Horm. Metab. Res.* *32*, 485–499.

Engeli, S., Negrel, R., and Sharma, A.M. (2000). Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. *Hypertension* *35*, 1270–1277.

Erb, P., Battegay, M., Zimmerli, W., Rickenbach, M., and Egger, M. (2000). Effect of antiretroviral therapy on viral load, CD4 cell count, and progression to acquired immunodeficiency syndrome in a community human immunodeficiency virus-infected cohort. Swiss HIV Cohort Study. *Arch. Intern. Med.* *160*, 1134–1140.

Fain, J.N., and García-Sáinz, J.A. (1983). Adrenergic regulation of adipocyte metabolism. *J. Lipid Res.* *24*, 945–966.

Fain, J.N., Bahouth, S.W., and Madan, A.K. (2004). TNF α release by the nonfat cells of human adipose tissue. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* *28*, 616–622.

Fantin, A., Vieira, J.M., Gestri, G., Denti, L., Schwarz, Q., Prykhodzhiy, S., Peri, F., Wilson, S.W., and Ruhrberg, C. (2010). Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood* *116*, 829–840.

Farmer, S.R. (2006). Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab.* *4*, 263–273.

Farmer, S.R. (2008). Brown fat and skeletal muscle: unlikely cousins? *Cell* *134*, 726–727.

Faust, I.M., Johnson, P.R., Stern, J.S., and Hirsch, J. (1978). Diet-induced adipocyte number increase in adult rats: a new model of obesity. *Am. J. Physiol.* *235*, E279–286.

Fazeli, P.K., Horowitz, M.C., MacDougald, O.A., Scheller, E.L., Rodeheffer, M.S., Rosen, C.J., and Klibanski, A. (2013). Marrow fat and bone—new perspectives. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *98*, 935–945.

Fearon, K., Arends, J., and Baracos, V. (2013). Understanding the mechanisms and treatment options in cancer cachexia. *Nat Rev Clin Oncol* *10*, 90–99.

Fearon, K.C.H., Glass, D.J., and Guttridge, D.C. (2012). Cancer cachexia: mediators, signaling, and metabolic pathways. *Cell Metab.* *16*, 153–166.

Febbraio, M., Abumrad, N.A., Hajjar, D.P., Sharma, K., Cheng, W., Pearce, S.F., and Silverstein, R.L. (1999). A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. *J. Biol. Chem.* *274*, 19055–19062.

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

Feige, J.N., Lagouge, M., Canto, C., Strehle, A., Houten, S.M., Milne, J.C., Lambert, P.D., Matak, C., Elliott, P.J., and Auwerx, J. (2008). Specific SIRT1 activation mimics low energy levels and protects against diet-induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation. *Cell Metab.* *8*, 347–358.

Feingold, K.R., and Grunfeld, C. (1987). Tumor necrosis factor- α stimulates hepatic lipogenesis in the rat in vivo. *J. Clin. Invest.* *80*, 184–190.

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

- Feng, X.-H., and Derynck, R. (2005). Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *21*, 659–693.
- Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E., and Berger, E.A. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* *272*, 872–877.
- Fernandez, J.A., Mampel, T., Villarroya, F., and Iglesias, R. (1987). Direct assessment of brown adipose tissue as a site of systemic tri-iodothyronine production in the rat. *Biochem. J.* *243*, 281–284.
- Fernandez-Sauze, S., Delfino, C., Mabrouk, K., Dussert, C., Chinot, O., Martin, P.-M., Grisoli, F., Ouafik, L., and Boudouresque, F. (2004). Effects of adrenomedullin on endothelial cells in the multistep process of angiogenesis: involvement of CRLR/RAMP2 and CRLR/RAMP3 receptors. *Int. J. Cancer* *108*, 797–804.
- Festa, E., Fretz, J., Berry, R., Schmidt, B., Rodeheffer, M., Horowitz, M., and Horsley, V. (2011). Adipocyte lineage cells contribute to the skin stem cell niche to drive hair cycling. *Cell* *146*, 761–771.
- Fielding, B.A., and Frayn, K.N. (1998). Lipoprotein lipase and the disposition of dietary fatty acids. *Br. J. Nutr.* *80*, 495–502.
- Fisher, F.M., Kleiner, S., Douris, N., Fox, E.C., Mepani, R.J., Verdeguer, F., Wu, J., Kharitonov, A., Flier, J.S., Maratos-Flier, E., et al. (2012). FGF21 regulates PGC-1 α and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev.* *26*, 271–281.
- Flatmark, T., and Pedersen, J.I. (1975). Brown adipose tissue mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* *416*, 53–103.
- Fontaine, C., Cousin, W., Plaisant, M., Dani, C., and Peraldi, P. (2008). Hedgehog signaling alters adipocyte maturation of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* *26*, 1037–1046.
- Forristal, C.E., Wright, K.L., Hanley, N.A., Oreffo, R.O.C., and Houghton, F.D. (2010). Hypoxia inducible factors regulate pluripotency and proliferation in human embryonic stem cells cultured at reduced oxygen tensions. *Reproduction* *139*, 85–97.
- Foster, D.O., and Frydman, M.L. (1978). Brown adipose tissue: the dominant site of nonshivering thermogenesis in the rat. *Experientia Suppl.* *32*, 147–151.
- Foster, K.W., Frost, A.R., McKie-Bell, P., Lin, C.Y., Engler, J.A., Grizzle, W.E., and Ruppert, J.M. (2000). Increase of GSK3 β messenger RNA and protein expression during progression of breast cancer. *Cancer Res.* *60*, 6488–6495.
- Frayn, K.N., Arner, P., and Yki-Järvinen, H. (2006). Fatty acid metabolism in adipose tissue, muscle and liver in health and disease. *Essays Biochem.* *42*, 89–103.
- Fredrikson, G., Strålfors, P., Nilsson, N.O., and Belfrage, P. (1981). Hormone-sensitive lipase of rat adipose tissue. Purification and some properties. *J. Biol. Chem.* *256*, 6311–6320.
- Freed, E.O. (2015). HIV-1 assembly, release and maturation. *Nat. Rev. Microbiol.* *13*, 484–496.
- Freytag, S.O., Paielli, D.L., and Gilbert, J.D. (1994). Ectopic expression of the CCAAT/enhancer-binding protein alpha promotes the adipogenic program in a variety of mouse fibroblastic cells. *Genes Dev.* *8*, 1654–1663.
- Fried, S.K., Bunkin, D.A., and Greenberg, A.S. (1998). Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *83*, 847–850.
- Fritz-Six, K.L., Dunworth, W.P., Li, M., and Caron, K.M. (2008). Adrenomedullin signaling is necessary for murine lymphatic vascular development. *J. Clin. Invest.* *118*, 40–50.
- Frontini, A., Vitali, A., Perugini, J., Murano, I., Romiti, C., Ricquier, D., Guerrieri, M., and Cinti, S. (2013). White-to-brown transdifferentiation of omental adipocytes in patients affected by pheochromocytoma. *Biochim. Biophys. Acta* *1831*, 950–959.

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

Fujimura, J., Ogawa, R., Mizuno, H., Fukunaga, Y., and Suzuki, H. (2005). Neural differentiation of adipose-derived stem cells isolated from GFP transgenic mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *333*, 116–121.

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

Gabrilovich, D.I., and Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 162–174.

Galitzky, J., Sengenès, C., Thalamas, C., Marques, M.A., Senard, J.M., Lafontan, M., and Berlan, M. (2001). The lipid-mobilizing effect of atrial natriuretic peptide is unrelated to sympathetic nervous system activation or obesity in young men. *J. Lipid Res.* *42*, 536–544.

Gandotra, S., Le Dour, C., Bottomley, W., Cervera, P., Giral, P., Reznik, Y., Charpentier, G., Auclair, M., Delépine, M., Barroso, I., et al. (2011). Perilipin deficiency and autosomal dominant partial lipodystrophy. *N. Engl. J. Med.* *364*, 740–748.

Gaou, I., Malliti, M., Guimont, M.C., Lettéron, P., Demeilliers, C., Peytavin, G., Degott, C., Pessayre, D., and Fromenty, B. (2001). Effect of stavudine on mitochondrial genome and fatty acid oxidation in lean and obese mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *297*, 516–523.

Garayoa, M., Martínez, A., Lee, S., Pío, R., An, W.G., Neckers, L., Trepel, J., Montuenga, L.M., Ryan, H., Johnson, R., et al. (2000). Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) up-regulates adrenomedullin expression in human tumor cell lines during oxygen deprivation: a possible promotion mechanism of carcinogenesis. *Mol. Endocrinol.* *14*, 848–862.

Garcia de Herreros, A., and Birnbaum, M.J. (1989). The acquisition of increased insulin-responsive hexose transport in 3T3-L1 adipocytes correlates with expression of a novel transporter gene. *J. Biol. Chem.* *264*, 19994–19999.

Garg, A. (2000). Gender differences in the prevalence of metabolic complications in familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *85*, 1776–1782.

Garg, A., and Agarwal, A.K. (2008). Caveolin-1: a new locus for human lipodystrophy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *93*, 1183–1185.

Garg, A., Peshock, R.M., and Fleckenstein, J.L. (1999). Adipose tissue distribution pattern in patients with familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *84*, 170–174.

Garlid, K.D., Jabůrek, M., and Jezek, P. (1998). The mechanism of proton transport mediated by mitochondrial uncoupling proteins. *FEBS Lett.* *438*, 10–14.

GBD 2015 Obesity Collaborators, Afshin, A., Forouzanfar, M.H., Reitsma, M.B., Sur, P., Estep, K., Lee, A., Marczak, L., Mokdad, A.H., Moradi-Lakeh, M., et al. (2017). Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. *N. Engl. J. Med.* *377*, 13–27.

George, S., Rochford, J.J., Wolfrum, C., Gray, S.L., Schinner, S., Wilson, J.C., Soos, M.A., Murgatroyd, P.R., Williams, R.M., Acerini, C.L., et al. (2004). A family with severe insulin resistance and diabetes due to a mutation in AKT2. *Science* *304*, 1325–1328.

Gereben, B., Zavacki, A.M., Ribich, S., Kim, B.W., Huang, S.A., Simonides, W.S., Zeöld, A., and Bianco, A.C. (2008). Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. *Endocr. Rev.* *29*, 898–938.

Gerin, I., Bommer, G.T., McCoin, C.S., Sousa, K.M., Krishnan, V., and MacDougald, O.A. (2010). Roles for miRNA-378/378* in adipocyte gene expression and lipogenesis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *299*, E198–206.

Gesta, S., Tseng, Y.-H., and Kahn, C.R. (2007). Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* *131*, 242–256.

Ghebeh, H., Barhoush, E., Tulbah, A., Elkum, N., Al-Tweigeri, T., and Dermime, S. (2008). FOXP3+ Tregs and B7-H1+/PD-1+ T lymphocytes co-infiltrate the tumor tissues of high-risk breast cancer patients: Implication for immunotherapy. *BMC Cancer* 8, 57.

Gibbons, C., Dackor, R., Dunworth, W., Fritz-Six, K., and Caron, K.M. (2007). Receptor activity-modifying proteins: RAMPing up adrenomedullin signaling. *Mol. Endocrinol.* 21, 783–796.

Gibellini, L., De Biasi, S., Nasi, M., Carnevale, G., Pisciotta, A., Bianchini, E., Bartolomeo, R., Polo, M., De Pol, A., Pinti, M., et al. (2015). Different origin of adipogenic stem cells influences the response to antiretroviral drugs. *Exp. Cell Res.* 337, 160–169.

Giguère, V. (2008). Transcriptional control of energy homeostasis by the estrogen-related receptors. *Endocr. Rev.* 29, 677–696.

Ginestier, C., Hur, M.H., Charafe-Jauffret, E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., Jacquemier, J., Viens, P., Kleer, C.G., Liu, S., et al. (2007). ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* 1, 555–567.

Giordano, A., Frontini, A., and Cinti, S. (2016). Convertible visceral fat as a therapeutic target to curb obesity. *Nat Rev Drug Discov* 15, 405–424.

Giralt, M., Domingo, P., Guallar, J.P., Rodriguez de la Concepción, M.L., Alegre, M., Domingo, J.C., and Villarroya, F. (2006). HIV-1 infection alters gene expression in adipose tissue, which contributes to HIV-1/HAART-associated lipodystrophy. *Antivir. Ther. (Lond.)* 11, 729–740.

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

Giudicelli, H., Combes-Pastré, N., and Boyer, J. (1974). Lipolytic activity of adipose tissue. IV. The diacylglycerol lipase activity of human adipose tissue. *Biochim. Biophys. Acta* 369, 25–33.

Glass, C.K., and Olefsky, J.M. (2012). Inflammation and lipid signaling in the etiology of insulin resistance. *Cell Metab.* 15, 635–645.

Glass, C.K., and Witztum, J.L. (2001). Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* 104, 503–516.

Goldberg, I.J. (1996). Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J. Lipid Res.* 37, 693–707.

Gómez Rosso, L., Meroño, T., Benítez, M.B., López, G., Giunta, G., D'Ambrosio, M.L., Wikinski, R., Cuniberti, L., and Brites, F. (2009). Low adiponectin levels in primary hypertriglyceridemic male patients. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 19, 135–139.

Goossens, G.H., Blaak, E.E., Arner, P., Saris, W.H.M., and van Baak, M.A. (2007). Angiotensin II: a hormone that affects lipid metabolism in adipose tissue. *Int J Obes (Lond)* 31, 382–384.

Goossens, G.H., Bizzarri, A., Venteclef, N., Essers, Y., Cleutjens, J.P., Konings, E., Jocken, J.W.E., Cajlakovic, M., Ribitsch, V., Clément, K., et al. (2011). Increased adipose tissue oxygen tension in obese compared with lean men is accompanied by insulin resistance, impaired adipose tissue capillarization, and inflammation. *Circulation* 124, 67–76.

Goudenege, S., Pisani, D.F., Wdziekonski, B., Di Santo, J.P., Bagnis, C., Dani, C., and Dechesne, C.A. (2009). Enhancement of myogenic and muscle repair capacities of human adipose-derived stem cells with forced expression of MyoD. *Mol. Ther.* 17, 1064–1072.

Grauer, W.O., Moss, A.A., Cann, C.E., and Goldberg, H.I. (1984). Quantification of body fat distribution in the abdomen using computed tomography. *Am. J. Clin. Nutr.* 39, 631–637.

Greenberg, A.S., Egan, J.J., Wek, S.A., Garty, N.B., Blanchette-Mackie, E.J., and Londos, C. (1991). Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. *J. Biol. Chem.* 266, 11341–11346.

Greenberg, A.S., Egan, J.J., Wek, S.A., Moos, M.C., Londos, C., and Kimmel, A.R. (1993). Isolation of cDNAs for perilipins A and B: sequence and expression of lipid droplet-associated proteins of adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *90*, 12035–12039.

Grefhorst, A., van den Beukel, J.C., van Houten, E.L.A., Steenbergen, J., Visser, J.A., and Themmen, A.P. (2015). Estrogens increase expression of bone morphogenetic protein 8b in brown adipose tissue of mice. *Biol Sex Differ* *6*, 7.

Gregoire, F.M., Smas, C.M., and Sul, H.S. (1998). Understanding adipocyte differentiation. *Physiol. Rev.* *78*, 783–809.

Grinspoon, S., and Carr, A. (2005). Cardiovascular risk and body-fat abnormalities in HIV-infected adults. *N. Engl. J. Med.* *352*, 48–62.

Grujic, D., Susulic, V.S., Harper, M.E., Himms-Hagen, J., Cunningham, B.A., Corkey, B.E., and Lowell, B.B. (1997). Beta3-adrenergic receptors on white and brown adipocytes mediate beta3-selective agonist-induced effects on energy expenditure, insulin secretion, and food intake. A study using transgenic and gene knockout mice. *J. Biol. Chem.* *272*, 17686–17693.

Guarente, L. (2005). Calorie restriction and SIR2 genes--towards a mechanism. *Mech. Ageing Dev.* *126*, 923–928.

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

de Guise, C., Lacerte, A., Rafiei, S., Reynaud, R., Roy, M., Brue, T., and Lebrun, J.-J. (2006). Activin inhibits the human Pit-1 gene promoter through the p38 kinase pathway in a Smad-independent manner. *Endocrinology* *147*, 4351–4362.

Gulick, R.M., Mellors, J.W., Havlir, D., Eron, J.J., Gonzalez, C., McMahon, D., Richman, D.D., Valentine, F.T., Jonas, L., Meibohm, A., et al. (1997). Treatment with indinavir, zidovudine, and lamivudine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy. *N. Engl. J. Med.* *337*, 734–739.

Gunawardana, S.C., and Piston, D.W. (2012). Reversal of type 1 diabetes in mice by brown adipose tissue transplant. *Diabetes* *61*, 674–682.

Gunawardana, S.C., and Piston, D.W. (2015). Insulin-independent reversal of type 1 diabetes in nonobese diabetic mice with brown adipose tissue transplant. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *308*, E1043-1055.

Gupta, R.K., Arany, Z., Seale, P., Mepani, R.J., Ye, L., Conroe, H.M., Roby, Y.A., Kulaga, H., Reed, R.R., and Spiegelman, B.M. (2010). Transcriptional control of preadipocyte determination by Zfp423. *Nature* *464*, 619–623.

Gupta, R.K., Mepani, R.J., Kleiner, S., Lo, J.C., Khandekar, M.J., Cohen, P., Frontini, A., Bhowmick, D.C., Ye, L., Cinti, S., et al. (2012). Zfp423 expression identifies committed preadipocytes and localizes to adipose endothelial and perivascular cells. *Cell Metab.* *15*, 230–239.

Gustafson, B., Hammarstedt, A., Hedjazifar, S., Hoffmann, J.M., Svensson, P.-A., Grimsby, J., Rondinone, C., and Smith, U. (2015). BMP4 and BMP Antagonists Regulate Human White and Beige Adipogenesis. *Diabetes* *64*, 1670–1681.

Gu-Trantien, C., Loi, S., Garaud, S., Equeter, C., Libin, M., de Wind, A., Ravoet, M., Le Buanec, H., Sibille, C., Manfouo-Foutsop, G., et al. (2013). CD4⁺ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *J. Clin. Invest.* *123*, 2873–2892.

Hadi, H.A.R., and Suwaidi, J.A. (2007). Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Vasc Health Risk Manag* *3*, 853–876.

Hadigan, C., Borgonha, S., Rabe, J., Young, V., and Grinspoon, S. (2002). Increased rates of lipolysis among human immunodeficiency virus-infected men receiving highly active antiretroviral therapy. *Metab. Clin. Exp.* *51*, 1143–1147.

Hajri, T., and Abumrad, N.A. (2002). Fatty acid transport across membranes: relevance to nutrition and metabolic pathology. *Annu. Rev. Nutr.* *22*, 383–415.

Halberg, N., Khan, T., Trujillo, M.E., Wernstedt-Asterholm, I., Attie, A.D., Sherwani, S., Wang, Z.V., Landskroner-Eiger, S., Dineen, S., Magalang, U.J., et al. (2009). Hypoxia-inducible factor 1alpha induces fibrosis and insulin resistance in white adipose tissue. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 4467–4483.

Halder, S.K., Beauchamp, R.D., and Datta, P.K. (2005). A specific inhibitor of TGF-beta receptor kinase, SB-431542, as a potent antitumor agent for human cancers. *Neoplasia* *7*, 509–521.

van Hall, G., Steensberg, A., Sacchetti, M., Fischer, C., Keller, C., Schjerling, P., Hiscock, N., Møller, K., Saltin, B., Febbraio, M.A., et al. (2003). Interleukin-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *88*, 3005–3010.

Hamaguchi, K., Itabashi, A., Kuroe, Y., Nakano, M., Fujimoto, E., Kato, T., Satoi, K., Utsuyama, M., and Sato, K. (2012). Analysis of adipose tissues and stromal vascular cells in a murine arthritis model. *Metab. Clin. Exp.* *61*, 1687–1695.

Hamburger, A.W., and Salmon, S.E. (1977). Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* *197*, 461–463.

Hamilton, J.A., Guo, W., and Kamp, F. (2002). Mechanism of cellular uptake of long-chain fatty acids: Do we need cellular proteins? *Mol. Cell. Biochem.* *239*, 17–23.

Hammer, S.M., Squires, K.E., Hughes, M.D., Grimes, J.M., Demeter, L.M., Currier, J.S., Eron, J.J., Feinberg, J.E., Balfour, H.H., Deyton, L.R., et al. (1997). A controlled trial of two nucleoside analogues plus indinavir in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. AIDS Clinical Trials Group 320 Study Team. *N. Engl. J. Med.* *337*, 725–733.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646–674.

Hanssen, M.J.W., Hoeks, J., Brans, B., van der Lans, A.A.J.J., Schaart, G., van den Driessche, J.J., Jørgensen, J.A., Boekschoten, M.V., Hesselink, M.K.C., Havekes, B., et al. (2015). Short-term cold acclimation improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes mellitus. *Nat. Med.* *21*, 863–865.

Hanssen, M.J.W., van der Lans, A.A.J.J., Brans, B., Hoeks, J., Jardon, K.M.C., Schaart, G., Mottaghy, F.M., Schrauwen, P., and van Marken Lichtenbelt, W.D. (2016). Short-term Cold Acclimation Recruits Brown Adipose Tissue in Obese Humans. *Diabetes* *65*, 1179–1189.

Hao, R.-H., Guo, Y., Dong, S.-S., Weng, G.-Z., Yan, H., Zhu, D.-L., Chen, X.-F., Chen, J.-B., and Yang, T.-L. (2016). Associations of Plasma FGF2 Levels and Polymorphisms in the FGF2 Gene with Obesity Phenotypes in Han Chinese Population. *Sci Rep* *6*, 19868.

Hare, S., Gupta, S.S., Valkov, E., Engelman, A., and Cherepanov, P. (2010). Retroviral intasome assembly and inhibition of DNA strand transfer. *Nature* *464*, 232–236.

Harms, M., and Seale, P. (2013). Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat. Med.* *19*, 1252–1263.

Haslam, D.W., and James, W.P.T. (2005). Obesity. *Lancet* *366*, 1197–1209.

Haugen, F., Jørgensen, A., Drevon, C.A., and Trayhurn, P. (2001). Inhibition by insulin of resistin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett.* *507*, 105–108.

Hawkins, K.E., Sharp, T.V., and McKay, T.R. (2013). The role of hypoxia in stem cell potency and differentiation. *Regen Med* *8*, 771–782.

Hay, D.L., Walker, C.S., and Poyner, D.R. (2011). Adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide receptors in endocrine-related cancers: opportunities and challenges. *Endocr. Relat. Cancer* *18*, C1-14.

Hayashi, Y.K., Matsuda, C., Ogawa, M., Goto, K., Tominaga, K., Mitsuhashi, S., Park, Y.-E., Nonaka, I., Hino-Fukuyo, N., Haginoya, K., et al. (2009). Human PTRF mutations cause secondary deficiency of caveolins resulting in muscular dystrophy with generalized lipodystrophy. *J. Clin. Invest.* *119*, 2623–2633.

- He, G., Andersen, O., Haugaard, S.B., Lihn, A.S., Pedersen, S.B., Madsbad, S., and Richelsen, B. (2005). Plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) in plasma and adipose tissue in HIV-associated lipodystrophy syndrome. Implications of adipokines. *Eur. J. Clin. Invest.* *35*, 583–590.
- Heaton, G.M., Wagenvoord, R.J., Kemp, A., and Nicholls, D.G. (1978). Brown-adipose-tissue mitochondria: photoaffinity labelling of the regulatory site of energy dissipation. *Eur. J. Biochem.* *82*, 515–521.
- Hegele, R.A., Cao, H., Frankowski, C., Mathews, S.T., and Leff, T. (2002). PPAR γ F388L, a transactivation-deficient mutant, in familial partial lipodystrophy. *Diabetes* *51*, 3586–3590.
- Heimann, R., and Hellman, S. (1998). Aging, progression, and phenotype in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* *16*, 2686–2692.
- Hempen, P.M., Zhang, L., Bansal, R.K., Iacobuzio-Donahue, C.A., Murphy, K.M., Maitra, A., Vogelstein, B., Whitehead, R.H., Markowitz, S.D., Willson, J.K.V., et al. (2003). Evidence of selection for clones having genetic inactivation of the activin A type II receptor (ACVR2) gene in gastrointestinal cancers. *Cancer Res.* *63*, 994–999.
- Hepple, R.T., Baker, D.J., McConkey, M., Murynka, T., and Norris, R. (2006). Caloric restriction protects mitochondrial function with aging in skeletal and cardiac muscles. *Rejuvenation Res* *9*, 219–222.
- Heymisfield, S.B., and Wadden, T.A. (2017). Mechanisms, Pathophysiology, and Management of Obesity. *N. Engl. J. Med.* *376*, 254–266.
- Hinson, J.P., Kapas, S., and Smith, D.M. (2000). Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide. *Endocr. Rev.* *21*, 138–167.
- Hirakawa, S., Kodama, S., Kunstfeld, R., Kajiya, K., Brown, L.F., and Detmar, M. (2005). VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *J. Exp. Med.* *201*, 1089–1099.
- Hirano, Y., Yoshida, M., Shimizu, M., and Sato, R. (2001). Direct demonstration of rapid degradation of nuclear sterol regulatory element-binding proteins by the ubiquitin-proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* *276*, 36431–36437.
- Hirota, M., Watanabe, K., Hamada, S., Sun, Y., Strizzi, L., Mancino, M., Nagaoka, T., Gonzales, M., Seno, M., Bianco, C., et al. (2008). Smad2 functions as a co-activator of canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway independent of Smad4 through histone acetyltransferase activity of p300. *Cell. Signal.* *20*, 1632–1641.
- Hirsch, J., and Batchelor, B. (1976). Adipose tissue cellularity in human obesity. *Clin Endocrinol Metab* *5*, 299–311.
- Hjelmeland, M.D., Hjelmeland, A.B., Sathornsumetee, S., Reese, E.D., Herbstreith, M.H., Laping, N.J., Friedman, H.S., Bigner, D.D., Wang, X.-F., and Rich, J.N. (2004). SB-431542, a small molecule transforming growth factor-beta-receptor antagonist, inhibits human glioma cell line proliferation and motility. *Mol. Cancer Ther.* *3*, 737–745.
- Hodson, L. (2014). Adipose tissue oxygenation: Effects on metabolic function. *Adipocyte* *3*, 75–80.
- Hodson, L., Humphreys, S.M., Karpe, F., and Frayn, K.N. (2013). Metabolic signatures of human adipose tissue hypoxia in obesity. *Diabetes* *62*, 1417–1425.
- Holliday, D.L., and Speirs, V. (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res.* *13*, 215.
- Hollmén, M., Roudnicky, F., Karaman, S., and Detmar, M. (2015). Characterization of macrophage--cancer cell crosstalk in estrogen receptor positive and triple-negative breast cancer. *Sci Rep* *5*, 9188.
- Holm, C. (2003). Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochem. Soc. Trans.* *31*, 1120–1124.
- Holm, E., Hagmüller, E., Staedt, U., Schlickeiser, G., Günther, H.J., Leweling, H., Tokus, M., and Kollmar, H.B. (1995). Substrate balances across colonic carcinomas in humans. *Cancer Res.* *55*, 1373–1378.
- Hondares, E., Mora, O., Yubero, P., Rodriguez de la Concepción, M., Iglesias, R., Giralt, M., and Villarroya, F. (2006). Thiazolidinediones and rexinoids induce peroxisome proliferator-activated receptor-coactivator (PGC)-

1alpha gene transcription: an autoregulatory loop controls PGC-1alpha expression in adipocytes via peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivation. *Endocrinology* 147, 2829–2838.

Hondares, E., Iglesias, R., Giral, A., Gonzalez, F.J., Giral, M., Mampel, T., and Villarroya, F. (2011). Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 286, 12983–12990.

Hondares, E., Gallego-Escuredo, J.M., Flachs, P., Frontini, A., Cereijo, R., Goday, A., Perugini, J., Kopecky, P., Giral, M., Cinti, S., et al. (2014). Fibroblast growth factor-21 is expressed in neonatal and pheochromocytoma-induced adult human brown adipose tissue. *Metab. Clin. Exp.* 63, 312–317.

Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S., and Spiegelman, B.M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259, 87–91.

Houstěk, J., Vizek, K., Pavelka, S., Kopecký, J., Krejcová, E., Hermanská, J., and Cermáková, M. (1993). Type II iodothyronine 5'-deiodinase and uncoupling protein in brown adipose tissue of human newborns. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77, 382–387.

Hovey, R.C., and Aimo, L. (2010). Diverse and active roles for adipocytes during mammary gland growth and function. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 15, 279–290.

Hu, E., Tontonoz, P., and Spiegelman, B.M. (1995). Transdifferentiation of myoblasts by the adipogenic transcription factors PPAR gamma and C/EBP alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 9856–9860.

Hu, W., Ru, Z., Xiao, W., Xiong, Z., Wang, C., Yuan, C., Zhang, X., and Yang, H. (2018). Adipose tissue browning in cancer-associated cachexia can be attenuated by inhibition of exosome generation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 506, 122–129.

Huang, L.E., Gu, J., Schau, M., and Bunn, H.F. (1998a). Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 7987–7992.

Huang, S.-P., Huang, C.-H., Shyu, J.-F., Lee, H.-S., Chen, S.-G., Chan, J.Y.-H., and Huang, S.-M. (2013). Promotion of wound healing using adipose-derived stem cells in radiation ulcer of a rat model. *J. Biomed. Sci.* 20, 51.

Huang, Z., Willett, W.C., Manson, J.E., Rosner, B., Stampfer, M.J., Speizer, F.E., and Colditz, G.A. (1998b). Body weight, weight change, and risk for hypertension in women. *Ann. Intern. Med.* 128, 81–88.

Hugo, E.R., Borcharding, D.C., Gersin, K.S., Loftus, J., and Ben-Jonathan, N. (2008). Prolactin release by adipose explants, primary adipocytes, and LS14 adipocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93, 4006–4012.

Husain, Z., Huang, Y., Seth, P., and Sukhatme, V.P. (2013a). Tumor-derived lactate modifies antitumor immune response: effect on myeloid-derived suppressor cells and NK cells. *J. Immunol.* 191, 1486–1495.

Husain, Z., Seth, P., and Sukhatme, V.P. (2013b). Tumor-derived lactate and myeloid-derived suppressor cells: Linking metabolism to cancer immunology. *Oncoimmunology* 2, e26383.

Ichikawa-Shindo, Y., Sakurai, T., Kamiyoshi, A., Kawate, H., Iinuma, N., Yoshizawa, T., Koyama, T., Fukuchi, J., Iimuro, S., Moriyama, N., et al. (2008). The GPCR modulator protein RAMP2 is essential for angiogenesis and vascular integrity. *J. Clin. Invest.* 118, 29–39.

Ikeda, S.-I., Tamura, Y., Kakehi, S., Sanada, H., Kawamori, R., and Watada, H. (2016). Exercise-induced increase in IL-6 level enhances GLUT4 expression and insulin sensitivity in mouse skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 473, 947–952.

Isakson, P., Hammarstedt, A., Gustafson, B., and Smith, U. (2009). Impaired preadipocyte differentiation in human abdominal obesity: role of Wnt, tumor necrosis factor-alpha, and inflammation. *Diabetes* 58, 1550–1557.

Ishikawa, T., Chen, J., Wang, J., Okada, F., Sugiyama, T., Kobayashi, T., Shindo, M., Higashino, F., Katoh, H., Asaka, M., et al. (2003). Adrenomedullin antagonist suppresses in vivo growth of human pancreatic cancer cells in SCID mice by suppressing angiogenesis. *Oncogene* 22, 1238–1242.

Ito, M., Yang, Z., Andl, T., Cui, C., Kim, N., Millar, S.E., and Cotsarelis, G. (2007). Wnt-dependent de novo hair follicle regeneration in adult mouse skin after wounding. *Nature* 447, 316–320.

Jacob, A., Wu, R., and Wang, P. (2012). Regulation of RAMP expression in diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.* 744, 87–103.

Jardé, T., Caldefie-Chézet, F., Goncalves-Mendes, N., Mishellany, F., Buechler, C., Penault-Llorca, F., and Vasson, M.P. (2009). Involvement of adiponectin and leptin in breast cancer: clinical and in vitro studies. *Endocr. Relat. Cancer* 16, 1197–1210.

Jeffery, E., Berry, R., Church, C.D., Yu, S., Shook, B.A., Horsley, V., Rosen, E.D., and Rodeheffer, M.S. (2014). Characterization of Cre recombinase models for the study of adipose tissue. *Adipocyte* 3, 206–211.

Jespersen, N.Z., Larsen, T.J., Peijs, L., Dagaard, S., Homøe, P., Loft, A., de Jong, J., Mathur, N., Cannon, B., Nedergaard, J., et al. (2013). A classical brown adipose tissue mRNA signature partly overlaps with brite in the supraclavicular region of adult humans. *Cell Metab.* 17, 798–805.

Jiang, C., Kim, J.-H., Li, F., Qu, A., Gavrilova, O., Shah, Y.M., and Gonzalez, F.J. (2013). Hypoxia-inducible factor 1 α regulates a SOCS3-STAT3-adiponectin signal transduction pathway in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 288, 3844–3857.

Joe, A.W.B., Yi, L., Even, Y., Vogl, A.W., and Rossi, F.M.V. (2009). Depot-specific differences in adipogenic progenitor abundance and proliferative response to high-fat diet. *Stem Cells* 27, 2563–2570.

Jones, B.H., Standridge, M.K., and Moustaid, N. (1997). Angiotensin II increases lipogenesis in 3T3-L1 and human adipose cells. *Endocrinology* 138, 1512–1519.

Jones, S.P., Janneh, O., Back, D.J., and Pirmohamed, M. (2005). Altered adipokine response in murine 3T3-F442A adipocytes treated with protease inhibitors and nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Antivir. Ther. (Lond.)* 10, 207–213.

Julian-Reynier, C. (2011). [Genetic predisposition to breast and ovarian cancer: importance of test results]. *Med Sci (Paris)* 27, 657–661.

Justesen, J., Stenderup, K., Ebbesen, E.N., Mosekilde, L., Steiniche, T., and Kassem, M. (2001). Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis. *Biogerontology* 2, 165–171.

Kaafarani, I., Fernandez-Sauze, S., Berenguer, C., Chinot, O., Delfino, C., Dussert, C., Metellus, P., Boudouresque, F., Mabrouk, K., Grisoli, F., et al. (2009). Targeting adrenomedullin receptors with systemic delivery of neutralizing antibodies inhibits tumor angiogenesis and suppresses growth of human tumor xenografts in mice. *FASEB J.* 23, 3424–3435.

Kabbinavar, F., Hurwitz, H.I., Fehrenbacher, L., Meropol, N.J., Novotny, W.F., Lieberman, G., Griffing, S., and Bergsland, E. (2003). Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 21, 60–65.

Kadowaki, T., and Yamauchi, T. (2005). Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr. Rev.* 26, 439–451.

Kaestner, K.H., Christy, R.J., and Lane, M.D. (1990). Mouse insulin-responsive glucose transporter gene: characterization of the gene and trans-activation by the CCAAT/enhancer binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 251–255.

Kajimura, S., Seale, P., Tomaru, T., Erdjument-Bromage, H., Cooper, M.P., Ruas, J.L., Chin, S., Tempst, P., Lazar, M.A., and Spiegelman, B.M. (2008). Regulation of the brown and white fat gene programs through a PRDM16/CtBP transcriptional complex. *Genes Dev.* 22, 1397–1409.

Kajimura, S., Seale, P., Kubota, K., Lunsford, E., Frangioni, J.V., Gygi, S.P., and Spiegelman, B.M. (2009). Initiation of myoblast to brown fat switch by a PRDM16-C/EBP-beta transcriptional complex. *Nature* 460, 1154–1158.

Kamp, F., and Hamilton, J.A. (2006). How fatty acids of different chain length enter and leave cells by free diffusion. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 75, 149–159.

Kanazawa, A., Kawamura, Y., Sekine, A., Iida, A., Tsunoda, T., Kashiwagi, A., Tanaka, Y., Babazono, T., Matsuda, M., Kawai, K., et al. (2005). Single nucleotide polymorphisms in the gene encoding Krüppel-like factor 7 are associated with type 2 diabetes. *Diabetologia* *48*, 1315–1322.

Kanda, T., Brown, J.D., Orasanu, G., Vogel, S., Gonzalez, F.J., Sartoretto, J., Michel, T., and Plutzky, J. (2009). PPAR γ in the endothelium regulates metabolic responses to high-fat diet in mice. *J. Clin. Invest.* *119*, 110–124.

Kang, S., Akerblad, P., Kiviranta, R., Gupta, R.K., Kajimura, S., Griffin, M.J., Min, J., Baron, R., and Rosen, E.D. (2012). Regulation of early adipose commitment by Zfp521. *PLoS Biol.* *10*, e1001433.

Karagiannides, I., Tchkonina, T., Dobson, D.E., Steppan, C.M., Cummins, P., Chan, G., Salvatori, K., Hadzopoulou-Cladaras, M., and Kirkland, J.L. (2001). Altered expression of C/EBP family members results in decreased adipogenesis with aging. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* *280*, R1772-1780.

Karamanlidis, G., Karamitri, A., Docherty, K., Hazlerigg, D.G., and Lomax, M.A. (2007). C/EBP β reprograms white 3T3-L1 preadipocytes to a Brown adipocyte pattern of gene expression. *J. Biol. Chem.* *282*, 24660–24669.

Karpnich, N.O., Kechele, D.O., Espenschied, S.T., Willcockson, H.H., Fedoriw, Y., and Caron, K.M. (2013). Adrenomedullin gene dosage correlates with tumor and lymph node lymphangiogenesis. *FASEB J.* *27*, 590–600.

Kasza, I., Suh, Y., Wollny, D., Clark, R.J., Roopra, A., Colman, R.J., MacDougald, O.A., Shedd, T.A., Nelson, D.W., Yen, M.-I., et al. (2014). Syndecan-1 is required to maintain intradermal fat and prevent cold stress. *PLoS Genet.* *10*, e1004514.

Kather, H. (1990). Beta-adrenergic stimulation of adenine nucleotide catabolism and purine release in human adipocytes. *J. Clin. Invest.* *85*, 106–114.

Kawabata, M., Imamura, T., and Miyazono, K. (1998). Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev.* *9*, 49–61.

Keele, B.F., Van Heuverswyn, F., Li, Y., Bailes, E., Takehisa, J., Santiago, M.L., Bibollet-Ruche, F., Chen, Y., Wain, L.V., Liegeois, F., et al. (2006). Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science* *313*, 523–526.

Keipert, S., Ost, M., Johann, K., Imber, F., Jastroch, M., van Schothorst, E.M., Keijer, J., and Klaus, S. (2014). Skeletal muscle mitochondrial uncoupling drives endocrine cross-talk through the induction of FGF21 as a myokine. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *306*, E469-482.

Keipert, S., Kutschke, M., Lamp, D., Brachthäuser, L., Neff, F., Meyer, C.W., Oelkrug, R., Kharitonov, A., and Jastroch, M. (2015). Genetic disruption of uncoupling protein 1 in mice renders brown adipose tissue a significant source of FGF21 secretion. *Mol Metab* *4*, 537–542.

Kenchaiah, S., Evans, J.C., Levy, D., Wilson, P.W.F., Benjamin, E.J., Larson, M.G., Kannel, W.B., and Vasan, R.S. (2002). Obesity and the risk of heart failure. *N. Engl. J. Med.* *347*, 305–313.

Kershaw, E.E., and Flier, J.S. (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *89*, 2548–2556.

Kersten, S. (2001). Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep.* *2*, 282–286.

Khandekar, M.J., Cohen, P., and Spiegelman, B.M. (2011). Molecular mechanisms of cancer development in obesity. *Nat. Rev. Cancer* *11*, 886–895.

Kim, J.B., and Spiegelman, B.M. (1996). ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev.* *10*, 1096–1107.

Kim, C., Xuong, N.-H., and Taylor, S.S. (2005). Crystal structure of a complex between the catalytic and regulatory (R1 α) subunits of PKA. *Science* *307*, 690–696.

Kim, C.A., Delépine, M., Boutet, E., El Mourabit, H., Le Lay, S., Meier, M., Nemani, M., Bridel, E., Leite, C.C., Bertola, D.R., et al. (2008). Association of a homozygous nonsense caveolin-1 mutation with Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *93*, 1129–1134.

Kim, J.B., Sarraf, P., Wright, M., Yao, K.M., Mueller, E., Solanes, G., Lowell, B.B., and Spiegelman, B.M. (1998a). Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. *J. Clin. Invest.* *101*, 1–9.

Kim, J.B., Wright, H.M., Wright, M., and Spiegelman, B.M. (1998b). ADD1/SREBP1 activates PPARgamma through the production of endogenous ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *95*, 4333–4337.

Kim, J.H., Kim, S.-H., Song, S.Y., Kim, W.-S., Song, S.U., Yi, T., Jeon, M.-S., Chung, H.-M., Xia, Y., and Sung, J.-H. (2014). Hypoxia induces adipocyte differentiation of adipose-derived stem cells by triggering reactive oxygen species generation. *Cell Biol. Int.* *38*, 32–40.

Kim, K.H., Lee, K., Moon, Y.S., and Sul, H.S. (2001). A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* *276*, 11252–11256.

Kim, M.J., Leclercq, P., Lanoy, E., Cervera, P., Antuna-Puente, B., Maachi, M., Dorofeev, E., Slama, L., Valantin, M.A., Costagliola, D., et al. (2007). A 6-month interruption of antiretroviral therapy improves adipose tissue function in HIV-infected patients: the ANRS EP29 Lipostop Study. *Antivir. Ther. (Lond.)* *12*, 1273–1283.

Kir, S., White, J.P., Kleiner, S., Kazak, L., Cohen, P., Baracos, V.E., and Spiegelman, B.M. (2014). Tumour-derived PTH-related protein triggers adipose tissue browning and cancer cachexia. *Nature* *513*, 100–104.

Kitamura, K., Kangawa, K., Kawamoto, M., Ichiki, Y., Nakamura, S., Matsuo, H., and Eto, T. (1993). Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *192*, 553–560.

Klaus, S. (2004). Adipose tissue as a regulator of energy balance. *Curr Drug Targets* *5*, 241–250.

Klaus, S., Keipert, S., Rossmesl, M., and Kopecky, J. (2012). Augmenting energy expenditure by mitochondrial uncoupling: a role of AMP-activated protein kinase. *Genes Nutr* *7*, 369–386.

Kleiner, S., Mepani, R.J., Laznik, D., Ye, L., Jurczak, M.J., Jornayvaz, F.R., Estall, J.L., Chatterjee Bhowmick, D., Shulman, G.I., and Spiegelman, B.M. (2012). Development of insulin resistance in mice lacking PGC-1 α in adipose tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *109*, 9635–9640.

Kleinfeld, A.M., Chu, P., and Romero, C. (1997). Transport of long-chain native fatty acids across lipid bilayer membranes indicates that transbilayer flip-flop is rate limiting. *Biochemistry* *36*, 14146–14158.

Kleinsmith, L.J., and Pierce, G.B. (1964). Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells. *Cancer Res.* *24*, 1544–1551.

Knittle, J.L., Timmers, K., Ginsberg-Fellner, F., Brown, R.E., and Katz, D.P. (1979). The growth of adipose tissue in children and adolescents. Cross-sectional and longitudinal studies of adipose cell number and size. *J. Clin. Invest.* *63*, 239–246.

Kobayashi, K., Kitamura, K., Hirayama, N., Date, H., Kashiwagi, T., Ikushima, I., Hanada, Y., Nagatomo, Y., Takenaga, M., Ishikawa, T., et al. (1996). Increased plasma adrenomedullin in acute myocardial infarction. *Am. Heart J.* *131*, 676–680.

Koh, Y.J., Koh, B.I., Kim, H., Joo, H.J., Jin, H.K., Jeon, J., Choi, C., Lee, D.H., Chung, J.H., Cho, C.-H., et al. (2011). Stromal vascular fraction from adipose tissue forms profound vascular network through the dynamic reassembly of blood endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *31*, 1141–1150.

Kohno, M., Hanehira, T., Kano, H., Horio, T., Yokokawa, K., Ikeda, M., Minami, M., Yasunari, K., and Yoshikawa, J. (1996). Plasma adrenomedullin concentrations in essential hypertension. *Hypertension* *27*, 102–107.

Kölliker (1886). *Anatomischer Anzeiger*.

Kopelman, P.G. (2000). Obesity as a medical problem. *Nature* *404*, 635–643.

Kościuczuk, E.M., Lisowski, P., Jarczak, J., Strzałkowska, N., Józwiak, A., Horbańczuk, J., Krzyżewski, J., Zwierzchowski, L., and Bagnicka, E. (2012). Cathelicidins: family of antimicrobial peptides. A review. *Mol. Biol. Rep.* *39*, 10957–10970.

- Kosteli, A., Sugaru, E., Haemmerle, G., Martin, J.F., Lei, J., Zechner, R., and Ferrante, A.W. (2010). Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue. *J. Clin. Invest.* *120*, 3466–3479.
- Kouidhi, M., Villageois, P., Mounier, C.M., Ménigot, C., Rival, Y., Piwnica, D., Aubert, J., Chignon-Sicard, B., and Dani, C. (2015). Characterization of human knee and chin adipose-derived stromal cells. *Stem Cells Int* *2015*, 592090.
- Kozak, U.C., Kopecky, J., Teisinger, J., Enerbäck, S., Boyer, B., and Kozak, L.P. (1994). An upstream enhancer regulating brown-fat-specific expression of the mitochondrial uncoupling protein gene. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 59–67.
- Kral, J.G., Björntorp, P., Scherstén, T., and Sjöström, L. (1977). Body composition and adipose tissue cellularity before and after jejuno-ileostomy in severely obese subjects. *Eur. J. Clin. Invest.* *7*, 413–419.
- Krishnan, J., Danzer, C., Simka, T., Ukropec, J., Walter, K.M., Kumpf, S., Mirtschink, P., Ukropcova, B., Gasperikova, D., Pedrazzini, T., et al. (2012). Dietary obesity-associated Hif1 α activation in adipocytes restricts fatty acid oxidation and energy expenditure via suppression of the Sirt2-NAD⁺ system. *Genes Dev.* *26*, 259–270.
- Krotkiewski, M., Björntorp, P., Sjöström, L., and Smith, U. (1983). Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution. *J. Clin. Invest.* *72*, 1150–1162.
- Kubota, N., Terauchi, Y., Yamauchi, T., Kubota, T., Moroi, M., Matsui, J., Eto, K., Yamashita, T., Kamon, J., Satoh, H., et al. (2002). Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J. Biol. Chem.* *277*, 25863–25866.
- Kubota, N., Yano, W., Kubota, T., Yamauchi, T., Itoh, S., Kumagai, H., Kozono, H., Takamoto, I., Okamoto, S., Shiuchi, T., et al. (2007). Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. *Cell Metab.* *6*, 55–68.
- Kuo, L.E., Czarnecka, M., Kitlinska, J.B., Tilan, J.U., Kvetnanský, R., and Zukowska, Z. (2008). Chronic stress, combined with a high-fat/high-sugar diet, shifts sympathetic signaling toward neuropeptide Y and leads to obesity and the metabolic syndrome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1148*, 232–237.
- Lacasa, D., Taleb, S., Keophiphath, M., Miranville, A., and Clement, K. (2007). Macrophage-secreted factors impair human adipogenesis: involvement of proinflammatory state in preadipocytes. *Endocrinology* *148*, 868–877.
- Lacroix, M., and Leclercq, G. (2004). Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Res. Treat.* *83*, 249–289.
- Ladoux, A., and Frelin, C. (2000). Coordinated Up-regulation by hypoxia of adrenomedullin and one of its putative receptors (RDC-1) in cells of the rat blood-brain barrier. *J. Biol. Chem.* *275*, 39914–39919.
- Lafontan, M., and Berlan, M. (1995). Fat cell alpha 2-adrenoceptors: the regulation of fat cell function and lipolysis. *Endocr. Rev.* *16*, 716–738.
- Lagathu, C., Eustace, B., Prot, M., Frantz, D., Gu, Y., Bastard, J.-P., Maachi, M., Azoulay, S., Briggs, M., Caron, M., et al. (2007). Some HIV antiretrovirals increase oxidative stress and alter chemokine, cytokine or adiponectin production in human adipocytes and macrophages. *Antivir. Ther. (Lond.)* *12*, 489–500.
- Lahmann, P.H., Hoffmann, K., Allen, N., van Gils, C.H., Khaw, K.-T., Tehard, B., Berrino, F., Tjønneland, A., Bigaard, J., Olsen, A., et al. (2004). Body size and breast cancer risk: findings from the European Prospective Investigation into Cancer And Nutrition (EPIC). *Int. J. Cancer* *111*, 762–771.
- Lang, D., Lu, M.M., Huang, L., Engleka, K.A., Zhang, M., Chu, E.Y., Lipner, S., Skoultchi, A., Millar, S.E., and Epstein, J.A. (2005). Pax3 functions at a nodal point in melanocyte stem cell differentiation. *Nature* *433*, 884–887.
- Langin, D. (2006). Control of fatty acid and glycerol release in adipose tissue lipolysis. *C. R. Biol.* *329*, 598–607; discussion 653–655.
- Langin, D., Tavernier, G., and Lafontan, M. (1995). Regulation of beta 3-adrenoceptor expression in white fat cells. *Fundam Clin Pharmacol* *9*, 97–106.

- Lapatto, R., Blundell, T., Hemmings, A., Overington, J., Wilderspin, A., Wood, S., Merson, J.R., Whittle, P.J., Danley, D.E., and Geoghegan, K.F. (1989). X-ray analysis of HIV-1 proteinase at 2.7 Å resolution confirms structural homology among retroviral enzymes. *Nature* *342*, 299–302.
- Lapeire, L., Hendrix, A., Lambein, K., Van Bockstal, M., Braems, G., Van Den Broecke, R., Limame, R., Mestdagh, P., Vandesompele, J., Vanhove, C., et al. (2014). Cancer-associated adipose tissue promotes breast cancer progression by paracrine oncostatin M and Jak/STAT3 signaling. *Cancer Res.* *74*, 6806–6819.
- Lapeire, L., Hendrix, A., Lecoutere, E., Van Bockstal, M., Vandesompele, J., Maynard, D., Braems, G., Van Den Broecke, R., Müller, C., Bracke, M., et al. (2017). Secretome analysis of breast cancer-associated adipose tissue to identify paracrine regulators of breast cancer growth. *Oncotarget* *8*, 47239–47249.
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M.A., and Dick, J.E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* *367*, 645–648.
- Large, V., Peroni, O., Letexier, D., Ray, H., and Beylot, M. (2004). Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes Metab.* *30*, 294–309.
- Larráyoz, I.M., Martínez-Herrero, S., García-Sanmartín, J., Ochoa-Callejero, L., and Martínez, A. (2014). Adrenomedullin and tumour microenvironment. *J Transl Med* *12*, 339.
- Lean, M.E., James, W.P., Jennings, G., and Trayhurn, P. (1986). Brown adipose tissue uncoupling protein content in human infants, children and adults. *Clin. Sci.* *71*, 291–297.
- Lee, S.-J. (2004). Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *20*, 61–86.
- Lee, A.V., Oesterreich, S., and Davidson, N.E. (2015). MCF-7 cells—changing the course of breast cancer research and care for 45 years. *J. Natl. Cancer Inst.* *107*.
- Lee, E.Y., Xia, Y., Kim, W.-S., Kim, M.H., Kim, T.H., Kim, K.J., Park, B.-S., and Sung, J.-H. (2009). Hypoxia-enhanced wound-healing function of adipose-derived stem cells: increase in stem cell proliferation and up-regulation of VEGF and bFGF. *Wound Repair Regen* *17*, 540–547.
- Lee, K., Villena, J.A., Moon, Y.S., Kim, K.-H., Lee, S., Kang, C., and Sul, H.S. (2003). Inhibition of adipogenesis and development of glucose intolerance by soluble preadipocyte factor-1 (Pref-1). *J. Clin. Invest.* *111*, 453–461.
- Lee, Y.-H., Petkova, A.P., Mottillo, E.P., and Granneman, J.G. (2012). In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by β 3-adrenoceptor activation and high-fat feeding. *Cell Metab.* *15*, 480–491.
- Leow, M.K.S., Addy, C.L., and Mantzoros, C.S. (2003). Clinical review 159: Human immunodeficiency virus/highly active antiretroviral therapy-associated metabolic syndrome: clinical presentation, pathophysiology, and therapeutic strategies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *88*, 1961–1976.
- Lepper, C., and Fan, C.-M. (2010). Inducible lineage tracing of Pax7-descendant cells reveals embryonic origin of adult satellite cells. *Genesis* *48*, 424–436.
- Lepper, C., Conway, S.J., and Fan, C.-M. (2009). Adult satellite cells and embryonic muscle progenitors have distinct genetic requirements. *Nature* *460*, 627–631.
- Leto, G., Incorvaia, L., Badalamenti, G., Tumminello, F.M., Gebbia, N., Flandina, C., Crescimanno, M., and Rini, G. (2006). Activin A circulating levels in patients with bone metastasis from breast or prostate cancer. *Clin. Exp. Metastasis* *23*, 117–122.
- Levenson, A.S., and Jordan, V.C. (1997). MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Res.* *57*, 3071–3078.
- Lewis, G.F., and Rader, D.J. (2005). New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ. Res.* *96*, 1221–1232.

- Li, D., Yea, S., Li, S., Chen, Z., Narla, G., Banck, M., Laborda, J., Tan, S., Friedman, J.M., Friedman, S.L., et al. (2005). Krüppel-like factor-6 promotes preadipocyte differentiation through histone deacetylase 3-dependent repression of DLK1. *J. Biol. Chem.* *280*, 26941–26952.
- Li, Q., Kumar, R., Underwood, K., O'Connor, A.E., Loveland, K.L., Seehra, J.S., and Matzuk, M.M. (2007). Prevention of cachexia-like syndrome development and reduction of tumor progression in inhibin-deficient mice following administration of a chimeric activin receptor type II-murine Fc protein. *Mol. Hum. Reprod.* *13*, 675–683.
- Li, Y., Zhang, W., Gao, J., Liu, J., Wang, H., Li, J., Yang, X., He, T., Guan, H., Zheng, Z., et al. (2016). Adipose tissue-derived stem cells suppress hypertrophic scar fibrosis via the p38/MAPK signaling pathway. *Stem Cell Res Ther* *7*, 102.
- Liang, J.S., Distler, O., Cooper, D.A., Jamil, H., Deckelbaum, R.J., Ginsberg, H.N., and Sturley, S.L. (2001). HIV protease inhibitors protect apolipoprotein B from degradation by the proteasome: a potential mechanism for protease inhibitor-induced hyperlipidemia. *Nat. Med.* *7*, 1327–1331.
- Lidell, M.E., Betz, M.J., Dahlqvist Leinhard, O., Heglind, M., Elander, L., Slawik, M., Mussack, T., Nilsson, D., Romu, T., Nuutila, P., et al. (2013). Evidence for two types of brown adipose tissue in humans. *Nat. Med.* *19*, 631–634.
- Lilla, J.N., and Werb, Z. (2010). Mast cells contribute to the stromal microenvironment in mammary gland branching morphogenesis. *Dev. Biol.* *337*, 124–133.
- Lin, F.T., and Lane, M.D. (1992). Antisense CCAAT/enhancer-binding protein RNA suppresses coordinate gene expression and triglyceride accumulation during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Genes Dev.* *6*, 533–544.
- Lin, F.T., and Lane, M.D. (1994). CCAAT/enhancer binding protein alpha is sufficient to initiate the 3T3-L1 adipocyte differentiation program. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *91*, 8757–8761.
- Linhart, H.G., Ishimura-Oka, K., DeMayo, F., Kibe, T., Repka, D., Poindexter, B., Bick, R.J., and Darlington, G.J. (2001). C/EBPalpha is required for differentiation of white, but not brown, adipose tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *98*, 12532–12537.
- Liu, C., Cao, X., Zhang, Y., Xu, H., Zhang, R., Wu, Y., Lu, P., and Jin, F. (2012a). Co-expression of Oct-4 and Nestin in human breast cancers. *Mol. Biol. Rep.* *39*, 5875–5881.
- Liu, L., Gao, J., Yuan, Y., Chang, Q., Liao, Y., and Lu, F. (2013a). Hypoxia preconditioned human adipose derived mesenchymal stem cells enhance angiogenic potential via secretion of increased VEGF and bFGF. *Cell Biol. Int.* *37*, 551–560.
- Liu, P., Ying, Y., Zhao, Y., Mundy, D.I., Zhu, M., and Anderson, R.G.W. (2004). Chinese hamster ovary K2 cell lipid droplets appear to be metabolic organelles involved in membrane traffic. *J. Biol. Chem.* *279*, 3787–3792.
- Liu, S., Ginestier, C., Charafe-Jauffret, E., Foco, H., Kleer, C.G., Merajver, S.D., Dontu, G., and Wicha, M.S. (2008). BRCA1 regulates human mammary stem/progenitor cell fate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 1680–1685.
- Liu, S., Lachapelle, J., Leung, S., Gao, D., Foulkes, W.D., and Nielsen, T.O. (2012b). CD8+ lymphocyte infiltration is an independent favorable prognostic indicator in basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res.* *14*, R48.
- Liu, S., Foulkes, W.D., Leung, S., Gao, D., Lau, S., Kos, Z., and Nielsen, T.O. (2014). Prognostic significance of FOXP3+ tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer depends on estrogen receptor and human epidermal growth factor receptor-2 expression status and concurrent cytotoxic T-cell infiltration. *Breast Cancer Res.* *16*, 432.
- Liu, W., Bi, P., Shan, T., Yang, X., Yin, H., Wang, Y.-X., Liu, N., Rudnicki, M.A., and Kuang, S. (2013b). miR-133a regulates adipocyte browning in vivo. *PLoS Genet.* *9*, e1003626.
- Liu, X., Rossmeisl, M., McClaine, J., Riachi, M., Harper, M.-E., and Kozak, L.P. (2003). Paradoxical resistance to diet-induced obesity in UCP1-deficient mice. *J. Clin. Invest.* *111*, 399–407.
- Liu, X., Zheng, Z., Zhu, X., Meng, M., Li, L., Shen, Y., Chi, Q., Wang, D., Zhang, Z., Li, C., et al. (2013c). Brown adipose tissue transplantation improves whole-body energy metabolism. *Cell Res.* *23*, 851–854.

- Lobo, S., Wiczler, B.M., Smith, A.J., Hall, A.M., and Bernlohr, D.A. (2007). Fatty acid metabolism in adipocytes: functional analysis of fatty acid transport proteins 1 and 4. *J. Lipid Res.* *48*, 609–620.
- Logan, C.Y., and Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *20*, 781–810.
- Loi, S., Sirtaine, N., Piette, F., Salgado, R., Viale, G., Van Eenoo, F., Rouas, G., Francis, P., Crown, J.P.A., Hitre, E., et al. (2013). Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. *J. Clin. Oncol.* *31*, 860–867.
- Longo, K.A., Wright, W.S., Kang, S., Gerin, I., Chiang, S.-H., Lucas, P.C., Opp, M.R., and MacDougald, O.A. (2004). Wnt10b inhibits development of white and brown adipose tissues. *J. Biol. Chem.* *279*, 35503–35509.
- Lorincz, A.M., and Sukumar, S. (2006). Molecular links between obesity and breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer* *13*, 279–292.
- Lowell, B.B., and Flier, J.S. (1997). Brown adipose tissue, beta 3-adrenergic receptors, and obesity. *Annu. Rev. Med.* *48*, 307–316.
- van der Lugt, J., Colbers, A., Molto, J., Hawkins, D., van der Ende, M., Vogel, M., Wyen, C., Schutz, M., Koopmans, P., Ruxrungtham, K., et al. (2009). The pharmacokinetics, safety and efficacy of boosted saquinavir tablets in HIV type-1-infected pregnant women. *Antivir. Ther. (Lond.)* *14*, 443–450.
- Lumeng, C.N., Bodzin, J.L., and Saltiel, A.R. (2007a). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J. Clin. Invest.* *117*, 175–184.
- Lumeng, C.N., Deyoung, S.M., Bodzin, J.L., and Saltiel, A.R. (2007b). Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes* *56*, 16–23.
- Lumeng, C.N., DelProposto, J.B., Westcott, D.J., and Saltiel, A.R. (2008). Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes. *Diabetes* *57*, 3239–3246.
- Lv, Z., Chu, Y., and Wang, Y. (2015). HIV protease inhibitors: a review of molecular selectivity and toxicity. *HIV AIDS (Auckl)* *7*, 95–104.
- Lyons, T.R., O'Brien, J., Borges, V.F., Conklin, M.W., Keely, P.J., Eliceiri, K.W., Marusyk, A., Tan, A.-C., and Schedin, P. (2011). Postpartum mammary gland involution drives progression of ductal carcinoma in situ through collagen and COX-2. *Nat. Med.* *17*, 1109–1115.
- Ma, I., and Allan, A.L. (2011). The role of human aldehyde dehydrogenase in normal and cancer stem cells. *Stem Cell Rev* *7*, 292–306.
- Maagaard, A., and Kvale, D. (2009). Long term adverse effects related to nucleoside reverse transcriptase inhibitors: clinical impact of mitochondrial toxicity. *Scand. J. Infect. Dis.* *41*, 808–817.
- Macciò, A., Madeddu, C., Gramignano, G., Mulas, C., Floris, C., Massa, D., Astara, G., Chessa, P., and Mantovani, G. (2010). Correlation of body mass index and leptin with tumor size and stage of disease in hormone-dependent postmenopausal breast cancer: preliminary results and therapeutic implications. *J. Mol. Med.* *88*, 677–686.
- Macotela, Y., Emanuelli, B., Mori, M.A., Gesta, S., Schulz, T.J., Tseng, Y.-H., and Kahn, C.R. (2012). Intrinsic differences in adipocyte precursor cells from different white fat depots. *Diabetes* *61*, 1691–1699.
- Madri, J.A., and Williams, S.K. (1983). Capillary endothelial cell cultures: phenotypic modulation by matrix components. *J. Cell Biol.* *97*, 153–165.
- Magré, J., Delépine, M., Khallouf, E., Gedde-Dahl, T., Van Maldergem, L., Sobel, E., Papp, J., Meier, M., Mégarbané, A., Bachy, A., et al. (2001). Identification of the gene altered in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy on chromosome 11q13. *Nat. Genet.* *28*, 365–370.

- Mahdi, A., Darvishi, B., Majidzadeh-A, K., Salehi, M., and Farahmand, L. (2019). Challenges facing antiangiogenesis therapy: The significant role of hypoxia-inducible factor and MET in development of resistance to anti-vascular endothelial growth factor-targeted therapies. *J. Cell. Physiol.* *234*, 5655–5663.
- Mahmoud, S.M.A., Paish, E.C., Powe, D.G., Macmillan, R.D., Lee, A.H.S., Ellis, I.O., and Green, A.R. (2011). An evaluation of the clinical significance of FOXP3+ infiltrating cells in human breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* *127*, 99–108.
- Mahmoud, S.M.A., Lee, A.H.S., Paish, E.C., Macmillan, R.D., Ellis, I.O., and Green, A.R. (2012). The prognostic significance of B lymphocytes in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res. Treat.* *132*, 545–553.
- Maijubi, J.G., Boyd, N.L., Dale, J.R., Hoying, J.B., Morris, M.E., and Williams, S.K. (2015). Concentration-Dependent Vascularization of Adipose Stromal Vascular Fraction Cells. *Cell Transplant* *24*, 2029–2039.
- Mallewa, J.E., Wilkins, E., Vilar, J., Mallewa, M., Doran, D., Back, D., and Pirmohamed, M. (2008). HIV-associated lipodystrophy: a review of underlying mechanisms and therapeutic options. *J. Antimicrob. Chemother.* *62*, 648–660.
- Mandriota, S.J., Jussila, L., Jeltsch, M., Compagni, A., Baetens, D., Prevo, R., Banerji, S., Huarte, J., Montesano, R., Jackson, D.G., et al. (2001). Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. *EMBO J.* *20*, 672–682.
- Mansell, P.I., Fellows, I.W., MacDonald, I.A., and Allison, S.P. (1990). Defect in thermoregulation in malnutrition reversed by weight gain. Physiological mechanisms and clinical importance. *Q. J. Med.* *76*, 817–829.
- Marchiq, I., Le Floch, R., Roux, D., Simon, M.-P., and Pouyssegur, J. (2015). Genetic disruption of lactate/H⁺ symporters (MCTs) and their subunit CD147/BASIGIN sensitizes glycolytic tumor cells to phenformin. *Cancer Res.* *75*, 171–180.
- Marcinkiewicz, A., Gauthier, D., Garcia, A., and Brasaemle, D.L. (2006). The phosphorylation of serine 492 of perilipin a directs lipid droplet fragmentation and dispersion. *J. Biol. Chem.* *281*, 11901–11909.
- Marcucci, F., Bellone, M., Caserta, C.A., and Corti, A. (2014). Pushing tumor cells towards a malignant phenotype: stimuli from the microenvironment, intercellular communications and alternative roads. *Int. J. Cancer* *135*, 1265–1276.
- Markan, K.R., Naber, M.C., Ameka, M.K., Anderegg, M.D., Mangelsdorf, D.J., Kliewer, S.A., Mohammadi, M., and Potthoff, M.J. (2014). Circulating FGF21 is liver derived and enhances glucose uptake during refeeding and overfeeding. *Diabetes* *63*, 4057–4063.
- van Marken Lichtenbelt, W.D., and Schrauwen, P. (2011). Implications of nonshivering thermogenesis for energy balance regulation in humans. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* *301*, R285–296.
- van Marken Lichtenbelt, W.D., Vanhommel, J.W., Smulders, N.M., Drossaerts, J.M.A.F.L., Kemerink, G.J., Bouvy, N.D., Schrauwen, P., and Teule, G.J.J. (2009). Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N. Engl. J. Med.* *360*, 1500–1508.
- Markowitz, J., Wesolowski, R., Papenfuss, T., Brooks, T.R., and Carson, W.E. (2013). Myeloid-derived suppressor cells in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* *140*, 13–21.
- Martínez, A., Vos, M., Guédez, L., Kaur, G., Chen, Z., Garayoa, M., Pío, R., Moody, T., Stetler-Stevenson, W.G., Kleinman, H.K., et al. (2002). The effects of adrenomedullin overexpression in breast tumor cells. *J. Natl. Cancer Inst.* *94*, 1226–1237.
- Martínez, A., Oh, H.-R., Unsworth, E.J., Bregonzio, C., Saavedra, J.M., Stetler-Stevenson, W.G., and Cuttitta, F. (2004). Matrix metalloproteinase-2 cleavage of adrenomedullin produces a vasoconstrictor out of a vasodilator. *Biochem. J.* *383*, 413–418.
- Martinson, H.A., Jindal, S., Durand-Rougely, C., Borges, V.F., and Schedin, P. (2015). Wound healing-like immune program facilitates postpartum mammary gland involution and tumor progression. *Int. J. Cancer* *136*, 1803–1813.

- Mathews, L.S., and Vale, W.W. (1991). Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase. *Cell* 65, 973–982.
- Matros, E., Wang, Z.C., Lodeiro, G., Miron, A., Iglehart, J.D., and Richardson, A.L. (2005). BRCA1 promoter methylation in sporadic breast tumors: relationship to gene expression profiles. *Breast Cancer Res. Treat.* 91, 179–186.
- Matzuk, M.M., Finegold, M.J., Mather, J.P., Krummen, L., Lu, H., and Bradley, A. (1994). Development of cancer cachexia-like syndrome and adrenal tumors in inhibin-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 8817–8821.
- Maumus, M., Sengenès, C., Decaunes, P., Zakaroff-Girard, A., Bourlier, V., Lafontan, M., Galitzky, J., and Bouloumié, A. (2008). Evidence of in situ proliferation of adult adipose tissue-derived progenitor cells: influence of fat mass microenvironment and growth. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93, 4098–4106.
- Maumus, M., Peyrafitte, J.-A., D'Angelo, R., Fournier-Wirth, C., Bouloumié, A., Casteilla, L., Sengenès, C., and Bourin, P. (2011). Native human adipose stromal cells: localization, morphology and phenotype. *Int J Obes (Lond)* 35, 1141–1153.
- McBeath, R., Pirone, D.M., Nelson, C.M., Bhadriraju, K., and Chen, C.S. (2004). Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev. Cell* 6, 483–495.
- McComsey, G.A., Paulsen, D.M., Lonergan, J.T., Hessenthaler, S.M., Hoppel, C.L., Williams, V.C., Fisher, R.L., Cherry, C.L., White-Owen, C., Thompson, K.A., et al. (2005). Improvements in lipoatrophy, mitochondrial DNA levels and fat apoptosis after replacing stavudine with abacavir or zidovudine. *AIDS* 19, 15–23.
- McConnell, B.B., and Yang, V.W. (2010). Mammalian Krüppel-like factors in health and diseases. *Physiol. Rev.* 90, 1337–1381.
- McDaniel, S.M., Rumer, K.K., Biroc, S.L., Metz, R.P., Singh, M., Porter, W., and Schedin, P. (2006). Remodeling of the mammary microenvironment after lactation promotes breast tumor cell metastasis. *Am. J. Pathol.* 168, 608–620.
- McDonald, R.B., Horwitz, B.A., Hamilton, J.S., and Stern, J.S. (1988). Cold- and norepinephrine-induced thermogenesis in younger and older Fischer 344 rats. *Am. J. Physiol.* 254, R457-462.
- McKeon, C., and Pham, T. (1991). Transactivation of the human insulin receptor gene by the CAAT/enhancer binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 174, 721–728.
- Mego, M., Mani, S.A., and Cristofanilli, M. (2010). Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer—clinical applications. *Nat Rev Clin Oncol* 7, 693–701.
- Merdad, A., Karim, S., Schulten, H.-J., Dallol, A., Buhmeida, A., Al-Thubaity, F., Gari, M.A., Chaudhary, A.G., Abuzenadah, A.M., and Al-Qahtani, M.H. (2014). Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer: MMP-9 as a potential biomarker for cancer invasion and metastasis. *Anticancer Res.* 34, 1355–1366.
- Metzner (1890). Ueber die Beziehungen der Granul zum Fettansatz. Cited by Shaw, H.B. (1901) *J. Anat. Physiol.*, 36:l-13.
- Miles, P.D., Romeo, O.M., Higo, K., Cohen, A., Rafaat, K., and Olefsky, J.M. (1997). TNF-alpha-induced insulin resistance in vivo and its prevention by troglitazone. *Diabetes* 46, 1678–1683.
- Miller, M.J., Martínez, A., Unsworth, E.J., Thiele, C.J., Moody, T.W., Elsasser, T., and Cuttitta, F. (1996). Adrenomedullin expression in human tumor cell lines. Its potential role as an autocrine growth factor. *J. Biol. Chem.* 271, 23345–23351.
- Mills, E.L., Pierce, K.A., Jedrychowski, M.P., Garrity, R., Winther, S., Vidoni, S., Yoneshiro, T., Spinelli, J.B., Lu, G.Z., Kazak, L., et al. (2018). Accumulation of succinate controls activation of adipose tissue thermogenesis. *Nature* 560, 102–106.

- Minamino, T., Orimo, M., Shimizu, I., Kunieda, T., Yokoyama, M., Ito, T., Nojima, A., Nabetani, A., Oike, Y., Matsubara, H., et al. (2009). A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nat. Med.* *15*, 1082–1087.
- Miseki, T., Kawakami, H., Natsuizaka, M., Darmanin, S., Cui, H.Y., Chen, J., Fu, Q., Okada, F., Shindo, M., Higashino, F., et al. (2007). Suppression of tumor growth by intra-muscular transfer of naked DNA encoding adrenomedullin antagonist. *Cancer Gene Ther.* *14*, 39–44.
- Misra, A., and Garg, A. (2003). Clinical features and metabolic derangements in acquired generalized lipodystrophy: case reports and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* *82*, 129–146.
- Misra, A., Peethambaram, A., and 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.
- Miyazono, K., Kamiya, Y., and Morikawa, M. (2010). Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J. Biochem.* *147*, 35–51.
- Miyoshi, H., Souza, S.C., Zhang, H.-H., Strissel, K.J., Christoffolete, M.A., Kovsan, J., Rudich, A., Kraemer, F.B., Bianco, A.C., Obin, M.S., et al. (2006). Perilipin promotes hormone-sensitive lipase-mediated adipocyte lipolysis via phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. *J. Biol. Chem.* *281*, 15837–15844.
- Modica, S., Straub, L.G., Balaz, M., Sun, W., Varga, L., Stefanicka, P., Profant, M., Simon, E., Neubauer, H., Ukropcova, B., et al. (2016). Bmp4 Promotes a Brown to White-like Adipocyte Shift. *Cell Rep* *16*, 2243–2258.
- Mohammed, Z.M.A., Going, J.J., Edwards, J., Elsberger, B., and McMillan, D.C. (2013). The relationship between lymphocyte subsets and clinico-pathological determinants of survival in patients with primary operable invasive ductal breast cancer. *Br. J. Cancer* *109*, 1676–1684.
- Mohan, A., Asselin, J., Sargent, I.L., Groome, N.P., and Muttukrishna, S. (2001). Effect of cytokines and growth factors on the secretion of inhibin A, activin A and follistatin by term placental villous trophoblasts in culture. *Eur. J. Endocrinol.* *145*, 505–511.
- Mohyeldin, A., Garzón-Muvdi, T., and Quiñones-Hinojosa, A. (2010). Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell* *7*, 150–161.
- Molina, J.-M., Cohen, C., Katlama, C., Grinsztejn, B., Timerman, A., Pedro, R. de J., Vangeneugden, T., Miralles, D., Meyer, S.D., Parys, W., et al. (2007). Safety and efficacy of darunavir (TMC114) with low-dose ritonavir in treatment-experienced patients: 24-week results of POWER 3. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* *46*, 24–31.
- Mondal, D., Larussa, V.F., and Agrawal, K.C. (2001). Synergistic antiadipogenic effects of HIV type 1 protease inhibitors with tumor necrosis factor alpha: suppression of extracellular insulin action mediated by extracellular matrix-degrading proteases. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *17*, 1569–1584.
- Moore, H.-P.H., Silver, R.B., Mottillo, E.P., Bernlohr, D.A., and Granneman, J.G. (2005). Perilipin targets a novel pool of lipid droplets for lipolytic attack by hormone-sensitive lipase. *J. Biol. Chem.* *280*, 43109–43120.
- Morawietz, H., Rueckschloss, U., Niemann, B., Duerrschmidt, N., Galle, J., Hakim, K., Zerkowski, H.R., Sawamura, T., and Holtz, J. (1999). Angiotensin II induces LOX-1, the human endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Circulation* *100*, 899–902.
- Mori, M., Nakagami, H., Rodriguez-Araujo, G., Nimura, K., and Kaneda, Y. (2012). Essential role for miR-196a in brown adipogenesis of white fat progenitor cells. *PLoS Biol.* *10*, e1001314.
- Mori, T., Sakaue, H., Iguchi, H., Gomi, H., Okada, Y., Takashima, Y., Nakamura, K., Nakamura, T., Yamauchi, T., Kubota, N., et al. (2005). Role of Krüppel-like factor 15 (KLF15) in transcriptional regulation of adipogenesis. *J. Biol. Chem.* *280*, 12867–12875.
- Morishita, K. (2007). Leukemogenesis of the EVI1/MEL1 gene family. *Int. J. Hematol.* *85*, 279–286.

- Moro, C., Galitzky, J., Sengenès, C., Crampes, F., Lafontan, M., and Berlan, M. (2004). Functional and pharmacological characterization of the natriuretic peptide-dependent lipolytic pathway in human fat cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *308*, 984–992.
- Morrison, R.F., and Farmer, S.R. (1999). Role of PPAR γ in regulating a cascade expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, p18(INK4c) and p21(Waf1/Cip1), during adipogenesis. *J. Biol. Chem.* *274*, 17088–17097.
- Mudhasani, R., Puri, V., Hoover, K., Czech, M.P., Imbalzano, A.N., and Jones, S.N. (2011). Dicer is required for the formation of white but not brown adipose tissue. *J. Cell. Physiol.* *226*, 1399–1406.
- Murata, H., Hruz, P.W., and Mueckler, M. (2002). Indinavir inhibits the glucose transporter isoform Glut4 at physiologic concentrations. *AIDS* *16*, 859–863.
- Musri, M.M., Corominola, H., Casamitjana, R., Gomis, R., and Párrizas, M. (2006). Histone H3 lysine 4 dimethylation signals the transcriptional competence of the adiponectin promoter in preadipocytes. *J. Biol. Chem.* *281*, 17180–17188.
- Mutch, N.J., Wilson, H.M., and Booth, N.A. (2001). Plasminogen activator inhibitor-1 and haemostasis in obesity. *Proc Nutr Soc* *60*, 341–347.
- Mynarcik, D.C., Combs, T., McNurlan, M.A., Scherer, P.E., Komaroff, E., and Gelato, M.C. (2002). Adiponectin and leptin levels in HIV-infected subjects with insulin resistance and body fat redistribution. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* *31*, 514–520.
- Naghavi, M., Libby, P., Falk, E., Casscells, S.W., Litovsky, S., Rumberger, J., Badimon, J.J., Stefanadis, C., Moreno, P., Pasterkamp, G., et al. (2003). From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. *Circulation* *108*, 1664–1672.
- Nagy, G.S., Tsiodras, S., Martin, L.D., Avihingsanon, A., Gavrila, A., Hsu, W.C., Karchmer, A.W., and Mantzoros, C.S. (2003). Human immunodeficiency virus type 1-related lipodystrophy and lipohypertrophy are associated with serum concentrations of leptin. *Clin. Infect. Dis.* *36*, 795–802.
- Nakamura, M., Han, B., Nunobiki, O., and Kakudo, K. (2006). Adrenomedullin: a tumor progression factor via angiogenic control. *Curr Cancer Drug Targets* *6*, 635–643.
- Nakayama, M., Takahashi, K., Murakami, O., Murakami, H., Sasano, H., Shirato, K., and Shibahara, S. (1999). Adrenomedullin in monocytes and macrophages: possible involvement of macrophage-derived adrenomedullin in atherogenesis. *Clin. Sci.* *97*, 247–251.
- Naveiras, O., Nardi, V., Wenzel, P.L., Hauschka, P.V., Fahey, F., and Daley, G.Q. (2009). Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature* *460*, 259–263.
- Nawrocki, A.R., Rajala, M.W., Tomas, E., Pajvani, U.B., Saha, A.K., Trumbauer, M.E., Pang, Z., Chen, A.S., Ruderman, N.B., Chen, H., et al. (2006). Mice lacking adiponectin show decreased hepatic insulin sensitivity and reduced responsiveness to peroxisome proliferator-activated receptor γ agonists. *J. Biol. Chem.* *281*, 2654–2660.
- Nedergaard, J., and Cannon, B. (2013). UCP1 mRNA does not produce heat. *Biochim. Biophys. Acta* *1831*, 943–949.
- Nelson, B.H. (2010). CD20+ B cells: the other tumor-infiltrating lymphocytes. *J. Immunol.* *185*, 4977–4982.
- Nguyen, L.T., and Ohashi, P.S. (2015). Clinical blockade of PD1 and LAG3—potential mechanisms of action. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 45–56.
- Nicholls, M.G. (2004). Hemodynamic and hormonal actions of adrenomedullin. *Braz. J. Med. Biol. Res.* *37*, 1247–1253.
- Nicholls, D., Cunningham, S., and Wiesinger, H. (1986). Mechanisms of thermogenesis in brown adipose tissue. *Biochem. Soc. Trans.* *14*, 223–225.

Nieman, K.M., Kenny, H.A., Penicka, C.V., Ladanyi, A., Buell-Gutbrod, R., Zillhardt, M.R., Romero, I.L., Carey, M.S., Mills, G.B., Hotamisligil, G.S., et al. (2011). Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat. Med.* *17*, 1498–1503.

Nikitenko, L.L., Fox, S.B., Kehoe, S., Rees, M.C.P., and Bicknell, R. (2006). Adrenomedullin and tumour angiogenesis. *Br. J. Cancer* *94*, 1–7.

Nikitenko, L.L., Leek, R., Henderson, S., Pillay, N., Turley, H., Generali, D., Gunningham, S., Morrin, H.R., Pellagatti, A., Rees, M.C.P., et al. (2013). The G-protein-coupled receptor CLR is upregulated in an autocrine loop with adrenomedullin in clear cell renal cell carcinoma and associated with poor prognosis. *Clin. Cancer Res.* *19*, 5740–5748.

Nishikimi, T., Yoshihara, F., Mori, Y., Kangawa, K., and Matsuoka, H. (2003). Cardioprotective effect of adrenomedullin in heart failure. *Hypertens. Res.* *26 Suppl*, S121-127.

Nishimatsu, H., Suzuki, E., Nagata, D., Moriyama, N., Satonaka, H., Walsh, K., Sata, M., Kangawa, K., Matsuo, H., Goto, A., et al. (2001). Adrenomedullin induces endothelium-dependent vasorelaxation via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway in rat aorta. *Circ. Res.* *89*, 63–70.

Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Eto, K., Yamashita, H., Ohsugi, M., Otsu, M., Hara, K., Ueki, K., Sugiura, S., et al. (2009). CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat. Med.* *15*, 914–920.

Noël, D., Caton, D., Roche, S., Bony, C., Lehmann, S., Casteilla, L., Jorgensen, C., and Cousin, B. (2008). Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal-stromal cells despite similar differentiation potentials. *Exp. Cell Res.* *314*, 1575–1584.

Norman, D.C., Grahn, D., and Yoshikawa, T.T. (1985). Fever and aging. *J Am Geriatr Soc* *33*, 859–863.

Nowell, P.C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* *194*, 23–28.

Ntambi, J.M., and Young-Cheul, K. (2000). Adipocyte differentiation and gene expression. *J. Nutr.* *130*, 3122S-3126S.

Nunes, S.S., Maijub, J.G., Krishnan, L., Ramakrishnan, V.M., Clayton, L.R., Williams, S.K., Hoying, J.B., and Boyd, N.L. (2013). Generation of a functional liver tissue mimic using adipose stromal vascular fraction cell-derived vasculatures. *Sci Rep* *3*, 2141.

Nwabo Kamdje, A.H., Seke Etet, P.F., Vecchio, L., Tagne, R.S., Amvene, J.M., Muller, J.-M., Krampera, M., and Lukong, K.E. (2014). New targeted therapies for breast cancer: A focus on tumor microenvironmental signals and chemoresistant breast cancers. *World J Clin Cases* *2*, 769–786.

Oehler, M.K., Fischer, D.C., Orłowska-Volk, M., Herrle, F., Kieback, D.G., Rees, M.C.P., and Bicknell, R. (2003). Tissue and plasma expression of the angiogenic peptide adrenomedullin in breast cancer. *Br. J. Cancer* *89*, 1927–1933.

Ogino, H., Yano, S., Kakiuchi, S., Muguruma, H., Ikuta, K., Hanibuchi, M., Uehara, H., Tsuchida, K., Sugino, H., and Sone, S. (2008). Follistatin suppresses the production of experimental multiple-organ metastasis by small cell lung cancer cells in natural killer cell-depleted SCID mice. *Clin. Cancer Res.* *14*, 660–667.

Oh, D.Y., Morinaga, H., Talukdar, S., Bae, E.J., and Olefsky, J.M. (2012). Increased macrophage migration into adipose tissue in obese mice. *Diabetes* *61*, 346–354.

Ohno, H., Shinoda, K., Spiegelman, B.M., and Kajimura, S. (2012). PPAR γ agonists induce a white-to-brown fat conversion through stabilization of PRDM16 protein. *Cell Metab.* *15*, 395–404.

Oishi, Y., Manabe, I., Tobe, K., Tsushima, K., Shindo, T., Fujiu, K., Nishimura, G., Maemura, K., Yamauchi, T., Kubota, N., et al. (2005). Krüppel-like transcription factor KLF5 is a key regulator of adipocyte differentiation. *Cell Metab.* *1*, 27–39.

Okumura, T., Ohuchida, K., Sada, M., Abe, T., Endo, S., Koikawa, K., Iwamoto, C., Miura, D., Mizuuchi, Y., Moriyama, T., et al. (2017). Extra-pancreatic invasion induces lipolytic and fibrotic changes in the adipose

microenvironment, with released fatty acids enhancing the invasiveness of pancreatic cancer cells. *Oncotarget* 8, 18280–18295.

Olkhanud, P.B., Damdinsuren, B., Bodogai, M., Gress, R.E., Sen, R., Wejksza, K., Malchinkhuu, E., Wersto, R.P., and Biragyn, A. (2011). Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting CD4⁺ T cells to T-regulatory cells. *Cancer Res.* 71, 3505–3515.

Olsson, H., and Belfrage, P. (1987). The regulatory and basal phosphorylation sites of hormone-sensitive lipase are dephosphorylated by protein phosphatase-1, 2A and 2C but not by protein phosphatase-2B. *Eur. J. Biochem.* 168, 399–405.

Oñate, B., Vilahur, G., Camino-López, S., Díez-Caballero, A., Ballesta-López, C., Ybarra, J., Moscatiello, F., Herrero, J., and Badimon, L. (2013). Stem cells isolated from adipose tissue of obese patients show changes in their transcriptomic profile that indicate loss in stemcellness and increased commitment to an adipocyte-like phenotype. *BMC Genomics* 14, 625.

Ono, A. (2009). HIV-1 Assembly at the Plasma Membrane: Gag Trafficking and Localization. *Future Virol* 4, 241–257.

O'Rourke, R.W., White, A.E., Metcalf, M.D., Olivas, A.S., Mitra, P., Larison, W.G., Cheang, E.C., Varlamov, O., Corless, C.L., Roberts, C.T., et al. (2011). Hypoxia-induced inflammatory cytokine secretion in human adipose tissue stromovascular cells. *Diabetologia* 54, 1480–1490.

Ortega, F.J., Moreno-Navarrete, J.M., Pardo, G., Sabater, M., Hummel, M., Ferrer, A., Rodriguez-Hermosa, J.I., Ruiz, B., Ricart, W., Peral, B., et al. (2010). MiRNA expression profile of human subcutaneous adipose and during adipocyte differentiation. *PLoS ONE* 5, e9022.

Ortega Martinez de Victoria, E., Xu, X., Koska, J., Francisco, A.M., Scalise, M., Ferrante, A.W., and Krakoff, J. (2009). Macrophage content in subcutaneous adipose tissue: associations with adiposity, age, inflammatory markers, and whole-body insulin action in healthy Pima Indians. *Diabetes* 58, 385–393.

Osako, T., Iwase, T., Ushijima, M., Horii, R., Fukami, Y., Kimura, K., Matsuura, M., and Akiyama, F. (2014). Incidence and prediction of invasive disease and nodal metastasis in preoperatively diagnosed ductal carcinoma in situ. *Cancer Sci.* 105, 576–582.

Osborn, O., and Olefsky, J.M. (2012). The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nat. Med.* 18, 363–374.

Oskowitz, A.Z., Lu, J., Penforntis, P., Ylostalo, J., McBride, J., Flemington, E.K., Prockop, D.J., and Pochampally, R. (2008). Human multipotent stromal cells from bone marrow and microRNA: regulation of differentiation and leukemia inhibitory factor expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 18372–18377.

Ostman, A., and Augsten, M. (2009). Cancer-associated fibroblasts and tumor growth--bystanders turning into key players. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 19, 67–73.

Ouellet, V., Labbé, S.M., Blondin, D.P., Phoenix, S., Guérin, B., Haman, F., Turcotte, E.E., Richard, D., and Carpentier, A.C. (2012). Brown adipose tissue oxidative metabolism contributes to energy expenditure during acute cold exposure in humans. *J. Clin. Invest.* 122, 545–552.

Oxburgh, L., Chu, G.C., Michael, S.K., and Robertson, E.J. (2004). TGFbeta superfamily signals are required for morphogenesis of the kidney mesenchyme progenitor population. *Development* 131, 4593–4605.

Ozet, A., Arpacı, F., Yilmaz, M.I., Ayta, H., Ozturk, B., Komurcu, S., Yavuz, A.A., Tezcan, Y., and Acikel, C. (2001). Effects of tamoxifen on the serum leptin level in patients with breast cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 31, 424–427.

Pacenti, M., Barzon, L., Favaretto, F., Fincati, K., Romano, S., Milan, G., Vettor, R., and Palù, G. (2006). Microarray analysis during adipogenesis identifies new genes altered by antiretroviral drugs. *AIDS* 20, 1691–1705.

Paglialunga, S., Fisette, A., Yan, Y., Deshaies, Y., Brouillette, J.-F., Pekna, M., and Cianflone, K. (2008). Acylation-stimulating protein deficiency and altered adipose tissue in alternative complement pathway knockout mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 294, E521-529.

Pagnon, J., Matzaris, M., Stark, R., Meex, R.C.R., Macaulay, S.L., Brown, W., O'Brien, P.E., Tiganis, T., and Watt, M.J. (2012). Identification and functional characterization of protein kinase A phosphorylation sites in the major lipolytic protein, adipose triglyceride lipase. *Endocrinology* *153*, 4278–4289.

Pardoll, D.M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 252–264.

Parekh, N., Chandran, U., and Bandera, E.V. (2012). Obesity in cancer survival. *Annu. Rev. Nutr.* *32*, 311–342.

Park, B.O., Ahrends, R., and Teruel, M.N. (2012). Consecutive positive feedback loops create a bistable switch that controls preadipocyte-to-adipocyte conversion. *Cell Rep* *2*, 976–990.

Park, C.H., Bergsagel, D.E., and McCulloch, E.A. (1971). Mouse myeloma tumor stem cells: a primary cell culture assay. *J. Natl. Cancer Inst.* *46*, 411–422.

Park, H.Y., Kwon, H.M., Lim, H.J., Hong, B.K., Lee, J.Y., Park, B.E., Jang, Y., Cho, S.Y., and Kim, H.S. (2001). Potential role of leptin in angiogenesis: leptin induces endothelial cell proliferation and expression of matrix metalloproteinases in vivo and in vitro. *Exp. Mol. Med.* *33*, 95–102.

Park, J., Euhus, D.M., and Scherer, P.E. (2011). Paracrine and endocrine effects of adipose tissue on cancer development and progression. *Endocr. Rev.* *32*, 550–570.

Partanen, T.A., Alitalo, K., and Miettinen, M. (1999). Lack of lymphatic vascular specificity of vascular endothelial growth factor receptor 3 in 185 vascular tumors. *Cancer* *86*, 2406–2412.

Paulauskis, J.D., and Sul, H.S. (1988). Cloning and expression of mouse fatty acid synthase and other specific mRNAs. Developmental and hormonal regulation in 3T3-L1 cells. *J. Biol. Chem.* *263*, 7049–7054.

Payne, V.A., Grimsey, N., Tuthill, A., Virtue, S., Gray, S.L., Dalla Nora, E., Semple, R.K., O'Rahilly, S., and Rochford, J.J. (2008). The human lipodystrophy gene BSCL2/seipin may be essential for normal adipocyte differentiation. *Diabetes* *57*, 2055–2060.

Pei, H., Yao, Y., Yang, Y., Liao, K., and Wu, J.-R. (2011). Krüppel-like factor KLF9 regulates PPAR γ transactivation at the middle stage of adipogenesis. *Cell Death Differ.* *18*, 315–327.

Peirce, V., Carobbio, S., and Vidal-Puig, A. (2014). The different shades of fat. *Nature* *510*, 76–83.

Pépin, J. (2012). The expansion of HIV-1 in colonial Leopoldville, 1950s: driven by STDs or STD control? *Sex Transm Infect* *88*, 307–312.

Pepper, M.S., Tille, J.-C., Nisato, R., and Skobe, M. (2003). Lymphangiogenesis and tumor metastasis. *Cell Tissue Res.* *314*, 167–177.

Pérez-Castells, J., Martín-Santamaría, S., Nieto, L., Ramos, A., Martínez, A., Pascual-Teresa, B. de, and Jiménez-Barbero, J. (2012). Structure of micelle-bound adrenomedullin: a first step toward the analysis of its interactions with receptors and small molecules. *Biopolymers* *97*, 45–53.

Permana, P.A., Nair, S., Lee, Y.-H., Luczy-Bachman, G., Vozarova De Courten, B., and Tataranni, P.A. (2004). Subcutaneous abdominal preadipocyte differentiation in vitro inversely correlates with central obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *286*, E958-962.

Petrovic, N., Walden, T.B., Shabalina, I.G., Timmons, J.A., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2010). Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) 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*, 7153–7164.

Petruzzelli, M., Schweiger, M., Schreiber, R., Campos-Olivas, R., Tsoli, M., Allen, J., Swarbrick, M., Rose-John, S., Rincon, M., Robertson, G., et al. (2014). A switch from white to brown fat increases energy expenditure in cancer-associated cachexia. *Cell Metab.* *20*, 433–447.

- Pisani, D.F., Djedaini, M., Beranger, G.E., Elabd, C., Scheideler, M., Ailhaud, G., and Amri, E.-Z. (2011). Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells into “Brite” (Brown-in-White) Adipocytes. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2, 87.
- Plaisant, M., Giorgetti-Peraldi, S., Gabrielson, M., Loubat, A., Dani, C., and Peraldi, P. (2011). Inhibition of hedgehog signaling decreases proliferation and clonogenicity of human mesenchymal stem cells. *PLoS ONE* 6, e16798.
- Plaks, V., Kong, N., and Werb, Z. (2015). The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells? *Cell Stem Cell* 16, 225–238.
- Plikus, M.V., Guerrero-Juarez, C.F., Ito, M., Li, Y.R., Dedhia, P.H., Zheng, Y., Shao, M., Gay, D.L., Ramos, R., Hsi, T.-C., et al. (2017). Regeneration of fat cells from myofibroblasts during wound healing. *Science* 355, 748–752.
- Poissonnet, C.M., Burdi, A.R., and Garn, S.M. (1984). The chronology of adipose tissue appearance and distribution in the human fetus. *Early Hum. Dev.* 10, 1–11.
- Poitout, V., and Robertson, R.P. (2008). Glucolipototoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr. Rev.* 29, 351–366.
- Polanska, U.M., and Orimo, A. (2013). Carcinoma-associated fibroblasts: non-neoplastic tumour-promoting mesenchymal cells. *J. Cell. Physiol.* 228, 1651–1657.
- Polyak, K. (2001). On the birth of breast cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1552, 1–13.
- Polyak, K. (2007). Breast cancer stem cells: a case of mistaken identity? *Stem Cell Rev* 3, 107–109.
- Pond, C.M. (1992). An evolutionary and functional view of mammalian adipose tissue. *Proc Nutr Soc* 51, 367–377.
- Poole, S., and Stephenson, J.D. (1977). Body temperature regulation and thermoneutrality in rats. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci* 62, 143–149.
- Pouliot, M.C., Després, J.P., Moorjani, S., Lupien, P.J., Tremblay, A., Nadeau, A., and Bouchard, C. (1991). Regional variation in adipose tissue lipoprotein lipase activity: association with plasma high density lipoprotein levels. *Eur. J. Clin. Invest.* 21, 398–405.
- Poyner, D.R., Sexton, P.M., Marshall, I., Smith, D.M., Quirion, R., Born, W., Muff, R., Fischer, J.A., and Foord, S.M. (2002). International Union of Pharmacology. XXXII. The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors. *Pharmacol. Rev.* 54, 233–246.
- Prabu-Jeyabalan, M., Nalivaika, E., and Schiffer, C.A. (2002). Substrate shape determines specificity of recognition for HIV-1 protease: analysis of crystal structures of six substrate complexes. *Structure* 10, 369–381.
- Prado, M.A., Evans-Bain, B., and Dickerson, I.M. (2002). Receptor component protein (RCP): a member of a multi-protein complex required for G-protein-coupled signal transduction. *Biochem. Soc. Trans.* 30, 460–464.
- Prendergast, G.C. (2008). Immune escape as a fundamental trait of cancer: focus on IDO. *Oncogene* 27, 3889–3900.
- Prins, J.B. (2002). Adipose tissue as an endocrine organ. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 16, 639–651.
- Prunet-Marcassus, B., Cousin, B., Caton, D., André, M., Pénicaud, L., and Casteilla, L. (2006). From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: site-specific differences. *Exp. Cell Res.* 312, 727–736.
- Puigserver, P., and Spiegelman, B.M. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr. Rev.* 24, 78–90.
- Puigserver, P., Wu, Z., Park, C.W., Graves, R., Wright, M., and Spiegelman, B.M. (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92, 829–839.

- Qi, T., Christopoulos, G., Bailey, R.J., Christopoulos, A., Sexton, P.M., and Hay, D.L. (2008). Identification of N-terminal receptor activity-modifying protein residues important for calcitonin gene-related peptide, adrenomedullin, and amylin receptor function. *Mol. Pharmacol.* **74**, 1059–1071.
- Qian, S.-W., Tang, Y., Li, X., Liu, Y., Zhang, Y.-Y., Huang, H.-Y., Xue, R.-D., Yu, H.-Y., Guo, L., Gao, H.-D., et al. (2013). BMP4-mediated brown fat-like changes in white adipose tissue alter glucose and energy homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, E798-807.
- Qiao, L., Zou, C., van der Westhuyzen, D.R., and Shao, J. (2008). Adiponectin reduces plasma triglyceride by increasing VLDL triglyceride catabolism. *Diabetes* **57**, 1824–1833.
- Quetelet, L.A. (1994). A treatise on man and the development of his faculties. 1842. *Obes. Res.* **2**, 72–85.
- Ragolia, L., and Begum, N. (1998). Protein phosphatase-1 and insulin action. *Mol. Cell. Biochem.* **182**, 49–58.
- Rahmouni, K., and Sigmund, C.D. (2008). Id3, E47, and SREBP-1c: fat factors controlling adiponectin expression. *Circ. Res.* **103**, 565–567.
- Ramel, M.-C., and Hill, C.S. (2012). Spatial regulation of BMP activity. *FEBS Lett.* **586**, 1929–1941.
- Ravaud, C., Esteve, D., Villageois, P., Bouloumie, A., Dani, C., and Ladoux, A. (2015). IER3 Promotes Expansion of Adipose Progenitor Cells in Response to Changes in Distinct Microenvironmental Effectors. *Stem Cells* **33**, 2564–2573.
- Ravussin, Y., Xiao, C., Gavrilova, O., and Reitman, M.L. (2014). Effect of intermittent cold exposure on brown fat activation, obesity, and energy homeostasis in mice. *PLoS ONE* **9**, e85876.
- Razanajaona, D., Joguet, S., Ay, A.-S., Treilleux, I., Goddard-Léon, S., Bartholin, L., and Rimokh, R. (2007). Silencing of FLRG, an antagonist of activin, inhibits human breast tumor cell growth. *Cancer Res.* **67**, 7223–7229.
- Razani, B., Rubin, C.S., and Lisanti, M.P. (1999). Regulation of cAMP-mediated signal transduction via interaction of caveolins with the catalytic subunit of protein kinase A. *J. Biol. Chem.* **274**, 26353–26360.
- Reaven, G.M. (1988). Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* **37**, 1595–1607.
- Rehman, J., Traktuev, D., Li, J., Merfeld-Clauss, S., Temm-Grove, C.J., Bovenkerk, J.E., Pell, C.L., Johnstone, B.H., Considine, R.V., and March, K.L. (2004). Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* **109**, 1292–1298.
- Renehan, A.G., Tyson, M., Egger, M., Heller, R.F., and Zwahlen, M. (2008). Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet* **371**, 569–578.
- Rey, S., and Semenza, G.L. (2010). Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling. *Cardiovasc. Res.* **86**, 236–242.
- Ricquier, D., and Kader, J.C. (1976). Mitochondrial protein alteration in active brown fat: a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **73**, 577–583.
- Ricquier, D., Nechad, M., and Mory, G. (1982). Ultrastructural and biochemical characterization of human brown adipose tissue in pheochromocytoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **54**, 803–807.
- Rigamonti, A., Brennand, K., Lau, F., and Cowan, C.A. (2011). Rapid cellular turnover in adipose tissue. *PLoS ONE* **6**, e17637.
- Robidoux, J., Cao, W., Quan, H., Daniel, K.W., Moukdar, F., Bai, X., Floering, L.M., and Collins, S. (2005). Selective activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 and p38alpha MAP kinase is essential for cyclic AMP-dependent UCP1 expression in adipocytes. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 5466–5479.
- Rodbell, M., and Jones, A.B. (1966). Metabolism of isolated fat cells. 3. The similar inhibitory action of phospholipase C (*Clostridium perfringens* alpha toxin) and of insulin on lipolysis stimulated by lipolytic hormones and theophylline. *J. Biol. Chem.* **241**, 140–142.

Rodeheffer, M.S., Birsoy, K., and Friedman, J.M. (2008). Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo. *Cell* *135*, 240–249.

Rodriguez, A.-M., Elabd, C., Delteil, F., Astier, J., Vernochet, C., Saint-Marc, P., Guesnet, J., Guezennec, A., Amri, E.-Z., Dani, C., et al. (2004). Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *315*, 255–263.

Rodriguez, A.-M., Pisani, D., Dechesne, C.A., Turc-Carel, C., Kurzenne, J.-Y., Wdziekonski, B., Villageois, A., Bagnis, C., Breittmayer, J.-P., Groux, H., et al. (2005). Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J. Exp. Med.* *201*, 1397–1405.

Rodríguez de la Concepción, M.L., Yubero, P., Domingo, J.C., Iglesias, R., Domingo, P., Villarroya, F., and Giral, M. (2005). Reverse transcriptase inhibitors alter uncoupling protein-1 and mitochondrial biogenesis in brown adipocytes. *Antivir. Ther. (Lond.)* *10*, 515–526.

Rogers, N.H., Landa, A., Park, S., and Smith, R.G. (2012). Aging leads to a programmed loss of brown adipocytes in murine subcutaneous white adipose tissue. *Aging Cell* *11*, 1074–1083.

Roh, J., Chang, C.L., Bhalla, A., Klein, C., and Hsu, S.Y.T. (2004). Intermedin is a calcitonin/calcitonin gene-related peptide family peptide acting through the calcitonin receptor-like receptor/receptor activity-modifying protein receptor complexes. *J. Biol. Chem.* *279*, 7264–7274.

Romanovsky, A.A. (2014). Skin temperature: its role in thermoregulation. *Acta Physiol (Oxf)* *210*, 498–507.

Rosen, E.D., Hsu, C.-H., Wang, X., Sakai, S., Freeman, M.W., Gonzalez, F.J., and Spiegelman, B.M. (2002). C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. *Genes Dev.* *16*, 22–26.

Rosenwald, M., Perdikari, A., Rüllicke, T., and Wolfrum, C. (2013). Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat. Cell Biol.* *15*, 659–667.

Ross, S.E., Hemati, N., Longo, K.A., Bennett, C.N., Lucas, P.C., Erickson, R.L., and MacDougald, O.A. (2000). Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science* *289*, 950–953.

Rothwell, N.J., and Stock, M.J. (1979). A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Nature* *281*, 31–35.

Roux, C., Pisani, D.F., Yahia, H.B., Djedaini, M., Beranger, G.E., Chambard, J.-C., Ambrosetti, D., Michiels, J.-F., Breuil, V., Ailhaud, G., et al. (2013). Chondrogenic potential of stem cells derived from adipose tissue: a powerful pharmacological tool. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *440*, 786–791.

Rubin, C.S., Hirsch, A., Fung, C., and Rosen, O.M. (1978). Development of hormone receptors and hormonal responsiveness in vitro. Insulin receptors and insulin sensitivity in the preadipocyte and adipocyte forms of 3T3-L1 cells. *J. Biol. Chem.* *253*, 7570–7578.

Rubio-Cabezas, O., Puri, V., Murano, I., Saudek, V., Semple, R.K., Dash, S., Hyden, C.S.S., Bottomley, W., Vigouroux, C., Magré, J., et al. (2009). Partial lipodystrophy and insulin resistant diabetes in a patient with a homozygous nonsense mutation in CIDEC. *EMBO Mol Med* *1*, 280–287.

Rydén, M., and Arner, P. (2007). Tumour necrosis factor-alpha in human adipose tissue -- from signalling mechanisms to clinical implications. *J. Intern. Med.* *262*, 431–438.

Sadur, C.N., and Eckel, R.H. (1982). Insulin stimulation of adipose tissue lipoprotein lipase. Use of the euglycemic clamp technique. *J. Clin. Invest.* *69*, 1119–1125.

Safford, K.M., Hicok, K.C., Safford, S.D., Halvorsen, Y.-D.C., Wilkison, W.O., Gimble, J.M., and Rice, H.E. (2002). Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *294*, 371–379.

Sagar, G., Sah, R.P., Javeed, N., Dutta, S.K., Smyrk, T.C., Lau, J.S., Giorgadze, N., Tchkonina, T., Kirkland, J.L., Chari, S.T., et al. (2016). Pathogenesis of pancreatic cancer exosome-induced lipolysis in adipose tissue. *Gut* *65*, 1165–1174.

Sakai, J., Rawson, R.B., Espenshade, P.J., Cheng, D., Seegmiller, A.C., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1998). Molecular identification of the sterol-regulated luminal protease that cleaves SREBPs and controls lipid composition of animal cells. *Mol. Cell* 2, 505–514.

Salans, L.B., Horton, E.S., and Sims, E.A. (1971). Experimental obesity in man: cellular character of the adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 50, 1005–1011.

Salgado, R., Denkert, C., Demaria, S., Sirtaine, N., Klauschen, F., Pruneri, G., Wienert, S., Van den Eynden, G., Baehner, F.L., Penault-Llorca, F., et al. (2015). The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann. Oncol.* 26, 259–271.

Samuelsson, L., Strömberg, K., Vikman, K., Bjursell, G., and Enerbäck, S. (1991). The CCAAT/enhancer binding protein and its role in adipocyte differentiation: evidence for direct involvement in terminal adipocyte development. *EMBO J.* 10, 3787–3793.

Sanada, Y., Yoshida, K., Konishi, K., Oeda, M., Ohara, M., and Tsutani, Y. (2006). Expression of gastric mucin MUC5AC and gastric transcription factor SOX2 in ampulla of Vater adenocarcinoma: comparison between expression patterns and histologic subtypes. *Oncol. Rep.* 15, 1157–1161.

Sanchez-Gurmaches, J., Hung, C.-M., Sparks, C.A., Tang, Y., Li, H., and Guertin, D.A. (2012). PTEN loss in the Myf5 lineage redistributes body fat and reveals subsets of white adipocytes that arise from Myf5 precursors. *Cell Metab.* 16, 348–362.

Sata, M., Kakoki, M., Nagata, D., Nishimatsu, H., Suzuki, E., Aoyagi, T., Sugiura, S., Kojima, H., Nagano, T., Kangawa, K., et al. (2000). Adrenomedullin and nitric oxide inhibit human endothelial cell apoptosis via a cyclic GMP-independent mechanism. *Hypertension* 36, 83–88.

Sato, R., Yang, J., Wang, X., Evans, M.J., Ho, Y.K., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1994). Assignment of the membrane attachment, DNA binding, and transcriptional activation domains of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1). *J. Biol. Chem.* 269, 17267–17273.

Savage, D.B., Sewter, C.P., Klenk, E.S., Segal, D.G., Vidal-Puig, A., Considine, R.V., and O’Rahilly, S. (2001). Resistin / Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans. *Diabetes* 50, 2199–2202.

Scarpace, P.J., Dove, J., and Matheny, M. (1996). Effects of age on beta adrenergic subtype activation of adenylyl cyclase in brown adipose tissue. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 213, 262–267.

Schedin, P., O’Brien, J., Rudolph, M., Stein, T., and Borges, V. (2007). Microenvironment of the involuting mammary gland mediates mammary cancer progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 12, 71–82.

Scheller, E.L., and Rosen, C.J. (2014). What’s the matter with MAT? Marrow adipose tissue, metabolism, and skeletal health. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1311, 14–30.

Scheller, E.L., Doucette, C.R., Learman, B.S., Cawthorn, W.P., Khandaker, S., Schell, B., Wu, B., Ding, S.-Y., Bredella, M.A., Fazeli, P.K., et al. (2015). Region-specific variation in the properties of skeletal adipocytes reveals regulated and constitutive marrow adipose tissues. *Nat Commun* 6, 7808.

Schipani, E., Ryan, H.E., Didrickson, S., Kobayashi, T., Knight, M., and Johnson, R.S. (2001). Hypoxia in cartilage: HIF-1alpha is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes Dev.* 15, 2865–2876.

Schmidt, B.A., and Horsley, V. (2013). Intradermal adipocytes mediate fibroblast recruitment during skin wound healing. *Development* 140, 1517–1527.

Schmit, J.C., and Weber, B. (1997). Recent advances in antiretroviral therapy and HIV infection monitoring. *Intervirology* 40, 304–321.

Schulz, T.J., Huang, T.L., Tran, T.T., Zhang, H., Townsend, K.L., Shadrach, J.L., Cerletti, M., McDougall, L.E., Giorgadze, N., Tchkonja, T., et al. (2011). Identification of inducible brown adipocyte progenitors residing in skeletal muscle and white fat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 143–148.

- Seale, P., Kajimura, S., Yang, W., Chin, S., Rohas, L.M., Uldry, M., Tavernier, G., Langin, D., and Spiegelman, B.M. (2007). Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell Metab.* 6, 38–54.
- Seale, P., Bjork, B., Yang, W., Kajimura, S., Chin, S., Kuang, S., Scimè, A., Devarakonda, S., Conroe, H.M., Erdjument-Bromage, H., et al. (2008). PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* 454, 961–967.
- Seale, P., Conroe, H.M., Estall, J., Kajimura, S., Frontini, A., Ishibashi, J., Cohen, P., Cinti, S., and Spiegelman, B.M. (2011). Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *J. Clin. Invest.* 121, 96–105.
- Sears, I.B., MacGinnitie, M.A., Kovacs, L.G., and Graves, R.A. (1996). Differentiation-dependent expression of the brown adipocyte uncoupling protein gene: regulation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Mol. Cell. Biol.* 16, 3410–3419.
- Seip, M. (1959). Lipodystrophy and gigantism with associated endocrine manifestations. A new diencephalic syndrome? *Acta Paediatr* 48, 555–574.
- Sengenès, C., Berlan, M., De Glisezinski, I., Lafontan, M., and Galitzky, J. (2000). Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes. *FASEB J.* 14, 1345–1351.
- Sengenès, C., Bouloumie, A., Hauner, H., Berlan, M., Busse, R., Lafontan, M., and Galitzky, J. (2003). Involvement of a cGMP-dependent pathway in the natriuretic peptide-mediated hormone-sensitive lipase phosphorylation in human adipocytes. *J. Biol. Chem.* 278, 48617–48626.
- Sengenès, C., Lolmède, K., Zakaroff-Girard, A., Busse, R., and Bouloumié, A. (2005). Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display distinct features from the adult mesenchymal and hematopoietic stem cells. *J. Cell. Physiol.* 205, 114–122.
- Sepe, A., Tchkonja, T., Thomou, T., Zamboni, M., and Kirkland, J.L. (2011). Aging and regional differences in fat cell progenitors - a mini-review. *Gerontology* 57, 66–75.
- Serradeil-Le Gal, C., Lafontan, M., Raufaste, D., Marchand, J., Pouzet, B., Casellas, P., Pascal, M., Maffrand, J.P., and Le Fur, G. (2000). Characterization of NPY receptors controlling lipolysis and leptin secretion in human adipocytes. *FEBS Lett.* 475, 150–156.
- Seufert, J., Lübben, G., Dietrich, K., and Bates, P.C. (2004). A comparison of the effects of thiazolidinediones and metformin on metabolic control in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Ther* 26, 805–818.
- Sevastianova, K., Sutinen, J., Kannisto, K., Hamsten, A., Ristola, M., and Yki-Järvinen, H. (2008). Adipose tissue inflammation and liver fat in patients with highly active antiretroviral therapy-associated lipodystrophy. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295, E85-91.
- Shalapour, S., and Karin, M. (2015). Immunity, inflammation, and cancer: an eternal fight between good and evil. *J. Clin. Invest.* 125, 3347–3355.
- Sham, H.L., Kempf, D.J., Molla, A., Marsh, K.C., Kumar, G.N., Chen, C.M., Kati, W., Stewart, K., Lal, R., Hsu, A., et al. (1998). ABT-378, a highly potent inhibitor of the human immunodeficiency virus protease. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 3218–3224.
- Sharp, L.Z., Shinoda, K., Ohno, H., Scheel, D.W., Tomoda, E., Ruiz, L., Hu, H., Wang, L., Pavlova, Z., Gilsanz, V., et al. (2012). Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells. *PLoS ONE* 7, e49452.
- Shastri, S., Delgado, M.R., Dirik, E., Turkmen, M., Agarwal, A.K., and Garg, A. (2010). Congenital generalized lipodystrophy, type 4 (CGL4) associated with myopathy due to novel PTRF mutations. *Am. J. Med. Genet. A* 152A, 2245–2253.
- Shekhar, M.P.V., Pauley, R., and Heppner, G. (2003). Host microenvironment in breast cancer development: extracellular matrix-stromal cell contribution to neoplastic phenotype of epithelial cells in the breast. *Breast Cancer Res.* 5, 130–135.
- Shen, M.M. (2007). Nodal signaling: developmental roles and regulation. *Development* 134, 1023–1034.

- Shen, J.J., Huang, L., Li, L., Jorgez, C., Matzuk, M.M., and Brown, C.W. (2009). Deficiency of growth differentiation factor 3 protects against diet-induced obesity by selectively acting on white adipose. *Mol. Endocrinol.* *23*, 113–123.
- Shimekake, Y., Nagata, K., Ohta, S., Kambayashi, Y., Teraoka, H., Kitamura, K., Eto, T., Kangawa, K., and Matsuo, H. (1995). Adrenomedullin stimulates two signal transduction pathways, cAMP accumulation and Ca²⁺ mobilization, in bovine aortic endothelial cells. *J. Biol. Chem.* *270*, 4412–4417.
- Shindo, T., Kurihara, Y., Nishimatsu, H., Moriyama, N., Kakoki, M., Wang, Y., Imai, Y., Ebihara, A., Kuwaki, T., Ju, K.H., et al. (2001). Vascular abnormalities and elevated blood pressure in mice lacking adrenomedullin gene. *Circulation* *104*, 1964–1971.
- Shipitsin, M., Campbell, L.L., Argani, P., Weremowicz, S., Bloushtain-Qimron, N., Yao, J., Nikolskaya, T., Serebryiskaya, T., Beroukhim, R., Hu, M., et al. (2007). Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell* *11*, 259–273.
- Shojaei, F. (2012). Anti-angiogenesis therapy in cancer: current challenges and future perspectives. *Cancer Lett.* *320*, 130–137.
- Shuster, A., Atlas, M., Pinthus, J.H., and Mourtzakis, M. (2012). The clinical importance of visceral adiposity: a critical review of methods for visceral adipose tissue analysis. *Br J Radiol* *85*, 1–10.
- Siclari, V.A., Guise, T.A., and Chirgwin, J.M. (2006). Molecular interactions between breast cancer cells and the bone microenvironment drive skeletal metastases. *Cancer Metastasis Rev.* *25*, 621–633.
- Siclari, V.A., Mohammad, K.S., Tompkins, D.R., Davis, H., McKenna, C.R., Peng, X., Wessner, L.L., Niewolna, M., Guise, T.A., Suvannasankha, A., et al. (2014). Tumor-expressed adrenomedullin accelerates breast cancer bone metastasis. *Breast Cancer Res.* *16*, 458.
- Sidelmann, J.J., Gram, J., Jespersen, J., and Kluft, C. (2000). Fibrin clot formation and lysis: basic mechanisms. *Semin. Thromb. Hemost.* *26*, 605–618.
- Silva, J.E., and Larsen, P.R. (1983). Adrenergic activation of triiodothyronine production in brown adipose tissue. *Nature* *305*, 712–713.
- Silva, J.E., and Larsen, P.R. (1985). Potential of brown adipose tissue type II thyroxine 5'-deiodinase as a local and systemic source of triiodothyronine in rats. *J. Clin. Invest.* *76*, 2296–2305.
- Simha, V., and Garg, A. (2003). Phenotypic heterogeneity in body fat distribution in patients with congenital generalized lipodystrophy caused by mutations in the AGPAT2 or seipin genes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *88*, 5433–5437.
- Simmons, J.K., Hildreth, B.E., Supsavhad, W., Elshafae, S.M., Hassan, B.B., Dirksen, W.P., Toribio, R.E., and Rosol, T.J. (2015). Animal Models of Bone Metastasis. *Vet. Pathol.* *52*, 827–841.
- Singh, R., Parveen, M., Basgen, J.M., Fazel, S., Meshesha, M.F., Thames, E.C., Moore, B., Martinez, L., Howard, C.B., Vergnes, L., et al. (2016). Increased Expression of Beige/Brown Adipose Markers from Host and Breast Cancer Cells Influence Xenograft Formation in Mice. *Mol. Cancer Res.* *14*, 78–92.
- Sjöström, L., Björntorp, P., and Månsson, J.E. (1973). An optimal assay system for subcellular determination of de novo fatty acid synthesis in human adipose tissue. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* *31*, 191–204.
- Sjöström, L., Gummesson, A., Sjöström, C.D., Narbro, K., Peltonen, M., Wedel, H., Bengtsson, C., Bouchard, C., Carlsson, B., Dahlgren, S., et al. (2009). Effects of bariatric surgery on cancer incidence in obese patients in Sweden (Swedish Obese Subjects Study): a prospective, controlled intervention trial. *Lancet Oncol.* *10*, 653–662.
- Snijder, M.B., Dekker, J.M., Visser, M., Bouter, L.M., Stehouwer, C.D.A., Kostense, P.J., Yudkin, J.S., Heine, R.J., Nijpels, G., and Seidell, J.C. (2003a). Associations of hip and thigh circumferences independent of waist circumference with the incidence of type 2 diabetes: the Hoorn Study. *Am. J. Clin. Nutr.* *77*, 1192–1197.

Snijder, M.B., Dekker, J.M., Visser, M., Yudkin, J.S., Stehouwer, C.D.A., Bouter, L.M., Heine, R.J., Nijpels, G., and Seidell, J.C. (2003b). Larger thigh and hip circumferences are associated with better glucose tolerance: the Hoorn study. *Obes. Res.* *11*, 104–111.

Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., and Brennan, M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* *51*, 1409–1416.

Spalding, K.L., Arner, E., Westermark, P.O., Bernard, S., Buchholz, B.A., Bergmann, O., Blomqvist, L., Hoffstedt, J., Näslund, E., Britton, T., et al. (2008). Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* *453*, 783–787.

Spiegelman, B.M., Frank, M., and Green, H. (1983). Molecular cloning of mRNA from 3T3 adipocytes. Regulation of mRNA content for glycerophosphate dehydrogenase and other differentiation-dependent proteins during adipocyte development. *J. Biol. Chem.* *258*, 10083–10089.

Spite, M., Hellmann, J., Tang, Y., Mathis, S.P., Kosuri, M., Bhatnagar, A., Jala, V.R., and Haribabu, B. (2011). Deficiency of the leukotriene B4 receptor, BLT-1, protects against systemic insulin resistance in diet-induced obesity. *J. Immunol.* *187*, 1942–1949.

Stahl, A., Evans, J.G., Pattel, S., Hirsch, D., and Lodish, H.F. (2002). Insulin causes fatty acid transport protein translocation and enhanced fatty acid uptake in adipocytes. *Dev. Cell* *2*, 477–488.

Stanford, K.I., Middelbeek, R.J.W., Townsend, K.L., An, D., Nygaard, E.B., Hitchcox, K.M., Markan, K.R., Nakano, K., Hirshman, M.F., Tseng, Y.-H., et al. (2013). Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *J. Clin. Invest.* *123*, 215–223.

Stanford, K.I., Middelbeek, R.J.W., and Goodyear, L.J. (2015). Exercise Effects on White Adipose Tissue: Being and Metabolic Adaptations. *Diabetes* *64*, 2361–2368.

Stears, A.J., and Byrne, C.D. (2001). Adipocyte metabolism and the metabolic syndrome. *Diabetes Obes Metab* *3*, 129–142.

Stefan, N., and Stumvoll, M. (2002). Adiponectin--its role in metabolism and beyond. *Horm. Metab. Res.* *34*, 469–474.

Stenn, K.S., and Paus, R. (2001). Controls of hair follicle cycling. *Physiol. Rev.* *81*, 449–494.

Steppan, C.M., Bailey, S.T., Bhat, S., Brown, E.J., Banerjee, R.R., Wright, C.M., Patel, H.R., Ahima, R.S., and Lazar, M.A. (2001). The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* *409*, 307–312.

Stevens, L.C. (1967). Origin of testicular teratomas from primordial germ cells in mice. *J. Natl. Cancer Inst.* *38*, 549–552.

Stevens, L.C., and Little, C.C. (1954). Spontaneous Testicular Teratomas in an Inbred Strain of Mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *40*, 1080–1087.

Stini, W.A. (1981). Body composition and nutrient reserves in evolutionary perspective. *World Rev Nutr Diet* *37*, 55–83.

Stofkova, A. (2009). Leptin and adiponectin: from energy and metabolic dysbalance to inflammation and autoimmunity. *Endocr Regul* *43*, 157–168.

Strålfors, P., and Honnor, R.C. (1989). Insulin-induced dephosphorylation of hormone-sensitive lipase. Correlation with lipolysis and cAMP-dependent protein kinase activity. *Eur. J. Biochem.* *182*, 379–385.

Strissel, K.J., Stancheva, Z., Miyoshi, H., Perfield, J.W., DeFuria, J., Jick, Z., Greenberg, A.S., and Obin, M.S. (2007). Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes* *56*, 2910–2918.

Strong, A.L., Strong, T.A., Rhodes, L.V., Semon, J.A., Zhang, X., Shi, Z., Zhang, S., Gimble, J.M., Burow, M.E., and Bunnell, B.A. (2013). Obesity associated alterations in the biology of adipose stem cells mediate enhanced tumorigenesis by estrogen dependent pathways. *Breast Cancer Res.* *15*, R102.

- Su, C.-L., Sztalryd, C., Contreras, J.A., Holm, C., Kimmel, A.R., and Londos, C. (2003). Mutational analysis of the hormone-sensitive lipase translocation reaction in adipocytes. *J. Biol. Chem.* *278*, 43615–43619.
- Su, G.H., Bansal, R., Murphy, K.M., Montgomery, E., Yeo, C.J., Hruban, R.H., and Kern, S.E. (2001). ACVR1B (ALK4, activin receptor type 1B) gene mutations in pancreatic carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *98*, 3254–3257.
- Su, S., Guntur, A.R., Nguyen, D.C., Fakory, S.S., Doucette, C.C., Leech, C., Lotana, H., Kelley, M., Kohli, J., Martino, J., et al. (2018). A Renewable Source of Human Beige Adipocytes for Development of Therapies to Treat Metabolic Syndrome. *Cell Rep* *25*, 3215-3228.e9.
- Subbaramaiah, K., Iyengar, N.M., Morrow, M., Elemento, O., Zhou, X.K., and Dannenberg, A.J. (2019). Prostaglandin E2 down-regulates sirtuin 1 (SIRT1), leading to elevated levels of aromatase, providing insights into the obesity-breast cancer connection. *J. Biol. Chem.* *294*, 361–371.
- Suenaga, M., Kurosawa, N., Asano, H., Kanamori, Y., Umemoto, T., Yoshida, H., Murakami, M., Kawachi, H., Matsui, T., and Funaba, M. (2013). Bmp4 expressed in preadipocytes is required for the onset of adipocyte differentiation. *Cytokine* *64*, 138–145.
- Suganami, T., and Ogawa, Y. (2010). Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. *J. Leukoc. Biol.* *88*, 33–39.
- Sugimoto, H., Mundel, T.M., Kieran, M.W., and Kalluri, R. (2006). Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biol. Ther.* *5*, 1640–1646.
- Sun, K., Kusminski, C.M., and Scherer, P.E. (2011a). Adipose tissue remodeling and obesity. *J. Clin. Invest.* *121*, 2094–2101.
- Sun, K., Tordjman, J., Clément, K., and Scherer, P.E. (2013). Fibrosis and adipose tissue dysfunction. *Cell Metab.* *18*, 470–477.
- Sun, L., Xie, H., Mori, M.A., Alexander, R., Yuan, B., Hattangadi, S.M., Liu, Q., Kahn, C.R., and Lodish, H.F. (2011b). Mir193b-365 is essential for brown fat differentiation. *Nat. Cell Biol.* *13*, 958–965.
- Sun, S., Fei, X., Mao, Y., Wang, X., Garfield, D.H., Huang, O., Wang, J., Yuan, F., Sun, L., Yu, Q., et al. (2014). PD-1(+) immune cell infiltration inversely correlates with survival of operable breast cancer patients. *Cancer Immunol. Immunother.* *63*, 395–406.
- Syed, F.A., Oursler, M.J., Hefferanm, T.E., Peterson, J.M., Riggs, B.L., and Khosla, S. (2008). Effects of estrogen therapy on bone marrow adipocytes in postmenopausal osteoporotic women. *Osteoporos Int* *19*, 1323–1330.
- Symonds, M.E. (2013). Brown adipose tissue growth and development. *Scientifica (Cairo)* *2013*, 305763.
- Sztalryd, C., Xu, G., Dorward, H., Tansey, J.T., Contreras, J.A., Kimmel, A.R., and Londos, C. (2003). Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation. *J. Cell Biol.* *161*, 1093–1103.
- Szymanski, K.M., Binns, D., Bartz, R., Grishin, N.V., Li, W.-P., Agarwal, A.K., Garg, A., Anderson, R.G.W., and Goodman, J.M. (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*, 20890–20895.
- Takei, Y., Inoue, K., Ogoshi, M., Kawahara, T., Bannai, H., and Miyano, S. (2004). Identification of novel adrenomedullin in mammals: a potent cardiovascular and renal regulator. *FEBS Lett.* *556*, 53–58.
- Tallquist, M.D., Weismann, K.E., Hellström, M., and Soriano, P. (2000). Early myotome specification regulates PDGFA expression and axial skeleton development. *Development* *127*, 5059–5070.
- Tamori, Y., Masugi, J., Nishino, N., and Kasuga, M. (2002). Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in maintenance of the characteristics of mature 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* *51*, 2045–2055.
- Tanaka, T., Yoshida, N., Kishimoto, T., and Akira, S. (1997). Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene. *EMBO J.* *16*, 7432–7443.

- Tanei, T., Morimoto, K., Shimazu, K., Kim, S.J., Tanji, Y., Taguchi, T., Tamaki, Y., and Noguchi, S. (2009). Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential Paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers. *Clin. Cancer Res.* *15*, 4234–4241.
- Tang, X. (2013). Tumor-associated macrophages as potential diagnostic and prognostic biomarkers in breast cancer. *Cancer Lett.* *332*, 3–10.
- Tang, Q.-Q., Otto, T.C., and Lane, M.D. (2003). Mitotic clonal expansion: a synchronous process required for adipogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 44–49.
- Tang, Q.-Q., Otto, T.C., and Lane, M.D. (2004). Commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *101*, 9607–9611.
- Tang, Q.-Q., Grønborg, M., Huang, H., Kim, J.-W., Otto, T.C., Pandey, A., and Lane, M.D. (2005). Sequential phosphorylation of CCAAT enhancer-binding protein beta by MAPK and glycogen synthase kinase 3beta is required for adipogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 9766–9771.
- Tang, T., Abbott, M.J., Ahmadian, M., Lopes, A.B., Wang, Y., and Sul, H.S. (2013). Desnutrin/ATGL activates PPAR δ to promote mitochondrial function for insulin secretion in islet β cells. *Cell Metab.* *18*, 883–895.
- Tang, W., Zeve, D., Suh, J.M., Bosnakovski, D., Kyba, M., Hammer, R.E., Tallquist, M.D., and Graff, J.M. (2008). White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science* *322*, 583–586.
- Tchkonia, T., Morbeck, D.E., Von Zglinicki, T., Van Deursen, J., Lustgarten, J., Scrable, H., Khosla, S., Jensen, M.D., and Kirkland, J.L. (2010). Fat tissue, aging, and cellular senescence. *Aging Cell* *9*, 667–684.
- Tchoukalova, Y.D., Votruba, S.B., Tchkonia, T., Giorgadze, N., Kirkland, J.L., and Jensen, M.D. (2010). Regional differences in cellular mechanisms of adipose tissue gain with overfeeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *107*, 18226–18231.
- Teruel, T., Hernandez, R., Benito, M., and Lorenzo, M. (2003). Rosiglitazone and retinoic acid induce uncoupling protein-1 (UCP-1) in a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent manner in fetal primary brown adipocytes. *J. Biol. Chem.* *278*, 263–269.
- Thiery, J.P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 442–454.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* *282*, 1145–1147.
- Tiainen, S., Tumelius, R., Rilla, K., Hämäläinen, K., Tammi, M., Tammi, R., Kosma, V.-M., Oikari, S., and Auvinen, P. (2015). High numbers of macrophages, especially M2-like (CD163-positive), correlate with hyaluronan accumulation and poor outcome in breast cancer. *Histopathology* *66*, 873–883.
- Timmons, J.A., Wennmalm, K., Larsson, O., Walden, T.B., Lassmann, T., Petrovic, N., Hamilton, D.L., Gimeno, R.E., Wahlestedt, C., Baar, K., et al. (2007). Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 4401–4406.
- Tiraby, C., Tavernier, G., Lefort, C., Larrouy, D., Bouillaud, F., Ricquier, D., and Langin, D. (2003). Acquisition of brown fat cell features by human white adipocytes. *J. Biol. Chem.* *278*, 33370–33376.
- Tisdale, M.J. (2002). Cachexia in cancer patients. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 862–871.
- Todd et Bowman (1845). *The Physiological Anatomy and Physiology of Man*.
- Tong, Q., Sankalé, J.-L., Hadigan, C.M., Tan, G., Rosenberg, E.S., Kanki, P.J., Grinspoon, S.K., and Hotamisligil, G.S. (2003). Regulation of adiponectin in human immunodeficiency virus-infected patients: relationship to body composition and metabolic indices. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *88*, 1559–1564.
- Tontonoz, P., Hu, E., and Spiegelman, B.M. (1994a). Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* *79*, 1147–1156.

Tontonoz, P., Hu, E., Graves, R.A., Budavari, A.I., and Spiegelman, B.M. (1994b). mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev.* *8*, 1224–1234.

Trajkovski, M., and Lodish, H. (2013). MicroRNA networks regulate development of brown adipocytes. *Trends Endocrinol. Metab.* *24*, 442–450.

Trajkovski, M., Ahmed, K., Esau, C.C., and Stoffel, M. (2012). MyomiR-133 regulates brown fat differentiation through Prdm16. *Nat. Cell Biol.* *14*, 1330–1335.

Traktuev, D.O., Merfeld-Clauss, S., Li, J., Kolonin, M., Arap, W., Pasqualini, R., Johnstone, B.H., and March, K.L. (2008). A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. *Circ. Res.* *102*, 77–85.

Tran, K.-V., Gealekman, O., Frontini, A., Zingaretti, M.C., Morroni, M., Giordano, A., Smorlesi, A., Perugini, J., De Matteis, R., Sbarbati, A., et al. (2012). The vascular endothelium of the adipose tissue gives rise to both white and brown fat cells. *Cell Metab.* *15*, 222–229.

Tran, T.T., Yamamoto, Y., Gesta, S., and Kahn, C.R. (2008). Beneficial effects of subcutaneous fat transplantation on metabolism. *Cell Metab.* *7*, 410–420.

Trayhurn, P. (2014). Hypoxia and adipocyte physiology: implications for adipose tissue dysfunction in obesity. *Annu. Rev. Nutr.* *34*, 207–236.

Trayhurn, P., and Wood, I.S. (2004). Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br. J. Nutr.* *92*, 347–355.

Triñanes, J., Salido, E., Fernández, J., Rufino, M., González-Posada, J.M., Torres, A., and Hernández, D. (2012). Type 1 diabetes increases the expression of proinflammatory cytokines and adhesion molecules in the artery wall of candidate patients for kidney transplantation. *Diabetes Care* *35*, 427–433.

Tseng, Y.-H., Kokkotou, E., Schulz, T.J., Huang, T.L., Winnay, J.N., Taniguchi, C.M., Tran, T.T., Suzuki, R., Espinoza, D.O., Yamamoto, Y., et al. (2008). New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature* *454*, 1000–1004.

Tseng, Y.-H., Cypess, A.M., and Kahn, C.R. (2010). Cellular bioenergetics as a target for obesity therapy. *Nat Rev Drug Discov* *9*, 465–482.

Tsuchida, K., Nakatani, M., Hitachi, K., Uezumi, A., Sunada, Y., Ageta, H., and Inokuchi, K. (2009). Activin signaling as an emerging target for therapeutic interventions. *Cell Commun. Signal* *7*, 15.

Tubiana-Hulin, M. (1991). Incidence, prevalence and distribution of bone metastases. *Bone* *12 Suppl 1*, S9-10.

Turner, N.C., Reis-Filho, J.S., Russell, A.M., Springall, R.J., Ryder, K., Steele, D., Savage, K., Gillett, C.E., Schmitt, F.C., Ashworth, A., et al. (2007). BRCA1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer. *Oncogene* *26*, 2126–2132.

Ueno, N., Oh-ishi, S., Segawa, M., Nishida, M., Fukuwatari, Y., Kizaki, T., Ookawara, T., and Ohno, H. (1998). Effect of age on brown adipose tissue activity in the obese (ob/ob) mouse. *Mech. Ageing Dev.* *100*, 67–76.

Uhl, M., Aulwurm, S., Wischhusen, J., Weiler, M., Ma, J.Y., Almirez, R., Mangadu, R., Liu, Y.-W., Platten, M., Herrlinger, U., et al. (2004). SD-208, a novel transforming growth factor beta receptor I kinase inhibitor, inhibits growth and invasiveness and enhances immunogenicity of murine and human glioma cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* *64*, 7954–7961.

Ukkola, O., and Santaniemi, M. (2002). Adiponectin: a link between excess adiposity and associated comorbidities? *J. Mol. Med.* *80*, 696–702.

Uldry, M., Yang, W., St-Pierre, J., Lin, J., Seale, P., and Spiegelman, B.M. (2006). Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. *Cell Metab.* *3*, 333–341.

Urist, M.R. (2002). Bone: formation by autoinduction. 1965. *Clin. Orthop. Relat. Res.* *4*–10.

Urso, R., and Gentile, M. (2001). Are “buffalo hump” syndrome, Madelung’s disease and multiple symmetrical lipomatosis variants of the same dysmetabolism? *AIDS* *15*, 290–291.

Valet, P., Berlan, M., Beauville, M., Crampes, F., Montastruc, J.L., and Lafontan, M. (1990). Neuropeptide Y and peptide YY inhibit lipolysis in human and dog fat cells through a pertussis toxin-sensitive G protein. *J. Clin. Invest.* *85*, 291–295.

Vernochet, C., Azoulay, S., Duval, D., Guedj, R., Ailhaud, G., and Dani, C. (2003). Differential effect of HIV protease inhibitors on adipogenesis: intracellular ritonavir is not sufficient to inhibit differentiation. *AIDS* *17*, 2177–2180.

Vernochet, C., Azoulay, S., Duval, D., Guedj, R., Cottrez, F., Vidal, H., Ailhaud, G., and Dani, C. (2005). Human immunodeficiency virus protease inhibitors accumulate into cultured human adipocytes and alter expression of adipocytokines. *J. Biol. Chem.* *280*, 2238–2243.

Vernochet, C., Peres, S.B., Davis, K.E., McDonald, M.E., Qiang, L., Wang, H., Scherer, P.E., and Farmer, S.R. (2009). C/EBPalpha and the corepressors CtBP1 and CtBP2 regulate repression of select visceral white adipose genes during induction of the brown phenotype in white adipocytes by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 4714–4728.

Vicente López, M.A., Vázquez García, M.N., Entrena, A., Olmedillas Lopez, S., García-Arranz, M., García-Olmo, D., and Zapata, A. (2011). Low doses of bone morphogenetic protein 4 increase the survival of human adipose-derived stem cells maintaining their stemness and multipotency. *Stem Cells Dev.* *20*, 1011–1019.

Viengchareun, S., Caron, M., Auclair, M., Kim, M.J., Frachon, P., Capeau, J., Lombès, M., and Lombès, A. (2007). Mitochondrial toxicity of indinavir, stavudine and zidovudine involves multiple cellular targets in white and brown adipocytes. *Antivir. Ther. (Lond.)* *12*, 919–929.

Vigouroux, C., Gharakhanian, S., Salhi, Y., Nguyễn, T.H., Adda, N., Rozenbaum, W., and Capeau, J. (1999). Adverse metabolic disorders during highly active antiretroviral treatments (HAART) of HIV disease. *Diabetes Metab.* *25*, 383–392.

Villarroya, F., Iglesias, R., and Giral, M. (2007). PPARs in the Control of Uncoupling Proteins Gene Expression. *PPAR Res* *2007*, 74364.

Villarroya, F., Domingo, P., and Giral, M. (2010). Drug-induced lipotoxicity: lipodystrophy associated with HIV-1 infection and antiretroviral treatment. *Biochim. Biophys. Acta* *1801*, 392–399.

Villarroya, F., Peyrou, M., and Giral, M. (2017). Transcriptional regulation of the uncoupling protein-1 gene. *Biochimie* *134*, 86–92.

Villena, J.A., Kim, K.H., and Sul, H.S. (2002). Pref-1 and ADSF/resistin: two secreted factors inhibiting adipose tissue development. *Horm. Metab. Res.* *34*, 664–670.

Virtanen, K.A., Lidell, M.E., Orava, J., Heglind, M., Westergren, R., Niemi, T., Taittonen, M., Laine, J., Savisto, N.-J., Enerbäck, S., et al. (2009). Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N. Engl. J. Med.* *360*, 1518–1525.

Viswanathan, S.R., Powers, J.T., Einhorn, W., Hoshida, Y., Ng, T.L., Toffanin, S., O’Sullivan, M., Lu, J., Phillips, L.A., Lockhart, V.L., et al. (2009). Lin28 promotes transformation and is associated with advanced human malignancies. *Nat. Genet.* *41*, 843–848.

Vogel, V.G. (2004). Atypia in the assessment of breast cancer risk: implications for management. *Diagn. Cytopathol.* *30*, 151–157.

Votteler, J., and Sundquist, W.I. (2013). Virus budding and the ESCRT pathway. *Cell Host Microbe* *14*, 232–241.

Wain-Hobson, S., Sonigo, P., Danos, O., Cole, S., and Alizon, M. (1985). Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. *Cell* *40*, 9–17.

Wajchenberg, B.L. (2000). Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr. Rev.* *21*, 697–738.

- Waldén, T.B., Hansen, I.R., Timmons, J.A., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2012). Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, “brite,” and white adipose tissues. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *302*, E19-31.
- Wallenius, K., Wallenius, V., Sunter, D., Dickson, S.L., and Jansson, J.-O. (2002). Intracerebroventricular interleukin-6 treatment decreases body fat in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *293*, 560–565.
- Wang, G.L., and Semenza, G.L. (1995). Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* *270*, 1230–1237.
- Wang, H., and Peng, D.-Q. (2011). New insights into the mechanism of low high-density lipoprotein cholesterol in obesity. *Lipids Health Dis* *10*, 176.
- Wang, W., and Seale, P. (2016). Control of brown and beige fat development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *17*, 691–702.
- Wang, F., Gao, S., Chen, F., Fu, Z., Yin, H., Lu, X., Yu, J., and Lu, C. (2014). Mammary fat of breast cancer: gene expression profiling and functional characterization. *PLoS ONE* *9*, e109742.
- Wang, Y.Y., Attané, C., Milhas, D., Dirat, B., Dauvillier, S., Guerard, A., Gilhodes, J., Lazar, I., Alet, N., Laurent, V., et al. (2017). Mammary adipocytes stimulate breast cancer invasion through metabolic remodeling of tumor cells. *JCI Insight* *2*, e87489.
- Warburg, O., Wind, F., and Negelein, E. (1927). The metabolism of tumors in the body. *J. Gen. Physiol.* *8*, 519–530.
- Weindruch, R., and Sohal, R.S. (1997). Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Caloric intake and aging. *N. Engl. J. Med.* *337*, 986–994.
- Weiner, F.R., Smith, P.J., Wertheimer, S., and Rubin, C.S. (1991). Regulation of gene expression by insulin and tumor necrosis factor alpha in 3T3-L1 cells. Modulation of the transcription of genes encoding acyl-CoA synthetase and stearoyl-CoA desaturase-1. *J. Biol. Chem.* *266*, 23525–23528.
- Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., and Ferrante, A.W. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* *112*, 1796–1808.
- Wellen, K.E., and Hotamisligil, G.S. (2005). Inflammation, stress, and diabetes. *J. Clin. Invest.* *115*, 1111–1119.
- Wendt, M.K., Taylor, M.A., Schiemann, B.J., and Schiemann, W.P. (2011). Down-regulation of epithelial cadherin is required to initiate metastatic outgrowth of breast cancer. *Mol. Biol. Cell* *22*, 2423–2435.
- Wenger, R.H. (2000). Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation. *J. Exp. Biol.* *203*, 1253–1263.
- Wentworth, J.M., Naselli, G., Brown, W.A., Doyle, L., Phipson, B., Smyth, G.K., Wabitsch, M., O’Brien, P.E., and Harrison, L.C. (2010). Pro-inflammatory CD11c+CD206+ adipose tissue macrophages are associated with insulin resistance in human obesity. *Diabetes* *59*, 1648–1656.
- West, N.R., Kost, S.E., Martin, S.D., Milne, K., Deleeuw, R.J., Nelson, B.H., and Watson, P.H. (2013). Tumour-infiltrating FOXP3(+) lymphocytes are associated with cytotoxic immune responses and good clinical outcome in oestrogen receptor-negative breast cancer. *Br. J. Cancer* *108*, 155–162.
- Whittle, A.J., Carobbio, S., Martins, L., Slawik, M., Hondares, E., Vázquez, M.J., Morgan, D., Csikasz, R.I., Gallego, R., Rodriguez-Cuenca, S., et al. (2012). BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions. *Cell* *149*, 871–885.
- Widberg, C.H., Newell, F.S., Bachmann, A.W., Ramnøruth, S.N., Spelta, M.C., Whitehead, J.P., Hutley, L.J., and Prins, J.B. (2009). Fibroblast growth factor receptor 1 is a key regulator of early adipogenic events in human preadipocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *296*, E121-131.
- Wiesener, M.S., Turley, H., Allen, W.E., Willam, C., Eckardt, K.U., Talks, K.L., Wood, S.M., Gatter, K.C., Harris, A.L., Pugh, C.W., et al. (1998). Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. *Blood* *92*, 2260–2268.

- Williams, S.K., Wang, T.F., Castrillo, R., and Jarrell, B.E. (1994). Liposuction-derived human fat used for vascular graft sodding contains endothelial cells and not mesothelial cells as the major cell type. *J. Vasc. Surg.* *19*, 916–923.
- Wilson-Fritch, L., Burkart, A., Bell, G., Mendelson, K., Leszyk, J., Nicoloso, S., Czech, M., and Corvera, S. (2003). Mitochondrial biogenesis and remodeling during adipogenesis and in response to the insulin sensitizer rosiglitazone. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 1085–1094.
- Winslow, S., Leandersson, K., Edsjö, A., and Larsson, C. (2015). Prognostic stromal gene signatures in breast cancer. *Breast Cancer Res.* *17*, 23.
- Wong, H., and Schotz, M.C. (2002). The lipase gene family. *J. Lipid Res.* *43*, 993–999.
- Wong, H., Yang, D., Hill, J.S., Davis, R.C., Nikazy, J., and Schotz, M.C. (1997). A molecular biology-based approach to resolve the subunit orientation of lipoprotein lipase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *94*, 5594–5598.
- Wong-Staal, F. (1991). The AIDS virus. What we know and what we can do about it. *West. J. Med.* *155*, 481–487.
- Wu, J., Srinivasan, S.V., Neumann, J.C., and Lingrel, J.B. (2005). The KLF2 transcription factor does not affect the formation of preadipocytes but inhibits their differentiation into adipocytes. *Biochemistry* *44*, 11098–11105.
- Wu, J., Boström, P., Sparks, L.M., Ye, L., Choi, J.H., Giang, A.-H., Khandekar, M., Virtanen, K.A., Nuutila, P., Schaart, G., et al. (2012). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* *150*, 366–376.
- Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, R.C., et al. (1999a). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* *98*, 115–124.
- Wu, Z., Rosen, E.D., Brun, R., Hauser, S., Adelmant, G., Troy, A.E., McKeon, C., Darlington, G.J., and Spiegelman, B.M. (1999b). Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol. Cell* *3*, 151–158.
- Wykoff, C.C., Beasley, N.J., Watson, P.H., Turner, K.J., Pastorek, J., Sibtain, A., Wilson, G.D., Turley, H., Talks, K.L., Maxwell, P.H., et al. (2000). Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res.* *60*, 7075–7083.
- Xiao, L., Yuan, X., and Sharkis, S.J. (2006). Activin A maintains self-renewal and regulates fibroblast growth factor, Wnt, and bone morphogenic protein pathways in human embryonic stem cells. *Stem Cells* *24*, 1476–1486.
- Xie, H., Lim, B., and Lodish, H.F. (2009). MicroRNAs induced during adipogenesis that accelerate fat cell development are downregulated in obesity. *Diabetes* *58*, 1050–1057.
- Xu, H., Barnes, G.T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C.J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J.S., Tartaglia, L.A., et al. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* *112*, 1821–1830.
- Xue, B., Rim, J.-S., Hogan, J.C., Coulter, A.A., Koza, R.A., and Kozak, L.P. (2007). Genetic variability affects the development of brown adipocytes in white fat but not in interscapular brown fat. *J. Lipid Res.* *48*, 41–51.
- Xue, R., Lynes, M.D., Dreyfuss, J.M., Shamsi, F., Schulz, T.J., Zhang, H., Huang, T.L., Townsend, K.L., Li, Y., Takahashi, H., et al. (2015). Clonal analyses and gene profiling identify genetic biomarkers of the thermogenic potential of human brown and white preadipocytes. *Nat. Med.* *21*, 760–768.
- Yin, X., Lanza, I.R., Swain, J.M., Sarr, M.G., Nair, K.S., and Jensen, M.D. (2014). Adipocyte mitochondrial function is reduced in human obesity independent of fat cell size. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *99*, E209–216.
- Yoneshiro, T., Aita, S., Matsushita, M., Kayahara, T., Kameya, T., Kawai, Y., Iwanaga, T., and Saito, M. (2013). Recruited brown adipose tissue as an antiobesity agent in humans. *J. Clin. Invest.* *123*, 3404–3408.
- Yubero, P., Manchado, C., Cassard-Doulier, A.M., Mampel, T., Viñas, O., Iglesias, R., Giralt, M., and Villarroya, F. (1994). CCAAT/enhancer binding proteins alpha and beta are transcriptional activators of the brown fat uncoupling protein gene promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *198*, 653–659.

Yubero, P., Barberá, M.J., Alvarez, R., Viñas, O., Mampel, T., Iglesias, R., Villarroya, F., and Giral, M. (1998). Dominant negative regulation by c-Jun of transcription of the uncoupling protein-1 gene through a proximal cAMP-regulatory element: a mechanism for repressing basal and norepinephrine-induced expression of the gene before brown adipocyte differentiation. *Mol. Endocrinol.* *12*, 1023–1037.

Zamani, N., and Brown, C.W. (2011). Emerging roles for the transforming growth factor- β superfamily in regulating adiposity and energy expenditure. *Endocr. Rev.* *32*, 387–403.

Zangari, J., Partisani, M., Bertucci, F., Milanini, J., Bidaut, G., Berruyer-Pouyet, C., Finetti, P., Long, E., Brau, F., Cabaud, O., et al. (2014). EFA6B antagonizes breast cancer. *Cancer Res.* *74*, 5493–5506.

Zaragosi, L.-E., Ailhaud, G., and Dani, C. (2006). Autocrine fibroblast growth factor 2 signaling is critical for self-renewal of human multipotent adipose-derived stem cells. *Stem Cells* *24*, 2412–2419.

Zaragosi, L.-E., Wdziekonski, B., Villageois, P., Keophiphath, M., Maumus, M., Tchkonja, T., Bourlier, V., Mohsen-Kanson, T., Ladoux, A., Elabd, C., et al. (2010). Activin A plays a critical role in proliferation and differentiation of human adipose progenitors. *Diabetes* *59*, 2513–2521.

Zaragosi, L.-E., Wdziekonski, B., Brigand, K.L., Villageois, P., Mari, B., Waldmann, R., Dani, C., and Barbry, P. (2011). Small RNA sequencing reveals miR-642a-3p as a novel adipocyte-specific microRNA and miR-30 as a key regulator of human adipogenesis. *Genome Biol.* *12*, R64.

Zhang, D.J., Wu, J.H., Husile, G., Sun, H.L., and Zhang, W.G. (2014). Sequence variation and molecular evolution of BMP4 genes. *Genet. Mol. Res.* *13*, 9196–9201.

Zhang, J.-W., Klemm, D.J., Vinson, C., and Lane, M.D. (2004). Role of CREB in transcriptional regulation of CCAAT/enhancer-binding protein beta gene during adipogenesis. *J. Biol. Chem.* *279*, 4471–4478.

Zhang, L., Guerrero-Juarez, C.F., Hata, T., Bapat, S.P., Ramos, R., Plikus, M.V., and Gallo, R.L. (2015). Innate immunity. Dermal adipocytes protect against invasive *Staphylococcus aureus* skin infection. *Science* *347*, 67–71.

Zhang, Q., Ramlee, M.K., Brunmeir, R., Villanueva, C.J., Halperin, D., and Xu, F. (2012). Dynamic and distinct histone modifications modulate the expression of key adipogenesis regulatory genes. *Cell Cycle* *11*, 4310–4322.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* *372*, 425–432.

Zhang, Y., Schmidt, R.J., Foxworthy, P., Emkey, R., Oler, J.K., Large, T.H., Wang, H., Su, E.W., Mosior, M.K., Eacho, P.I., et al. (2005). Niacin mediates lipolysis in adipose tissue through its G-protein coupled receptor HM74A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *334*, 729–732.

Zhang, Y., Marsboom, G., Toth, P.T., and Rehman, J. (2013). Mitochondrial respiration regulates adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *PLoS ONE* *8*, e77077.

Zheng, Z., Liu, X., Zhao, Q., Zhang, L., Li, C., and Xue, Y. (2014). Regulation of UCP1 in the Browning of Epididymal Adipose Tissue by β 3-Adrenergic Agonist: A Role for MicroRNAs. *Int J Endocrinol* *2014*, 530636.

Zhou, Z., Yon Toh, S., Chen, Z., Guo, K., Ng, C.P., Ponniah, S., Lin, S.-C., Hong, W., and Li, P. (2003). Cidea-deficient mice have lean phenotype and are resistant to obesity. *Nat. Genet.* *35*, 49–56.

Zhu, P., Zhang, Z.-H., Huang, X.-F., Shi, Y.-C., Khandekar, N., Yang, H.-Q., Liang, S.-Y., Song, Z.-Y., and Lin, S. (2018). Cold exposure promotes obesity and impairs glucose homeostasis in mice subjected to a high-fat diet. *Mol Med Rep* *18*, 3923–3931.

Zhu, Y., Qi, C., Korenberg, J.R., Chen, X.N., Noya, D., Rao, M.S., and Reddy, J.K. (1995). Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *92*, 7921–7925.

Zimmermann, R., Strauss, J.G., Haemmerle, G., Schoiswohl, G., Birner-Gruenberger, R., Riederer, M., Lass, A., Neuberger, G., Eisenhaber, F., Hermetter, A., et al. (2004). Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* *306*, 1383–1386.

Zudaire, E., Martínez, A., and Cattitta, F. (2003). Adrenomedullin and cancer. *Regul. Pept.* 112, 175–183.

Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D.A., Huang, J.I., Mizuno, H., Alfonso, Z.C., Fraser, J.K., Benhaim, P., and Hedrick, M.H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell* 13, 4279–4295.