



HAL
open science

Rôle du régulateur du cycle cellulaire Cdkn2a dans la plasticité et la fonction du tissu adipeux et le diabète de type 2

Yasmina Kahoul

► To cite this version:

Yasmina Kahoul. Rôle du régulateur du cycle cellulaire Cdkn2a dans la plasticité et la fonction du tissu adipeux et le diabète de type 2. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2023. Français. NNT : 2023ULILS021 . tel-04220210

HAL Id: tel-04220210

<https://theses.hal.science/tel-04220210>

Submitted on 27 Sep 2023

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.



Université de Lille
École Doctorale Biologie Santé de Lille

EGID, UMR1283/8199

« (Épi)généétique fonctionnelle et mécanismes du diabète de type 2 et maladies associées »

Thèse de doctorat pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Lille
En science de la vie et de la santé

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Rôle du régulateur du cycle cellulaire *Cdkn2a* dans la plasticité et la fonction du tissu adipeux et le diabète de type 2

Soutenue publiquement le 26 mai 2023 par

Yasmina Kahoul

Membres du Jury :

Pr. Corinne Vigouroux
Dr. Isabelle Dugail
Dr. Mireille Cormont
Dr. Jérôme Eeckhoute
Dr. Jean-Sébastien Annicotte
Pr. Christophe BRETON

Présidente du Jury
Rapporteuse
Rapporteuse
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier chacun des membres du jury, présidé par le Pr Corinne Vigouroux. Pour m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de ce travail, je remercie Dr. Isabelle Dugail et Dr. Mireille Cormont. Pour avoir eu la gentillesse de participer à ce jury, je remercie également Dr. Jérôme Eeckhoutte et Dr. Jean-Sébastien Annicotte pour leurs expertises. Merci à mon directeur de thèse le Pr. Christophe Breton.

Je remercie très sincèrement les membres de mon comité, qui m'ont suivie et accompagnée avec la plus grande bienveillance Pr. Corinne Vigouroux et le Dr. Jérôme Eeckhoutte.

Je souhaite remercier le Pr. Philippe Froguel, directeur du laboratoire, ainsi que le Dr. Amélie Bonnefond de m'avoir permis d'intégrer leur laboratoire et équipe.

Je remercie vivement mon ancienne équipe, l'équipe 2, plus particulièrement Maeva et Charlène, pour leur bonne humeur, temps, conseils, patience, ainsi que pour le partage de leur bureau, passion, rigueur, savoir et connaissances. Je tiens aussi à remercier le Dr. Frederik Oger mais aussi Arnaud Dance pour leur aide, nombreux conseils et intérêt pour ce projet. Merci aux autres membres de l'équipe 2 que je n'ai pas encore cité Jessica, Florine et Cyril.

Je tiens à remercier le Dr. Jean-Sébastien Annicotte et le Dr. Nabil Rabhi pour m'avoir permis de continuer le travail qu'ils avaient initié sur Cdkn2a, merci pour le partage de vos connaissances, données et protocoles.

Merci à Nico, VV, Jéjé, Raphy, Arnaud, Victoria, Héléne et Constance pour tous ces bons moments autour d'un excellent café le midi.

Je remercie aussi l'ensemble de l'équipe 1 qui m'as très bien accueilli et intégré. Je remercie plus particulièrement Audrey et Nico pour leur aide dans la gestion des commandes et Raphy pour son aide technique et scientifique.

Merci à Emilie Caron pour son aide concernant l'utilisation et l'analyse des données des cages métabolique et Antonino Bongiovanni pour le temps qu'il a passé dans le développement des différentes macros.



Un grand merci à ma famille et mes amis pour leur soutien incondicional, leur écoute et conseils. Sans vous rien n'aurait été possible. Merci d'avoir supporté mes nombreuses lamentations, de m'avoir apportée de la joie, de m'avoir soulevée quand j'étais au plus bas, d'avoir essuyais mes larmes et d'avoir ris avec moi.

À ma mère Sahra, à mes frères et sœurs : Sabrina, Rabah, Kamel et Nadia, à mon beau-frère Mohamed, à ma belle-sœur Khadîdja, à mes neveux les gremlins : Zayd, Adem, Youcef et Salah merci infiniment pour tous ces moments ensemble, pour ces soirées SDA-Hobbit en famille, pour ces repas du dimanche midi en famille, pour nos voyages, nos découvertes culinaires, nos débats.

Merci les gremlins de toujours me faire rire et de me faire me sentir mieux même quand je suis triste, stressée ou énervée.

A Khalé Alou et Tata Fouzia merci pour ces moments avec vous pendant mes séjours en Algérie, merci pour votre soutien.

Mais surtout merci à ma MAMAN pour toujours me pousser à être une meilleure version de moi-même, pour m'avoir appris à ne jamais abandonner même dans les moments les plus difficile, de croire en moi, merci d'être mon roc, mon phare et de toujours me ramener à bon port.

A mon PAPA je dis merci de m'avoir permis d'arriver là où je suis aujourd'hui, de m'avoir donné l'envie de faire une thèse et de devenir chercheuse. Merci de m'avoir fait découvrir les travaux d'Ibn Sina et de m'avoir ouvert les yeux sur l'importance du monde musulman dans de nombreuses découverte scientifiques qui m'ont inspirée. Même si tu n'es plus là aujourd'hui tes paroles, tes conseils et ton éducation guide chacun de mes choix et de mes actes. Je ferais tout pour vous rendre fière MAMAN et toi, merci à vous deux de m'avoir appris que je pouvais accomplir tout ce que je souhaite tant que Allah est avec moi.

Je remercie Allah de m'avoir ouvert toutes les portes qui m'ont mené jusqu'au bout de ce chemin.

Finalement je tiens à remercier l'ensemble des personnes qui m'ont aidées durant cette thèse et sa rédaction.



Résumé

La dérégulation de la balance énergétique et l'obésité sont des problèmes de santé publique conduisant au développement de pathologies métaboliques comme le diabète de type 2 (DT2) ou les maladies cardiovasculaires. Les études pangénomiques ont établi que la région du gène suppresseur de tumeur *CDKN2A* (inhibiteur 2a de kinase dépendante des cyclines) était associée à une augmentation du risque de DT2. Ce locus présente une double fonction dans la régulation du cycle cellulaire et du métabolisme énergétique. L'expression de *CDKN2A* est notamment augmentée dans le tissu adipeux (TA) des personnes obèses.

Nous avons montré précédemment que les souris globalement déficientes en *Cdkn2a* nourries avec un régime hyperlipidique hypercalorique (DIO) sont résistantes à l'obésité et présentent une augmentation de la thermogenèse *via* le brunissement du TA sous-cutané et une amélioration de la sensibilité à l'insuline. Afin d'établir si le brunissement est dû à un phénomène de transdifférenciation adipocytaire, nous avons étudié l'effet de l'inactivation de *Cdkn2a* spécifiquement dans l'adipocyte différencié (*Cdkn2a^{ad/-}*) chez la souris DIO en établissant leur profil métabolique, hormonal et histologique. Les souris *Cdkn2a^{ad/-}* présentent un meilleur profil métabolique que les souris sauvages avec une tolérance au glucose améliorée sans modification de la sensibilité à l'insuline, une hypoleptinémie et une hyporésistinémie, associées à un remodelage cellulaire des dépôts de TA et à une augmentation de la dépense énergétique, sans brunissement visible. L'analyse transcriptomique par séquençage de l'ARN des différents dépôts de TA a montré que seul le TA épидidymal présente une augmentation globale des voies métaboliques impliquées dans l'utilisation des substrats énergétiques et l'activité oxydative, en particulier le métabolisme du glucose. Ces résultats ont été validés par la méthode Seahorse et par mesure de la capture du glucose après inactivation de l'expression de *Cdkn2a* par siRNA dans la lignée adipocytaire 3T3-L1. L'analyse de l'activité kinase a été également effectuée afin d'étudier les voies impliquées.

Des données préliminaires ont montré que l'extinction de *CDKN2A* à l'aide de siARN lors de la différenciation des cellules souches pluripotentes humaines engagées dans la lignée adipocytaire brune (hiPSC-BAPs) entraîne une augmentation des marqueurs de la thermogenèse. En parallèle du modèle souris, des hiPSC-BAPs différenciés en sphéroïdes 3D transfectés à l'aide de siARN ont été développés afin d'étudier l'implication de *CDKN2A* dans l'initiation d'un programme thermogénique au stade progéniteur. Des analyses du transcriptome et de l'activité kinase ont montré que l'extinction de *CDKN2A* active les voies impliquées dans l'adipogenèse, le métabolisme oxydatif et potentialise le processus de

brunissement, entraînant une reprogrammation des hiPSC-BAPs différenciés en adipocytes de type brun.

L'ensemble de ces données suggère que le brunissement observé lors de l'inactivation globale de *Cdkn2a* chez la souris n'est pas dû à une transdifférenciation des adipocytes. Cependant, l'extinction de *Cdkn2a* activerait les voies du métabolisme énergétique et potentialiserait le brunissement de l'adipocyte par des voies indépendantes de celles utilisées pour moduler le cycle cellulaire. De plus, l'extinction de *CDKN2A* dans les hiPSC-BAPs montre que cet effet cellulaire est autonome. Ces deux approches combinées ont permis de mettre en évidence des voies adipocytaires communes sous le contrôle de *CDKN2A* (telles que l'AMPK et la p70S6K) associées au brunissement adipocytaire. La mise en évidence des voies moléculaires contrôlées par *CDKN2A* dans l'adipocyte impliquées dans le brunissement est une première étape pour la mise en place d'approches thérapeutiques visant à activer le brunissement afin d'atténuer les effets délétères de l'obésité sur la résistance à l'insuline et de DT2.

Abstract

Disorders of energy balance during obesity are a major health problem with consequences on the development of metabolic pathologies such as type 2 diabetes (T2D) or cardiovascular diseases. Genome-wide studies have established that the tumor suppressor gene region *CDKN2A* (cyclin-dependent kinase 2a inhibitor) is associated with T2D risk. This locus has a dual function in regulating the cell cycle and energy metabolism. In particular, the expression of *CDKN2A* is increased in the adipose tissue (AT) of obese subjects.

We have previously shown that globally *Cdkn2a*-deficient mice fed a high-fat diet (DIO) are resistant to obesity with increased thermogenesis *via* browning of subcutaneous TA and improvement of insulin sensitivity. In order to assess whether browning is due to adipocyte transdifferentiation, we studied the effects of the invalidation of *Cdkn2a* restricted to adipocyte (*Cdkn2a^{ad-/-}*) in DIO mice by determining their metabolic, hormonal and histological profile. *Cdkn2a^{ad-/-}* mice exhibit a better metabolic profile than wild-type mice with improved glucose tolerance without modification of insulin sensitivity, hypoleptinemia and hyporesistinemia. They also display cellular remodeling of TA deposits associated with an increase in energy expenditure without visible browning. Transcriptomic analysis by RNA sequencing of different fat pads shows that only epididymal AT exhibits an overall increase in the metabolic pathways involved in the utilization of energy substrates and oxidative activity, in particular glucose metabolism. These findings have been validated by Seahorse and measurement of glucose uptake in *CDKN2A*-deficient 3T3-L1 cells differentiated into adipocyte using siRNA methodology. A global kinome analysis has also been carried out to investigate the pathways involved.

Previous data have shown that the suppression of *CDKN2A* expression using siRNA during differentiation of human induced pluripotent stem cells committed to the brown adipogenic lineage (hiPSC-BAPs) results in an increase in the thermogenic marker UCP1. In parallel, hiPSC-BAPs cultured in 3D spheroids transfected with siRNAs were developed in order to understand how *CDKN2A* mediates the initiation of a thermogenic program at the progenitor stage. RNA sequencing and kinase activity profiling analyses have shown that *CDKN2A* silencing enhances pathways involved in adipogenesis, oxidative metabolism, and browning process, resulting in reprogramming of brown-like adipocytes by promoting the expression of browning markers.

Overall, these data suggest that browning observed during global *Cdkn2a* knockdown in mice is not due to adipocyte transdifferentiation. However, *CDKN2A* might control global cellular oxidative metabolism in adipocyte *via* alternative pathways from those used for



regulating the cell to potentiate browning process. *CDKN2A* knockdown in hiPSC-BAPs demonstrated that this locus plays an important role in brown-like adipogenic maturation in a cell-autonomous manner. Both models have highlighted common pathways (i.e., AMPK and p70S6K) regulated by *CDKN2A* that are involved in adipocyte browning. Finding and targeting new signaling pathways driving browning may constitute a great scientific breakthrough and may help to develop therapeutic approach against obesity and T2D.



Sommaire

REMERCIEMENTS.....	1
RESUME.....	3
ABSTRACT.....	5
SOMMAIRE	7
LISTE DES ABREVIATIONS	11
TABLES DES FIGURES.....	16
LISTE DES TABLEAUX.....	19
INTRODUCTION	20
<i>I. L'obésité et ses comorbidités</i>	20
A. Définition	20
B. Prévalence.....	20
C. Traitements actuels.....	23
<i>II. Le diabète</i>	24
A. Définition	24
B. Prévalence	25
C. Les différents types de diabètes	26
1. Le diabète de type 1.....	26
2. Le diabète de type 2.....	27
3. Le diabète gestationnel	28
4. Les diabètes monogéniques	28
D. Le développement du diabète de type 2.....	29
<i>III. Les maladies métaboliques focus sur la diabésité</i>	31
<i>IV. Le tissu adipeux</i>	33
A. Caractéristiques générales du tissu adipeux	33
B. Origine	33
C. L'adipogenèse	34
1. La détermination.....	36
2. La différenciation	37
D. Le renouvellement des adipocytes	38
E. Différences entre les types de tissus adipeux : blanc, brun, beige	38
F. Distribution anatomique	39
G. Composition cellulaire.....	40
1. Fraction adipocytaire.....	41



2.	Fraction stroma vasculaire (SVF).....	45
H.	Fonctions adipocytaires	49
1.	Régulation énergétique :	49
2.	Fonction endocrine :.....	49
3.	Régulation de la thermogenèse :	51
4.	Fonction immunitaire :	52
5.	Rôle mécanique et de protection	52
6.	Rôle dans la reproduction	52
7.	Rôle dans la régulation de l'hémostase :	52
8.	Rôle dans le métabolisme du cholestérol :	52
9.	Rôle dans le métabolisme du glucose :	53
V.	<i>Plasticité des tissus adipeux</i>	54
A.	Hypertrophie/hyperplasie	54
B.	Brunissement : brun dans blanc	55
C.	Activation TA brun par cachexie	58
VI.	<i>Cdkn2a</i>	58
A.	Généralités sur le cycle cellulaire	58
B.	Les membres de la familles INK4 (pour INhibitor of CDK4)	60
1.	p19INK4d (Cdkn2d).....	61
2.	p18INK4c (Cdkn2c).....	61
3.	p15INK4b (Cdkn2b) et p16INK4a (Cdkn2a).....	62
C.	Le Locus INK4a/ARF : Cdkn2a.....	64
1.	p16INK4a	64
2.	p14/p19ARF	66
D.	<i>Cdkn2a</i> : Rôle de régulateur du cycle cellulaire	67
E.	<i>Cdkn2a</i> : Rôles dans la sénescence	69
F.	<i>Cdkn2a</i> : Rôles dans la différenciation cellulaire	71
G.	<i>Cdkn2a</i> : Rôle de régulateur du métabolisme énergétique	72
	OBJECTIFS DE LA THESE.....	75
I.	<i>Première partie : modèle murin</i>	75
II.	<i>Deuxième partie : hiPSC-BAP</i>	75
	MATERIEL ET METHODES	76
I.	<i>Expérimentation animale</i>	76
A.	Génération des lignées transgéniques	76
B.	Génotypage des lignées de souris	76



C. Régime alimentaire	77
D. Test de tolérance à l'insuline (ITT).....	77
E. Test de tolérance au glucose (IPGTT).....	77
F. Dosage sanguin de l'insuline	78
G. Calorimétrie indirecte.....	78
H. Sacrifice et prélèvement des organes	78
I. Immunohistochimie	79
J. Extraction ARN et RT-qPCR.....	79
K. Séquençage à haut débit de l'ARNm des différents dépôts de tissu adipeux	80
<i>II. Culture cellulaire.....</i>	<i>80</i>
A. Modèle cellulaire murin de préadipocytes: 3T3-L1	80
1. Différenciation des cellules 3T3-L1	80
2. Traitement palmitate.....	81
3. Coloration à l'huile rouge : Oil red O	81
4. Transfection de siRNA	81
5. Extraction ARN et RT-qPCR	82
6. Extraction protéines et dosage.....	82
7. Western blot	82
8. Pamgene	83
9. Glucose uptake (sigma MAK083).....	84
10. Mesure des taux de consommation d'oxygène (OCR) et d'acidification extracellulaire (ECAR) par Seahorse	84
B. Modèle cellulaire humain : hiPSC-BAP	85
1. Formation de sphéroïdes et différenciation en adiposhères de type brun	85
2. Transfection siRNA	85
3. Extraction ARN et séquençage à haut débit de l'ARNm	86
4. Extraction des protéines et PamGene	86
<i>III. Analyses bioinformatiques</i>	<i>87</i>
A. RNA-seq	87
B. PamGene.....	87
<i>IV. Analyses statistiques.....</i>	<i>88</i>
RESULTATS	89
PARTIE I : ETUDE DE L'EXTINCTION DE <i>CDKN2A</i> DANS L'ADIPOCYTE MATURE DANS UN MODELE DE SOURIS <i>CDKN2A^{AD-/-}</i>	89



I. Validation du modèle d'étude	90
A. Modèle AdipoQCre Tomato	90
B. Diminution de l'expression de l'ARNm de p16 et p19.....	90
II. Caractérisation métabolique des animaux sous.....	91
III. Caractérisation métabolique des animaux sous HFD	91
A. Amélioration de la tolérance au glucose chez les souris Cdkn2a ^{ad-/-} après un régime HFD.....	92
B. Pas de modification de la sensibilité, ni de la sécrétion d'insuline.....	93
C. Paramètres physiologiques et calorimétrie indirecte	94
D. Conclusion	96
IV. Hypoléptinémie et hyporésistinémie des souris Cdkn2a ^{ad-/-} suite à un régime HFD	96
V. Caractérisation histologique des dépôts de tissus adipeux suite à l'extinction de Cdkn2a dans l'adipocyte mature et à un régime HFD.....	97
A. Poids des tissus adipeux	97
B. Hypertrophie de l'eWAT et hypoplasie de l'IWAT des souris Cdkn2a ^{ad-/-} suite à un régime HFD.....	98
C. Conclusion	99
VI. Caractérisation transcriptomique des dépôts de tissus adipeux suite à l'extinction de Cdkn2a dans l'adipocyte mature et à un régime HFD.....	100
A. Différenciation des 3T3-L1 en adipocyte mature	104
B. Efficacité du siRNA	106
C. Teneur en lipides	106
D. Étude de la respiration mitochondriale	107
E. Capture du glucose.....	109
F. Analyse du kinome.....	109
A. Teneur en lipides	117
B. Étude de la respiration mitochondriale	117
IX. Conclusion.....	123

PARTIE II : ETUDE DE L'EXTINCTION DE CDKN2A DANS LES HIPSC-BAP 3D.....125

CONCLUSION GENERALE	129
DISCUSSION	131
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	146
ANNEXES	167



Liste des abréviations

A:

ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
AG : Acide gras
AGNE : Acide gras non estérifié
AKT/PKB : protéine kinase B
Alk : kinase du lymphome anaplasique
AMP : Adénosine monophosphate
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
AMPK : Adénosine monophosphate kinase
ANP: Atrial natriuretic peptide
ANRIL: Antisense Non-Coding RNA in the INK4 locus
ARF: ADP Ribosylation Factor
ARN: Acide RiboNucléique
ARNm: Acide RiboNucléique messenger
ASC: adipose derived stem cells
ATGL : lipase des triglycérides adipeux
ATP : Adénosine Tri-Phosphate
AUR: Aurora Kinase

B:

BAP: Brown adipose progenitor
BAT: Brown adipose tissue
Bmi1: Polycomb Ring Finger
BMP : protéines morphogéniques osseuses
BNP : Brain natriuretic peptide
Brite: Brown in white
BSA: Bovine serum albumin

C:

C/EBP: CCAAT-enhancer-binding proteins
CD : Chow diet
CD8/ CD137 : cluster de différenciation 8/137
CDK: Cyclins dependant kinase
CDK-L: CDK-Like
CDK2/4/ 6 : Cyclin dependant kinase 2 /4 /6
CDKI : Inhibiteur de CDK
Cdkn1a/ b / c: Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1 a / b / c
Cdkn2a / b / c: Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2 a / b /
CE : Cellule endothéliale
Cip: CDK interacting protein
CL-316243: β 3-adrenoceptor agonist
Cox8b: Cytochrome c oxidase subunit 8B
CREB : cAMP Response Element Binding protein
CRP : protéine C-réactive
Ct: Cycle threshold

D:

DAPI: 4',6-DiAmidino-2-PhénylIndole
DC : Cellule dendritique
DG : Diabète gestationnel
DGM : Diabète sucré gestationnel
DIO : Diet-induced obesity
DIP : Diabète pendant la grossesse



DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's medium

DNTB : Acide 5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoïque, acide 3,3'-dithiobis 6-nitrobenzoïque

dNTP : Désoxyribonucléotide triphosphate quelconque

DPP-4 : Dipeptidyl peptidase-4

DT2/ T2D : Diabète de type 2

DTT: Dithiothréitol

E:

E2F: E2 Factor

ECAR: Taux d'acidification extracellulaire

EGF: Epidermal Growth Factor

EGFR: Epithelial Growth Factor Receptor

EIF2 / 4: Eukaryotic Initiation Factor 2 / 4

En1: Engrailed Homeobox 1

Eph: Éphrine

ERK: Extracellular signal-regulated kinases

eWAT: Tissu adipeux blanc epididymal

F:

FABP4: Fatty Acid Binding Protein 4

FAHFA: Fatty Acid esters of Hydroxyl Fatty Acids

FCCP: Carbonyl cyanide-4 (trifluoromethoxy) phenylhydrazine

FGF: Fibroblast Growth Factor

FIGO : Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique

FITC: Isothiocyanate de fluoresceine

Fak: Focal adhesion kinase

G:

GATA: Globin transcription factor

GCR: glucocorticoids

GH : Hormone de croissance

GLP-1 : Glucagon-like Peptide-1

GLUT 1/3/5 : Glucose Transporter 1/3/5

GPS2: G Protein Pathway Suppressor 2

GSIS: Glucose stimulated insulin secretion

GWAS: Genome-Wide Association Studies

H:

H&E : Hématoxyline et éosine

HFD : High Fat Diet – Régime riche en graisse

HGF: Hepatocyte growth factor

HIF-1: Hypoxia inducible Factor 1

HIP : Hyperglycémie pendant la grossesse

hiPSC : Cellules souches pluripotentes induites humaines

hiPSC-BAP : Cellules souches pluripotentes induites humaines de type brun

HLD: Hyperlipidémie

hMADS: Human multipotent adipose derived stem

HRP : Horseradish peroxidase

HSL : Lipase sensible aux hormones

HTN : Hypertension

I:

IBMX : 3-isobutyl-1-méthylxanthine



IDF : Fédération Internationale du Diabète
IKK: inhibitor of nuclear factor kappa-B
IL : interleukine
ILC : cellule lymphoïde innée
IMC: Indice de Masse Corporelle
INK4: INhibitors of CDK4
INSR: Insulin Receptor
IOTF: International Obesity Taskforce
IPA : Ingenuity pathway analysis
IpGTT : Test de tolérance au glucose en
intra-péritonéal
IRS: Insulin Receptor Substrate
ITT : Test de tolérance à l'insuline
iWAT : Tissu adipeux blanc sous-cutané

J:

JNK : c-Jun N-terminal Kinase

K:

Kip: Kinase inhibitory protein
KLF: Kruppel Like Factor
KO: Knockout
KRPH: Krebs-Ringer-Phosphate-HEPES

L:

LXR: Liver X receptors

M:

M1/M2: Macrophages
MAPK: Mitogen-Activated Protein kinase

MAPKAPK: Mitogen-Activated Protein
Kinase-Activated Protein Kinases
MCP-1: Monocyte Chemoattractant
Protein-1
MDM2 /HDM2: Mouse/Human Double
Minute 2 Homolog
MEC: Matrice extracellulaire
MODY: Maturity Onset Diabetes of the
Youth
mTOR C1 /C2: Mammalian target of
rapamycin complex I / complex II
Myf5 : Myogenic Factor 5
MyoD : Myogenic differentiation

N:

NAFLD : Stéatose hépatique non alcoolique
NAPDH : Nicotinamide adénine
dinucléotide phosphate
NF k B: Nuclear factor-kappa B
NGS: Next generation sequencing
NK: Cellules tueuses naturelles

O:

OCDE : Organisation de coopération et de
développement économiques
OCR : Taux de consommation d'oxygène
OD : Densité optique
OMS : Organisation mondiale de la santé

P:

p70S6K: Ribosomal protein S6 kinase beta-
1



PA : Progéniteur adipeux
PAF/PFA : Paraformaldéhyde
PAX3/7: protéine paired box 3 /7
PBS: Phosphate-buffered saline
PCR: polymérase en chaîne
PDGFR: Platelet-derived growth factor receptor
PDK 1 : Pyruvate Déshydrogénase kinase 1
Pdn6 : Hexamères aléatoires
PET-CT: Positron Emission Tomography
PGC1 α : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
PI3K : Phosphoinositide 3-kinase
PIM: Proviral Integration site for Moloney murine leukemia virus
PKA: Protéine Kinase A
PKAR2: Protein kinase, cAMP-dependent, regulatory subunit type 2
PKC: Protéine Kinase C
PKG: Protéine Kinase G
PoMICS : sénescence cellulaire post-mitotique
PPAR γ : Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma
PRDM16 : PR domain containing 16
PTK : Phosphotyrosine kinase

R:

RAS : p21
Rb : Protéine du rétinoblastome
RBP4 : Retinol Binding Protein 4
RER : Taux d'échange respiratoire
RIN : RNA integrity number

RT-PCR : Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction
RXR : Retinoid X Receptor

S:

SA-b-gal : Senescence-associated beta-galactosidase
SASP : phénotype sécrétoire associé à la sénescence
SC : Syndrome de cachexie
SCAT : Tissu adipeux blanc sous cutané
SCC : Syndrome de cachexie cancéreux
SM22 : Transgelin
SMAD: Suppressor of Mothers against Decapentaplegic
SNS : Système nerveux sympathique
Src: Non-Receptor Tyrosine Kinase
SREBP-1c: Sterol regulatory element-binding protein
STAT: Signal transducer and activators of transcription
STE7: Serine/threonine-protein kinase E7
STK : Sérine-thréonine kinase
SVF : Fraction stromale vasculaire
Syk: Spleen Associated Tyrosine Kinase

T:

T3 : Triiodothyronine
TA : Tissu Adipeux
TAB : Tissu adipeux blanc
TBS : Tris-buffer saline
TBX1 : T-box transcription factor 1
TG/TAG : TriGlycérine

TGF β : Transforming Growth Factor-beta1

Th 1 / 2: Lymphocyte T helper 1 / 2

TH: Tyrosine hydroxylase

TMEM26: Transmembrane Protein 26

TNF α : tumor necrosis factor α

Treg : T régulateurs

Treg: Lymphocyte T régulateur

Trk: Tropomyosin receptor kinase

TWEAK: TNF-related weak inducer of apoptosis

TZD : Thiazolidinediones

U:

UCP-1 : Uncoupling Protein 1

V:

VAT: Tissu adipeux perivisceral

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VLDL : Triglycérides de faible densité

W:

WAT: White adipose tissue

Wnt: Wingless/Integrated

Autres:

2DG : 2-Deoxy-D-glucose

2DG6P : 2-deoxy-D-glucose-6-phosphate

β -AR: récepteur β adrénergique



Tables des figures

Figure 1. Prévalence de l'obésité mondiale chez l'adulte (18 ans et +) selon OMS 2017.	21
Figure 2. Prévalence de l'obésité en France selon l'étude OBÉPI-ROCHE.	22
Figure 3. Évolution de la prévalence du surpoids et de l'obésité chez les enfants de 2 à 17 ans (selon les seuils IOTF) d'après l'étude Obépi-Roche 2020.	23
Figure 4. Schématisation du fonctionnement des organes métaboliques en condition normale.	24
Figure 5. Prévalence du diabète en France (santé publique France).	26
Figure 6. Développement diabète de type 1.	26
Figure 7. Action du récepteur à l'insuline lors du DT2.	27
Figure 8. Développement du DT2.	29
Figure 9. Développement du diabète de type 2, implication des organes métaboliques.	31
Figure 10. Fardeau mondial des maladies métaboliques [31].	32
Figure 11. Capacité multiligne des cellules souches adipeuses.	34
Figure 12. Représentation des 2 étapes de l'adipogenèse : la détermination et la différenciation [34].	35
Figure 13. Répartition anatomique des tissus adipeux blanc et brun chez l'Homme et la souris (adapté de Zhang et al., 2018)[47]. WAT sont indiqués en bleu, les TA pouvant devenir beiges en jaune et les TA plus classiques de type BAT en marron.	39
Figure 14. Composition cellulaire du tissu adipeux [49] adaptée de Bourgeois et al., 2019	40
Figure 15. Représentation schématique d'un adipocyte blanc, beige et brun.	42
Figure 16. Réaction inflammatoire du TA en condition physiologique et d'obésité.	48
Figure 17. Expansion du tissu adipeux blanc dans l'obésité.	55
Figure 18. Origine des adipocytes beiges.	55
Figure 19. Stimuli qui ont été associés au brunissement du WAT [70,71].	57
Figure 20. Régulation du cycle cellulaire.	59
Figure 21. Schéma du locus Cdkn2a et de ses actions cellulaires.	64
Figure 22. Le locus Cdkn2a : un acteur clé émergent des fonctions métaboliques. (Kahoul et al., 2020)	73
Figure 23. Rôles de Cdkn2a dans le TA.	74
Figure 24. Validation du modèle AdipoQCre Tomato.	90

Figure 25. Diminution de l'expression de l'ARNm des deux protéines codées par Cdkn2a.....	91
Figure 26. Évolution du poids chez les souris Cdkn2a ^{ad+/+} et Cdkn2a ^{ad-/-}	92
Figure 27. Amélioration de la tolérance au glucose chez les souris Cdkn2a ^{ad-/-} suite à un régime HFD.....	93
Figure 28. Les souris Cdkn2a ^{ad-/-} ne présentent aucun changement de leur profil insulinémique.....	94
Figure 29. Les souris Cdkn2a ^{ad-/-} présentent une augmentation de la dépense énergétique.....	95
Figure 30. Les souris Cdkn2a ^{ad-/-} présentent une hypoleptinémie et un taux réduit de résistine.....	97
Figure 31. Masse des différents dépôts de tissus adipeux des souris Cdkn2a ^{ad-/-} et Cdkn2a ^{ad+/+} à 12 semaines de HFD.....	97
Figure 32. Hypertrophie de l'eWAT et hypoplasie de l'iWAT chez les souris Cdkn2a ^{ad-/-} suite à un HFD.....	98
Figure 33. L'extinction spécifique du gène Cdkn2a dans l'adipocyte mature semble diminuer l'inflammation dans l'eWAT.....	99
Figure 34. Volcano-plots de l'analyse transcriptomique des dépôts de TA des souris Cdkn2a ^{ad-/-}	100
Figure 35. Profil transcriptomique des souris Cdkn2a ^{ad-/-} et Cdkn2a ^{ad+/+} dans le BAT.....	102
Figure 36. Les souris Cdkn2a ^{ad-/-} présentent un profil transcriptomique dans l'eWAT avec des expressions diminuées pour la voie de régulation eif4 et P70S6K et augmentées pour la capture de glucose ainsi que pour sa capacité oxydative.	103
Figure 37. Validation du protocole de différenciation des cellules 3T3-L1.....	105
Figure 38. Expression de Cdkn2a et de l'adiponectine au cours de la différenciation des cellules 3T3-L1.....	105
Figure 39. Validation du protocole d'extinction siRNA Cdkn2a à 48h.....	106
Figure 40. Effet de la délétion de Cdkn2a sur la teneur en triglycérides des cellules 3T3-L1 différenciées.....	107
Figure 41. Mito Stress Test Assay Seahorse utilisé pour déterminer la fonction mitochondriale cellulaire.....	108
Figure 42. La respiration mitochondriale est améliorée dans les cellules 3T3-L1 siCdkn2a.....	108
Figure 43. La capture du glucose est améliorée dans les cellules 3T3-L1 siCdkn2a.	109



Figure 44. Présentation de la technologie PamGene et principe du test PamChip.....	111
Figure 45. Analyse du kinome des cellules 3T3-L1 différenciées et déficientes en CDKN2A versus contrôles.	112
Figure 46. Effet du palmitate sur la sensibilité à l'insuline par mesure de la phosphorylation d'AKT.	116
Figure 47. Effet de l'extinction de Cdkn2a sur la teneur en triglycérides des cellules 3T3-L1 différenciées.....	117
Figure 48. La respiration mitochondriale est améliorée dans les cellules 3T3-L1 siCdkn2a suite à une stimulation au palmitate.....	118
Figure 49. La capture du glucose est améliorée dans les cellules 3T3-L1 siCdkn2a. .	119
Figure 50. Analyse du kinome des cellules 3T3-L1 différenciées déficientes en CDKN2A versus contrôles après stimulation au palmitate.	120
Figure 51. Graphical abstract Knocking Down CDKN2A in 3D hiPSC-Derived Brown Adipose Progenitors Potentiates Differentiation, Oxidative Metabolism and Browning Process.....	126
Figure 52. Représentation schématique de la conclusion de cette étude.	130
Figure 53. Mécanismes d'action possible de l'extinction de Cdkn2a dans l'adipocyte mature.....	145



Liste des tableaux

Tableau 1. Prévalence du diabète dans le monde, et en Europe [14].	25
Tableau 2. Liste des amorces de géotypage.	77
Tableau 3. Liste des amorces sens et antisens utilisées pour q-PCR.	80
Tableau 4. Analyse du kinome des cellules 3T3-L1 différenciées et déficientes en CDKN2A versus contrôles.	113
Tableau 5. Analyse du kinome des cellules 3T3-L1 différenciées stimulées à l'insuline et déficientes en Cdkn2a versus contrôles.	115
Tableau 6. Analyse du kinome des cellules 3T3-L1 différenciées stimulées au palmitate et déficientes en Cdkn2a versus contrôles.	122
Tableau 7. Analyse du kinome des cellules 3T3-L1 différenciées stimulées au palmitate, à l'insuline et déficientes en Cdkn2a versus contrôles.	123



Introduction

I. L'obésité et ses comorbidités

A. Définition

De nos jours l'obésité, définie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme « une maladie multifactorielle complexe définie par l'accumulation excessive ou anormale de graisse présentant un risque pour la santé » est considérée comme une véritable pandémie. Une personne est considérée obèse lorsque son indice de masse corporelle (IMC) est égal ou supérieur à 30. Cette pandémie constitue un problème économique, social et de santé publique majeur. Cette accumulation excessive de graisse se localise au niveau du tissu adipeux et est due à un déséquilibre de la balance énergétique avec, notamment, une augmentation de l'apport énergétique (alimentation), associée à une diminution de la dépense énergétique (activité physique) [1]. En effet, bien que la génétique puisse expliquer une partie de la variation de la masse corporelle, les facteurs environnementaux tels que la surnutrition et les aliments ultra-transformés, le mode de vie sédentaire, les xénobiotiques, ainsi que l'exposition aux produits chimiques sont les principaux contributeurs [2]. L'expansion du tissu adipeux blanc (TAB) sur le long terme est associée à l'apparition d'un profil inflammatoire marqué, qui conduit ainsi à la dysfonction de celui-ci (i.e., altération de l'extensibilité et de la plasticité) [3]. L'incapacité d'une expansion supplémentaire du TA accélère le transfert de graisse du TA vers le muscle squelettique et le foie, entraînant un dépôt de graisse ectopique et une résistance à l'insuline dans ces tissus, qui jouent un rôle crucial dans la résistance systémique à l'insuline et le DT2 [4,5]. Ces modifications qui contribuent fortement au développement des comorbidités telles que le diabète de type 2 (DT2), les maladies cardiovasculaires et l'obésité [6,7], font du TA une nouvelle cible thérapeutique potentielle.

B. Prévalence

Durant la plus grande partie de l'évolution humaine, l'accès à la nourriture était limité et sporadique. Pour la survie de l'Homme, il fallait donc être capable de stocker en prévision des longs moments d'insécurité alimentaire. Cette capacité de stockage est réalisée par le tissu adipeux. En effet, le tissu adipeux est défini comme le principal réservoir énergétique grâce à la capacité des adipocytes de stocker le surplus d'énergie [8]. Cependant de nos jours, pour

la majorité de la population mondiale qui a un mode de vie sédentaire, l'accès à la nourriture n'est plus un problème. En revanche, la suralimentation chronique a engendré à travers le monde une épidémie de l'obésité et de ses comorbidités. En effet, selon l'OMS, depuis 1975, le nombre de cas d'obésité à l'échelle mondiale aurait presque triplé. En 2016, plus de 1,9 milliard d'adultes étaient en surpoids dont 650 millions étaient obèses soit respectivement 39% et 13% de la population mondiale (Figure 1). Ce chiffre devrait dépasser les 3 milliards d'ici 2030 [9]. La plupart de la population mondiale vit dans des pays où le surpoids et l'obésité font davantage de morts que l'insuffisance pondérale. L'OMS a reconnu le surpoids et l'obésité comme la cinquième cause de mortalité dans le monde. Suite à la crise sanitaire du covid-19, l'obésité a multiplié par deux les risques d'entrée en réanimation des personnes atteintes du covid-19 et par un facteur compris entre deux et trois les risques de décès [10].

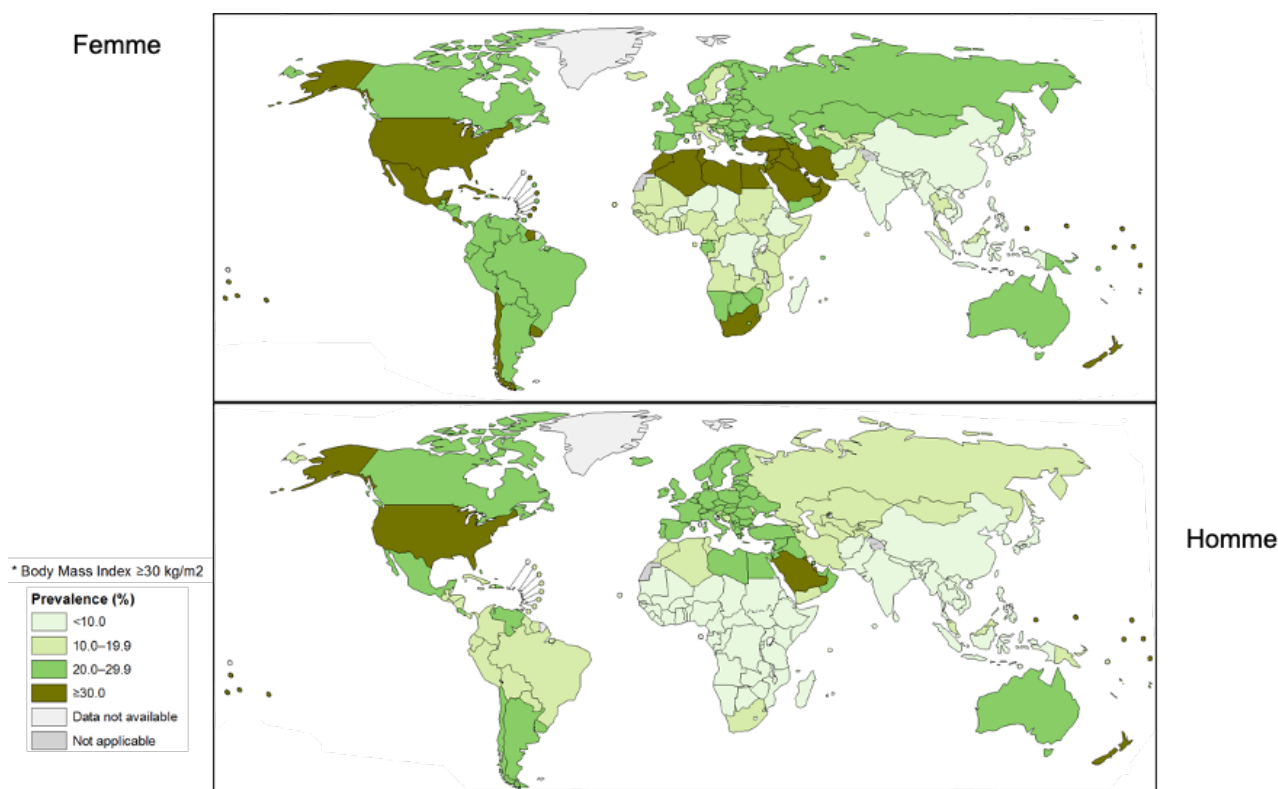


Figure 1. Prévalence de l'obésité mondiale chez l'adulte (18 ans et +) selon OMS 2017.

En France, le dernier rapport de l'étude OBÉPI-ROCHE de 2020 [11] a mis en avant une recrudescence des taux d'obésité nationale avec une augmentation de 2% depuis l'étude de 2012, ce qui signifie qu'une personne sur deux est en état de surpoids ou d'obésité. En effet, désormais le taux d'obésité national en France est de 17%, soit environ 8 567 128 d'individus, contre 15% en 2012. Parmi ces individus, 2% sont en situation d'obésité massive, soit plus d'un million de personnes. Cette étude a aussi démontré que l'obésité touche de façon inégale en fonction du sexe, des tranches d'âge, du milieu socio-culturel et des régions (Figure

2). Effectivement, comme à l'échelle mondiale les femmes sont les plus touchés que les hommes avec une progression de 1,7 points par rapport à 2012, avec notamment plus d'obésité massive (1,8%).

En revanche, l'évolution de la prévalence de l'obésité s'accroît avec l'âge indépendamment du sexe, puisqu'on observe une augmentation de la sédentarité et une diminution de l'activité physique avec l'âge. Effectivement, les personnes âgées de plus de 65 ans représentent la tranche d'âge avec le taux de prévalence le plus élevé avec 19,9%. On observe aussi une augmentation significative chez les 18-24 ans par rapport aux années précédentes, tranche d'âge à grand risque de développer une obésité.

Des différences significatives sont observées en fonction des différentes régions française, avec notamment une rupture nette entre les régions nord et sud de la France. En effet, les trois régions où la prévalence de l'obésité est largement plus importantes se trouve dans la partie nord-est de la France avec les Hauts-de-France, ayant le taux d'obésité le plus élevé avec 22,1%, suivi du Grand-Est 20,2% et la Normandie 19,8%.

De plus, selon l'OCDE, la durée de vie moyenne des français serait réduite de 2,3 ans en raison du surpoids et l'obésité.

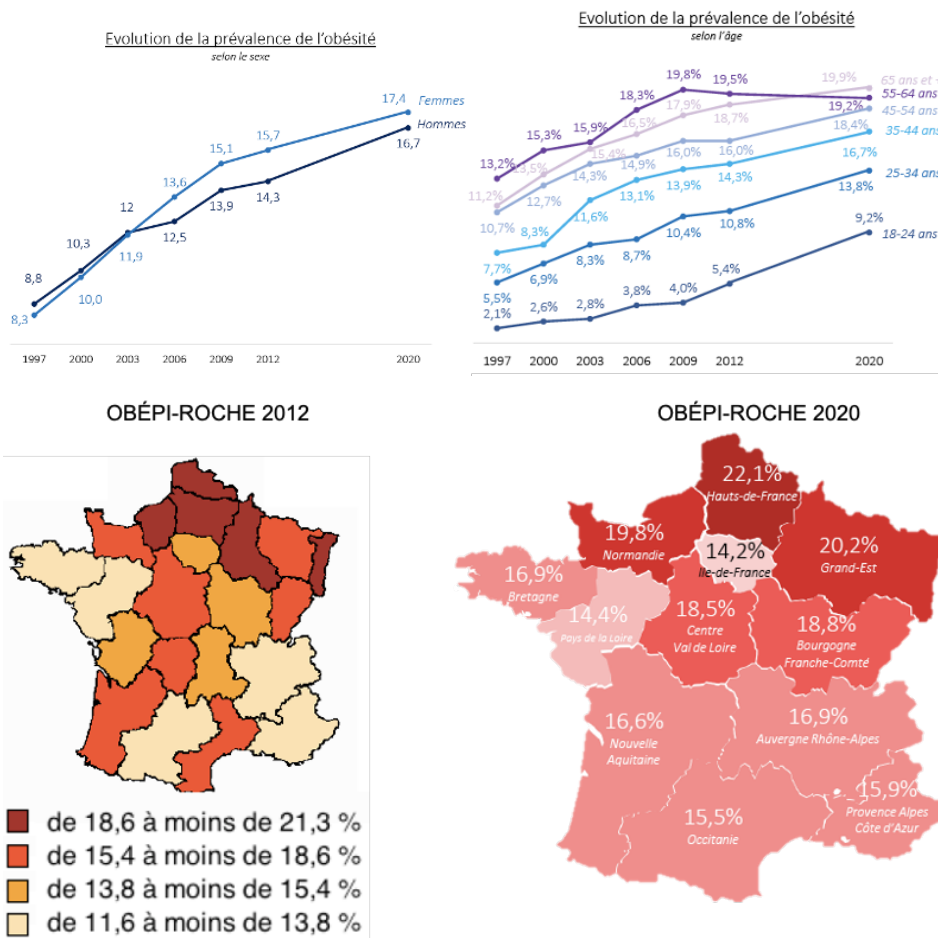


Figure 2. Prévalence de l'obésité en France selon l'étude OBÉPI-ROCHE.



Ce fléau qu'est l'obésité ne concerne pas que les adultes. En effet, les taux d'obésité infantile augmentent fortement dans le monde et en France, avec une recrudescence suite au confinement dû à la COVID-19.

Cette obésité infantile concerne de plus en plus les enfants et jeunes adultes. Selon l'OMS en 2016, plus de 340 millions d'enfants et d'adolescents âgés de 5 à 19 ans étaient en surpoids ou obèses, atteignant en 2019, 38 millions d'enfants de moins de 5.

En France, la prévalence du surpoids et de l'obésité pédiatrique atteint 34% des enfants de 2 à 7 ans en 2020, avec 18% en situation d'obésité (Obépi-roche2020). La prévalence la plus élevée est observée chez les enfants entre 5-7 ans, 39% des enfants de ces âges sont en surpoids ou obèse (19%) (Figure 3). Chez les enfants de 8 à 17 ans, cette prévalence diminue atteignant 21% en surpoids et/ou obésité dont 6% obèses (Obépi-roche2020).

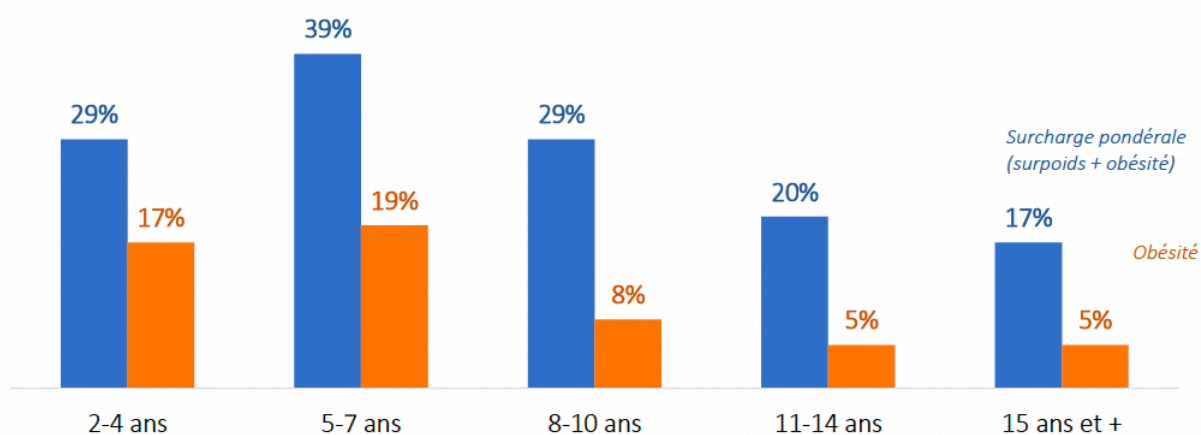


Figure 3. Évolution de la prévalence du surpoids et de l'obésité chez les enfants de 2 à 17 ans (selon les seuils IOTF) d'après l'étude Obépi-Roche 2020.

C. Traitements actuels

Actuellement, les traitements de première intention consistent en la réduction de l'apport énergétique par modification des habitudes alimentaires et/ou de l'activité physique. Des traitements pharmacologiques basés sur la diminution de la prise alimentaire ainsi que la chirurgie bariatrique sont actuellement utilisés en seconde intention, mais ne sont pas adaptés à tous les patients. Il est parfois utile d'associer aux mesures hygiéno-diététiques, des médicaments, un suivi psychologique, voire même une prise en charge chirurgicale. Néanmoins, ces approches thérapeutiques se sont avérées inefficaces à long terme, d'où la nécessité de trouver de nouvelles cibles de traitements.



II. Le diabète

A. Définition

La Fédération Internationale du Diabète (IDF) définit le diabète mellitus, plus simplement appelé diabète, comme « une affection grave à long terme (ou « chronique ») qui se produit lorsque des niveaux élevés de glucose sont présents dans le sang parce que le corps ne peut pas produire une partie ou une quantité suffisante de l'hormone insuline ou ne peut pas utiliser efficacement l'insuline qu'il produit. »

En effet, le diabète est une maladie métabolique chronique qui se caractérise par la présence d'une hyperglycémie chronique. Il est avéré si le taux de glycémie à jeun est égal ou supérieur à 1,26 g/l ou 7 mmol/l de sang lors de deux dosages successifs. Cette hyperglycémie chronique est due à un défaut dans la fonction et de masse des cellules bêta pancréatiques, sécrétrices d'insuline, et/ou par l'apparition d'une résistance à l'insuline au niveau des autres organes métaboliques périphériques tels que le tissu adipeux, les muscles ou le foie (Figure 4). Cette maladie métabolique peut être catégorisée en 4 grandes formes de diabète : le diabète de type 1, le diabète de type 2, le diabète gestationnel et les diabètes monogéniques avec des prévalences différentes[12,13].

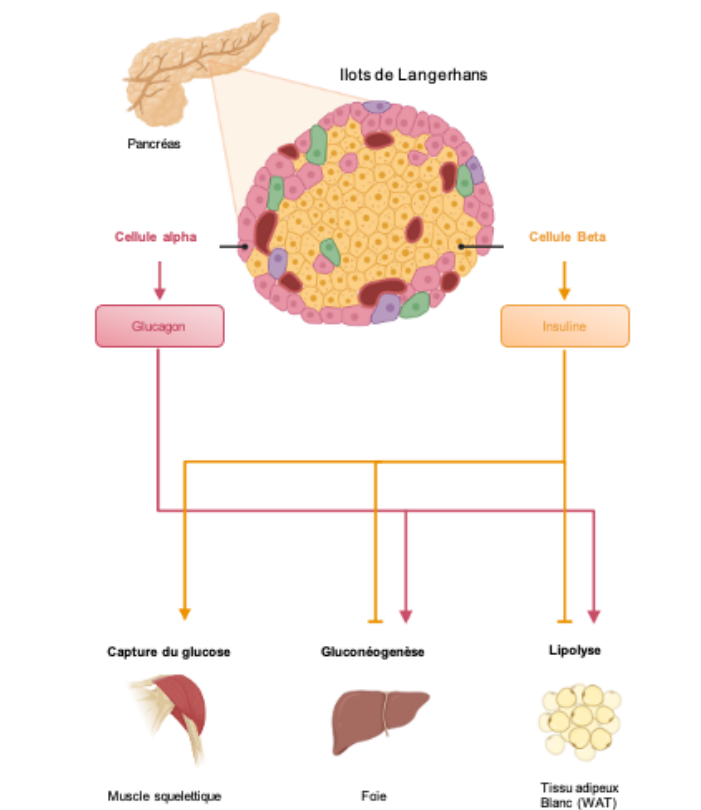


Figure 4. Schématisation du fonctionnement des organes métaboliques en condition normale.

B. Prévalence

Le diabète est l'une des maladies les plus répandues dans le monde, selon l'IDF le nombre de diabétiques dans le monde ne cesse d'augmenter. En 2016, on estimait que 422 millions de personnes souffraient de diabète dans le monde, dont plus de 90 % souffraient de diabète de type 2, avec une tendance à l'augmentation. En 2019, le nombre de diabétiques dans le monde a atteint les 463 millions soit 9,3% de la population mondiale. Il est prévu que cette augmentation de 25% atteignant ainsi les 578 millions d'ici 2030, soit 10,2% de la population mondiale. D'ici 2045, cette augmentation aura atteint les 700 millions de diabétiques, soit 10,9% de la population mondiale [14] (Tableau 1).

Table 1 - World-age standardised prevalence (%) of diabetes among ages 20–79 years in IDF Regions, ranked by 2019 world-age standardised prevalence estimates.

Rank	IDF Region	2019 ¹		2030 ¹		2045 ¹	
		Number of people with diabetes, Million	World-age standardised diabetes prevalence, %	Number of people with diabetes, Million	World-age standardised diabetes prevalence, %	Number of people with diabetes, Million	World-age standardised diabetes prevalence, %
	World	463.0 (368.7–600.6)	8.3 (6.2–11.8)	578.4 (456.5–747.6)	9.2 (6.8–12.9)	700.2 (540.7–904.6)	9.6 (7.1–13.4)
1	MENA	54.8 (30.7–75.1)	12.2 (8.3–16.1)	76.0 (43.0–104.1)	13.3 (9.1–17.6)	107.6 (60.6–147.4)	13.9 (9.5–18.3)
2	WP	162.6 (146.6–203.0)	11.4 (8.3–15.6)	196.5 (176.6–241.6)	12.4 (9.0–16.8)	212.2 (188.3–255.9)	12.8 (9.3–17.4)
3	SEA	87.6 (70.9–110.9)	11.3 (8.0–15.9)	115.1 (92.9–144.5)	12.2 (8.6–17.2)	152.8 (123.4–190.1)	12.6 (8.9–17.7)
4	NAC	47.6 (37.4–56.4)	11.1 (9.0–14.5)	56.0 (43.4–66.5)	12.3 (10.0–15.9)	63.2 (48.1–74.9)	13.0 (10.5–16.5)
5	SACA	31.6 (26.3–39.2)	8.5 (6.7–11.3)	40.2 (33.3–49.9)	9.5 (7.4–12.6)	49.1 (40.3–60.7)	9.9 (7.8–13.2)
6	EUR	59.3 (46.3–80.2)	6.3 (4.9–9.2)	66.0 (51.3–87.9)	7.3 (5.6–10.3)	68.1 (52.6–89.6)	7.8 (6.0–10.8)
7	AFR	19.4 (10.6–35.8)	4.7 (3.2–8.1)	28.6 (16.0–53.1)	5.1 (3.4–8.8)	47.1 (27.4–86.0)	5.2 (3.5–9.1)

IDF: International Diabetes Federation; AFR: Africa; EUR: Europe; MENA: Middle East and North Africa; NAC: North America and Caribbean; SACA: South and Central America; SEA: South-East Asia; WP: Western Pacific.
¹ Confidence intervals are presented in brackets.

Tableau 1. Prévalence du diabète dans le monde, et en Europe [14].

La France ne fait pas exception, en effet, la prévalence du diabète traité pharmacologiquement ne cesse d'augmenter puisqu'en 2016, plus de 3,3 millions de personnes étaient traitées pour un diabète (92% diabète de type 2), soit 5% de la population. Selon santé publique France en 2020, ce chiffre dépasse les 3,5 millions, soit 5,3 % de la population (Figure 5) [15]. En plus des diabétiques dont le diabète a été diagnostiqué, il y a une partie de diabétique qui n'ont pas encore été diagnostiqué. On estime que 1 diabétique sur 2 n'est pas encore diagnostiqué.

Tout comme pour l'obésité, on observe des variabilités en fonctions du sexe et de la région. En effet, on peut observer une prévalence plus élevée chez les hommes que chez les femmes, avec un pourcentage atteignant les 6% pour les hommes en 2020 et d'environ 4,5% pour les femmes (Figure 5). La disparité territoriale est elle aussi très marquée avec notamment une prévalence plus élevée dans les départements d'Outre-mer et Seine Saint-Denis. On retrouve aussi les départements du Nord-Est et du Val d'Oise (Figure 5).



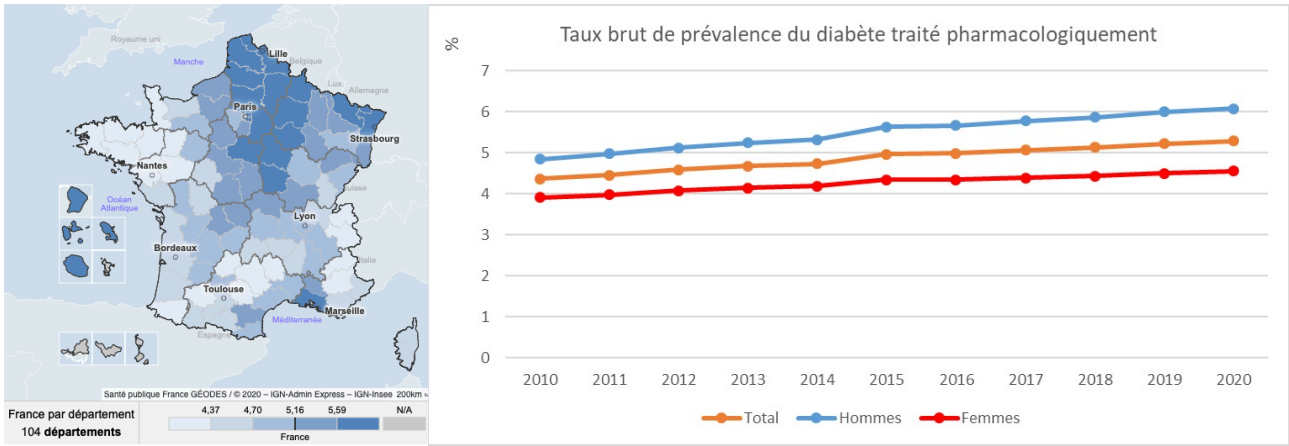


Figure 5. Prévalence du diabète en France (santé publique France).

C. Les différents types de diabètes

1. Le diabète de type 1

Le diabète de type 1, représente 10% des personnes diabétiques, il est causé par un processus auto-immun dans lequel le système immunitaire de l'organisme attaque les cellules bêta productrices d'insuline du pancréas (Figure 6). En conséquence, le corps produit très peu ou pas d'insuline. Les causes de ce processus destructeur ne sont pas entièrement comprises, mais une explication probable est que la combinaison de la susceptibilité génétique (conférée par un grand nombre de gènes) et d'un déclencheur environnemental tel qu'une infection virale, initie la réaction auto-immune [16,17]. La maladie peut se développer à tout âge, bien que le diabète de type 1 survienne le plus souvent chez les enfants et les jeunes adultes. Le diabète de type 1 est l'une des maladies chroniques les plus courantes chez l'enfant [17]. Le diabète de type 2 est également observé chez les enfants plus âgés et augmente dans certains pays à mesure que le surpoids et l'obésité infantiles deviennent plus courants[17].

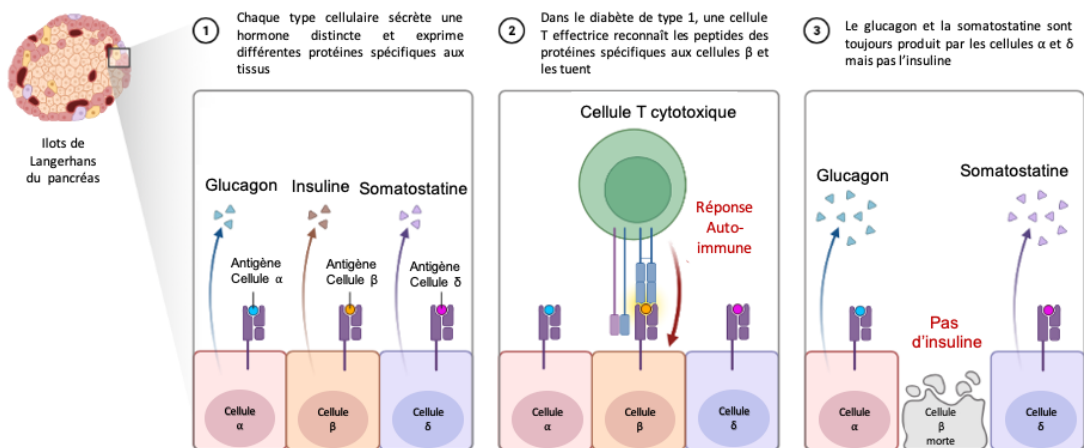


Figure 6. Développement diabète de type 1.



2. Le diabète de type 2

Le diabète de type 2, anciennement appelé diabète non insulino-dépendant ou diabète d'âge adulte, est le type de diabète le plus courant, représentant plus de 90 % de tous les diabètes dans le monde. Cette catégorie de diabète englobe les personnes qui ont une résistance à l'insuline, c'est-à-dire une désensibilisation du récepteur à l'insuline, associé généralement à une carence relative en insuline, qui conduit à l'inhibition du transport de glucose (Figure 7) engendrant une hyperglycémie. Les causes du diabète de type 2 ne sont pas complètement comprises, mais il existe un lien étroit avec le surpoids, l'obésité, l'âge, l'origine ethnique et les antécédents familiaux. Comme pour le diabète de type 1, on pense que les facteurs contribuant au risque de diabète de type 2 incluent des déclencheurs polygéniques et environnementaux.

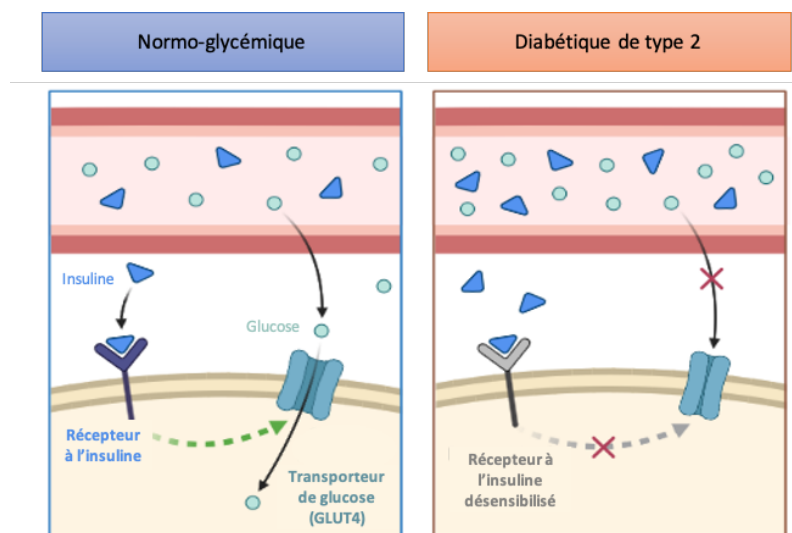


Figure 7. Action du récepteur à l'insuline lors du DT2.

À l'échelle mondiale, la prévalence du diabète de type 2 est élevée et en augmentation dans toutes les régions. Cette augmentation est due au vieillissement de la population, au développement économique et à l'urbanisation croissante, entraînant des modes de vie plus sédentaires et une plus grande consommation d'aliments liés à l'obésité [18]. Cependant, les résultats bénéfiques d'un dépistage précoce, d'un traitement plus efficace et de la survie plus longue qui en résulte contribuent également à la hausse de la prévalence. Le diabète de type 2 est également devenu une préoccupation chez les enfants et les jeunes en raison de la prévalence croissante de l'obésité.

La première intention de traitement du diabète de type 2 fait la promotion d'un mode de vie qui inclut une alimentation saine, activité physique régulière, arrêt du tabac et le maintien d'un poids corporel sain. Si des tentatives de changement de mode de vie sont insuffisantes

pour contrôler la glycémie, une médication orale est généralement instaurée, la metformine étant le médicament de première intention. Si le traitement avec un seul médicament antidiabétique n'est pas suffisant, une gamme d'options thérapeutiques combinées est désormais disponible (par exemple, les sulfonylurées, les inhibiteurs de l'alpha-glucosidase, les thiazolidinediones, les inhibiteurs de la dipeptidyl peptidase 4 [DPP-4], les agonistes du glucagon-like peptide 1 [GLP-1] et le co-transporteur sodium glucose 2 inhibiteurs). Des injections d'insuline peuvent être nécessaires pour contrôler l'hyperglycémie aux niveaux recommandés si les médicaments autres que l'insuline ne parviennent pas à contrôler la glycémie.

3. Le diabète gestationnel

Selon l'OMS et la Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO), l'hyperglycémie pendant la grossesse (HIP) peut être classée comme diabète prégestationnel, diabète sucré gestationnel (GDM) ou diabète pendant la grossesse (DIP) [19,20]. Le diabète prégestationnel comprend les femmes atteintes de diabète de type 1, de type 2 ou de formes plus rares connues avant la grossesse. Le DG peut survenir à tout moment pendant la période prénatale et ne devrait pas persister après l'accouchement [21]. Le DIP s'applique aux femmes enceintes atteintes d'hyperglycémie qui ont été diagnostiquées pour la première fois pendant la grossesse et qui répondent aux critères de diabète de l'OMS en dehors de la grossesse. Le DIP est mieux détecté au cours du premier trimestre [22]. Il a été estimé que la plupart (75 % à 90 %) des cas de HIP sont des DGM [13].

4. Les diabètes monogéniques

Le diabète monogénique que l'on appelait autrefois le « diabète secondaire », résulte d'un seul gène plutôt que la contribution de plusieurs gènes et facteurs environnementaux, comme on le voit dans le diabète de type 1 et de type 2. Le diabète monogénique est beaucoup moins courant et représente 1,5 à 2 % de tous les cas, bien que cela puisse être une sous-estimation car il est souvent diagnostiqué à tort comme un diabète de type 1 ou de type 2 [23]. Ces formes monogéniques présentent un large spectre, allant du diabète mellitus néonatal (parfois appelé « diabète monogénique de la petite enfance »), au diabète de la maturité du jeune (MODY) et aux maladies syndromiques rares associées au diabète [24].

D'un point de vue clinique, le diagnostic exact des formes monogéniques de diabète est important car, dans certains cas, le traitement peut être adapté au défaut génétique spécifique

[23]. Une distinction plus poussée entre les 14 sous-types différents de MODY conduit non seulement à des différences dans la prise en charge clinique, mais également à des prédictions différentes du risque de complication. Ces dernières années, avec l'accumulation d'études d'association à l'échelle du génome, un nombre croissant de formes monogéniques de diabète ont été découvertes [24–26]. Ainsi, la prévalence réelle de ces types peut être sous-estimée. Le diabète peut également survenir à la suite d'autres conditions. Ces autres types spécifiques de diabète sont énumérés ci-dessous, selon la classification du diabète la plus récente de l'OMS [27].

D. Le développement du diabète de type 2

Le diabète de type 2 pouvant être asymptomatique, il se développe silencieusement pendant de nombreuses années et il est donc difficile de déterminer le moment exact de son apparition (Figure 8). En conséquence, il y a souvent une longue période de pré-diagnostic et jusqu'à un tiers voire la moitié des personnes atteintes peuvent ne pas être diagnostiqué. La maladie est souvent découverte de façon fortuite à l'occasion d'une prise de sang, ou en cas de complication. En effet, si le diagnostic est retardé pendant une période prolongée, des complications telles qu'une déficience visuelle, des ulcères des membres inférieurs qui guérissent mal, une maladie cardiaque ou un accident vasculaire cérébral peuvent conduire au diagnostic [28,29].

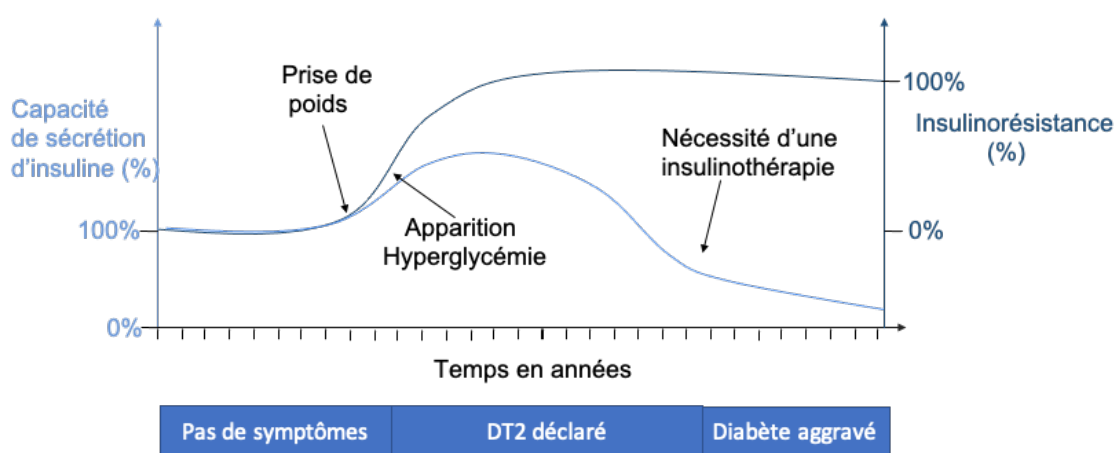


Figure 8. Développement du DT2.

Dans le diabète de type 2, l'hyperglycémie est le résultat, initialement, de l'incapacité des cellules de l'organisme à répondre pleinement à l'insuline, une condition appelée résistance à l'insuline (Figure 9). Avec l'apparition de la résistance à l'insuline, l'hormone est moins efficace et, en temps voulu, provoque une augmentation de la production d'insuline. Au

fil du temps, une production inadéquate d'insuline peut se développer en raison de l'incapacité des cellules bêta pancréatiques à répondre à la demande [30].

L'insuline est l'hormone clé de la régulation de la glycémie et, généralement, la normoglycémie est maintenue par l'interaction équilibrée entre l'action de l'insuline et la sécrétion d'insuline. La cellule pancréatique saine peut s'adapter aux modifications de l'action de l'insuline, c'est-à-dire qu'une diminution de l'action de l'insuline s'accompagne d'une régulation à la hausse de la sécrétion d'insuline (et vice versa). Ainsi, le dysfonctionnement des cellules β est un élément clé dans la pathogenèse du diabète de type 2.

Lorsque l'action de l'insuline diminue (comme dans le cas d'une obésité croissante), le système compense généralement en augmentant la fonction des cellules β . Cependant, dans le même temps, les concentrations de glucose sanguin à jeun et 2 h après la charge de glucose augmenteront légèrement. Chez les sujets pré-diabétiques on va retrouver ce qu'on appelle une phase d'intolérance au glucose, elle va se définir par une résistance progressive à l'insuline dans les tissus périphériques avec en premier le TA. Afin de pallier à cette résistance au niveau des tissus périphériques les cellules β pancréatique vont surproduire de l'insuline. Il va donc avoir d'abord une phase de prédiabétique insulino-résistant suivi d'une phase prédiabétique hyperinsulinémique (Figure 9). Cette augmentation pourrait bien être faible, mais avec le temps, elle devient dommageable en raison de la toxicité du glucose et constitue en soi une cause de dysfonctionnement. Ainsi, même avec une réserve cellulaire théoriquement illimitée, la résistance à l'insuline ouvre la voie à l'hyperglycémie et au DT2.

On dit que la résistance à l'insuline est présente lorsque les effets biologiques de l'insuline sont moindres que prévu à la fois pour l'utilisation du glucose dans le muscle squelettique et la suppression de la production endogène de glucose principalement dans le foie. À jeun, cependant, le muscle ne représente qu'une petite proportion de l'utilisation du glucose (moins de 20 %) alors que la production endogène de glucose est responsable de tout le glucose entrant dans le plasma. La production endogène de glucose est accélérée chez les patients atteints de DT2 ou d'une glycémie à jeun altérée. Étant donné que cette augmentation se produit en présence d'hyperinsulinémie, au moins dans les stades précoces et intermédiaires de la maladie, la résistance à l'insuline hépatique est le moteur de l'hyperglycémie de type 2 diabète (Figure 9).

La résistance à l'insuline est fortement associée à l'obésité et à l'inactivité physique, et plusieurs mécanismes médiant cette interaction ont été identifiés. Un certain nombre d'hormones circulantes, de cytokines et de substrats énergétiques, tels que les acides gras non estérifiés (libres) (AGNE) proviennent de l'adipocyte et modulent l'action de l'insuline. Une masse accrue de triglycérides (TG) stockés, en particulier dans les dépôts adipeux viscéraux



ou sous-cutanés profonds, conduit à des adipocytes hypertrophiés qui sont eux-mêmes résistants à la capacité de l'insuline à supprimer la lipolyse. Cela entraîne une augmentation de la libération et des niveaux circulants d'AGNE et de glycérol, qui aggravent tous deux la résistance à l'insuline dans les muscles squelettiques et le foie (Figure 9).

Le stockage excessif des graisses non seulement dans les adipocytes mais « ectopiquement » dans les cellules non adipeuses a également un rôle important. Par exemple, une augmentation des lipides intramyocellulaires est associée à une résistance à l'insuline du muscle squelettique dans certaines circonstances. Le couplage entre les lipides intrahépatiques et la résistance hépatique à l'insuline est bien établie.

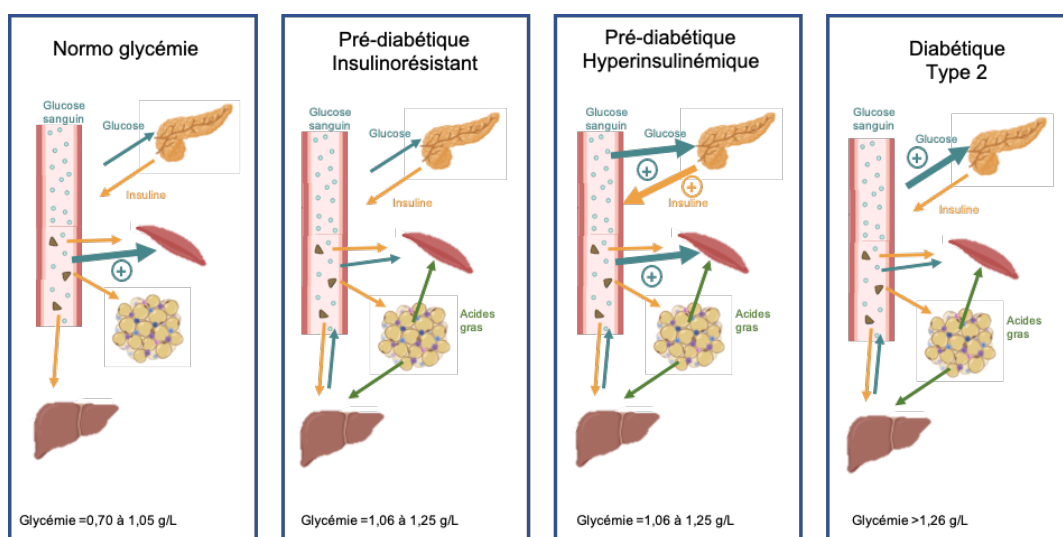


Figure 9. Développement du diabète de type 2, implication des organes métaboliques.

III. Les maladies métaboliques focus sur la diabésité

La prévalence mondiale des maladies métaboliques a augmenté au cours des deux dernières décennies (Figure) [31]. Le terme générique « maladies métaboliques » comprend l'hypertension (HTN), le DT2, l'hyperlipidémie (HLD), l'obésité et, plus récemment, la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD). Les taux de mortalité ont diminué au fil du temps dans l'hyperlipidémie, l'hypertension et la NAFLD, malgré une augmentation du nombre de cas, mais pas dans le DT2 et l'obésité (Figure 10) [31]. Bon nombre de ces maladies survient en tandem, partageant des facteurs de risque communs et est associé à des risques accrus d'invalidité, de cancers et de décès prématurés.

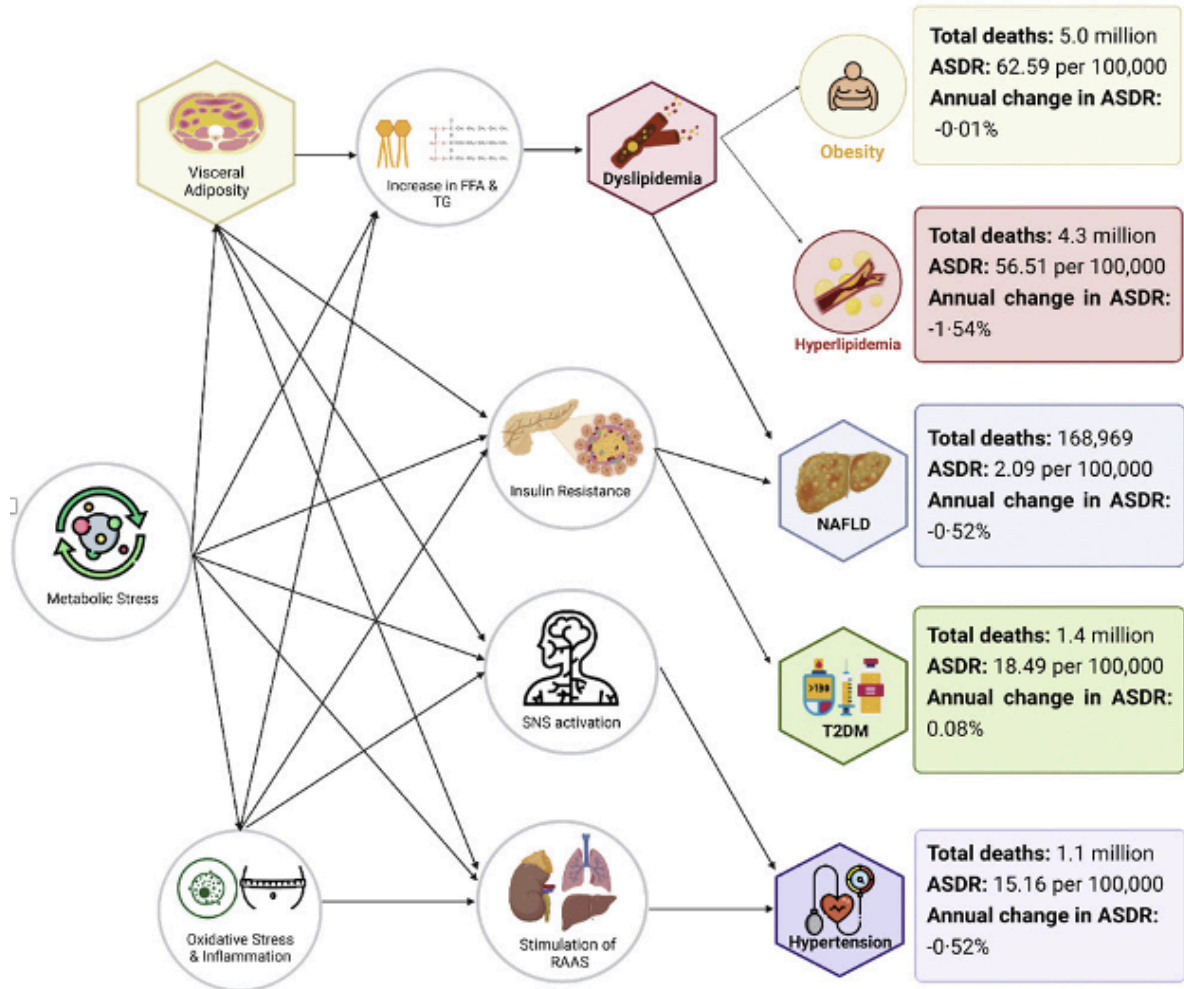


Figure 10. Fardeau mondial des maladies métaboliques [31].

Les trajectoires des maladies métaboliques étant souvent étroitement liées, un nouveau terme est apparu ces dernières années : diabésité.

Le terme « diabésité » désigne la conjonction de l'obésité et du diabète de type 2. La diabésité se définit comme une insulino-résistance sévère et un syndrome métabolique avec excès d'adiposité viscérale, de dépôts graisseux dans les muscles, le foie et les îlots de Langerhans et de dyslipidémie. De nombreuses zones d'ombre persistent dans la compréhension des mécanismes impliqués. L'adipocyte du tissu adipeux viscéral semble être un élément clé du processus par des anomalies de fonctionnement liées à l'obésité et l'insulino-résistance. Les principales complications de la diabésité sont les maladies cardiovasculaires, pulmonaires, ostéoarticulaires, mais aussi les cancers (côlon, sein, prostate).

Le mode de vie des pays occidentaux, (associant régimes alimentaires hypercaloriques déséquilibrés et sédentarité), des facteurs environnementaux, sociétaux ou génétiques sont

identifiés comme des éléments dérégulateurs de la balance appétit/satiété dont la conséquence peut être le DT2.

Face à ces risques, l'objectif en termes de santé publique est de dépister les sujets obèses exposés au syndrome métabolique et donc à la diabésité avec son cortège de complications précoces.

IV. Le tissu adipeux

A. Caractéristiques générales du tissu adipeux

Le tissu adipeux est un tissu complexe qui joue un rôle central dans la régulation de l'homéostasie énergétique, puisqu'il sert de site de stockage énergétique en condition postprandiale (surplus) ou de substrat énergétique en cas de jeûne ou d'exercice physique, grâce à la libération d'acides gras circulants par lipolyse. Il a été montré que le tissu adipeux était impliqué dans différentes fonctions, notamment dans la régulation de la satiété, de la réponse immunitaire, les fonctions thyroïdiennes, etc...

Chez les mammifères il existe deux grands types de tissus adipeux, les tissus adipeux blanc et brun, qui se différencient de par leur origine, leur localisation et plus particulièrement leur fonction [32].

B. Origine

Chez l'Homme, le tissu adipeux dérive du mésoderme au cours du développement embryonnaire. Sa formation débute au milieu ou à la fin de la gestation, et à la naissance, les dépôts viscéraux et sous-cutanés sont visibles [33]. Les adipocytes situés dans la région craniofaciale proviennent du neuroectoderme [34]. En revanche, chez les rongeurs, le tissu adipeux blanc (WAT) est indétectable à l'échelle macroscopique pendant l'embryogenèse. Le développement du tissu adipeux est un processus continu, présent tout au long de la vie de l'individu et observable chez toutes les espèces de mammifères.

Les adipocytes se développent à partir de cellules précurseurs appelées préadipocytes, qui dérivent elles-mêmes de progéniteurs mésenchymateux, c'est-à-dire des cellules souches mésenchymateuses multipotentes, donnant naissance aux ostéoblastes, aux myoblastes et aux adipoblastes (Figure 11). Ces cellules souches multipotentes constituent une source illimitée de cellules différenciées, grâce à leur capacité à s'auto-renouveler indéfiniment. On

les retrouve dans la fraction stroma vasculaire (SVF) du tissu adipeux. Les adipoblastes se différencient ensuite en préadipocytes, qui à leur tour se différencieront en adipocytes matures [35] (Figure 11). Ce processus global est appelé adipogenèse et peut se produire tout au long de la vie de l'organisme ([36–38]).

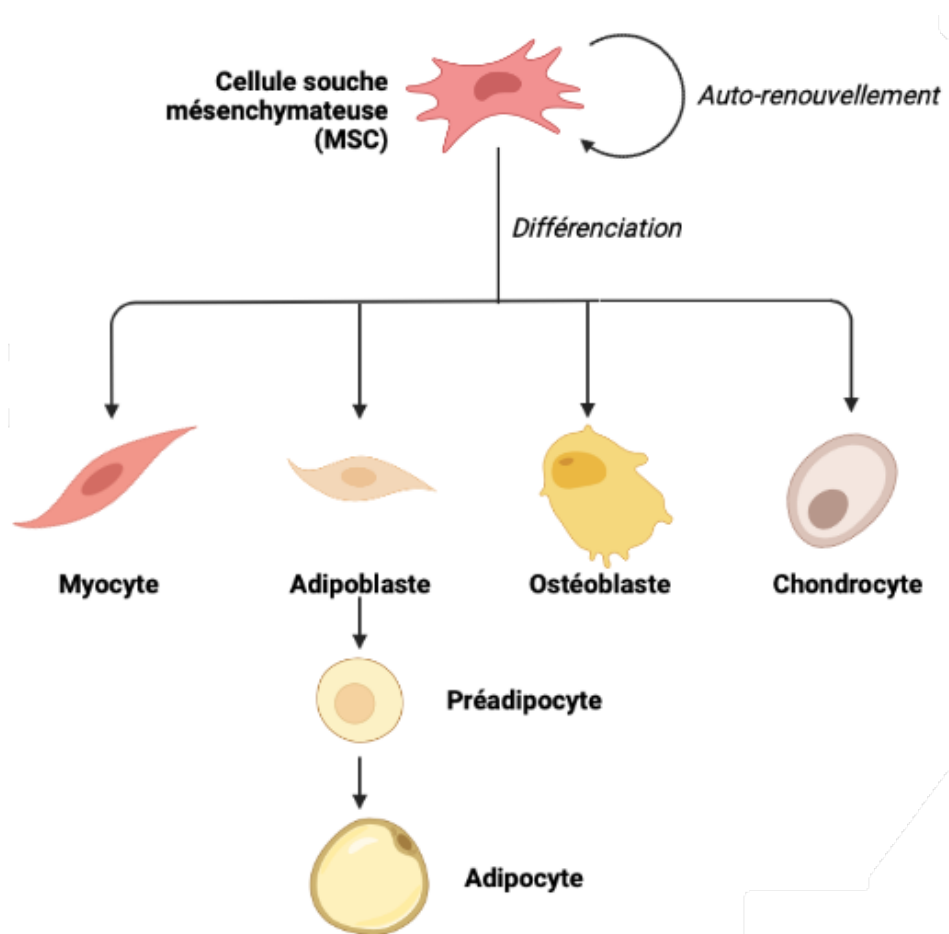


Figure 11. Capacité multiligne des cellules souches adipeuses.

Dérivées de la lignée germinale mésenchymateuse, les cellules souches adipeuses détiennent le multipotentiel pour se différencier en adipocytes, chondrocytes, ostéoblastes ou cellules musculaires avec l'ajout d'un facteur de croissance approprié et dans des conditions de culture appropriées. (inspirée de Parra-Peralbo et al., 2021[33])

C. L'adipogenèse

La reprogrammation génétique très complexe qui se produit lors de l'adipogenèse est étroitement contrôlée par des hormones, des cytokines, des nutriments et des molécules de signalisation, qui modulent l'expression et/ou l'activité de divers facteurs de transcription, régulant ainsi finement ce processus [39]. Il existe de nombreux facteurs de transcription pro et anti-adipogéniques, dont l'expression dépend de la phase de l'adipogenèse à laquelle se trouve la cellule.

Les hormones et les ligands régulent l'adipogenèse en modulant les voies de signalisation. Par exemple, l'insuline active la cascade de signalisation impliquant le substrat du récepteur de l'insuline (IRS), la phosphoinositide 3-kinase (PI3K), l'AKT et la cible mécaniste du complexe de rapamycine 1 (mTORC1), favorisant ainsi l'absorption du glucose par les préadipocytes en différenciation. Les glucocorticoïdes se lient au récepteur des glucocorticoïdes (GCR) pour stimuler la transcription via les protéines CCAAT/enhancer-binding (C/EBP) et le récepteur γ activé par les proliférateurs de peroxyssomes (PPAR γ), ce qui améliore la signalisation de l'insuline nécessaire à l'adipogenèse [40]. Les protéines morphogéniques osseuses (BMP), en particulier BMP2 et BMP4, favorisent l'adipogenèse en partie en régulant positivement PPAR γ par l'intermédiaire de SMAD4 [41]. La voie de signalisation hedgehog, quant à elle, s'oppose à l'adipogenèse en interférant avec la signalisation BMP [42]. La signalisation canonique Wnt supprime l'adipogenèse en stabilisant la β -caténine, qui réprime le complexe PPAR γ -C/EBP α [38,43]. D'autres voies, telles que la signalisation TGF β , FGF, ERK/MAPK, p38/MAPK et Notch, peuvent être pro- ou anti-adipogéniques en fonction du contexte expérimental, des ligands spécifiques utilisés, du type de cellule et du stade de développement ou de différenciation [38,41,44,45].

L'adipogenèse est un processus séquentiel divisé en deux grandes phases : une première phase d'événements précoces correspondant à l'engagement des cellules souches pluripotentes en préadipocytes, suivie d'une seconde phase d'événements tardifs comprenant la différenciation terminale des préadipocytes en adipocytes matures (Figure 12).

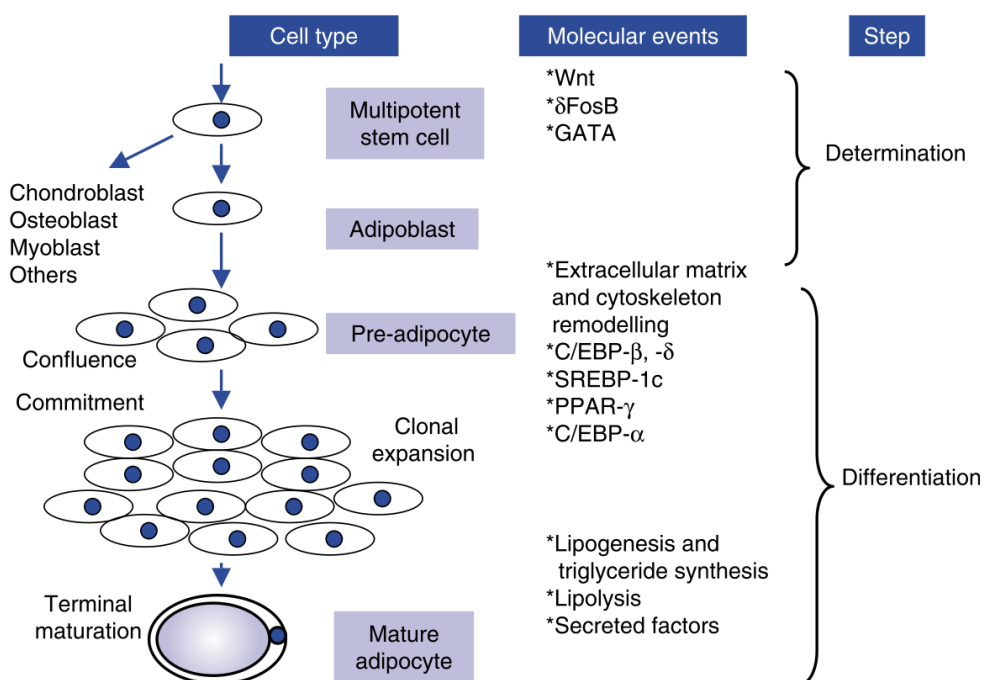


Figure 12. Représentation des 2 étapes de l'adipogenèse : la détermination et la différenciation [34].



1. La détermination

Au cours de l'étape de détermination, les cellules souches multipotentes s'orientent vers différents types cellulaires, en particulier vers les adipoblastes, en réponse à des signaux spécifiques (Figure 12). Cette phase de l'adipogenèse est relativement peu documentée dans la littérature. En effet, l'adipogenèse a été principalement étudiée *in vitro* dans des lignées de préadipocytes déjà engagées dans la lignée adipocytaire, ce qui rend ces modèles inadéquats pour l'étude de l'engagement des préadipocytes, notamment chez les 3T3-L1 et 3T3-F442A [39]. Cependant, l'obtention de cellules souches isolées de jeunes donneurs humains, appelées hMADS (human multipotent adipose derived stem cells), a permis d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans la détermination adipocytaire [46].

Les cellules sont orientées vers leur destinée cellulaire par des signaux paracrines, notamment ceux provenant des voies de signalisation telles que Wnt/ β -caténine, hedgehog et le facteur de croissance transformant bêta (TGF- β). Les protéines morphogénétiques osseuses (BMP) inhibent la voie adipogénique pour favoriser les voies ostéogénique et myogénique [38].

Certaines études ont révélé que Wnt10b et Wnt-5a sont réprimés pendant l'adipogenèse. La signalisation Wnt inhibe la différenciation des cellules adipeuses en réduisant l'expression du récepteur γ activé par le proliférateur de peroxyosomes (PPAR γ) et du CCAAT-enhancer binding protein α (C/EBP α) dans les cellules 3T3-L1 et 3T3-F442A. Des souris transgéniques exprimant le Wnt10b ectopique montrent une réduction de 50 % du tissu adipeux blanc et une diminution drastique des adipocytes multiloculaires (MTS) [47]. D'autres études ont montré que TGF- β 1 induit la différenciation des progéniteurs adipeux en myofibroblastes [48].

PPAR γ est un régulateur transcriptionnel clé de l'adipogenèse. Son rôle dans ce processus a été démontré en utilisant des modèles murins déficients en PPAR γ , que ce soit de manière globale ou spécifiquement au niveau du tissu adipeux, entraînant une perte du tissu adipeux blanc (WAT) [49,50]. De plus, PPAR γ , associé à C/EBP α , peut induire la transdifférenciation des myoblastes en adipocytes [51].

Durant cette première phase, on observe également le remodelage du cytosquelette et un changement de la composition de la matrice extracellulaire (Figure 12). Ces événements sont suivis d'une phase d'expansion clonale et d'un stade de réplication cellulaire [39]. Une fois atteint le stade de préadipocyte, les cellules peuvent commencer la deuxième étape : la différenciation.

2. La différenciation

Maintenant que la cellule est engagée dans la voie adipocytaire et est considérée comme une cellule souche unipotente, elle va acquérir l'ensemble des propriétés spécifiques de l'adipocyte au cours de ce que l'on appelle la différenciation terminale (acquisition des enzymes de la lipogenèse, de la lipolyse, augmentation de la sensibilité à l'insuline).

Le programme de différenciation adipocytaire est un continuum de phénomènes moléculaires superposés. Il comprend différents signaux ainsi qu'un remodelage transcriptionnel menant à l'activation d'un certain nombre de gènes de l'adipocyte nécessaires à la conversion des préadipocytes en adipocytes.

Parmi ces régulateurs, on retrouve des membres de familles de protéines de liaison telles que C/EBPs, SREBP-1c et PPAR γ , dont l'expression varie en fonction de l'étape de la différenciation. En effet, cette étape est elle-même divisée en deux phases : une différenciation précoce et une différenciation tardive.

Au cours de l'étape précoce de différenciation, une première vague de facteurs de transcription est activée par des stimuli provenant d'un mélange d'hormones et d'agents stimulant l'activité de l'adénylate cyclase [52], tels que l'insuline, les acides gras, l'hormone de croissance (GH) ainsi que la Triiodothyronine (T3), parmi d'autres.

Plusieurs familles de facteurs de transcription favorisent la différenciation des adipocytes, y compris les membres des familles des protéines C/EBPs, les transducteurs de signal et les activateurs de la transcription (STAT), ainsi que les protéines du facteur de type Kruppel (KLF) [53]. Cependant, PPAR γ est le facteur de transcription le plus crucial pour le développement des cellules adipeuses. En effet, la plupart des inhibiteurs de l'adipogenèse modulent l'expression et/ou l'activité de PPAR γ . Le développement des adipocytes peut également être régulé par des facteurs endocriniens, y compris le T3, les glucocorticoïdes, la GH et les membres de la famille des cytokines gp130.

Deux membres de la famille des facteurs de transcription GATA (GATA-2 et GATA-3), qui sont des protéines de liaison à l'ADN à doigts de zinc impliquées dans les processus de développement, sont exprimés dans les pré-adipocytes et sont régulés à la baisse pendant la maturation terminale. L'expression constante de GATA-2 et GATA-3 inhibe la différenciation des adipocytes et maintient les cellules au stade préadipocytaire. Cet effet inhibiteur sur l'adipogenèse pourrait être médié par une activité réduite du promoteur PPAR γ [39].

D. Le renouvellement des adipocytes

Les adipocytes ont une durée de vie limitée et sont constamment reconstitués avec de nouveaux adipocytes issus du pool de cellules souches. La vitesse de ce processus est intermédiaire entre les cellules épithéliales et les myocytes. Le renouvellement des adipocytes est un phénomène très lent, c'est pourquoi pendant très longtemps il a été admis que les adipocytes étaient des cellules qui ne renouvelaient pas.

Les premières études qui ont quantifié et révélé ce renouvellement ont été réalisées grâce à l'utilisation de la datation par carbone 14, elles ont démontré qu'en moyenne 10% des adipocytes du tissu adipeux humain sous-cutané étaient remplacés tous les ans [54,55]. Chez les jeunes souris adultes, environ 10 % à 15 % des adipocytes sont remplacés chaque mois [56,57]. Des études ont montré que de nouveaux adipocytes se sont formés dans la graisse viscérale de la souris après environ 8 semaines d'alimentation de régime riche en graisses [50].

Dans des conditions homéostatiques, le processus est relativement constant, mais il est sensible aux stimuli pharmacologiques, physiologiques et alimentaires. Par exemple, l'excès calorique accélère diverses étapes allant de la division des cellules souches à la mort des adipocytes. Les cytokines, telles que le TNF α et l'interleukine (IL)-6, et les agents pharmacologiques semblent réguler le renouvellement des adipocytes. Notamment, PPAR γ est une cible de la classe des thiazolidinediones (TZD) des traitements du diabète, et les TZD augmentent la prolifération des cellules souches, l'auto-renouvellement des cellules souches et la formation d'adipocytes, ce qui est cohérent avec l'expression de PPAR γ dans le compartiment des cellules souches[57].

E. Différences entre les types de tissus adipeux : blanc, brun, beige

Il existe principalement trois types de tissu adipeux dans le corps humain, chacun ayant des caractéristiques et des fonctions distinctes. Le tissu adipeux blanc est le type le plus abondant chez les humains et les mammifères. Il est spécialisé dans le stockage de l'énergie sous forme de lipides, contribuant à la régulation de l'équilibre énergétique à long terme. Le tissu adipeux brun, quant à lui, est principalement présent chez les nouveau-nés et diminue avec l'âge. Il a une couleur brunâtre due à la présence de mitochondries riches en fer. Son rôle principal est de générer de la chaleur (thermogenèse) en brûlant les acides gras, ce qui est crucial pour la survie au froid. Le tissu adipeux beige, souvent considéré comme intermédiaire entre les tissus adipeux blanc et brun, possède également des capacités

thermogéniques, bien que moins marquées que le tissu adipeux brun. Il est généralement dispersé dans le tissu adipeux blanc et sa présence peut augmenter en réponse à différents stimuli tel que le froid ou l'exercice.

F. Distribution anatomique

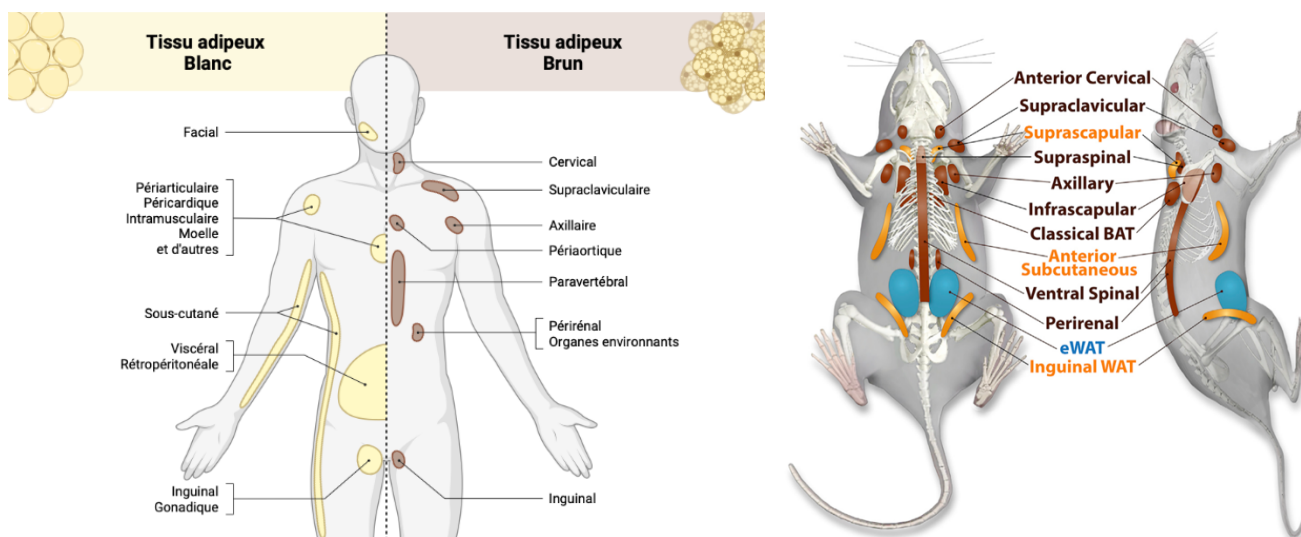


Figure 13. Répartition anatomique des tissus adipeux blanc et brun chez l'Homme et la souris (adapté de Zhang et al., 2018)[47]. WAT sont indiqués en bleu, les TA pouvant devenir beiges en jaune et les TA plus classiques de type BAT en marron.

Le TA est un organe hétérogène [58] complexe tant au niveau du corps, du tissu que de la cellule. C'est un organe dynamique distribué dans tout le corps avec une capacité presque illimitée à se développer pendant l'obésité. Plusieurs dépôts distincts peuvent être définis par leur emplacement, leur taille, leur composition cellulaire et leur fonction. Bien que de nombreuses fonctions du TA soient conservées entre les modèles murins et humains, leur emplacement et leur abondance peuvent varier considérablement. En effet, chez les mammifères, deux grands types de tissus adipeux sont retrouvés en proportions variable à travers le corps : blanc et brun (Figure 13).

Le TAB qui est le plus représenté dans l'organisme, peut être retrouvé autour des principaux organes et des vaisseaux sanguins dans la cavité abdominale (au niveau viscérale) et sous-cutanée (Figure 13), avec des variations en fonctions du sexe, de l'âge et de l'état métabolique. De par sa localisation, le tissu adipeux sous-cutané permet de former une barrière contre les infections et joue un rôle d'isolant thermique contre la perte de chaleur. Le tissu adipeux viscéral sert principalement de lieu de stockage du surplus énergétique. Ces dépôts diffèrent de par leur composition mais aussi de par leur rôle dans la régulation de l'homéostasie énergétique. L'expansion du TA sous-cutané est associée à une meilleure

sensibilité à l'insuline. En revanche, le TA viscéral est plus sensible aux stimuli inflammatoires et joue donc un rôle important dans la physiopathologie des maladies métaboliques. Dans la catégorie des TABs les plus importants, on peut retrouver en sous cutanée (SCAT) le TA fémoro-glutéale et abdominale, en périviscérale (VAT) le TA omentale et rétro-péritonéale, et enfin en périgonadique le TA épидидymaire et péri-ovarien (Figure 13). On retrouve aussi des adipocytes blancs au niveau de la moelle osseuse et de la glande mammaire.

En ce qui concerne le BAT, contrairement au tissu adipeux blanc, il n'est pas toujours représenté chez l'Homme. En effet, il ne représente qu'environ 4,3 % de tous les TA chez les humains adultes et peut être trouvé dans les dépôts cervicaux, supraclaviculaires, axillaires, paraspiniaux, médiastinaux et abdominaux (Figure 13). En plus des adipocytes bruns préformés par le développement, les souris et les humains ont également des adipocytes bruns inductibles, appelés adipocytes beiges ou brites. Ces cellules graisseuses multiloculaires proviennent d'une lignée de développement distincte et ont tendance à être dans le tissu adipeux blanc, mais expriment également UCP1.

G. Composition cellulaire

Le TA se compose de différents types cellulaires : adipocyte, cellules immunitaires, cellules endothéliales, mésothéliales, des fibroblastes et des progéniteurs, présent en pourcentage différents [59] (Figure 14). Ces types cellulaires sont classés en deux grandes catégories la fraction adipocytaire et la fraction SVF. Ces cellules sont séparées par une fine couche de matrice extracellulaire (MEC) qui est composée principalement par le collagène de type I, III et VI [60].

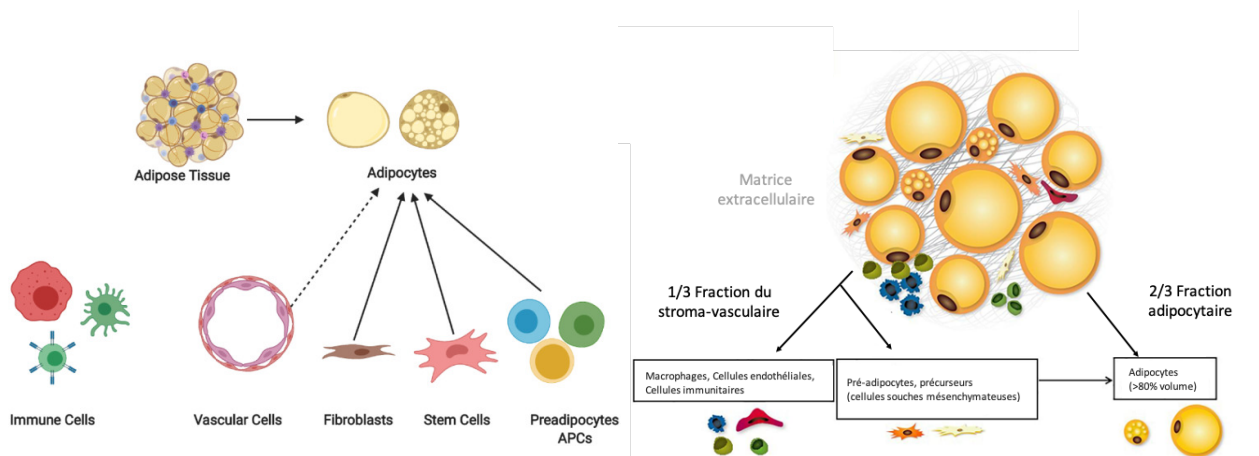


Figure 14. Composition cellulaire du tissu adipeux [49] adaptée de Bourgeois et al., 2019

Il est bien connu que les dépôts de TA ne contiennent pas de population cellulaire homogène. Il est également entendu que les adipocytes au sein d'un seul dépôt adipeux présentent une grande diversité morphologique et fonctionnelle.

Autrefois considéré comme un dépôt de stockage homogène, les progrès récents ont permis des caractérisations approfondies de la structure sous-jacente et de la composition des dépôts de tissu adipeux. Au cours de la dernière décennie, la mise en œuvre de techniques modernes telles que le génie génétique, le traçage de la lignée et les caractérisations unicellulaires avec l'émergence du profilage cellulaire profond au niveau des tissus et, plus récemment, des cellules individuelles (single-cell) a approfondi notre compréhension de la dynamique complexe qui contribue à la fonction tissulaire et de leurs implications dans le développement de la maladie. Désormais largement acceptée comme un organe hautement hétérogène jouant un rôle majeur dans l'homéostasie métabolique, la signalisation endocrinienne et la fonction immunitaire, l'étude de la dynamique du tissu adipeux a atteint une nouvelle frontière. Les types de cellules résidentes, y compris les adipocytes matures, les cellules précurseurs des adipocytes et les cellules immunitaires sont des acteurs majeurs qui contribuent à la fonction globale et au remodelage. L'hétérogénéité subsiste au-delà de l'existence de types cellulaires divergents, car les cellules individuelles présentent des caractéristiques uniques indiquant des rôles fonctionnels distincts.

1. Fraction adipocytaire

L'adipocyte constitue la principale composante cellulaire du TA et constitue le principal dépôt de stockage de l'énergie sous forme de gouttelettes lipidiques.

Les adipocytes matures constituent environ 70 à 90 % de la fraction totale des cellules adipeuses en termes de volume. On retrouve trois types distincts d'adipocyte, le blanc, le brun et le beige (Figure 15). Malgré leur distinction, ces adipocytes possèdent des composantes communes, avec notamment la présence de gouttelettes lipidiques, de mitochondries d'un noyau et d'autres organites cellulaires, tels que l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique lisse et rugueux (Figure 15).



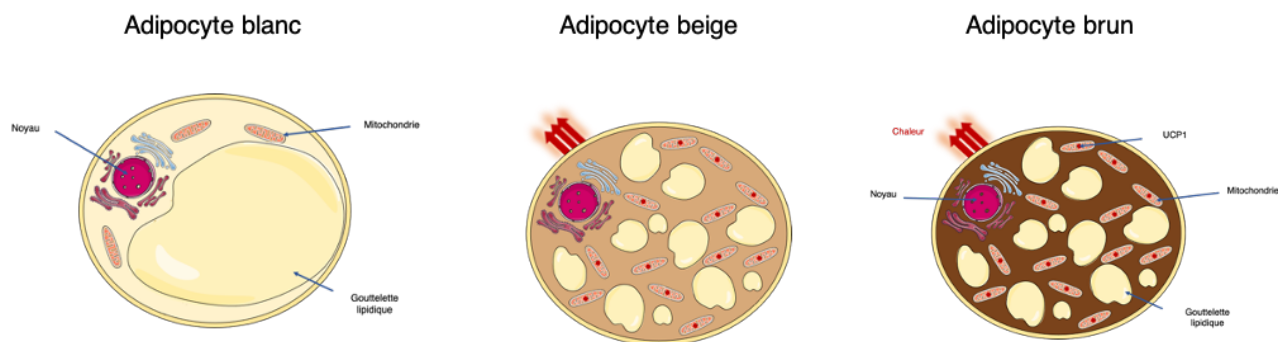


Figure 15. Représentation schématique d'un adipocyte blanc, beige et brun.

Dans le TAB, un adipocyte est composé d'une large gouttelette lipidique uniloculaire qui représente plus de 90% du volume, le reste étant constitué d'un fin cytoplasme et d'un noyau, ainsi que de quelques mitochondries et organites (Figure 15). La gouttelette lipidique est recouverte de nombreuses protéines dont la périlipine qui a pour rôle de maintenir les lipides dans cette gouttelette. Selon les besoins énergétiques, la taille de cette cellule peut varier entre 20 à 200 μM de diamètre. Dans le BAT les adipocytes ont un diamètre plus petit que les adipocytes blancs (25 à 50 μM). Ces adipocytes sont composés de petites gouttelettes lipidiques multiloculaires, un noyau central ainsi que d'un grand nombre de mitochondries, avec notamment la présence de la protéine UCP-1 (uncoupling protein 1) (Figure 15), qui agit comme un canal à protons en dissipant le gradient électrochimique sous forme de chaleur en bloquant l'ATP-synthase. La protéine UCP-1 procure ainsi au BAT la capacité d'oxyder les lipides pour remplir sa fonction de régulateur thermique. La découverte de cette protéine chez les rongeurs et l'Homme adulte confirme que les mécanismes moléculaires nécessaires pour la thermogenèse sont présents chez l'adulte. Ces adipocytes bruns sont à la fois richement vascularisés et innervés, principalement par le système nerveux sympathique qui agit via la libération de noradrénaline.

L'hétérogénéité de la fonction WAT découle de la diversité des types de cellules qui résident dans le tissu adipeux, y compris les adipocytes matures eux-mêmes. De nouvelles avancées révèlent que les adipocytes matures ont des caractéristiques et des fonctions distinctes les unes des autres.

Jusqu'à récemment, l'analyse des adipocytes matures était techniquement difficile en raison des teneurs extrêmes en lipides qui sont largement incompatibles avec le tri cellulaire activé par fluorescence (FACS) et les stratégies d'analyse unicellulaire. Cependant, le séquençage d'ARN à noyau unique (sn-RNAseq) et la transcriptomique spatiale ont créé une voie pour explorer la complexité du statut et de la fonction des adipocytes in vivo. Alors que

les connaissances actuelles ne cessent de s'étendre, il est maintenant clair que des populations d'adipocytes distinctes existent au sein des dépôts WAT. Deux études indépendantes caractérisant les sous-populations de WAT murin et humain ont décrit deux types prédominants d'adipocytes matures. Le premier type comprend les adipocytes sensibles à l'insuline et lipogéniques caractérisés par des niveaux élevés de marqueurs adipogènes classiques tels que PPAR γ , PLIN et les enzymes de lipogenèse de novo (appelées populations LGA/AdipoPLIN) [61,62]. Au lieu de cela, la deuxième sous-population distincte est marquée par une forte expression de gènes impliqués dans l'absorption et la manipulation des lipides (c'est-à-dire les populations LSA/AdipoLEP), ce qui suggère que ce sous-type d'adipocytes repose sur le piégeage des lipides plutôt que sur la synthèse des lipides de novo [61,62]. Notamment, les deux études ont montré que cette dernière population de cellules constitue la plus grande fraction d'adipocytes matures dans les dépôts viscéraux et sous-cutanés chez les souris adultes et les humains [61,62]. Des études in vivo indiquent également que cette sous-population est moins sensible à l'insuline chez l'homme par rapport à la plus petite population lipogénique [62]. Des travaux récents ont confirmé l'identification de ces deux sous-classes au cours du développement postnatal de l'iWAT dans les proportions décrites précédemment [63]. Conformément à leurs signatures d'expression génique, ces deux populations distinctes peuvent également avoir des profils de sécrétion d'adipokine distincts. Une autre étude a également identifié deux types d'adipocytes ressemblant à ceux décrits ci-dessus qui semblent exprimer préférentiellement l'adiponectine ou la leptine, respectivement [64]. Par conséquent, les effets endocriniens de ces cellules graisseuses peuvent jouer des rôles distincts dans la coordination des réponses physiologiques. Bien que la majorité des adipocytes matures semblent appartenir à la classe lipogénique ou piégeant les lipides, des sous-types moins abondants ont également été décrits. Une population d'adipocytes avec un profil transcriptionnel ressemblant à la sous-population piégeant les lipides, mais enrichie en gènes de réponse au stress a été identifiée [61]. Au lieu de cela, une autre équipe a signalé un groupe d'adipocytes rares qui ressemblent à la population adipogénique traditionnelle avec une expression accrue des gènes impliqués dans le métabolisme du rétinol [62]. Une étude décrit une caractérisation unicellulaire étendue du WAT viscéral et sous-cutané stratifié par espèce [65]. Cet « atlas unicellulaire » adipeux, en plus de s'appuyer sur la caractérisation des sous-populations d'adipocytes, a révélé que les adipocytes de souris, bien que distincts les uns des autres au niveau transcriptionnel, ne correspondent pas clairement aux homologues des adipocytes humains [65]. De plus, les adipocytes de souris ne présentent pas de différences claires dans l'enrichissement des sous-populations spécifiquement en iWAT ou



eWAT dans un état sain et maigre, contrairement aux enrichissements d'adipocytes spécifiques au dépôt trouvés dans les sWAT et vWAT humains [65].

La production de chaleur des adipocytes bruns est largement attribuée à l'expression de la protéine de découplage 1 (UCP1). Cependant, d'autres mécanismes indépendants d'UCP-1 qui contribuent à la thermogénèse du BAT, tels que le cycle futile de la créatine, ont été découverts [66,67] et il est maintenant clair que la capacité thermogénique de ces cellules s'étend au-delà de l'expression d'Ucp1 [68]. En fait, deux équipes ont rapporté une expression inégale de Ucp1 dans les adipocytes bruns, fournissant un premier aperçu de l'hétérogénéité du BAT [69,70]. Ces observations ont été étayées par des données in vivo utilisant des souris rapporteurs traçant la lignée des adipocytes qui ont confirmé l'existence de deux sous-populations distinctes d'adipocytes bruns résidant dans le BAT interscapulaire (iBAT), marqués par une expression élevée (BA-H) et faible (BA-L) d'adiponectine [71]. Une caractérisation plus poussée a révélé que l'expression d'Ucp1 est directement corrélée aux niveaux d'adiponectine et que les cellules BA-L ont un nombre réduit de mitochondries, un faible taux de consommation basale d'oxygène (OCR) et des gouttelettes lipidiques plus grosses [71]. Le profilage transcriptionnel a mis en évidence l'absorption d'acides gras, plutôt que la synthèse de novo, comme processus métabolique prédominant dans le sous-type BA-L [71]. Fait intéressant, l'émergence de ces deux populations n'est pas liée à l'innervation sympathique comme on pourrait s'y attendre, mais peut plutôt être due à des différences de sensibilité à la stimulation adrénérgique. Les cellules à haute teneur en adiponectine et à haute teneur en Ucp1 (BA-H) présentent également une expression plus élevée d'Adrb3 et sont caractérisées par un OCR basal et non couplé élevé en réponse à la noradrénaline par rapport à leurs homologues BA-L [71]. Cependant, les cellules BA-H et BA-L présentent une respiration maximale similaire, ce qui indique que les cellules BA-L possèdent toujours un potentiel mitochondrial élevé qui peut être activé si nécessaire [71].

Une étude récente décrit une sous-population rare d'adipocytes bruns matures, trouvés à la fois chez la souris et l'homme, capables de réguler la thermogénèse des cellules voisines [72]. Marqués par une expression élevée de Cyp2e1 et Aldh1a1, ces adipocytes ont une morphologie mitochondriale altérée, une expression plus faible de Ucp1 et Cidea et, comme les adipocytes BA-L, une augmentation de l'iBAT des souris hébergées en thermoneutralité. Malgré la faible abondance, les cellules Cyp2e1+/Aldh1a1+ sont des contributeurs majeurs de la capacité thermogénique de l'ensemble du dépôt de graisse. Les études de gain et de perte de fonction manipulant Aldh1a1 ont montré que l'expression d'Ucp1 et l'OCR étaient inversement corrélés à l'expression d'Aldh1a1 [72]. Enfin, les auteurs ont démontré que

l'inhibition de l'activité thermogénique est médiée par une augmentation de la production et de la sécrétion d'acétate, qui signale de manière paracrine via Gpr43 [72,73].

Bien que moins comprises par rapport aux les adipocytes blancs, les cellules grassieuses brite/beige présentent également un certain degré d'hétérogénéité. La marque caractéristique des cellules brite/beige est la présence de niveaux détectables d'UCP1 [74–77]. Cependant, une étude a montré que ces cellules peuvent avoir des signatures transcriptionnelles distinctes en fonction du signal de brunissement qui a conduit à leur recrutement/expansion [78], suggérant que les sous-types beiges peuvent provenir de différentes origines. De plus, un autre sous-type de cellules beiges (appelé graisse g-beige) marqué par une oxydation accrue du glucose et dérivé d'une lignée cellulaire distincte a également été identifié [79]. Cependant, toutes les cellules brite/beige n'expriment pas Ucp1, un mécanisme thermogénique indépendant d'Ucp1 qui repose sur le cycle Ca²⁺ dépendant de l'ATP à travers le réticulum sarcoendoplasmique Ca²⁺-ATPase 2b (SERCA2b) et le récepteur 2 de la ryanodine (RyR2) [68], apportant la preuve d'une autre sous-population distincte d'adipocytes beiges.

2. Fraction stroma vasculaire (SVF)

Bien que les adipocytes représentent plus de 90 % du volume du TA, ils représentent moins de 50 % de son contenu cellulaire [80]. La SVF est composée des cellules immunitaires, cellules endothéliales, mésothéliales, des fibroblastes et des progéniteurs. Ces différentes cellules, qui n'ont pas pour rôle de stocker les lipides, participent néanmoins au développement du TA et également à son activité endocrine [81]. En fonction du dépôt de TA, la composition et la capacité de la SVF seront différentes. En effet, la SVF du SCAT à une capacité adipogénique supérieure à celle du VAT [82,83].

a) Préadipocytes

Les pré-adipocytes sont issues des cellules souches mésenchymateuses multipotentes et sont le stade précoce avant la différenciation en adipocytes [46]. Du fait de leur engagement, ils appartiennent à une population différente des cellules progénitrices mais sont morphologiquement indifférenciables des fibroblastes [84]. L'adipocyte mature étant post-mitotique, le renouvellement du TA se fait principalement par la différenciation des préadipocytes. Ces préadipocytes permettent l'hyperplasie du TA, qui est un mécanisme non



pathologique de l'expansion du TA, est ont donc un rôle important dans la plasticité et la fonctionnalité de ce tissu.

b) Cellules souches

En plus des préadipocytes, la SVF du TA est composée d'autres cellules souches mésenchymateuses multipotente qui elles ne sont pas engagé dans une lignée cellulaire. Ces cellules vont pouvoir s'engager vers les voies ostéoblastique, myogénique et chondrogène [85–87]. Ces cellules que l'on appelle cellules souches adipeuses (ASC pour Adipose-derived Stem Cells) sont retrouvées en quantité abondante dans le TA et constituent une source illimitée de cellules différenciées, ce qui leur confère un intérêt pharmacologique et médical. Des ASC obtenu à partir de tissu adipeux de jeunes donneurs dénommées hMADS (Human Multipotent Adipose Derived Stem Cell) sont largement utilisées en recherche. Ces cellules ont démontré leur intérêt dans la thérapie cellulaire avec des résultats de régénération tissulaire notamment dans le muscle. En effet, La transplantation de cellules hMADS dans la souris mdx, un modèle animal de dystrophie musculaire de Duchenne, entraîne une expression substantielle de la dystrophine humaine dans le muscle tibial antérieur et gastrocnémien adjacent. Les études de ces cellules montrent qu'une fois isolées et mises en culture, ces cellules souches présentent une forte capacité de prolifération, des chromosomes normaux ainsi qu'une absence de caractéristiques tumorigènes. Une même cellule souche hMADS est capable de se transformer *in vitro* en cellules de type musculaire, osseux, adipeux ou cartilagineux, selon l'environnement [88].

c) Cellules endothéliales

Les cellules endothéliales (CE) représentent la couche à parois épaisse (endothélium) qui recouvre la face interne des vaisseaux. Dans le TA, elles constituent une barrière physique entre le compartiment sanguin et les adipocytes. Ces cellules ont un rôle majeur dans le contrôle des échanges de cellules immunitaires et inflammatoires, d'hormones, nutriments, d'oxygène qui vont varier en fonction du statut métabolique. Ces cellules vont permettre l'angiogenèse [89] qui nécessite un équilibre entre les molécules pro-angiogéniques et anti-angiogéniques.

La vascularisation du TA est un élément important dans sa plasticité et son développement. En effet, le TA est un des organes les plus vascularisé puisque chaque



adipocyte est entouré de capillaires. Il y a donc un lien étroit entre adipogenèse et angiogenèse.

Les adipocytes peuvent sécréter à la fois des molécules pro-angiogéniques, par exemple le facteur de nécrose tumorale-alpha (TNF- α), l'interleukine-6 (IL-6), ou le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF), et les facteurs anti-angiogéniques, par exemple les serpines. Ces facteurs ne sont pas seulement sécrétés par les adipocytes mais par les autres cellules du TA.

d) Cellules immunitaires

Un large spectre de cellules immunitaires est retrouvé au sein du TA, avec principalement des macrophages et des lymphocytes. Deux grands types de cellules immunitaires sont retrouvés dans le TA, les innées et les adaptative. Les cellules immunitaires innées présentes dans le TA sont les macrophages, les neutrophiles, les éosinophiles, les cellules dendritiques (DC), les mastocytes, les cellules lymphoïdes innées (ILC) et les cellules tueuses naturelles (NK) (Figure 16). Concernant les cellules immunitaires adaptatives, elles se composent des lymphocytes T et B [90].

Le rôle de ces cellules immunitaires est très important dans le maintien et le remodelage du TA, notamment lors du développement de l'obésité. Dans le TA sain, ces composantes fonctionnent en harmonie, avec des cellules immunitaires de nature anti-inflammatoire tel que les macrophages M2, les lymphocytes T auxiliaires (Th2) et lymphocytes T régulateurs (T reg) (Figure 16).

Les cellules immunitaires innées et adaptatives jouent un rôle essentiel dans le maintien et le renouvellement du tissu adipeux. Pour assurer l'homéostasie, les dépôts adipeux subissent un remodelage et un renouvellement constant pour exécuter les fonctions nécessaires lors d'un défi avec le stress dû au froid et l'épuisement/l'enrichissement en nutriments. Les cellules immunitaires jouent un rôle important dans la préservation de la flexibilité métabolique et structurelle du tissu adipeux. La diversité des cellules immunitaires innées et adaptatives résidant dans le tissu adipeux est importante. Des études récentes de sc-RNAseq [61,91–93] ont confirmé des rapports antérieurs [94,95] selon lesquels les macrophages du tissu adipeux (ATM) sont l'un des types de cellules immunitaires dominants en proportion et en fonction dans le tissu adipeux. Le profilage transcriptionnel des ATM démontre qu'ils ont également des fonctions divergentes dans des niches spécialisées au sein du tissu, comme l'ont rapporté plusieurs groupes [61,92,96–98]. Il s'agit notamment des populations de macrophages périvasculaires (PVM), non périvasculaires (NPVM), associés

aux lipides (LAM) et exprimant le collagène (CEM) [61]. Généralement, les macrophages équilibrent strictement les processus pro- et anti-inflammatoires dans le tissu pour maintenir une structure spatiale appropriée. En modifiant la matrice extracellulaire, en éliminant les débris et en agissant comme tampons du métabolisme des lipides pour empêcher la signalisation pathogène ou l'accumulation ectopique [99], les ATM sont les principaux centres de contrôle de la dynamique des dépôts. De plus, d'autres types de cellules immunitaires innées résident dans le tissu adipeux [61,91–93]. Les cellules T innées servent de pont entre les réponses immunitaires innées et adaptatives et régulent l'activité des cellules dans les deux classes d'immunité par la libération de cytokines. Il a été démontré que les cellules tueuses naturelles (NK), les cellules lymphoïdes innées (ILC) et les populations de cellules T innées, y compris les cellules T invariantes associées aux muqueuses (MAIT), les cellules T tueuses naturelles invariantes (iNKT) et les cellules T $\gamma\delta$, résident dans des dépôts adipeux. De même, les cellules immunitaires adaptatives classiques résident également dans les dépôts adipeux, notamment les cellules T auxiliaires CD4 + et les cellules T cytotoxiques CD8 +, ainsi que les cellules B [61,91–93]. Cependant, la densité et l'activité de ces cellules dépendent fortement des signaux environnementaux et de la présence / absence de physiopathologie.

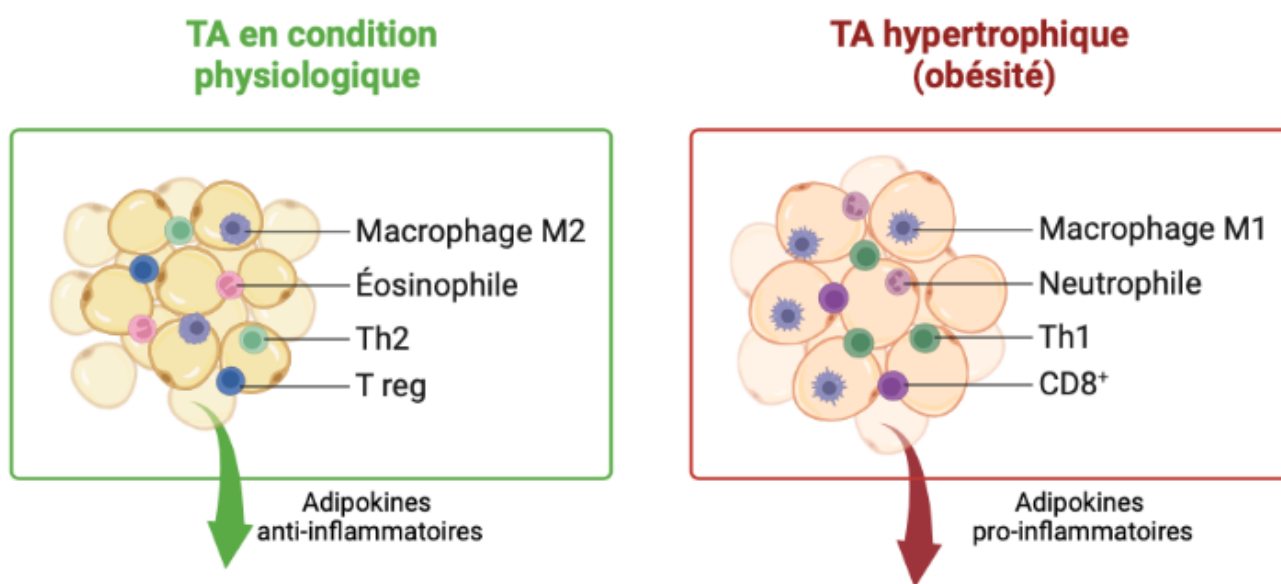


Figure 16. Réaction inflammatoire du TA en condition physiologique et d'obésité.

En revanche, lors d'un stress métabolique telle que la surnutrition cela induit une production de cellules pro-inflammatoires tel que les macrophages M1, les lymphocytes Th1 et lymphocytes T CD8 (Figure 16) et une hypoxie du TA. Une inflammation chronique va s'installer lors de l'obésité par la sécrétion de cytokines et d'adipokines pro-inflammatoires [100] (Figure 16). Parmi les adipokines pro-inflammatoires on retrouve la leptine dont les taux

sériques augmentent proportionnellement à la masse du tissu adipeux et favorise la résistance à l'insuline. D'autres adipokines telles que la résistine et la chimérine présentent également des propriétés pro-inflammatoires. Concernant les cytokines, des quantités accrues de facteur de nécrose tumorale (TNF), d'interleukine (IL)-6, de protéine chimioattractante des monocytes 1 (MCP-1), d'IL-1 et d'IL-8, activant et attirant ainsi les cellules immunitaires sont produites dans le TA.

H. Fonctions adipocytaires

Le TA possède plusieurs fonctions biologiques puisqu'il est notamment capable de stocker sous forme de triglycérides, de sécréter des acides gras ainsi que des adipokines. Il a également un rôle crucial dans de nombreux autres processus physiologiques.

1. Régulation énergétique :

La fonction principale du tissu adipeux blanc est de stocker des lipides ou acides gras (via la lipogénèse) et de les libérer (via la lipolyse) selon les besoins, en fonction de la disponibilité des ressources alimentaires. La dégradation ou l'hydrolyse des triglycérides stockés est soigneusement régulée, mais la résistance à l'insuline dans l'obésité est associée à une inhibition altérée de la lipolyse par l'insuline, ce qui entraîne une libération accrue des AG et de glycérol. Le glycérol est un substrat important pour la gluconéogenèse hépatique et les AG sont des substrats énergétiques importants pour les tissus périphériques. Les lipides en excès s'accumulent non seulement dans le tissu adipeux, mais aussi dans plusieurs autres tissus et ils sont également convertis en triglycérides de très faible densité (VLDL) et sécrétés par le foie, ce qui entraîne la dyslipidémie typique associée à l'obésité et à la T2D. L'accumulation de lipides dans le foie, le muscle squelettique et d'autres tissus non SAT est un mécanisme important pour le développement de la résistance à l'insuline dans ces tissus [101,102].

2. Fonction endocrine :

En plus de réguler la libération et le stockage des lipides, le tissu adipeux fonctionne comme un grand organe endocrinien. En effet, les adipocytes produisent et sécrètent une variété d'hormones, appelées adipokines, qui ont un impact sur diverses fonctions corporelles. Dans l'obésité induisant une résistance à l'insuline (environ 70 % des Caucasiens obèses), le

tissu adipeux sécrète des molécules qui antagonisent l'action de l'insuline, y compris les cytokines et d'autres molécules pro-inflammatoires (par ex. Protéine de liaison au rétinol 4 (RBP4), TNF α , IL-6 et IL-1b) qui favorisent le tissu adipeux et l'inflammation systémique. L'augmentation des niveaux de protéine C-réactive (CRP) est un marqueur de cet état inflammatoire qui est également associé à d'autres anomalies métaboliques et cardiovasculaires ou à des facteurs de risque, y compris la dyslipidémie, l'élévation de l'acide urique et l'hypertension. Ces anomalies constituent le syndrome métabolique qui est défini sur la base de la résistance à l'insuline et de ses conséquences métaboliques, ainsi que de l'augmentation de l'IMC et du tour de taille. Le syndrome métabolique est un prédicteur du risque de développer à la fois la T2D et les maladies cardiovasculaires [102]. Cependant, le tissu adipeux peut également sécréter des molécules qui sont associées à une sensibilité accrue à l'insuline telles que l'adiponectine et les esters d'acides gras ramifiés récemment découverts des acides gras hydroxy (FAHFA). Les niveaux de ces molécules « métaboliquement favorables » sont diminués dans l'obésité associée à la résistance à l'insuline.

Parmi les molécules sécrétées par le TA les plus étudiées sont la leptine et l'adiponectine, qui ont été découverts presque simultanément (leptine en 1994 et adiponectine en 1995).

La leptine est une hormone de satiété principalement sécrétée par les adipocytes qui agit sur l'hypothalamus pour diminuer l'apport alimentaire et augmenter la dépense énergétique entre autres fonctions. En tant que tel, les souris et les humains avec des mutations de leptine ou ses récepteurs présentent une obésité marquée [103–105]. La sécrétion de leptine est positivement corrélée à la masse grasse, et les personnes obèses peuvent développer une résistance à la leptine en raison d'une adiposité accrue [106]. La sécrétion de leptine semble dépendre du dépôt, les WAT sous-cutanés produisant des quantités plus importantes que les viscéraux [107,108]. Cette hormone joue également un rôle significatif au sein du système immunitaire, la leptine joue un rôle essentiel dans l'immunité adaptative, favorisant la différenciation des lymphocytes T vers le phénotype Th17 [109]. Des expériences de perte de fonction de la leptine ont montré qu'elles entraînent une déficience immunitaire. Ces conclusions correspondent aux niveaux réduits de leptine, associés à l'immunosuppression observée chez les individus dénutris [110]. Il est aussi crucial de mentionner que chez les individus obèses, les taux de leptine sont généralement élevés. Cependant, cette élévation de la leptine n'est pas suffisante pour diminuer la consommation alimentaire excessive observée chez ces sujets. Ce constat a mené à l'idée d'une résistance hypothalamique à la leptine, qui est couramment associée à l'obésité [111]. De manière



autocrine et paracrine, la leptine a la capacité de modifier la signalisation de l'insuline dans les adipocytes de souris [112,113], ainsi que d'induire la lipolyse [114,115].

En revanche, l'adiponectine est négativement corrélée à la masse graisseuse, bien qu'elle soit elle aussi sécrétée en plus grandes quantités par les WAT sous-cutanés par rapport aux viscéraux [116,117]. L'adiponectine est une hormone anti-inflammatoire et sensibilisatrice à l'insuline qui peut être utilisée pour prédire le développement de la résistance à l'insuline et du syndrome métabolique chez les patients en surpoids et obèses [118,119].

3. Régulation de la thermogénèse :

Contrairement au TAB, le BAT est capable de convertir cet excès de graisse en énergie sous forme de chaleur grâce, en partie, à la protéine mitochondriale UCP-1 (uncoupling protein 1) ce processus s'appelle thermogénèse sans frissons. Cette thermogénèse stimulée par le froid dépend de l'expression et de la fonction intrinsèques de la protéine UCP1, un transporteur de membrane mitochondriale interne qui dissipe l'énergie stockée dans le gradient électrochimique mitochondrial sous forme de chaleur [120]. Normalement, le processus de production d'énergie dans les mitochondries est couplé, c'est-à-dire que la production d'ATP est directement liée à la consommation d'oxygène et la production de dioxyde de carbone. Cependant, dans certaines circonstances, ce processus peut être découplé. Lors du découplage, les protons sont autorisés à retourner dans la matrice mitochondriale sans passer par la chaîne de transport d'électrons qui produit normalement l'ATP. Cela entraîne une consommation accrue d'oxygène et la production de chaleur, plutôt que la production d'ATP. Le découplage mitochondrial est un processus important dans la thermogénèse. En l'absence de stress thermique, on pense que l'adipocyte brun UCP1 est inhibé par les nucléotides puriniques [121,122]. Pendant le stress au froid, la thermogénèse des graisses brunes est classiquement stimulée par la norépinéphrine libérée par le système nerveux sympathique (SNS), qui active les récepteurs β 3-adrénergiques sur les adipocytes bruns pour stimuler la synthèse intracellulaire du second messenger cyclique AMP (AMPC), ce qui conduit à la stimulation des processus de catabolisme lipidique tels que la lipolyse qui libère les acides gras libres des TG, et augmente l'expression d'un programme d'expression génique thermogénique qui comprend l'ARNm UCP1 [121–124]. Chez l'Homme, il a été démontré que l'activité métabolique de thermogénèse du BAT était augmentée après exposition au froid (14-15°C). Cette augmentation s'accompagne d'une augmentation de la sensibilité à l'insuline chez des patients diabétiques [125]. C'est pourquoi des stratégies visant à augmenter l'activité du BAT dans un contexte d'obésité sont à l'étude afin de favoriser la perte de poids.

4. Fonction immunitaire :

Les adipocytes sont impliqués dans la réponse immunitaire, en partie par la sécrétion d'adipokines qui peuvent avoir des effets pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires. De plus, le tissu adipeux contient une variété de cellules immunitaires.

5. Rôle mécanique et de protection

Le tissu adipeux sous-cutané, fournit une protection physique pour protéger les organes, et agit comme un isolant thermique pour aider à maintenir la température corporelle.

6. Rôle dans la reproduction

Chez les femmes, le tissu adipeux est impliqué dans la régulation des hormones sexuelles et peut jouer un rôle dans la reproduction.

7. Rôle dans la régulation de l'hémostase :

Les adipocytes sécrètent plusieurs facteurs qui peuvent influencer la coagulation sanguine, comme le facteur tissulaire et le PAI-1 (inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1), ce qui peut avoir un impact sur le risque de thrombose.

8. Rôle dans le métabolisme du cholestérol :

Les adipocytes sont impliqués dans le stockage et la régulation du cholestérol dans le corps :

Les adipocytes peuvent stocker une quantité significative de cholestérol, en particulier du cholestérol esterifié, dans leurs gouttelettes lipidiques. Le cholestérol est une composante clé des membranes cellulaires, et la capacité des adipocytes à stocker le cholestérol peut aider à réguler la disponibilité du cholestérol pour la biosynthèse des membranes cellulaires. La lipoprotéine lipase (LPL) est une enzyme clé dans le métabolisme des lipoprotéines, les molécules qui transportent le cholestérol et les triglycérides dans le sang. Les adipocytes expriment et sécrètent la LPL, qui hydrolyse les triglycérides dans les lipoprotéines de très basse densité (VLDL) et les chylomicrons, produisant des acides gras libres et des

lipoprotéines de densité plus élevée contenant du cholestérol. Par conséquent, les adipocytes peuvent influencer le métabolisme des lipoprotéines et le taux de cholestérol dans le sang. Bien que le foie soit le principal site de synthèse de cholestérol dans le corps, les adipocytes peuvent également synthétiser du cholestérol. De plus, ils peuvent libérer du cholestérol dans la circulation sanguine, un processus appelé efflux de cholestérol. Le cholestérol est la molécule précurseur des hormones stéroïdes. Les adipocytes sont capables de convertir le cholestérol en hormones stéroïdes, notamment les glucocorticoïdes et les hormones sexuelles. Les adipocytes peuvent influencer le métabolisme du cholestérol par leur interaction avec l'insuline. En réponse à l'insuline, les adipocytes augmentent leur synthèse et leur stockage de cholestérol.

En somme, les adipocytes jouent un rôle important dans le métabolisme du cholestérol, à la fois par la régulation directe du cholestérol et par l'interaction avec d'autres processus métaboliques.

9. Rôle dans le métabolisme du glucose :

Le tissu adipeux joue un rôle crucial dans la régulation du métabolisme du glucose.

En effet, lorsqu'il y a un excès de glucose dans le sang, par exemple après un repas, les adipocytes utilisent ce glucose pour synthétiser des triglycérides. Cela aide à réduire la concentration de glucose dans le sang. Les adipocytes sont l'une des principales cibles de l'insuline. L'insuline stimule l'absorption du glucose par les adipocytes, ce qui aide à abaisser la glycémie. Les adipocytes sécrètent une variété d'adipokines, qui peuvent affecter la régulation du glucose. Par exemple, l'adiponectine améliore la sensibilité à l'insuline et augmente l'absorption du glucose par les cellules, tandis que la leptine peut également influencer la régulation du glucose, bien que son rôle soit plus complexe. Bien que le foie soit le principal organe responsable de la gluconéogenèse, des recherches récentes suggèrent que le tissu adipeux peut également être capable de gluconéogenèse, contribuant ainsi à la production endogène de glucose.

V. Plasticité des tissus adipeux

A. Hypertrophie/hyperplasie

Le TA se développe par deux mécanismes connus sous le nom de l'hyperplasie et l'hypertrophie. L'hyperplasie se définit par l'augmentation du nombre d'adipocytes dans le TA et l'hypertrophie par une augmentation considérable de la taille des adipocytes du TA. Cette croissance a lieu dans des conditions de développement normal ou anormal du TA. Chez l'adulte, lors d'une balance énergétique à l'équilibre, il est connu que le nombre d'adipocytes est significativement stable [54]. Lors du développement de l'obésité, le tissu adipeux s'élargit afin de pouvoir stocker l'excès d'apport énergétique engendré. Cette modification du TA lors de l'obésité est médiée par différents facteurs, environnementaux, génétiques, mais aussi par les interactions inter-organes [126–129].

L'hypertrophie apparaît avant l'hyperplasie pour répondre au besoin de capacité de stockage supplémentaire des graisses dans la progression de l'obésité (Figure 17) [130].

L'accroissement du volume des adipocytes n'est pas infini, une fois une taille critique atteinte par l'adipocyte, celui-ci commence à sécréter des signaux induisant la prolifération et différenciation des précurseurs adipeux [130].

Contrairement à l'hypertrophie, l'hyperplasie est considérée comme un processus d'expansion du tissu sain qui a lieu dans des conditions non pathologiques. En effet, l'hyperplasie est un mécanisme de développement du TA qui a lieu à différentes périodes de la vie : phase fœtale, post-natale et adolescence.

Le remodelage du TA peut varier en fonction de sa localisation, en effet la formation et le développement du SAT et du VAT sont différents, même à l'âge adulte on peut observer des différences significatives entre ces deux types de TA. Effectivement, il a été démontré que l'accumulation de TA dans le VAT est un plus grand risque de développement d'une insulino-résistance durant l'obésité, que l'accumulation dans le SAT [131].

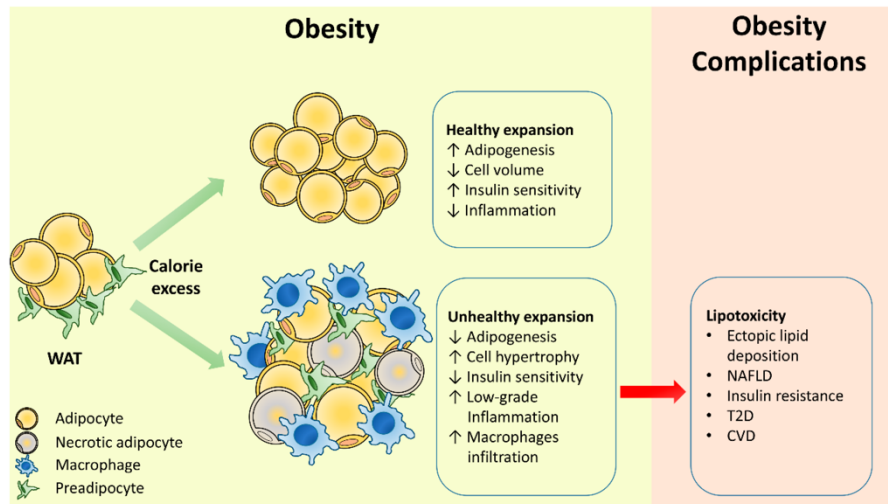


Figure 17. Expansion du tissu adipeux blanc dans l'obésité.

Le tissu adipeux blanc répond à l'excès calorique par une expansion saine ou malsaine. Une expansion saine par l'hyperplasie des adipocytes protège contre les complications métaboliques de l'obésité. L'expansion malsaine par l'hypertrophie des adipocytes favorise les complications métaboliques associées à l'obésité. WAT, tissu adipeux blanc ; T2D, diabète de type 2 ; NAFLD, stéatose hépatique non alcoolique ; MCD, maladie cardiovasculaire. (Longo et al., 2019)

B. Brunissement : brun dans blanc

La plasticité du TAB a été mise en évidence suite à la découverte de la présence de cellules de type brunes dans le TAB, appelées adipocytes beiges (Figure 18) [132]. Ces études préliminaires ont non seulement confirmé que ce tissu est une cible prometteuse pour lutter contre l'obésité en augmentant la dépense énergétique chez l'Homme et ont également stimulé les recherches sur la découverte de nouveaux facteurs impliqués dans le brunissement du TA [133].

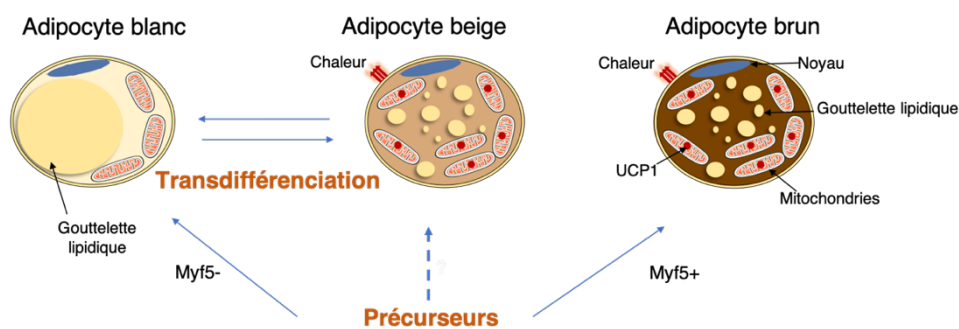


Figure 18. Origine des adipocytes beiges.

Au départ ou pendant la thermoneutralité, les adipocytes beiges présentent un phénotype plus blanc avec de grandes gouttelettes lipidiques et une faible expression des gènes thermogéniques [134]. Mais l'activation par une exposition au froid, une stimulation béta-adrénergique ou en cas d'exercice entraîne une activation d'un programme thermogénique dans un processus communément appelé « brunissement ». Alors que ces adipocytes bruns inductibles par le froid ont été décrits pour la première fois il y a près de 40 ans [135], leur origine développementale, leurs propriétés moléculaires et leurs rôles physiologiques n'ont été étudiés que plus récemment [134,136,137]. Chez la souris, les adipocytes beiges sont enrichis dans les dépôts de graisse sous-cutanée et sont rarement détectés dans les dépôts viscéraux. Curieusement, en raison de leur plasticité dépendante de la température, les adipocytes beiges ont également la capacité de « blanchir » dans un environnement chaud [138].

Des études réalisées chez la souris ont mis en évidence la présence d'adipocytes semblables aux adipocytes bruns au sein du TAB sous cutané suite à une exposition au froid (brunissement du tissu adipeux). Ces adipocytes, nommés adipocytes brites (pour « brown in white ») ou beiges, possèdent la même morphologie (nombreuses mitochondries, gouttelettes lipidiques multiloculaires), phénotype (expression d'UCP1 et PGC1 α) et fonctions thermogéniques que les adipocytes bruns [133]. Malgré leur ressemblance, les adipocytes beiges diffèrent des bruns, notamment par l'expression d'UCP1 dans ces adipocytes beiges qui n'est pas constitutive et qui résulte d'une stimulation par la voie béta 3-adrénergique ou d'agonistes pharmacologiques tel que ceux des PPAR γ [139], mais aussi de par l'expression de leur marqueurs caractéristiques comme CD137, TMEM26, TBX1 [140]. Des études ont montré que la stimulation des adipocytes beiges permet une amélioration des paramètres métaboliques chez les rongeurs [137,141], conférant ainsi un intérêt à la découverte de facteurs impliqués dans le brunissement du TA.

De nos jours de nombreux facteurs impliqués dans le brunissement du TA ont été découverts notamment grâce à des études réalisées essentiellement dans des modèles animaux de rongeurs. La plupart de ces facteurs augmente le tonus sympathique au TAB et/ou en augmentant la sensibilité du TAB à la stimulation adrénergique, en déclenchant une expression accrue du récepteur β 3-adrénergique (Figure 19). Certains semblent fonctionner de manière intracrine, agissant depuis l'intérieur de la cellule sur des régulateurs transcriptionnels clés. La plupart ont un double effet chez les rongeurs activant BAT et induisant le brunissement du TAB. Certains d'entre eux semblent agir sélectivement, ou surtout, sur le brunissement du BAT. Les mécanismes expliquant cette sélectivité sont largement méconnus et méritent d'être approfondis. De plus, pour beaucoup d'entre eux, il



existe des preuves qu'ils peuvent réduire la graisse corporelle *in vivo* chez les rongeurs par un mécanisme métabolique, indépendamment de la réduction de l'apport alimentaire.

Bien que des augmentations de la quantité d'UCP1 ne signifient pas nécessairement une augmentation du découplage et de la dépense énergétique, il convient de noter que de nombreux agents provoquent également des augmentations du métabolisme oxydatif dans les adipocytes blancs.

Fait intéressant, les résultats chez les souris avec une expression ectopique d'UCP1 dans TAB ont suggéré que l'activité d'UCP1, par la dépression de la charge d'énergie cellulaire et l'activation subséquente de l'AMPK, peut favoriser l'oxydation des acides gras et la genèse mitochondriale dans le tissu tout en réprimant la lipogenèse. D'autre part, certains des agents/conditions remodelent le TAB vers un métabolisme oxydatif accru sans induire l'expression d'UCP1 (par exemple, n - 3 acides gras d'origine marine). Bien que cela ne puisse pas être exactement considéré comme un brunissement, ces agents représentent également des stratégies potentielles pour réduire la graisse corporelle en exploitant la plasticité du métabolisme du TAB [142].

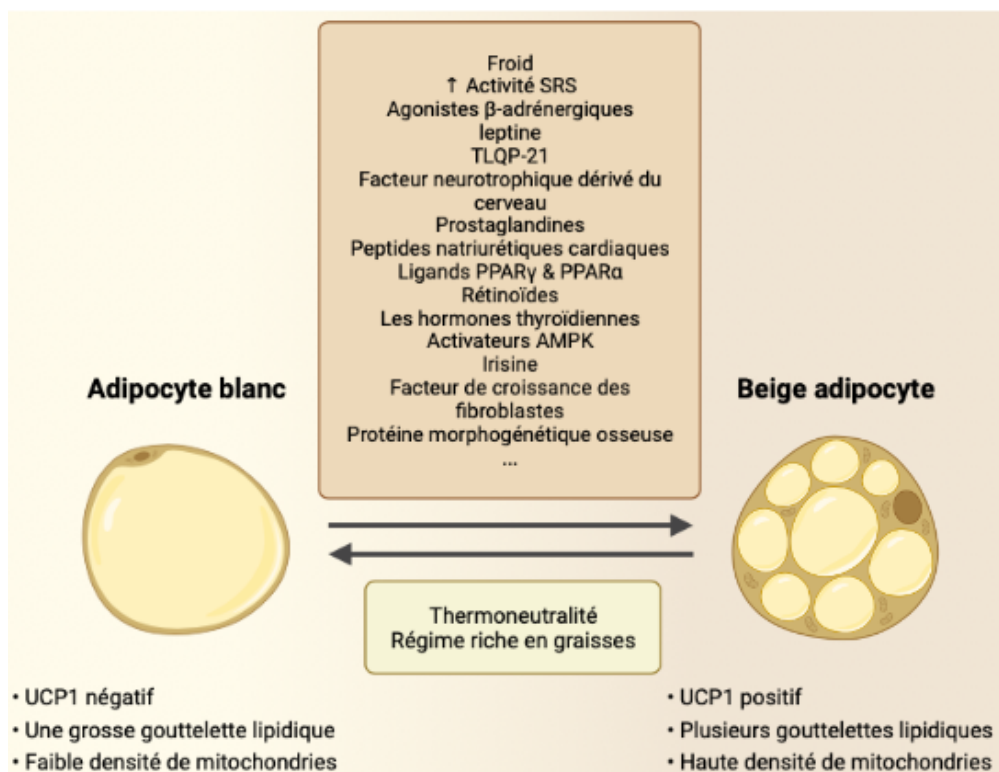


Figure 19. Stimuli qui ont été associés au brunissement du WAT [70,71].

C. Activation TA brun par cachexie

Le syndrome de cachexie (SC) se définit comme un syndrome métabolique progressif caractérisé par un état pathologique d'amaigrissement profond avec une déplétion en graisse, muscle squelettique et une asthénie, qui ne sont pas attribuables uniquement à un apport nutritionnel insuffisant, conduisant ainsi à un affaiblissement extrême [143]. Une cachexie sévère survient chez la plupart des patients atteints d'un cancer avancé ou du SIDA. On retrouve aussi cette cachexie lors de diabète associé au cancer du pancréas (PCDM) [144,145].

Le SC cancéreux (SCC) est directement impliqué comme cause de décès dans au moins 20 % à 30 % de tous les cancers. Le BAT semble impliqué dans la cachexie cancéreuse [146], en effet cette cachexie est souvent associée à une forte activation du BAT. En effet, des études ont démontré que l'activation du BAT (*via* une expression accrue de UCP1) contribuait au développement de SCC chez des souris ayant reçu des injections de lignées cellulaires de cancer du côlon cachectique [147]. Une autre étude chez l'Homme a montré que l'activité du BAT s'est avérée être corrélée positivement avec le stade du cancer [147]. De plus, le brunissement des dépôts de TAB a aussi été associé au SCC chez l'Homme et la souris [147]. Cette activation pourrait être une réponse permettant de combattre l'hypothermie résultant de la diminution de la masse grasse et de la masse musculaire.

VI. Cdkn2a

A. Généralités sur le cycle cellulaire

Pour se reproduire les cellules ont un fonctionnement cyclique, rythmé par ce qu'on appelle le cycle cellulaire.

Le cycle cellulaire est l'ensemble des modifications qui constitue et délimite la vie d'une cellule. Il consiste en une succession immuable de différentes phases, régulées par différents complexes, qui vont permettre à la cellule de se dupliquer et de se diviser.

Chez les eucaryotes, la réplication de l'ADN est limitée à une synthèse discrète ou à une phase S, et la ségrégation chromosomique se produit à la mitose ou à la phase M. Deux phases de Gap séparent la phase S et la mitose, connues sous le nom de G1 et G2. Il ne s'agit pas de périodes d'inactivité, mais plutôt de périodes où les cellules se développent, intègrent des signaux de croissance, organisent un génome répliqué et se préparent à la ségrégation

chromosomique. Il existe aussi une phase de sortie du cycle cellulaire G₀ qui est appelé phase de quiescence puisque la cellule arrête de se diviser pour soit entrer en apoptose soit en différenciation cellulaire (Figure 20).

Pour assurer la bonne progression à travers le cycle cellulaire, la cellule dispose de systèmes de régulation hautement perfectionnés qui opèrent à différents niveaux.

La bonne exécution de chaque phase ainsi que la transition de phase du cycle dépendent de la cellule qui passe par trois points de contrôle du cycle cellulaire, de la transition G₁-S, de la transition G₂ à M et du point de contrôle du fuseau mitotique M à G₁(Figure 20). Les points de contrôle du cycle cellulaire sont des mécanismes de surveillance qui surveillent l'ordre, l'intégrité et la fidélité des événements majeurs du cycle cellulaire. Il s'agit notamment de la croissance à la taille cellulaire appropriée, de la réplication et de l'intégrité des chromosomes, et de leur ségrégation précise à la mitose. Certains de ces mécanismes contrôlent les devenir cellulaires alternatifs avec un impact significatif sur la suppression des tumeurs.

Le cycle cellulaire est aussi régulé par une machinerie moléculaire *via* le taux d'expression variable de certaines protéines : les cyclines (Figure 20). Il y a 4 cyclines qui régule le cycle cellulaire : Cycline A, B, D et E. En plus de leur niveau d'expression le cycle cellulaire sera dépendant de leur formation en complexe avec des kinases dépendantes des cyclines (CDK), dont il existe plus de 20 membres.

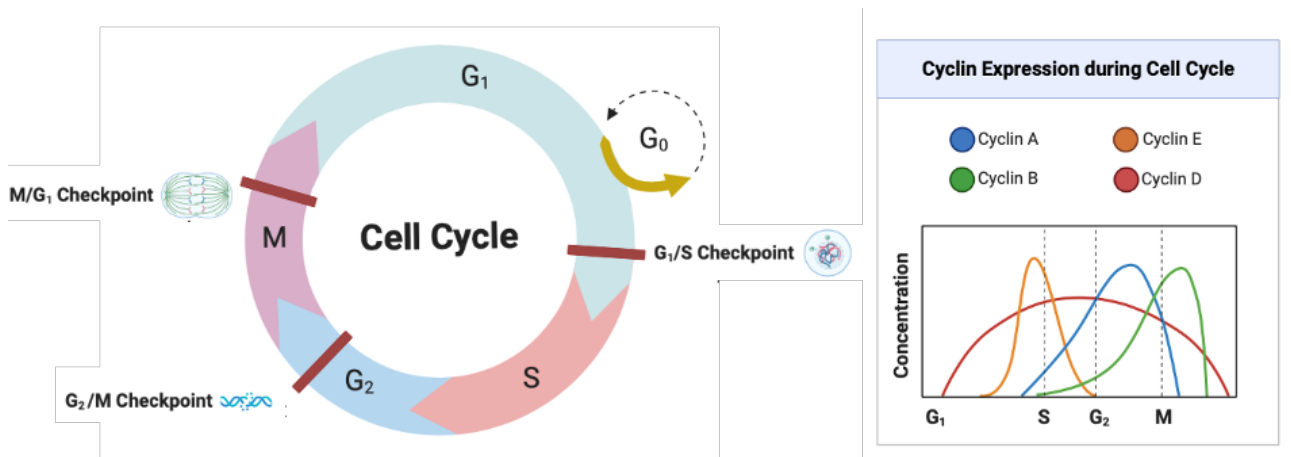


Figure 20. Régulation du cycle cellulaire.

Les principaux acteurs qui conduisent la progression du cycle cellulaire sont les CDK. Ce sont des protéines sérine/thréonine kinases qui phosphorylent des substrats clés pour favoriser la synthèse de l'ADN et la progression mitotique. Les sous-unités catalytiques sont en excès molaire, mais manquent d'activité jusqu'à ce qu'elles soient liées par leurs sous-unités de cycline apparentées, qui sont étroitement régulées à la fois aux niveaux de synthèse



et de protéolyse dépendante de l'ubiquitine. La liaison à la cycline permet aux CDK inactives d'adopter une configuration active similaire aux kinases monomères et actives. En plus de cette régulation, l'activité CDK peut également être régulée négativement par la liaison de petites protéines inhibitrices, les CKI, ou par la phosphorylation inhibitrice de la tyrosine qui bloque le transfert de phosphate vers les substrats.

Une coopération étroite entre ce trio : Cycline, CDK et CDKI, est nécessaire pour assurer une progression ordonnée tout au long du cycle cellulaire.

Les CKI sont subdivisés en deux classes en fonction de leur structure et de leur spécificité CDK. Les membres de la famille Ink4 [p16INK4a (Cdkn2a), p15INK4b (Cdkn2b), p18INK4c (Cdkn2c) et p19INK4d (Cdkn2d)] ciblent principalement Cdk4 et Cdk6. Inversement, les membres de la famille Cip/Kip [p21Cip1 (Cdkn1a), p27Kip1 (Cdkn1b) et p57Kip2 (Cdkn1c)] interfèrent largement avec les activités des complexes kinases dépendantes de la cycline D, E, A.

B. Les membres de la familles INK4 (pour INhibitor of CDK4)

La voie cycline D-Cdk4-6/INK4/Rb/E2F est essentielle pour contrôler la croissance cellulaire, car elle intègre divers mitogènes et stimuli antimitogènes. Les protéines INK4, dont les membres comprennent p16INK4a, p15INK4b, p18INK4c et p19INK4d, empêchent la progression du cycle cellulaire en se liant à Cdk4 ou Cdk6 et en inhibant l'activité de la cycline D. Ces protéines INK4 partagent une structure dominée par des répétitions multiples d'ankyrine. Malgré leur apparente redondance structurelle et leur puissance inhibitrice comparable, les protéines INK4 sont exprimées de façon différenciée au cours du développement de la souris. Cette variabilité d'expression suggère que ces inhibiteurs du cycle cellulaire pourraient avoir des fonctions spécifiques à certaines lignées cellulaires ou tissus. Ces protéines INK4 sont fréquemment perdues ou inactivées par des mutations dans divers types de cancers, ce qui en fait des suppressions de tumeurs potentielles ou avérées. En plus de leur capacité à bloquer les cellules en phase G1 du cycle cellulaire, il a été prouvé que les protéines INK4 participent à un nombre croissant de processus cellulaires. Compte tenu de leurs rôles émergents dans des fonctions physiologiques fondamentales et des processus pathologiques, il est nécessaire d'explorer les différents rôles des membres individuels de la famille INK4 au-delà de la régulation du cycle cellulaire.

Des études approfondies révèlent l'implication des protéines INK4 dans la sénescence, l'apoptose, la réparation de l'ADN et plusieurs stades de l'oncogenèse.



1. *p19INK4d (Cdkn2d)*

p19INK4d, également connu sous le nom de CDKN2D est situé sur le chromosome 19p13.2. p19INK4d humain est identique à 86 % au niveau des acides aminés au clone murin, et il est identique à environ 44 % aux autres membres humains de la famille INK4 [148]. Son expression oscille de manière dépendante du cycle cellulaire, avec son expression la plus basse étant observée à mi-G1 et son expression maximum étant observée pendant la phase S [149]. La régulation de l'expression de p19INK4d se produit à la fois au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. Au niveau transcriptionnel, divers facteurs de transcription régulent l'expression de p19INK4d dans certains processus biologiques, tel que le facteur de transcription Msx1, AML-1(RUNX1), E2F1 ou encore les FOXOs [150]. Au niveau post-transcriptionnel, l'expression p19INK4d est principalement modulée par les miARN et la dégradation des protéines médiée par le protéasome [150].

p19INK4d participe à de nombreuses fonctions biologiques tel que le contrôle du cycle cellulaire, la réparation des dommages à l'ADN, la différenciation cellulaire et la sénescence. En effet, en tant que membre de la famille INK4, de nombreuses études ont montré que p19INK4d inhibe la prolifération cellulaire en arrêtant le cycle cellulaire à la phase G1. Dans les neuroblastomes amplifiés par MYCN [151], dans la lignée de cellules du cancer du poumon H1299 [152], les cellules souches mésenchymateuses-microvésicule-miR-451a [153]. De plus, p19INK4d peut être phosphorylé par p38 et CDK1. Le complexe inhibiteur CDK6-p19INK4d est dissocié, et donc CDK6 déclenche l'entrée des cellules dans la phase S [154]. D'autre part, la suppression de l'expression p19INK4d favorise la progression du cycle cellulaire, augmente la prolifération et conduit à la tumorigenèse [155,156]. Il a été rapporté que p19INK4d est induit par E2F1 en réponse à la lumière UV, ce qui favorise la réparation des dommages à l'ADN [157]. Après un stimulus de sénescence, l'expression de p19INK4d est régulée vers le haut et se transloque dans le noyau pour s'associer étroitement à la chromatine. Des niveaux réduits de p19INK4d nuisent à l'hétérochromatinisation génomique globale liée à la sénescence [158].

2. *p18INK4c (Cdkn2c)*

Le gène humain p18INK4c a été initialement découvert en 1994, isolé dans des cribles de levure à deux hybrides conçus pour rechercher des protéines qui interagissent avec CDK6 [159]. L'homologue souris a été signalé l'année suivante par un autre groupe [160]. p18 et p19 sont approximativement 40% identiques et ont des degrés similaires d'homologie de protéine avec p16 et p15. Comme il est caractéristique de la famille INK4, p18 est une protéine de 168

acides aminés composés de quatre motifs tandem ankyrine, chacun d'environ 32 acides aminés de longueur et une similitude substantielle avec Notch humain et l'inhibiteur de la levure cdk PHO8 [161].

p18 se lie spécifiquement aux sous-unités catalytiques dépendantes de la cycline D, CDK4 et CDK6, avec une association préférentielle avec CDK6 [159,160], et est incapable d'interagir avec d'autres CDK ou directement avec la cycline D [160].

Il y a au moins trois transcriptions différentes de p 18 de 2,5, 1,9 et 1,1 ko. Celles-ci sont exprimées différemment dans divers tissus [160]. Lors de l'entrée des cellules dans le cycle cellulaire, l'ARNm p18 est induit avec des cinétiques similaires à celles de p19.

Les données des études sur la souris knock-out ont montré un rôle clair pour p18INK4c dans la prolifération cellulaire, la taille des organes et le cancer. En effet, les souris déficientes pour p18INK4c développent une gamme de néoplasmes spontanés, indiquant son rôle dans la suppression des tumeurs [162]. Malgré les premiers résultats négatifs dans les échantillons de cancer humain, des études ont montré son implication dans une gamme de types de tumeurs humaines, y compris l'adénocarcinome du sein, le myélome multiple, la leucémie lymphoblastique aiguë, l'oligodendrogliome et le méningiome [163–167].

De nombreuses études ont impliqué p18INK4c en tant que suppresseur de tumeur dont l'inactivation génétique joue un rôle dans la pathogenèse du glioblastome multiforme (GBM), du myélome multiple et d'une variété d'autres cancers courants. Les délétions de p18INK4c sont nettement moins fréquentes que celles du locus p16INK4a/p14ARF/p15INK4b et semblent montrer une hétérogénéité intratumorale importante. Ils se produisent souvent dans les tumeurs présentant également des délétions du locus p16INK4a/p14ARF/p15INK4b mais se produisent probablement plus tard dans la tumorigenèse, soulevant des questions fondamentales sur les contributions relatives de ces deux loci à l'initiation et à la progression de la néoplasie humaine.

Au-delà de la suppression des tumeurs, p18INK4c joue également un rôle important dans le maintien d'un état de repos chez les progéniteurs neuronaux [168], mais aussi dans le contrôle de l'adipogenèse [169] et la régulation de la différenciation des lymphocytes T et de l'alloimmunité [170].

3. p15INK4b (Cdkn2b) et p16INK4a (Cdkn2a)

Le locus INK4a/ARF/INK4b aussi connu sous le nom de CDKN2a et CDKN2b, se retrouve dans une petite portion de 35 kb du génome humain et code pour trois gènes apparentés : p14ARF/ p19ARF, p15INK4b et p16INK4a. CDKN2B réside à côté du gène



CDKN2A et est transcrit dans la même direction du centromère au télomère. Alors que p15INK4b a son propre cadre de lecture ouvert qui est physiquement distinct, p16INK4a et ARF ont des premiers exons différents qui sont épissés à un deuxième et un troisième exon commun. Bien que les exons 2 et 3 soient partagés par p16INK4a et ARF, les protéines sont codées dans des cadres de lecture alternatifs. En conséquence, p16INK4a et ARF ne sont pas des isoformes et ne partagent aucune homologie d'acides aminés.

Deux isoformes, p15 et p15.5 sont générés à partir de deux codons d'initiation alternatifs : p15 est initié au premier codon AUG situé à 328 nucléotides de l'extrémité 5' et p15.5 à un codon GUG en position 289. Les deux isoformes semblaient être fonctionnellement indissociable [171]. Une forme épissée alternativement, p10, provient d'un site donneur 5' alternatif dans l'intron 1, conduisant à un codon d'arrêt au sein même du cadre du nouvel exon. Par conséquent, la protéine p10 est identique à l'extrémité NH₂ de p15 mais contient une nouvelle extrémité COOH [172].

De plus, cette région comprend un ARN non codant, ANRIL, avec un premier exon situé entre le promoteur de p14/p19 et p15 et chevauchant les deux exons de p15. Sa transcription se produit dans le brin opposé au locus CDKN2A/B et co-clusters principalement avec p14/p19 [173].

p15 agit comme un effecteur du facteur de croissance transformant-b (TGF- β), induisant un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 par inhibition de CDK4/6 [174]. En conséquence, la protéine RB1 reste dans son état hypophosphorylé, empêchant les facteurs de transcription E2F d'activer la transcription des gènes nécessaires à l'entrée dans la phase S du cycle cellulaire et à la synthèse de l'ADN [175]. p15 joue également un rôle important dans la régulation de l'engagement cellulaire des cellules progénitrices hématopoïétiques et la différenciation des cellules myéloïdes [176–179]. Le produit du gène ANRIL est une molécule d'ARN fonctionnelle qui interagit avec le complexe répressif polycombien 1 (PRC1) et -2 (PRC2), ce qui entraîne le silence épigénétique de p15 [180].

CDKN2B est important dans la prévention de la croissance incontrôlée des cellules, qui peut conduire à la formation de tumeurs. En fait, une diminution de l'expression de CDKN2B ou une mutation de son gène a été associée à un certain nombre de cancers humains, dont le gliome, le mélanome et le cancer du poumon [181]. CDKN2B pourrait jouer un rôle dans la régulation de la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires, qui est un élément clé du développement de l'athérosclérose [182].

Une série d'études de liaison ont mis en évidence des polymorphismes nucléotidiques uniques (SNP) dans une région de 120 kb autour du locus INK4b-ARF-INK4a associés à une



susceptibilité accrue à la fragilité [183], maladies coronariennes [184,185], infarctus du myocarde [182], diabète de type 2 [186–188] et maladie d'Alzheimer [189].

C. Le Locus INK4a/ARF : Cdkn2a

Le locus *CDKN2A* se trouve sur le chromosome 9p21 chez l'Homme et le chromosome 4 chez la souris (Figure 21). Le gène *Cdkn2a* code deux protéines, p16^{INK4a} et p19^{ARF}, deux régulateurs clés du cycle cellulaire possédant respectivement un rôle anti-prolifératif et suppresseur de tumeur (Figure 21).

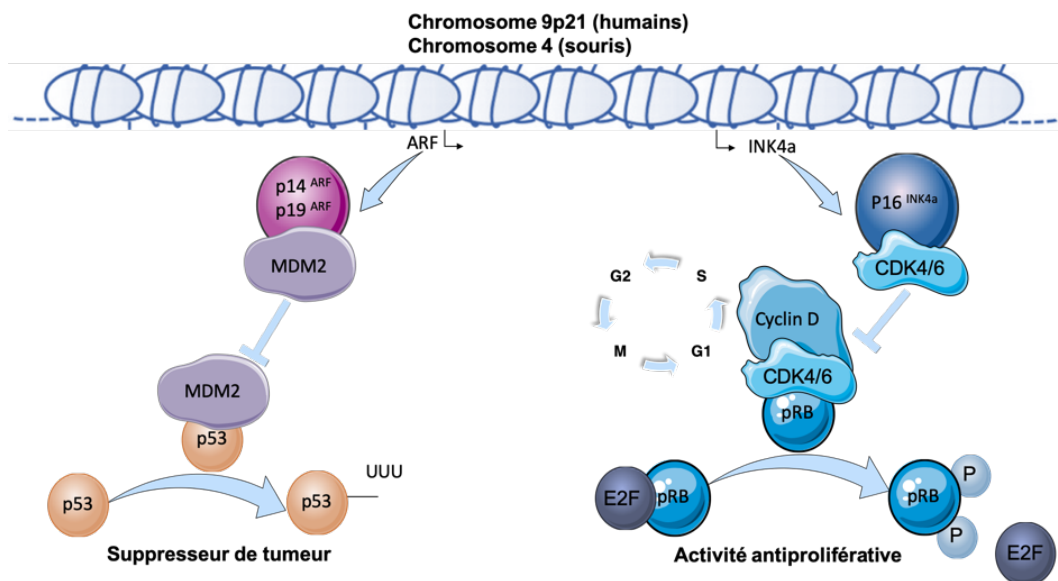


Figure 21. Schéma du locus *Cdkn2a* et de ses actions cellulaires.

1. p16^{INK4a}

La protéine p16 est encodée par le variant transcrit 1 dans l'organisme humain et par le variant transcrit 2 chez la souris. Ces deux variantes génétiques comportent respectivement 1267 et 850 paires de bases, menant à la production d'une protéine de 16 KDa. Celle-ci est composée de 156 acides aminés dans le cas de l'espèce humaine, et de 168 acides aminés chez la souris. Notamment, la séquence de la protéine p16 est largement conservée à travers différentes espèces, démontrant une remarquable homologie de 90% entre les versions humaine et murine de cette protéine.

En termes de structure, la protéine p16 est formée de quatre domaines ankyrines, qui facilitent son attachement aux CDK4 et CDK6. Le domaine minimal requis pour l'interaction entre p16 et la CDK4 comprend les domaines ankyrines 3 et 4, les boucles 2 et 3, ainsi que la

portion C-terminale adjacente [190]. Cette association de la protéine p16 avec les CDK4/6 provoque une modification de leur conformation allostérique. Cette transformation modifie à son tour le site d'accueil de la Cycline D1 et réduit leur affinité pour l'ATP, des implications cruciales pour la régulation du cycle cellulaire. La protéine p16 possède d'autres partenaires protéiques tel que la protéine p65 du complexe NF- κ B dans des cellules HeLa traitées au TNF α [191], la protéine Band 3 [192,193], BRG1 [194], le facteur général de transcription TFIIH [195] et l'ATP citrate lyase [196]. La protéine p16 peut également intervenir dans la transcription de certains micro-ARN (miRNA) [197].

L'expression et l'activité de p16 sont régulées à différents niveaux. Au niveau épigénétique p16 est régulée par méthylation, acétylation ou encore par les protéines du groupe polycomb. Dans des cellules embryonnaires, le promoteur et l'exon 1 de la séquence codant pour p16 sont méthylés au niveau d'îlots CpG. En effet, des méthyltransférases de l'ADN ou DNMT induisent la méthylation de ces îlots CpG [198]. Une étude a montré que dans des cellules 293T l'histone acétyltransférase p300 interagit avec le facteur de transcription SP1 afin de stimuler l'activité du promoteur de p16 et son expression [199]. Bmi1 est un répresseur transcriptionnel appartenant aux protéines du groupe Polycomb qui régule négativement p16 [200]. Au niveau transcriptionnel, l'expression de p16 est régulée positivement par différents facteurs tel que le facteur de transcription SP1, les voies Ras et p38 MAPK, et PPAR α induisant l'augmentation de l'expression de p16 afin de bloquer le cycle cellulaire [201–204]. Elle est régulée négativement par les protéines ID1 et TAL1 qui ont la capacité de former un hétérodimère avec la protéine E47 pour ensuite se lier aux sites dits "E-Box", bloquant ainsi la transcription de p16 stimulée par E47 [205]. Par ailleurs, le promoteur de p16 comprend également des composants connus sous le nom d'ITSE ou "INK4a Transcription Silence Element", qui permettent une régulation négative de son expression. Ces composants ITSE possèdent un site de liaison pour le facteur de transcription B-MYB, qui joue un rôle crucial dans la survie cellulaire, la prolifération et la différenciation. Plus précisément, B-MYB exerce une régulation négative de l'expression de p16 au sein des cellules embryonnaires [206].

L'activité de p16 peut également être modifiée par des modifications post-traductionnelles par phosphorylation et méthylation. La phosphorylation et la méthylation de p16 sont très liées et opèrent de concert pour réguler l'activité de p16. Effectivement, lorsqu'il y a une mutation au niveau du résidu serine 140, on observe une augmentation de la méthylation de p16. En revanche, lors d'une mutation de la serine 152, qui est phosphorylée lorsque p16 interagit avec la CDK4, la méthylation de p16 est réduite, voire même annulée [207].



2. p14/p19ARF

ARF connu sous le nom de p14ARF chez l'homme et p19ARF chez la souris a été identifié à l'origine comme un transcrite alternatif du locus INK4b-ARF-INK4a. Le transcrite ARF est formé par les exons 1 β , 2 et 3. La structure primaire de la protéine ARF souris est composée de 169 acides aminés et la protéine humaine de seulement 132 acides aminés. Les deux protéines ne partagent qu'une homologie de séquence limitée (50 %) qui pourrait expliquer certaines de leurs différences fonctionnelles. Néanmoins, ils sont tous deux composés de plus de 20% de résidus d'arginine leur conférant une forte basicité et ayant des propriétés hydrophobes. Fait intéressant, il n'y a pas de motifs structuraux reconnaissables dans les protéines ARF et la protéine a probablement besoin de former des complexes avec d'autres molécules, à la fois pour être pliée et pour que sa charge soit neutralisée au pH physiologique. Cela explique probablement le nombre croissant de partenaires ARF encore à identifier [208]. Chez la souris p19ARF ne contient qu'une seule lysine et p14ARF humain n'en a pas. p19ARF et le p14ARF ne contiennent qu'un seul résidu de méthionine interne (Met45 et Met48, respectivement), qui est absent chez d'autres espèces (rat, opossum, porc et poulet). L'initiation de la traduction à partir de ces résidus de méthionine produit à la fois chez la souris et chez l'homme une forme courte de la protéine qui, lorsqu'elle est surexprimée, se localise dans les mitochondries (smARF) [209]. Néanmoins, l'ARF de pleine longueur se localise préférentiellement dans les nucléoles, grâce aux signaux de localisation nucléolaire (NoLS). p19ARF contient un NoLS unique dans son exon 1 β (aa 26–37) dont la délétion induit la translocation nucléaire de la protéine [210]. La situation est plus complexe pour p14ARF puisque deux NoLS ont été identifiés dans la protéine. Le premier localisé dans l'exon 1 β joue un rôle clé dans la fonction antiproliférative de p14ARF car sa délétion inhibe la capacité de p14ARF à arrêter le cycle cellulaire et à se lier à Mdm2 [211]. Le second se trouve dans l'exon 2 (aa 83–101) et est impliqué dans la capacité de p14ARF à promouvoir la sumoylation de ses partenaires de liaison [212].

Alors qu'une faible expression d'ARF est maintenue dans des conditions normales, une expression d'ARF significativement accrue est induite par des signaux oncogéniques ou des dommages à l'ADN dans des conditions de stress, provoquant par la suite l'activation du programme de sécurité intégrée. Le réglage fin de l'expression de l'ARF par divers facteurs de transcription indique que l'activité suppressive de tumeur de l'ARF peut être manipulée sous divers stress, en fonction de la nature des signaux de stress. Parmi les différents facteurs de transcription clés dans la régulation de l'expression de l'ARNm de l'ARF on retrouve les activateurs de la transcription d'ARF tel que MYC [213], une oncoprotéine qui régule la

prolifération cellulaire, la différenciation, l'inflammation et le métabolisme [214]. Comme E2F est régulé par MYC, il a lui aussi été identifié comme un régulateur de l'expression de l'ARF médiée par MYC, et plus particulièrement E2F1 et E2F2 [215,216]. Au contraire, un autre membre E2F, E2F3b, fonctionne comme un régulateur négatif de l'expression de l'ARF [217]. La DMP1, également appelée protéine de type Myb liant la cycline D, peut également induire un arrêt de la croissance cellulaire en induisant l'expression de l'ARF [218,219]. On retrouve aussi FoxO, qui est un sous-type du facteur de transcription forkhead-box et a été identifié comme un facteur de transcription ARF [220]. TGF β 2 pourrait fonctionner comme un régulateur positif de la transcription de l'ARF pendant l'embryogenèse, en effet les embryons déficients en Tgf β 2 présentaient un phénotype semblables aux embryons déficients en Arf [221].

Contrairement au TGF β 2, le TGF β 1 participe à une voie de signalisation qui régule négativement la transcription de l'ARF dans le lymphome à cellules B [222]. Comme pour p16 on retrouve le facteur de transcription du groupe polycomb Bmi1 comme répresseur transcriptionnelle de ARF [200]. Une autre protéine du groupe polycomb, CBX7, a été identifiée comme un répresseur transcriptionnel de l'ARF [223]. On retrouve aussi Polycomb-repressive complex-2 (PRC2) qui réprime la transcription ARF en s'associant à Twist-1 [224], TBX2 [225] et EGFR [226].

L'accumulation de preuves concernant la régulation post-traductionnelle de l'ARF suggère que l'induction de l'ARF médiée par le stress oncogène peut être associée à des mécanismes moléculaires qui régulent les niveaux et les fonctions des protéines. En particulier, l'implication de la phosphorylation [227–229], de l'ubiquitination [230–233] et des voies dépendantes du protéasome [234–236] et du lysosome [237–239] dans la régulation post-traductionnelle de l'ARF a récemment été observée.

D. Cdkn2a : Rôle de régulateur du cycle cellulaire

Pour la première fois découvert en 1993 [240] p16 est le deuxième gène suppresseur de tumeur le plus courant, après p53. Le gène suppresseur de tumeur p16 code les protéines impliquées dans la régulation de deux voies fondamentales du cycle cellulaire, la p53 et la voie RB1.

La protéine P16^{INK4a} est majoritairement impliquée dans le contrôle de la voie E2F/CDK4-6/pRb. En effet, cette protéine bloque le passage de la phase G1 à S en inhibant la phosphorylation de pRb par le complexe CDK4/6-cyclinD et la libération du facteur de

transcription E2F, ce qui aura pour conséquence de bloquer la transcription des gènes cibles de E2F nécessaires à la sortie de la phase G1 du cycle cellulaire.

En raison de leur capacité à inhiber les kinases CDK 4-6/cycD, les protéines INK4 contribuent à maintenir la protéine Rb et ses homologues associés, p107 et p130, dans leur état non phosphorylé et suppresseur de croissance. Parmi toutes les voies possibles qui relient ces protéines, celle formée par p16INK4a/CDK4/cycD1/Rb (Figure 21) et, dans une moindre mesure, celle formée par p15INK4b/CDK4/cycD1/Rb semblent particulièrement pertinentes pour la tumorigenèse. Il est important de noter que la voie p16INK4a/Rb se comporte comme une seule cible mutagène dans de nombreuses tumeurs humaines [241]. Par exemple, l'inactivation de p16INK4a ou Rb est, en général, des altérations mutuellement exclusives. Dans l'ensemble, la voie p16INK4a/Rb semble être dérégulée dans la grande majorité des tumeurs humaines, soit par perte de p16INK4a ou de Rb, soit par surexpression de CDK4 ou de cycline D1.

Dans les situations où p16 est supprimée, les autres membres de la famille des inhibiteurs INK4 peuvent intervenir pour bloquer le cycle cellulaire, grâce à une certaine redondance existante entre les différents INK4. Par exemple, lors de situations de stress, l'élimination de p16 dans des fibroblastes embryonnaires de souris conduit à une stabilisation de la protéine p15, qui agit alors pour bloquer le cycle cellulaire. De même, l'éradication de p16 dans des astrocytes humains entraîne une hausse de l'expression de p18, qui est dépendante du facteur de transcription E2F [206].

La protéine p19^{ARF}, elle est impliquée dans l'activation directe de la voie P53 par inhibition de Mdm2/HDM2, bloquant les cellules en phase G1 et G2 [242] (Figure 21).

Le suppresseur de tumeur p53 est inactivé dans environ 50 % des cancers humains. Les niveaux de protéines de p53 sont déterminés principalement par l'ubiquitination et la dégradation protéolytique subséquente. La principale ubiquitine ligase pour p53 est l'oncogène MDM2 [243]. En concordant avec le rôle de MDM2 en tant que répresseur de la p53, les tumeurs qui expriment la MDM2 n'accumulent pas de niveaux de p53 détectables et ne portent pas de mutations dans le gène p53 [244]. La protéine p19ARF s'associe à MDM2 et la séquestre dans les nucléoles [210,245]. Ces deux fonctions, la liaison au MDM2 et à la localisation nucléolaire, sont essentielles pour la stabilisation médiée par p19ARF de p53[210,245]. On pense également que la voie p19ARF/p53 est dérégulée dans la grande majorité des tumeurs humaines, soit par perte de p19ARF ou de p53, soit par surexpression de MDM2.

Les voies décrites précédemment peuvent être simultanément dérégulées par délétion homozygote de l'ensemble du locus INK4/ARF, ou elles peuvent être dérégulées par une

combinaison d'événements mutagènes, tels que l'amplification de la cycline D1 et la perte de p53. Récemment, un nouveau mécanisme de déréglementation a été identifié par rapport à l'oncogène Bmi1. Bmi1 appartient à la famille des silencieux de chromatine Polycomb, et lorsqu'il est surexprimé, il est capable de réprimer simultanément l'activité transcriptionnelle des promoteurs INK4a et ARF [200].

Il est important de souligner l'existence de plusieurs niveaux de diaphonie entre les voies p16INK4a/Rb et p19ARF/p53. Par exemple, p53 active par transcription l'expression de p21Cip1 qui, à son tour, inhibe les kinases CDK2/A-E empêchant la phosphorylation complète de Rb [246]. En outre, MDM2 peut interférer avec l'activité de suppression de croissance de Rb [247]. Ces niveaux et d'autres niveaux supplémentaires de régulation compliquent l'interprétation des effets que des altérations particulières de ces voies peuvent avoir sur la prolifération cellulaire et l'apoptose.

E. *Cdkn2a* : Rôles dans la sénescence

La sénescence cellulaire est un état d'arrêt irréversible du cycle cellulaire provoqué par un stress, caractérisé par des changements morphologiques et fonctionnels dans les cellules. Ce phénomène complexe présente des aspects bénéfiques et nuisibles [248]. D'une part, il agit comme un mécanisme de suppression des tumeurs en empêchant la prolifération des cellules endommagées ou potentiellement cancéreuses. D'autre part, les cellules sénescents sécrètent des facteurs connus sous le nom de phénotype associé à la sénescence (SASP), qui peuvent entraîner à la fois une inflammation chronique et des altérations tissulaires [249,250]. Toutefois, l'accumulation progressive de cellules sénescents au fil du temps peut contribuer au vieillissement et aux maladies liées à l'âge [249,250]. Ces cellules persistent dans les tissus en raison de mécanismes de dégradation altérés [249,250]. Les facteurs SASP sécrétés par les cellules sénescents favorisent l'inflammation chronique, la dysfonction tissulaire et peuvent contribuer au développement de maladies liées à l'âge telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires et les troubles neurodégénératifs [249–251]. Un gène clé dans ce processus est *Cdkn2a*, qui joue un rôle crucial en facilitant la sénescence cellulaire grâce à l'action de la protéine p16INK4a [251]. Cette protéine est étroitement associée au vieillissement et à diverses conditions liées à l'âge. L'expression accrue de p16INK4a résulte des cycles de réplication et de dommages répétés subis par les cellules au fil du temps, ainsi que de facteurs tels que les dommages à l'ADN, le stress oxydatif et les signaux oncogéniques [249–251]. Les cellules sénescents présentent un arrêt définitif de leur division cellulaire en réponse au stress, ce qui les amène à augmenter en taille sans se diviser.



Elles deviennent très actives métaboliquement et libèrent divers facteurs biologiques qui influencent les tissus environnants [249–251]. Cette accumulation progressive de cellules sénescents dans différents tissus peut jouer un rôle essentiel dans le processus de vieillissement [249–251]. Des études utilisant des souris transgéniques "INK-ATTAC" ont démontré que la suppression des cellules "p16 positives" retarde l'apparition de tumeurs chez les souris, réduit la dégradation liée à l'âge de certains organes et augmente leur espérance de vie [251–253]. D'autres études sur des souris BubR1^{H/H}, présentant un faible niveau d'expression de la protéine BubR1 impliquée dans le contrôle de la mitose, ont également permis de mieux comprendre le rôle de p16 dans la sénescence [254]. Ces souris vieillissent prématurément, avec une augmentation de l'expression de p16 dans certains tissus et une augmentation de la sénescence [254]. La suppression de p16 chez ces souris a eu pour effet de diminuer ces effets et d'accroître partiellement leur espérance de vie, tout en réduisant la sénescence dans ces tissus [254]. Dans le contexte du vieillissement, on observe une augmentation de l'expression de p16 dans les îlots pancréatiques, associée à une diminution de la prolifération de ces cellules [255]. Des souris transgéniques surexprimant p16 présentent également une diminution de la prolifération des cellules β -pancréatiques chez les jeunes souris. Cependant, l'absence de p16 empêche le déclin de la prolifération des cellules β -pancréatiques au cours du vieillissement et améliore la régénération de ces cellules après un traitement cytotoxique induisant le diabète chez la souris [255]. Par ailleurs, l'absence de p16 a été démontrée pour restaurer la prolifération des cellules souches de l'épithélium de la glande mammaire, contrecarrant ainsi leur déclin causé par une perte de fonction du gène Brca1 [256]. Ces découvertes suggèrent que la modulation de l'expression de p16 pourrait être bénéfique pour ralentir le vieillissement et traiter certaines pathologies telles que le diabète. Toutefois, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour approfondir notre compréhension des mécanismes impliqués et des applications potentielles de ces connaissances. Il est également important de noter que le gène CDKN2A peut également réguler la sénescence par l'intermédiaire de p14ARF/p19ARF. En effet, l'expression de p14ARF/p19ARF est induite en réponse à des dommages à l'ADN et peut activer p53 pour induire la sénescence cellulaire [257]. Contrairement à p16INK4a, qui agit en inhibant spécifiquement une kinase dépendante des cyclines (CDK) impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire, p14ARF/p19ARF régule indirectement la sénescence cellulaire en ciblant le suppresseur de tumeur p53. Lorsque les cellules subissent des dommages importants, tels que des lésions de l'ADN, des facteurs oncogéniques ou du stress cellulaire p14ARF/p19ARF est activé pour stabiliser et activer p53. Le suppresseur de tumeur p53 est une protéine clé qui régule plusieurs voies impliquées dans la réparation de l'ADN, l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose et la sénescence. Une fois activée,



p53 induit l'expression de plusieurs gènes qui contribuent à la sénescence cellulaire. Il agit notamment en augmentant l'expression de p21CIP1, un inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines (CDK) qui bloque le cycle cellulaire, empêchant ainsi les cellules endommagées de se diviser. Des études expérimentales ont montré que p14ARF/p19ARF est capable d'induire la sénescence indépendamment de p16INK4a. Cela met en évidence le rôle distinct de p14ARF/p19ARF dans la régulation de la sénescence cellulaire et sa capacité à fonctionner comme un activateur clé de p53. Une étude a démontré que l'activation de p14ARF entraînait une stabilisation de p53 et une augmentation de la sénescence cellulaire [258].

Dans le TA l'activation de la voie p53 contribue à la résistance à l'insuline associée à l'obésité. En effet, l'importance cruciale de p53 dans l'émergence de la résistance à l'insuline a été illustré par une étude de l'équipe de Minamino [259]. Dans cette étude l'inhibition de l'activité de p53 dans le tissu adipeux a nettement amélioré les changements de type sénescence, diminué l'expression de cytokines pro-inflammatoires et amélioré la résistance à l'insuline chez les souris atteintes d'une maladie semblable au diabète de type 2. À l'inverse, la régulation à la hausse de p53 dans le tissu adipeux a provoqué une réponse inflammatoire qui a conduit à une résistance à l'insuline [259]. Une autre étude a mis en avant que l'activation de la voie p53 dans le TA était un événement précoce lors du développement de l'obésité chez le rongeur et suggère que les dommages à l'ADN dus à l'augmentation des ROS pourraient être à l'origine de la stabilisation de p53 [260]. p53 semble aussi avoir une influence sur les cellules stromales-vasculaires du tissu adipeux. Une recherche montre que l'activité de p53 dans les pré-adipocytes provoque leur sénescence en réponse à une concentration élevée d'acides gras estérifiés [261]. Les pré-adipocytes, lorsqu'ils deviennent sénescents, produisent des cytokines pro-inflammatoires [262]. L'activation de p53 dans le pré-adipocyte, en induisant sa sénescence, peut engendrer une inflammation du tissu adipeux [262].

Dans l'ensemble, ces études et d'autres soulignent l'importance de p19ARF dans la sénescence cellulaire et la suppression de la tumorigenèse chez la souris, principalement par son rôle dans l'activation du suppresseur de tumeur p53.

F. *Cdkn2a* : Rôles dans la différenciation cellulaire

La protéine p16 joue un rôle crucial dans le contrôle de la différenciation cellulaire, et ses fonctions s'étendent à plusieurs processus de différenciation. Tout d'abord, p16 intervient dans la différenciation des cellules érythroïdes [263] et des myocytes [264]. Son expression est impliquée dans le déroulement de la différenciation des cellules érythroïdes et participe également à la différenciation des myocytes en inhibant l'apoptose, le processus de mort



cellulaire programmée [263,264]. De plus, p16 est essentielle pour le maintien des cellules souches de l'épiderme. L'absence de p16 permet à ces cellules de conserver leur caractère de cellules souches, tandis que son activation est nécessaire pour leur différenciation terminale en kératinocytes, les cellules constituant la couche supérieure de l'épiderme [265]. Dans le contexte de la chondrogenèse, on observe une augmentation de l'expression de p16 [266]. La surexpression de p16 dans des chondrocytes stimule leur différenciation, suggérant ainsi que cette protéine joue un rôle essentiel dans la formation des os [266]. De manière intéressante, la méthylation du locus *CDKN2A*, est fortement associée au développement de la masse osseuse [267].

D'autres études ont montré que p19ARF joue un rôle crucial dans la différenciation des cellules neurales, où son activation est nécessaire pour la formation de neurones et d'autres types de cellules du système nerveux central [268–270].

Ces différentes preuves suggèrent que *Cdkn2a* est un acteur clé dans la régulation de la différenciation cellulaire, et son implication dans divers processus de différenciation, notamment dans la formation des tissus osseux et épidermiques, ouvre la voie à de nouvelles pistes de recherche pour mieux comprendre son rôle dans le développement et la régénération des tissus.

G. *Cdkn2a* : Rôle de régulateur du métabolisme énergétique

En plus de son rôle clé de régulateur du cycle cellulaire, dans la prolifération cellulaire et le cancer, des fonctions métaboliques de *Cdkn2a* ont été identifiées dans les cellules β pancréatiques dans l'hépatocyte et dans le tissu adipeux [1].

Des études d'association à l'échelle du génome entier (GWAS) ont également mis en évidence des polymorphismes du locus *CDKN2A* associés au risque génétique de développer différentes maladies métaboliques, telles que le DT2 [274].

Il est clairement établi que le locus *CDKN2A* joue de nombreux rôles dans les fonctions métaboliques dans des conditions normales et pathologiques (Figure 22). Plusieurs études de perte ou de gain de fonction de *CDKN2A* ont montré que ce locus est impliqué dans l'homéostasie du glucose [275,276], les fonctions des cellules β (sécrétion d'insuline) et la masse (prolifération) [277–279], la gluconéogenèse [272], l'athérosclérose [280–283] et la stéatose hépatique [284]. Quelques études ont également lié le locus *INK4A/ARF* à la régulation du rythme circadien *via* la modulation de l'activité RAS [285], la neurogenèse [268], la transdifférenciation neuronale [269] et la régénération axonale [286,287]. Comme rapporté dans le TA [141], l'activité PKA semble être une cible clé de ce locus dans le foie et le pancréas.



Les souris déficientes en p16INK4a améliorent la production de glucose hépatique induite par le jeûne grâce à l'activation de la voie de signalisation PKA-CREB-PGC1 α par la phosphorylation de ses sous-unités régulatrices (PKAR2) indépendamment des changements dans les niveaux intracellulaires d'AMPc [272]. L'inactivation de *CDKN2A* dans la lignée de cellules β entraîne une augmentation de la sécrétion d'insuline accompagnée d'une activité élevée de la PKA [276]. L'athérosclérose prématurée dans le DT2 est associée à une altération de l'homéostasie des cellules immunitaires (c'est-à-dire un état pro-inflammatoire associé au sous-type de cellule T), à une diminution de l'expression de p16INK4a et d'ANRIL et à une augmentation des taux de CDK4. Le traitement avec des médicaments entraînant une inhibition de CDK4 *via* des médicaments mimétiques de p16INK4a est actuellement considéré comme retardant l'athérosclérose [288,289]. Ogradnik et al. ont démontré que l'élimination des cellules sénescentes hépatiques *via* le ciblage du régulateur de sénescence p16INK4A peut être une nouvelle stratégie thérapeutique pour réduire la stéatose hépatique [284].

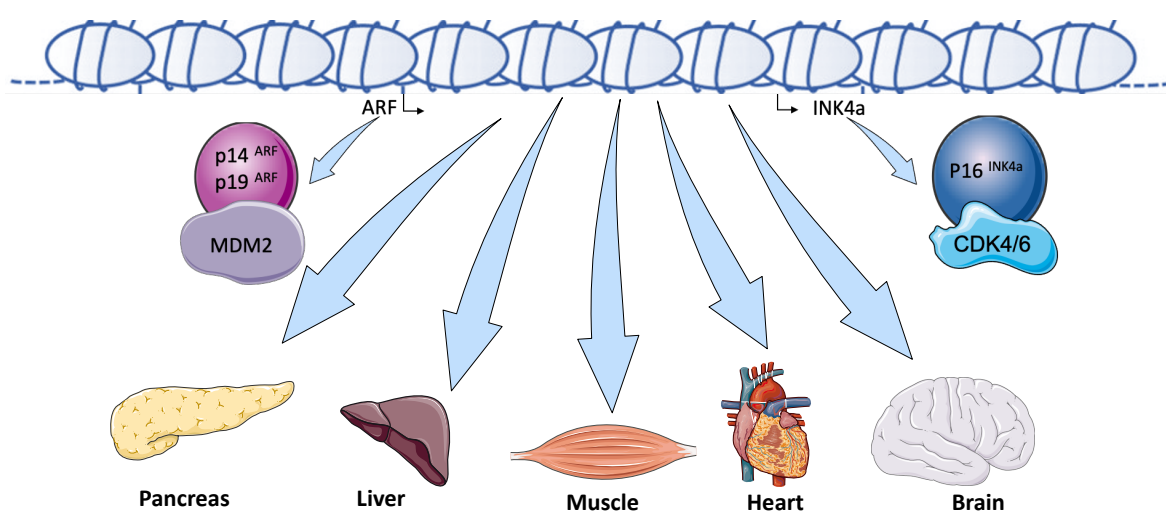


Figure 22. Le locus *Cdkn2a* : un acteur clé émergent des fonctions métaboliques. (Kahoul et al.,2020)

Dans le TA, plusieurs rôles du locus *Cdkn2a* ont été décrits dans la littérature avec notamment son implication dans la régulation de l'équilibre entre l'adipogenèse et la sénescence (Figure 23). En effet, la sénescence cellulaires est caractérisée par une expression élevée de p16^{ink4a}, or dans le modèle cellulaire 3T3-L1 il a été montré que la diminution de l'expression de p16^{ink4a} par siRNA conduisait à une augmentation de l'adipogenèse [290]. Son rôle dans le stockage des lipides sous forme de triglycérides et l'hypertrophie des adipocytes *via* la voie de signalisation de l'insuline a aussi été décrit (Figure 23). Il a été décrit comme un interrupteur moléculaire de la conversion des adipocytes blancs en beige et comme un déterminant clé du destin des adipocytes bruns, en plus des données

du laboratoire il a été montré que l'ablation inductible ou l'inhibition pharmacologique de p53 dans les adipocytes matures de souris restaure le brunissement induit par le froid et augmente la dépense énergétique et la sensibilité à l'insuline (Figure 23) [141,291]. Il est également impliqué dans le basculement entre le phénotype des macrophages et donc l'inflammation liée à l'obésité (Figure 23). En effet, l'extinction de p16^{ink4a} contribue à la polarisation des macrophages associés au TA en induisant un passage des macrophages M1 vers M2 [292].

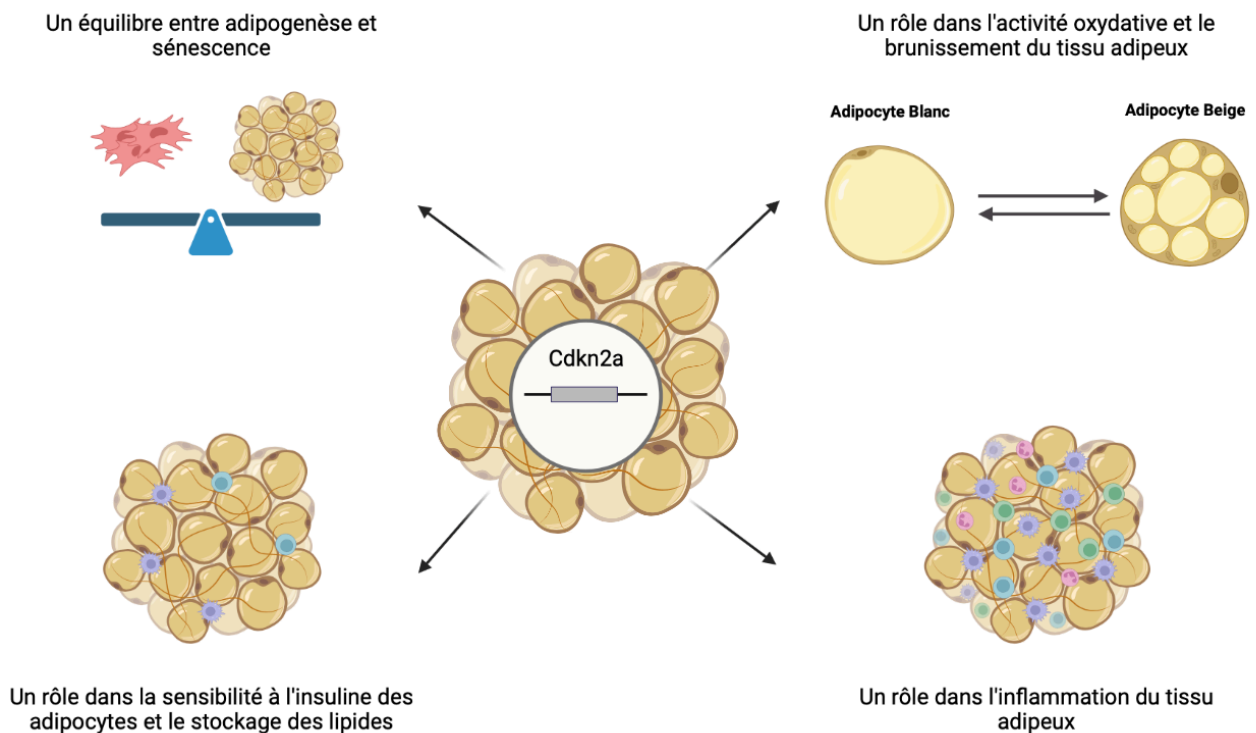


Figure 23. Rôles de *Cdkn2a* dans le TA

Une revue détaillée concernant le rôle de *Cdkn2a* dans le TA est disponible en annexe [273].

Objectifs de la thèse

Compte tenu de l'implication des polymorphismes du locus *CDKN2A* dans le développement de maladies métaboliques tel que le DT2, la mise en évidence du rôle de *Cdkn2a* dans la régulation de l'homéostasie énergétique prend toute son importance.

I. Première partie : modèle murin

En effet, des données du laboratoire publiées ont montré que la délétion globale de *Cdkn2a* protège les souris contre l'obésité induite par un régime riche en graisses en induisant un brunissement du TAB inguinal [141]. Afin de déterminer si ces modifications métaboliques sont liées à un effet direct de la délétion de *Cdkn2a* dans l'adipocyte mature, mes travaux de thèse poursuivent deux objectifs principaux :

1. Établir si le brunissement observé dans la délétion globale de *Cdkn2a* est dû à un phénomène de transdifférenciation de l'adipocyte mature.
2. Déchiffrer les mécanismes métaboliques et voies de signalisations contrôlées par *Cdkn2a* dans l'adipocyte mature.

II. Deuxième partie : hiPSC-BAP

De plus, des données additionnelles du laboratoire ont montré que les niveaux d'expression d'UCP1 sont augmentés dans les cellules souches pluripotentes induites humaines de type brun (hiPSC-BAPs) différenciées délétées en *CDKN2A*. Ces cellules ont le potentiel de se différencier en n'importe quel type de cellule, ce qui en fait un outil pertinent à des fins thérapeutiques telles que les thérapies cellulaires. Cependant, le faible potentiel de différenciation des adipocytes brun/beige dans les cultures 2D représente une forte limitation pour une utilisation clinique. Ces données suggèrent que la modulation de l'expression de *CDKN2A* dans les hiPSC-BAPs pourrait présenter des effets métaboliques de potentialisation de brunissement et donc pourrait représenter un modèle pertinent dans le traitement de l'obésité et ses comorbidités.

Dans le but de déchiffrer la signature moléculaire induite par la délétion de *CDKN2A* lors de la différenciation adipogénique dans les hiPSC-BAPs en culture 3D, nous avons dans un premier temps étudié les voies de signalisations modulées par une approche transcriptomique globale, puis dans un second temps nous avons analysé le kinome de ces cellules.



Matériel et méthodes

I. Expérimentation animale

Les expériences sont réalisées sur des souris mâles de même portée, de génotype $Cdkn2a^{+/+}$ et $Cdkn2a^{ad-/-}$ de fond génétique C57Bl/6J âgées de 5 à 7 mois. Les animaux sont hébergés dans des cages par 5 animaux dans une animalerie où le rythme circadien est réglé sur une alternance de phases de luminosité de 12h et d'obscurité de 12h avec une température contrôlée de 23°C. Les expérimentations animales ont été approuvées par le comité d'éthique et le Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Secondaire et de la Recherche, et en accord avec les règles d'éthiques européennes (dossier Apafis#2915-2015113009231025 v4).

A. Génération des lignées transgéniques

Les souris $Cdkn2a^{ad-/-}$ ont été générées après croisement des souris AdipoQCre provenant de chez Jax Laboratory (souris exprimant la cre-recombinase sous le contrôle du promoteur de l'Adiponectine) avec des souris dont le gène *Cdkn2a* est flanqué de sites LoxP ($Cdkn2a^{fl/fl}$) provenant de chez EUCOMM. Ces souris sont hétérozygotes pour le transgène AdipoQCre et homozygotes pour *Cdkn2a*. Les souris Tomato ont été obtenues de Jax Laboratory, et possèdent le gène codant la tomato, dont l'expression est bloquée par une cassette stop flanquée de sites LoxP. Ces souris ont été croisées avec les souris AdipoQCre. Les génotypes d'intérêt ont été obtenus après génotypage par PCR.

B. Génotypage des lignées de souris

L'ADN des souris est extrait d'échantillons de queues digérés sous agitation à 55°C sur la nuit avec 100 µL de tampon de lyse Direct PCR (102-T, Viagen) supplémentés avec 1 µL de protéinase K (A4392, PanReac). La réaction est stoppée par une incubation à 85°C pendant 40 min. La PCR est réalisée avec 1 µL d'ADN, 10 µL de Hot Start Phire Green 2X (F126, Thermo Scientific) et les différents amorces (voir tableaux), la réaction est complétée avec de l'eau pure jusqu'à 20 µL.



Génotypage	Séquence (5' - 3')	Concentration	Volume par réaction
AdipoQCre	ACG GAC AGA AGC ATT TTC CA	20 μ M	0,3 μ L
	GGA TGT GCC ATG TGA GTC TG		
	CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT		
	GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C		
Cdkn2aFlox	TCGTGGTATCGTTATGCGCC	10 μ M	1 μ L
	AGAGTGGATGGGGATTTCAGG		
	CGGGAGCATAGACACACAGC		
Tomato	AAGGGAGCTGCAGTGGAGTA	20 μ M	0,3 μ L
	CCGAAAATCTGTGGGAAGTC		
	GGCATTAAAGCAGCGTATCC		
	CTGTTCTGTACGGCATGG		

Tableau 2. Liste des amorces de génotypage.

C. Régime alimentaire

Les régimes alimentaires Chow Diet (CD régime RM1, Special Diets Services), High Fat Diet (HFD, 60% d'acides gras, 30% de glucides et 10 % de protéines, Research Diet, D12492i) et l'eau sont disponibles *ad libitum*. Dans le but d'évaluer le développement de l'obésité des souris et du phénotype diabétique, une mesure du poids des animaux a été réalisée de façon hebdomadaire durant les 12 semaines de régime ainsi que des tests métaboliques une fois par mois avec au moins 1 semaine d'intervalle entre chaque expérimentation.

D. Test de tolérance à l'insuline (ITT)

Les souris sont mises à jeun pendant 5 heures. Une solution d'insuline (0,75U d'insuline/Kg de souris) est injectée par voie intra péritonéale. La glycémie des souris est mesurée sur une goutte de sang après incision sur la queue à l'aide d'un glucomètre (Accu-Check, Roche) à différents temps avant et 15, 30, 45, 60, 90 et 120 minutes après injection d'insuline.

E. Test de tolérance au glucose (IPGTT)

Afin de tester la capacité de nos souris à répondre correctement au glucose, les souris sont mises à jeun pendant 16 heures. Une solution de glucose (2g/Kg de souris) est injectée en intra péritonéale. Le glucose (G8769, Sigma) est préalablement dilué à 200 mg/mL dans du NaCl 0,09%. La glycémie de ces souris est mesurée sur une goutte de sang après incision



sur la queue à l'aide d'un glucomètre Accucheck Performa à différents temps avant et 15, 30, 45, 60, 90, 120 et 150 minutes après injection de glucose.

F. Dosage sanguin de l'insuline

Au cours de l'IPGTT, le sang provenant de la queue est prélevé avant et 30 minutes après injection du glucose, centrifugé 20 minutes à 4500 rpm à 4°C pour récupérer le sérum. Le sérum est conservé à -80°C jusqu'à utilisation pour doser la sécrétion d'insuline par ELISA (Mouse Insulin Kit Mercodia) est utilisé pour doser l'insuline sur 10 µl de sérum selon le protocole du fabricant.

G. Calorimétrie indirecte.

Les expériences réalisées avec les cages métaboliques ont été effectuées au sein de l'animalerie EOPS du pôle recherche de la Faculté de Médecine de Lille. Les souris *Cdkn2a*^{ad-/-} et *Cdkn2a*^{ad+/+} ont eu un temps d'acclimatation de 2 jours dans des cages TSE Systems Phenomaster. La calorimétrie indirecte a été déterminée sur une période de 5 jours, durant lesquels toutes les 15 minutes les données suivantes ont été enregistrées : consommation d'eau, de nourriture, d'activité ambulatoire (axes X et Z) et échange gazeux (O₂ et CO₂). Les animaux ont été pesés avant et après l'expérience. Les dépenses en vO₂, vCO₂ et énergie ont été calculées conformément aux directives du fabricant (logiciel PhenoMaster, TSE Systems). Le taux d'échange respiratoire (RER) a été estimé en calculant le rapport vCO₂ / vO₂. Les valeurs ont été ajustées en fonction du poids corporel à la puissance de 0,75 (kg - 0,75). La dépense énergétique a été analysée après normalisation en fonction du poids corporel. De plus, l'ingestion de nourriture et d'eau ont été déterminés en continu à l'aide de capteurs de pesage fixés au sommet de la cage, à partir desquels les récipients pour aliments et l'eau avaient été suspendus dans l'environnement de la cage métabolique.

H. Sacrifice et prélèvement des organes

Après les 12 semaines de régime ainsi que la réalisation de l'ensemble des tests métaboliques, les animaux ont été sacrifiés. Avant le sacrifice les animaux sont pesés puis mis à jeun sur la nuit. Avant le début du sacrifice le poids, la glycémie et les corps cétoniques des animaux sont mesurés. Les animaux sont anesthésiés par l'injection d'une solution de kétamine (100mg/kg de poids corporelle) /xylazine (10mg/kg de poids corporelle) afin de

permettre de récupérer le sang en intra cardiaque pour le dosage des adipokines. Immédiatement après le sacrifice, les différents tissus : iWAT, eWAT, pancréas, foie, cœur, muscle gastrocnémien et BAT ont été prélevés. Chaque tissu a été en partie fixé dans de la PAF (4%) pour une analyse histologique et en partie congelé dans de l'azote liquide et conservé à -80°C.

I. Immunohistochimie

Les tissus prélevés sur des souris sont fixés dans une solution de paraformaldéhyde (PAF) à 4%. Une déshydratation des tissus est ensuite réalisée dans un bain d'éthanol à 70% puis les tissus sont envoyés au service d'histologie de la Faculté de Médecine de Lille pour être inclus en bloc de paraffine. Les blocs sont ensuite coupés en sections de 5 µm qui sont déposées sur des lames Superfrost. Pour la quantification de la taille et du nombre d'adipocytes, une coloration à l'hématoxyline et l'éosine (H&E) a été réalisée après déparaffinage des lames. Après déshydratation et montage des lamelles, les lames sont observées au microscope optique automatisé (Zeiss Axio scan. Z1) et les images sont analysées à l'aide du logiciel ImageJ64® à l'aide d'une macro ImageJ développée en collaboration avec le plateau d'imagerie cellulaire du pôle recherche de la Faculté de Médecine de Lille (BICeL), permettant la quantification automatique du nombre et de la taille des adipocytes.

J. Extraction ARN et RT-qPCR

Les tissus adipeux ont été disséqués immédiatement après le sacrifice des souris et rapidement transférés dans l'azote liquide. Les ARNs issus des tissus de souris sont extraits grâce aux colonnes RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen) selon les recommandations du fabricant puis dosés au Nanophotometer®. Pour la rétro-transcription (RT), 500 ng d'ARN sont utilisés avec un mélange composé de Transcriptor Universal Reaction buffer et Transcriptor Universal Reverse Transcriptase (Roche). Les échantillons sont ensuite incubés selon les recommandations du fabricant : 5 minutes à 25°C, 10 minutes à 55°C et 5 minutes à 55°C. Concernant la réaction de PCR quantitative (qPCR), un mélange composé de 0,5 µL d'amorces sens et antisens ciblant les gènes d'intérêt (Tableau 1) d'une concentration de 10µM, 7,5 µL de SYBmix 2X (Roche), 2 µL d'H₂O et 5 µL d'ADNc dilué au 1/10^{ème} est préparé. L'expression relative des ARNm des gènes d'intérêt est calculée par la méthode du delta-delta Ct (« cycle threshold »), en comparant le cycle seuil du gène d'intérêt à celui du gène de

ménage qui est ici la cyclophiline. Les Ct sont obtenus sur un appareil Roche LightCycler® 480 II.

Nom de la séquence	Séquence sens	Séquence anti-sens
P16	TTGGCCCAAGAGCGGGGACA	GCGGGCTGAGCCGGATTTA
P19	GAGCATGGGTCGCAGTTCTTGG	GCTACGTGAACGTTGCCCATCA

Tableau 3. Liste des amorces sens et antisens utilisées pour q-PCR.

K. Séquençage à haut débit de l'ARNm des différents dépôts de tissu adipeux

Afin de réaliser le séquençage, la qualité des ARN a été vérifiée à l'aide des nanopuces « RNA 6000 nanochips » et du BioAnalyzer 2100 de chez Agilent. Seul les ARN avec une qualité suffisante, c'est à dire avec un RIN « RNA integrity Number » supérieur ou égal à 8 ont été utilisés pour les bibliothèques (TruSeq stranded mRNA Library Preparation Kit, Illumina) et le séquençage (HiSeq2500, Illumina).

Une moyenne de 54 millions de « Reads » de 75 paires de bases a été générée pour chaque échantillon. Après validation de la qualité des séquences, les « reads » ont été alignés sur le génome de référence de la souris (mm10) à l'aide de TopHat2. La quantification et l'annotation des « reads » ont été réalisées à l'aide de « Bioconductor Rsubread ». Les analyses d'expression génique différentielle ont été réalisées à l'aide du logiciel Bioconductor DESeq2.

II. Culture cellulaire

A. Modèle cellulaire murin de préadipocytes: 3T3-L1

1. *Différenciation des cellules 3T3-L1*

Les cellules 3T3-L1 sont cultivées dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) contenant 4,5 g/l de glucose, supplémenté avec de la L-glutamine, 10% de sérum de veau fœtal et 1% de pénicilline–streptomycine à 37 °C dans une atmosphère humidifiée avec 5 % de CO₂. Elles sontensemencées dans une plaque 12 puits à une densité de 40 000

cellules/puits, après 48h elles sont cultivées avec un cocktail pro-adipogénique contenant 0,5 mM d'isobutylméthylxanthine, 1µM de dexaméthasone et 10 µg/ml d'insuline. Au bout de 48h, les cellules sont traitées avec le milieu supplémenté avec 10 µg/ml d'insuline, le milieu supplémenté avec 10 µg/ml d'insuline est changé tous les 2 jours jusqu'à D8.

2. *Traitement palmitate*

Les cellules 3T3-L1 après différenciation jusqu'à D8 ont été incubées avec 3mM de palmitate pendant 48h. A la fin du traitement les cellules ont été stimulées avec +/- d'insuline à 100nM pendant 20min à 37°C. Les cellules sont ensuite lysées pour procéder à l'extraction d'ARN et de protéines.

3. *Coloration à l'huile rouge : Oil red O*

Afin d'étudier l'accumulation de lipides intracellulaires, les cellules 3T3-L1 différenciées en adipocytes sont colorées à l'huile rouge. Les cellules sont rincées 2 fois au PBS 1x, puis fixées dans 4% de PFA pendant 1h à température ambiante. Après 2 lavages à l'eau ultra pure les cellules sont incubées pendant 5 minutes avec 60% d'isopropanol. Les cellules sont ensuite incubées avec une solution d'Oil Red O (6 volumes d'Oil Red O pour 4 volumes d'eau ultra pure) (Sigma Aldrich), pendant 30 minutes. Trois lavages à l'eau sont réalisés avant observation au microscope optique inversé. La quantification de la coloration à l'huile rouge se fait par l'ajout de 250 µl (plaque 24 puits) -500(plaque 12 puits) d'isopropanol 100% pendant 10 minutes sous agitation à température ambiante, avant de lire l'absorbance au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 500nm.

4. *Transfection de siRNA*

Les expériences de siRNA sont réalisées à D4. Avant la transfection, les antibiotiques sont éliminés par deux rinçages au PBS 1x. Les cellules sont ensuite transfectées avec des siRNA contrôles ou dirigés contre *Cdkn2a* (Dharmacon, Smartpool ON-TARGETplus siRNA, Horizon Discovery) à une concentration de 25 nM à l'aide du DharmaFECT1 transfection reagent (Dharmacon T-2001, Horizon Discovery) dans un milieu 3T3-L1 complet supplémenté avec de l'insuline sans antibiotiques selon les instructions du fabricant. 48H après la transfection les cellules sont rincées deux fois avec du PBS 1x et remis dans du milieu complet avec insuline jusqu'à D8.

5. *Extraction ARN et RT-qPCR*

L'ARN total est extrait des cellules en utilisant le kit Nucleospin RNA (740955, Macherey Nagel) selon les instructions du fabricant. L'ARN est rétrotranscrit avec les réactifs du kit SuperScript III (18080044, Invitrogen), des hexamères aléatoires (10609275, Invitrogen) et des dNTP (10520651, Thermo scientific). Plus précisément, 500 ng d'ARN sont dans un premier temps utilisé avec un mix composé d'héxanucléotides Pdn6 et d'un mix de dNTP à la concentration de 10mM (Invitrogen), les échantillons sont incubés 5 minutes à 65°C. Dans un second temps, un mélange composé de First stand buffer 5X, H2O, DTT 0,1M et Super script III (18080044, Invitrogen) est ajouté. Les échantillons sont ensuite incubés 5 minutes à 25°C, puis 60 minutes à 50°C et 15 minutes à 70°C selon les recommandations du fabricant. L'expression de l'ARNm est quantifiée par qPCR en temps réel à l'aide d'oligonucléotides spécifiques des gènes d'intérêts et le FastStart SYBR Green Master Mix (4913914001, Roche). Les résultats sont normalisés par l'expression de l'ARNm de la cyclophiline murine.

6. *Extraction protéines et dosage*

Les adipocytes 3T3-L1 ont été lysés dans un tampon M-PER (78503, Thermo fisher scientific) avec un cocktail d'inhibiteurs de protéase (78437, Thermo fisher scientific) et de phosphatase. (78428, Thermo fisher scientific). Après incubation pendant 20 minutes à 4°C, le lysat cellulaire est centrifugé à 4500 RPM pendant 20 minutes à 4°C, puis aliquoté avec 15µl dans différents tubes afin d'éviter les cycles de congélation et décongélation pouvant modifier l'activité des kinases et placés à -80°C. Les protéines sont quantifiées à l'aide du kit de dosage de protéines BCA « Pierce BCA protein assay » (Thermofischer, A53225).

7. *Western blot*

Trente µg de protéines totales sont déposés sur un Gel de SDS (Dodecylsulfate de sodium) (Biorad) et migrent à un voltage constant de 110V. Après migration, le transfert sur membrane de nitrocellulose s'effectue pendant 1h à 110V. Le blocage des sites non-spécifiques s'effectue à l'aide d'une solution de Tris-buffered saline (TBS)-Tween 0,05% supplémenté avec 5% de BSA (Bovine serum albumin) pendant 1h. Les membranes sont ensuite incubées à 4°C pendant la nuit avec les anticorps primaires dans du TBS-Tween 0,05% supplémenté avec 5% de BSA (Bovine serum albumin). Après 16 heures, les

membranes sont lavées 3 fois 7 minutes dans une solution de TBS Tween 0,05%, puis incubées pendant 1h avec les anticorps secondaires couplés à la Horseradish peroxidase (HRP) dilués dans une solution de TBS-Tween 0,05% supplémenté avec 5% BSA. Après 1h, les membranes sont à nouveau lavées 3 fois 7 minutes avec une solution de TBS-Tween 0,05%. La révélation des bandes lumineuses est réalisée à l'aide du kit « Pierce ECL Western blotting substrate » ou « Supersignal West DURA extended duration substrate » (ThermoFischer) à l'aide du Chemidox Xrs+ (Biorad). L'intensité du signal des bandes observées est mesurée à l'aide du logiciel ImageJ.

8. Pamgene

Les kinases sont une famille de protéines jouant un rôle essentiel dans la transduction du signal qui sous-tend de nombreux processus cellulaires. Le test de kinase fonctionnelle de PamGene est basé sur la détection l'activité de la protéine kinase directement dans les lysats cellulaires et tissulaires, en mesurant la phosphorylation des peptides par les protéines kinases.

La technologie de PamGene utilise des puces et des réactifs à base de phosphotyrosine kinase (PTK) ou de sérine-thréonine kinase (STK). La PamChip contient 4 puces peptidiques identiques, chaque puce contenant 144 (STK) ou 196 (PTK) séquences peptidiques de 13 acides aminés. Les peptides hébergent des sites de phosphorylation dérivés de la littérature ou des prédictions informatiques et sont corrélés avec une ou plusieurs kinases en amont. Des anticorps anti-phospho marqués par fluorescence sont utilisés pour détecter l'activité de phosphorylation des kinases présentes dans l'échantillon. L'échantillon composé de protéines et d'anticorps marqués est distribué sur la PamChip, qui est placée dans la PamStation. Une fois à l'intérieur de l'instrument, l'échantillon est incubé à une température prédéterminée. Pendant l'incubation, l'échantillon est pompé dans les deux sens à travers le matériau poreux pour maximiser la cinétique de liaison et minimiser le temps de dosage. Les temps de réaction sont généralement de quelques minutes à une heure. Lors du mouillage, le matériau de surface des puces à ADN PamChip devient translucide, facilitant l'imagerie à l'aide d'un système d'imagerie à LED. La ou les kinases présentes dans l'échantillon phosphorylent activement les substrats sur la PamChip, en présence d'ATP. Un anticorps PY20 conjugué au FITC, présent dans le mélange réactionnel, est utilisé pour détecter la Tyr phosphorylée afin de quantifier le signal de phosphorylation. Des images sont prises toutes les 5 minutes pour générer des données cinétiques en temps réel. Un mélange d'anticorps est utilisé pour détecter le Ser/Thr phosphorylé, et un 2e anticorps conjugué au FITC est utilisé dans un

mélange de détection pour quantifier le signal de phosphorylation. L'analyse des données s'effectue *via* le logiciel BioNavigator fourni par PamGene.

9. *Glucose uptake (sigma MAK083)*

Les préadipocytes 3T3-L1 ont étéensemencés à 1500 cellules/puits dans une plaque 96 puits, les cellules ont été différenciées comme décrit ci-dessus et une partie a été traitées avec du palmitate pendant 48 h. Les cellules sont lavées 2x avec du PBS 1x, puis sont laissée durant la nuit dans du milieu 3T3L-1 sans sérum. Les cellules sont ensuite lavées 3x avec du PBS 1x, puis en « starvation » pendant 40 min avec 100µl de KRPH (20mM HEPES, 5mM KH₂PO₄, 1mM MgSO₄, 1mM CaCl₂, 136mM NaCl, 4,7 mM KCl et ph 7,4) buffer avec 2% de BSA. Les cellules sont ensuite stimulées avec 1µM d'insuline pendant 20min, suivi d'une stimulation de 10mM de 2-DG6P pendant 20 min. Les cellules sont ensuite lavées 3x avec du PBS 1x et lyser avec 80µl d'extraction buffer et congeler/décongeler grâce à un bain d'éthanol et de neige carbonique. Les échantillons sont chauffés à 85°C pendant 40 min puis refroidit sur glace pendant 5 minutes. La réaction est neutralisé par l'ajout de 10µl de tampon de neutralisation, afin d'enlever le matériel insoluble les échantillons sont rapidement centrifugés a 13000g.

10. *Mesure des taux de consommation d'oxygène (OCR) et d'acidification extracellulaire (ECAR) par Seahorse*

Les préadipocytes 3T3-L1 ont étéensemencés à 50 000 cellules/puits dans une microplaque XFe24 recouverte de 2 % de gélatine, les cellules ont été différenciées comme décrit ci-dessus et traitées avec du palmitate pendant 48 h. Les cellules ont été lavées deux fois et le milieu a été remplacé par du milieu XF Assay contenant 4,5 g/L de glucose, 4,0 mM de glutamine et 1,0 mM de pyruvate de sodium (ajuster le pH à 7,35 ± 0,05 en utilisant 1 mol/L de NaOH). Les plaques ont été placées dans un incubateur à 37°C sans CO₂ pendant une heure avant le dosage. Les mesures OCR et ECAR ont été effectuées à l'aide de l'analyseur Seahorse Biosciences XFe. Toutes les expériences ont été réalisées à 37°C. Après la mesure de la respiration basale, glucose (20mM) l'oligomycine (1,0 µM), le FCCP (1,0 µM), la roténone/antimycine A (0,5 µM/0,5 µM) ont été ajoutés séquentiellement pour mesurer la production d'ATP, la respiration maximale et la respiration non mitochondriale (RMN), respectivement. Le taux d'acidification extracellulaire a été déterminé en surveillant la fonction

glycolytique et exprimé en mpH/min. Ces paramètres respiratoires de la fonction mitochondriale ont été calculés comme décrit par le fournisseur.

B. Modèle cellulaire humain : hiPSC-BAP

Les hiPSC-BAP, dérivés de la lignée hiPSC NOK6 comme décrit précédemment [293] ont été cultivés dans des conditions de culture tissulaire standard à 37 ° C avec 5% de CO₂. Le milieu de croissance est du DMEM à faible teneur en glucose additionné de L-glutamine (2 mM), pénicilline-streptomycine 5 000 UI/ml-5 000 g/ml (Pen/Strep), 10 % de FBS et 2,5 ng/ml de FGF2.

1. Formation de sphéroïdes et différenciation en adiposères de type brun

Pour générer des sphéroïdes, une suspension de hiPSC-BAP à 0,5 ~ 1x 10⁶ cellules / ml a été préparée dans un milieu de croissance et 1 ml de la suspension cellulaire a étéensemencé dans un puits de 24 puits Ultra-Low Attachment (ULA) plaque (Corning 3473). La plaque a été maintenue pendant 3 jours pour générer des sphéroïdes. Ensuite, pour différencier les sphéroïdes, le milieu de croissance a été remplacé par un milieu de différenciation composé d'EBM-2 (Lonza) additionné de 0,1% FCS, IBMX (0,5 mM), dexaméthasone (0,25 µM), T3 (0,2 nM), insuline (170 nM), rosiglitazone (1 µM), SB431542 (5 µM) et cocktail EGM-2 (Lonza, CC-3121) comprenant de l'acide ascorbique, de l'hydrocortisone et de l'EGF. L'IBMX et la dexaméthasone ont été utilisés que pendant les 3 premiers jours de différenciation. SB431542 et EGF ont été retirés après les 9 premiers jours de différenciation. Les sphéroïdes ont été maintenus dans un milieu de différenciation jusqu'à 20 à 30 jours, le milieu étant changé une fois par semaine.

2. Transfection siRNA

Les hiPSC-BAP ont été cultivés dans des conditions de croissance normale jusqu'à ce qu'ils atteignent la confluence (généralement 37 °C et 5 % de CO₂). 5 x 10⁵ cellules ont été étalées par puits d'une plaque ULA 24 puits dans 400 µl d'EBM contenant 0,5 % de sérum et des antibiotiques. 750 ng d'ARNsi (Human *CDKN2A* siRNASmart pool, GEHealth Bio-Sciences, Rosersberg, Suède) ont été dilués dans 100 µl de milieu de transfection d'ARNsi contenant 60 % de DMEM à faible teneur en glucose, 40 % de MCDB-201, 1 × ITS,

dexaméthasone (10^{-9} M), acide ascorbique de sodium (100 mM) qui a donné une concentration finale en siARN de 100 nM. Six μ l de réactif de transfection HiPerFect (Qiagen, France) ont été ajoutés au siARN dilué et mélangés par pipetage. Les mélanges ont été incubés pendant 5 à 10 min à température ambiante (15 à 25 ° C) pour permettre la formation de complexes de transfection. Les complexes ont été ajoutés goutte à goutte sur les cellules. Les cellules et les complexes de transfection ont été soigneusement mélangés délicatement par pipetage. Les cellules ont ensuite été maintenues dans des conditions pour former des sphéroïdes et induites à se différencier comme décrit précédemment.

3. Extraction ARN et séquençage à haut débit de l'ARNm

L'ARN total a été extrait des hiPSC-BAPs 3D à J0 et J10 de différenciation à l'aide du réactif TRIzolTM (Sigma). La qualité des ARN a été vérifiée avec des nanopuces d'ARN 6000 sur le bioanalyseur agilent 2100. L'ARN purifié (200 ng) a été utilisé pour la préparation de la bibliothèque. En bref, les bibliothèques d'ARN ont été préparées à l'aide du kit de préparation de bibliothèque d'ARNm TruSeq Stranded (Illumina, San Diego, CA, États-Unis) en suivant les instructions du fabricant. Les bibliothèques ont été séquencées sur le système NextSeq (Illumina), en utilisant un protocole apparié 2x75 bp. Trois répétitions biologiques par condition ont été séquencées. Le numéro d'accès GEO pour les données de séquençage est GSE223241.

4. Extraction des protéines et PamGene

Les sphéroïdes à J0 et J10 ont été rincés avec du PBS et lysés dans un tampon d'arrêt contenant 50 mM d'Hepes, pH 7,2, 150 mM de NaCl, 10 mM d'EDTA, 10 mM de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 2 mM de Na_3VO_4 et 1% de Triton X-100 additionné de Protease Inhibitor Cocktail (Roche). L'activité des tyrosine (PTK) et sérine/thréonine kinases (STK) a été étudiée comme décrit dans le paragraphe 1.A.8.



III. Analyses bioinformatiques

A. RNA-seq

Pour le séquençage de l'ARN, le démultiplexage des données de séquence a été effectué à l'aide du logiciel de conversion bcl2fastq (Illumina ; bcl2fastq v2.19.1). Le découpage des séquences d'adaptateurs a été effectué à l'aide du logiciel cutadapt (version 1.7.1). Le contrôle de la qualité des lectures a été évalué à l'aide de FastQC (v0.11.5). Par la suite, les lectures de séquences des fichiers FASTQ ont été alignées sur le génome humain GRCh38, téléchargé depuis Ensembl 108. L'alignement a été effectué à l'aide de l'aligneur STAR (version 2.5.2b). Plus de 19 millions de lectures PE-reads de 75 paires de bases ont été générées par échantillon. Les décomptes normalisés des différents gènes et isoformes ont été effectués à l'aide de RSEM (v1.2.31) en utilisant un GTF d'Ensembl 108. Enfin, l'expression différentielle a été effectuée à l'aide de R version 3.6.3 et du package DESeq2 v1.24.0. Une valeur p ajustée $< 0,05$, $\text{Log}_2\text{FC} > 1$ et $\text{Log}_2\text{FC} < -1$ ont été définis comme seuil. Nous avons ensuite effectué une analyse des voies à l'aide de la fonction d'analyse de base de l'analyse Ingenuity Pathway (IPA) (Qiagen) et l'analyse de l'enrichissement de l'ensemble de gènes (GSEA) a été effectuée à l'aide de la version 4.3.2 du logiciel GSEA (GSEA ; <http://software.broadinstitute.org/gsea/>). Toutes les données GSEA présentées ont une valeur p $< 0,05$.

B. PamGene

La mesure des données PamGene, l'acquisition d'images et l'analyse des données ont été effectuées conformément aux instructions du fabricant. Les données et l'analyse des kinases en amont ont été réalisées à l'aide du logiciel Bionavigator v.6.3.67.0 développé par PamGene. Les peptides et les kinases avec une valeur p ajustée $< 0,05$, $\text{Log}_2\text{FC} > 1$ et $\text{Log}_2\text{FC} < -1$ ont été définis comme seuil.

IV. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant un test t de Student (avec la correction Mann Whitney), un test ANOVA bilatéral à l'aide du logiciel GraphPad Prism 9.0 en fonction des expérimentations. L'ensemble des données est présenté en moyenne \pm SEM (erreur type de la moyenne). Les différences sont considérées comme significatives pour une $p < 0,05$ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).



Partie I : étude de l'extinction de *Cdkn2a* dans
l'adipocyte mature dans un modèle de souris
 $Cdkn2a^{ad-/-}$

I. Validation du modèle d'étude

A. Modèle AdipoQCre Tomato

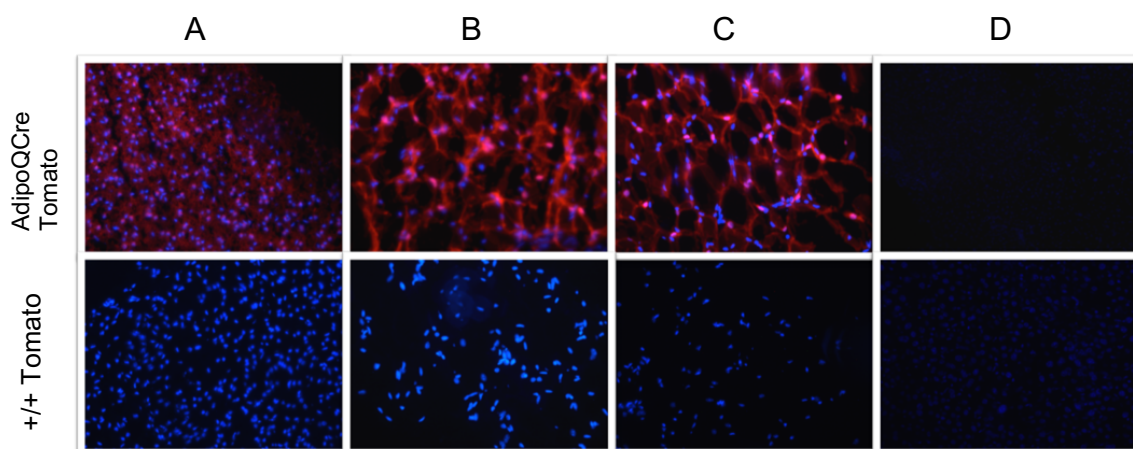


Figure 24. Validation du modèle AdipoQCre Tomato.

A : Immunofluorescence de coupes de BAT de souris AdipoQCre Tomato et +/+ Tomato sous CD, montrant les noyaux (DAPI, bleue) et la Tomato (rouge). B : Immunofluorescence de coupes d'eWAT de souris AdipoQCre Tomato et +/+ Tomato sous CD, montrant les noyaux (DAPI, bleue) et la Tomato (rouge). C : Immunofluorescence de coupes d'iWAT de souris AdipoQCre Tomato et +/+ Tomato sous CD, montrant les noyaux (DAPI, bleue) et la Tomato (rouge). D : Immunofluorescence de coupes de foie de souris AdipoQCre Tomato et +/+ Tomato sous CD, montrant les noyaux (DAPI, bleue) et la Tomato (rouge).

Dans un premier temps, afin de valider notre modèle de recombinaison homologue un modèle de souris AdipoQCre Tomato a été développé. Lorsque la Cre sous le contrôle du promoteur de l'adiponectine est exprimée on observe la fluorescence en rouge de l'adipocyte suite à l'activation de la cassette Tomato permettant ainsi de valider l'expression de la Cre recombinase dans notre modèle (Figure 24). Comme nous pouvons observer dans la figure ci-dessus (Figure 24), l'expression de la tomato est détectable dans nos 3 dépôts de tissus adipeux (de gauche à droite : BAT, eWAT iWAT) dans notre modèle AdipoQCre Tomato mais aucune fluorescence rouge n'est observée dans le foie qui constitue un contrôle négatif. De plus, nous constatons que dans notre modèle n'exprimant pas l'AdipoQCre, aucune recombinaison n'a eu lieu car nous n'observons pas de fluorescence rouge. Ces données nous permettent ainsi de valider notre modèle de recombinaison homologue et la spécificité de la Cre recombinase.

B. Diminution de l'expression de l'ARNm de p16 et p19

En plus de la validation de la recombinaison de la Cre recombinase, nous avons étudié le niveau d'expression de l'ARNm, grâce à la technique de RT-qPCR, des deux protéines codées par le gène *Cdkn2a* dans 3 dépôts de tissu adipeux (BAT, eWAT iWAT), le foie et le



muscle chez les animaux soumis à un régime riche en graisse (HFD). Ces deux protéines p16 et p19 ont une expression de leur ARNm réduite dans notre modèle de délétion génique *Cdkn2a*^{ad-/-} dans les 3 différents dépôts de tissu adipeux mais pas dans les autres tissus (Figure 25).

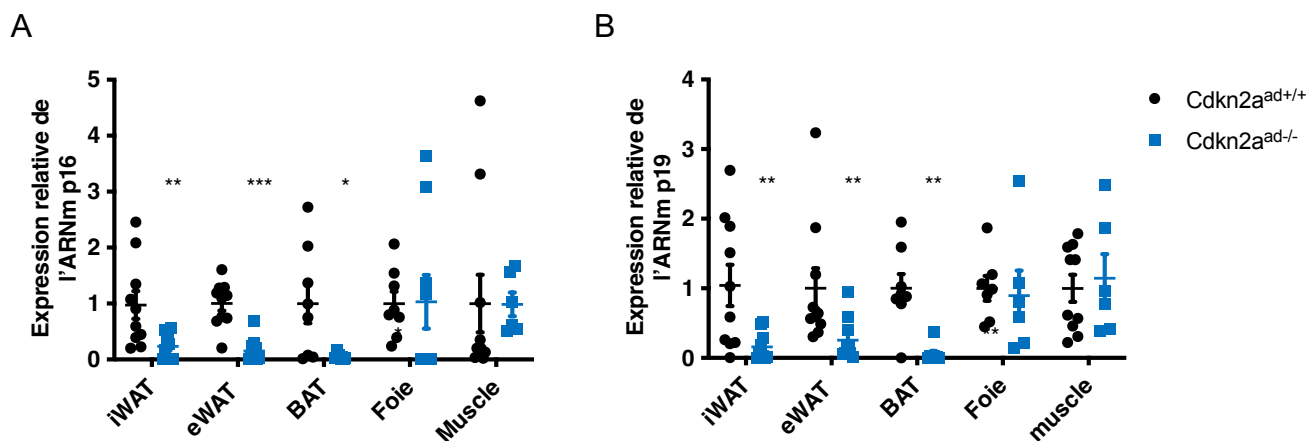


Figure 25. Diminution de l'expression de l'ARNm des deux protéines codées par *Cdkn2a*.

A : Expression ARNm de p16 dans l'iWAT, eWAT, BAT et foie des souris *Cdkn2a*^{ad-/-} et *Cdkn2a*^{+/+} sous régime HFD (n=10/groupes). B : Expression ARNm de p19 dans l'iWAT, eWAT, BAT et foie des souris *Cdkn2a*^{ad-/-} et *Cdkn2a*^{+/+} sous régime HFD (n=10/groupes). Les données sont exprimées sous formes de moyenne \pm SEM, *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001.

Ces données nous ont donc permis de valider la délétion spécifique de *Cdkn2a* au sein de l'adipocyte mature dans notre modèle *Cdkn2a*^{ad-/-}.

II. Caractérisation métabolique des animaux sous CD

Toutes les expériences *in vivo* de qPCR et d'étude histologique décrites dans la suite de ce manuscrit ont été réalisées en parallèle chez des souris en régime normal (CD). Ces souris ne présentant aucune variation métabolique (poids corporel, métabolisme glucidique, dépense énergétique, ...), nous avons décidé pour la suite de focaliser sur les souris sous régime riche en graisse (HFD).

III. Caractérisation métabolique des animaux sous HFD

Dans le but de développer une obésité engendrant le développement d'une insulino-résistance mimant le développement du DT2 chez l'Homme [294], nous avons utilisé un régime hyperlipidique hypercaloriques. Les souris contrôle (*Cdkn2a*^{+/+}) et délétées pour

Cdkn2a adipocytaire (*Cdkn2a*^{ad-/-}) âgés de 7-8 semaines ont été soumises à un régime riche en graisses (60%) durant 12 semaines. Pendant cette période aucune différence de prise de poids n'a été observée entre les animaux des deux groupes (Figure 26). En revanche une augmentation du poids au cours du temps sous régime est observée dans les deux groupes, avec un poids final à 12 semaines dépassant les 40g, montrant l'efficacité du HFD.

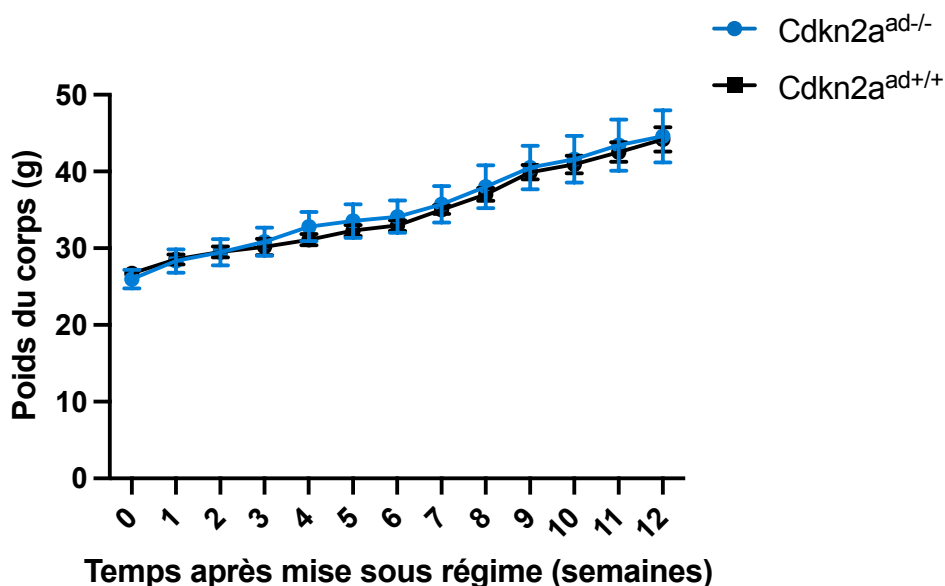


Figure 26. Évolution du poids chez les souris *Cdkn2a*^{ad+/+} et *Cdkn2a*^{ad-/-}.

Prise de poids des animaux sous régime riche en graisse (HFD) (n=10/groupes). Les données sont exprimées sous formes de moyenne ± SEM, *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001.

A. Amélioration de la tolérance au glucose chez les souris *Cdkn2a*^{ad-/-} après un régime HFD

Afin d'établir la capacité de l'animal à métaboliser le glucose, un test de tolérance au glucose a été réalisé dans nos deux groupes de souris contrôle (*Cdkn2a*^{ad+/+}) et délétées pour *Cdkn2a* adipocytaire (*Cdkn2a*^{ad-/-}) suite à un régime riche en graisses de 12 semaines (HFD). Les souris *Cdkn2a*^{ad-/-} présentent une glycémie significativement diminuée, à partir de 15 minutes et ce jusqu'à 1h après l'injection de glucose par voie intrapéritonéale, par rapport aux souris *Cdkn2a*^{ad+/+} (Figure 27). Nos souris *Cdkn2a*^{ad-/-} présentent une amélioration de leur tolérance au glucose sous HFD.



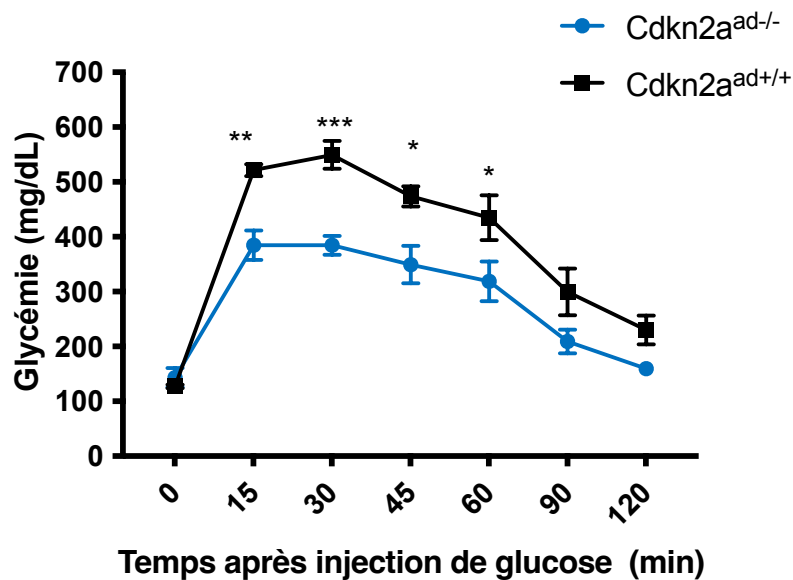


Figure 27. Amélioration de la tolérance au glucose chez les souris *Cdkn2a*^{ad/-} suite à un régime HFD.

Glycémie des souris *Cdkn2a*^{ad/-} et *Cdkn2a*^{ad+/+} sous régime HFD à différents temps (0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 et 150 min) après injection de glucose, exprimée en mg/dl (n=5/groupes). Les données sont exprimées sous formes de moyenne ± SEM, *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001.

B. Pas de modification de la sensibilité, ni de la sécrétion d'insuline

L'amélioration de la tolérance au glucose chez nos souris *Cdkn2a*^{ad/-} est corrélée à une absence d'augmentation du taux d'insuline circulante en réponse au glucose. En effet, nous avons testé l'insulinémie de nos souris *Cdkn2a*^{ad+/+} et *Cdkn2a*^{ad/-} avant et 30 minutes après injection de glucose (Figure 28). Malgré que nous observons une augmentation de l'insulinémie en réponse à un bolus de glucose (30 min) dans les animaux *Cdkn2a*^{ad+/+} et *Cdkn2a*^{ad/-}, aucune différence significative n'est observable entre nos animaux *Cdkn2a*^{ad+/+} et *Cdkn2a*^{ad/-} que ce soit avant (0min) ou après l'injection de glucose (30min)

Dans le but de déterminer si l'amélioration de la tolérance au glucose chez nos souris *Cdkn2a*^{ad/-}, corrélée à une absence de modification de la sécrétion d'insuline, est due à une modification de la sensibilité à l'insuline, nous avons donc réalisé un test de tolérance à l'insuline. Après injection de l'insuline, nous observons une réponse avec une diminution de la glycémie, cependant le même profil glycémique au cours du temps est observable chez nos souris contrôles et *Cdkn2a*^{ad/-} (Figure 28).

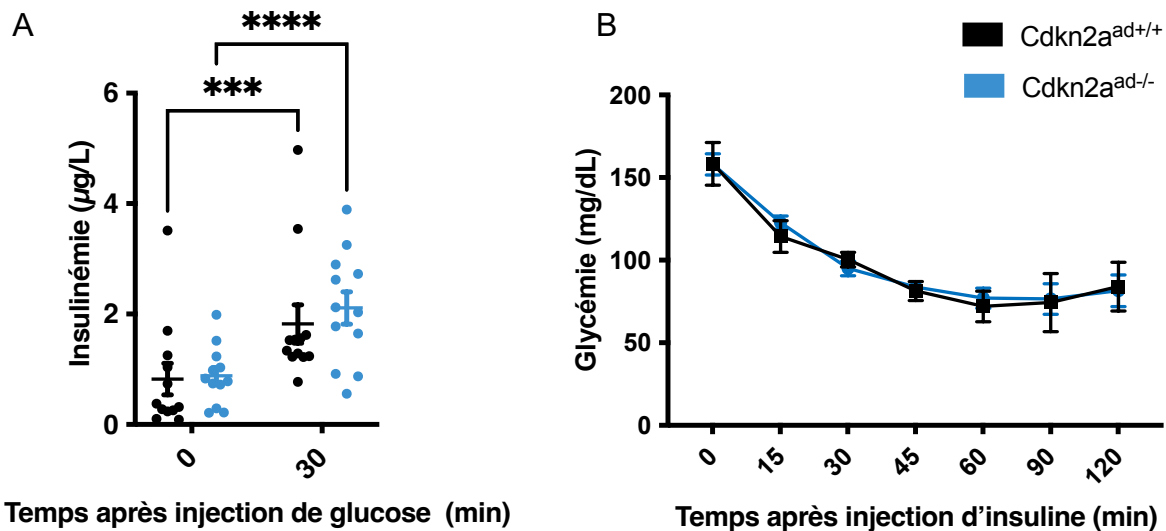


Figure 28. Les souris *Cdkn2a^{ad-/-}* ne présentent aucun changement de leur profil insulinémique.
 A : Taux d'insuline sanguin (µg/L) des souris *Cdkn2a^{ad-/-}* et *Cdkn2a^{ad+/+}* sous régime HFD avant injection de glucose (T0) et 30 minutes après injection de glucose (T30) (n=5/groupes). B : Glycémie des souris *Cdkn2a^{ad-/-}* et *Cdkn2a^{ad+/+}* sous régime HFD à différents temps ((0, 15, 30, 45, 60, 75, 90 et 120 min) après injection d'insuline, exprimée en mg/dl (n=5/groupes). Les données sont exprimées sous formes de moyenne ± SEM, *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001.

En conclusion l'amélioration de la tolérance au glucose chez nos animaux *Cdkn2a^{ad-/-}* n'est pas due à une modification de la sécrétion ni de la sensibilité à l'insuline. Donc l'absence de *Cdkn2a* dans l'adipocyte mature n'affecte pas les mécanismes modulant l'insuline au niveau globale.

Nous posons l'hypothèse que cette amélioration de la tolérance au glucose corrélée à une absence de modification de la sécrétion et de la sensibilité de l'insuline au niveau globale pourrait être due à une augmentation de la sensibilité de l'insuline au niveau adipocytaire spécifiquement (voir paragraphe analyse du transcriptome par RNA-seq).

C. Paramètres physiologiques et calorimétrie indirecte

Afin d'étudier si la délétion en *Cdkn2a* adipocytaire affecte le métabolisme énergétique, des analyses par calorimétrie indirecte ont été réalisées chez nos souris contrôles et souris *Cdkn2a^{ad-/-}*.

L'apport énergétique et la dépense énergétique, qui sont fortement influencés par des paramètres internes (activité locomotrice, ...) et externes (température ambiante, ...), ont été analysés à l'aide d'un système de calorimétrie indirect TSE System. Les conditions environnementales sont régulées et parfaitement contrôlées par des cages climatiques spécialement conçues. Cette méthode repose sur l'équivalence entre l'énergie consommée par l'organisme et celle convertie à partir de l'oxydation des nutriments. Il est donc possible d'utiliser la consommation globale d'oxygène comme témoin de la dépense énergétique. La

mesure des échanges gazeux respiratoires (consommation d'oxygène et production de gaz carbonique) peut être réalisée en cages métaboliques, dans des conditions où l'animal pourra reproduire ses activités quotidiennes.

Les études réalisées ont mis en évidence un certain nombre de différences entre le groupe contrôle et *Cdkn2a^{ad/-}*. Bien que aucune différence dans la prise alimentaire (Figure 29) ou le poids corporel ne soit observée entre les souris *Cdkn2a^{ad+/+}* et *Cdkn2a^{ad/-}*, on remarque une dépense énergétique significativement plus élevée chez les souris *Cdkn2a^{ad/-}* (Figure 29).

L'analyse du RER utilisée pour calculer les débits d'oxydation lipidique (RER =0,7) et glucidique (RER =1) est basée sur l'hypothèse que VO₂ et VCO₂ mesurées au niveau de la bouche reflète la consommation d'O₂ et la production de CO₂ au niveau des tissus. Ainsi, le RER mesuré au niveau de la bouche équivaldrait au RER cellulaire [295]. Enfin, le RER des souris *Cdkn2a^{ad/-}* présente une tendance à la diminution. En effet, le RER des souris *Cdkn2a^{ad/-}* présente une *pvalue* de 0,0559 en phase sombre ce qui semble indiquer une activité plus importante de l'oxydation lipidiques (Figure 29).

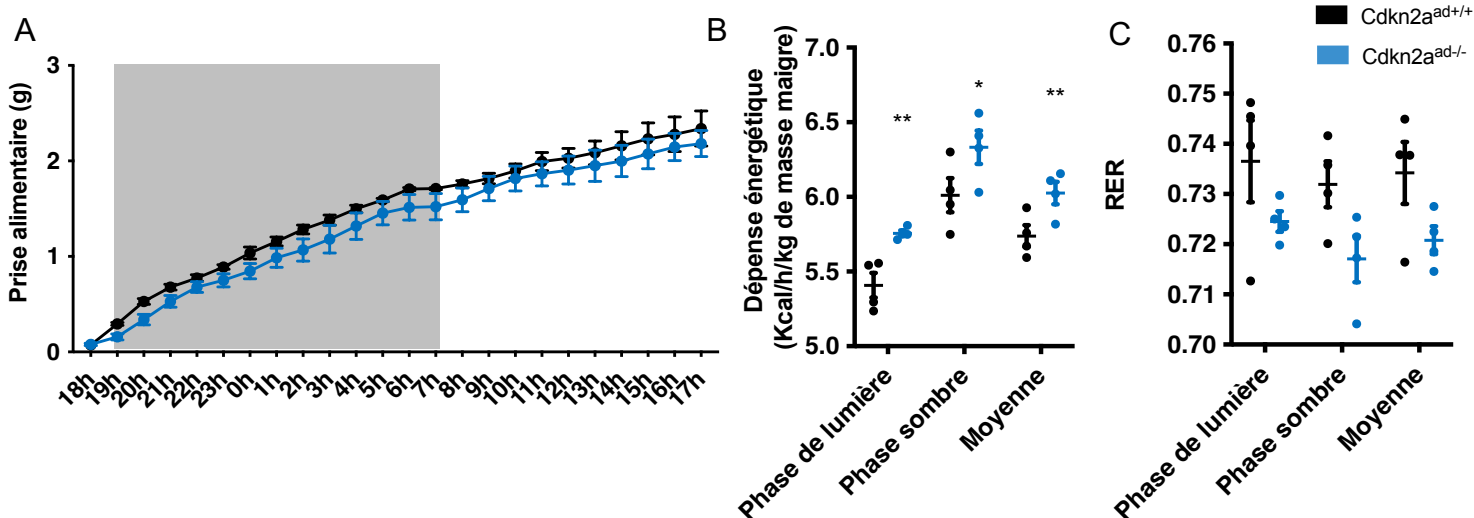


Figure 29. Les souris *Cdkn2a^{ad/-}* présentent une augmentation de la dépense énergétique.

A : Prise alimentaire des souris *Cdkn2a^{ad/-}* et *Cdkn2a^{ad+/+}* (n=4/groupes). B : Dépense énergétique des souris *Cdkn2a^{ad/-}* et *Cdkn2a^{ad+/+}* (n=4/groupes). C : Rapport d'échange respiratoire (RER) des souris *Cdkn2a^{ad/-}* et *Cdkn2a^{ad+/+}* (n=4/groupes). Les données sont exprimées sous formes de moyenne ± SEM, **p*<0,05 ; ***p*<0,01 ; ****p*<0,001.

Les souris *Cdkn2a^{ad/-}* sous HFD présentent donc une balance énergétique négative (Figure 29).

D. Conclusion

L'ensemble de ces données métaboliques permet de conclure que l'extinction de *Cdkn2a* dans l'adipocyte mature suite à un régime HFD affecte l'homéostasie énergétique, notamment par l'amélioration de la tolérance au glucose sans modification des paramètres insulinémiques. De plus, cette amélioration de la tolérance du glucose est corrélée à une balance énergétique négative qui n'affecte pas le poids corporel mais qui semble être corrélée à une augmentation de l'oxydation lipidique.

IV. Hypoléptinémie et hyporésistinémie des souris *Cdkn2a*^{ad-/-} suite à un régime HFD

Le tissu adipeux est un organe endocrine qui a un rôle majeur dans la régulation de la balance énergétique et les complications métaboliques. En effet, parmi les nombreuses substances sécrétées par le TA, on retrouve, entre autres les adipokines. Il est connu qu'en réponse à un régime HFD des modifications des sécrétions du TA sont observables et que celles-ci ont des conséquences significatives sur l'homéostasie glucidique. Nous avons donc réalisé l'analyse des profils plasmatiques des adipokines par la technologie Luminex®.

Nous avons pu observer une diminution des taux de leptine et de résistine chez les souris *Cdkn2a*^{ad-/-} sous HFD (Figure 30) sans modification des taux d'adiponectine (Figure 30) suggérant un profil métabolique amélioré.

Effectivement, la leptine est connue pour être une adipokine pro-inflammatoire qui est augmenté en corrélation avec la masse de TA et qui a pour conséquence de perturber l'homéostasie gluco-lipidique en inhibant les voies de réponse à l'insuline [296]. Concernant la résistine, les données de la littérature associent cette adipokine à la résistance à l'insuline et l'inflammation [297].

En conclusion, l'extinction de *Cdkn2a* dans l'adipocyte mature conduit à une amélioration des sécrétions du TA suite à un régime HFD, conduisant à un profil métabolique amélioré.

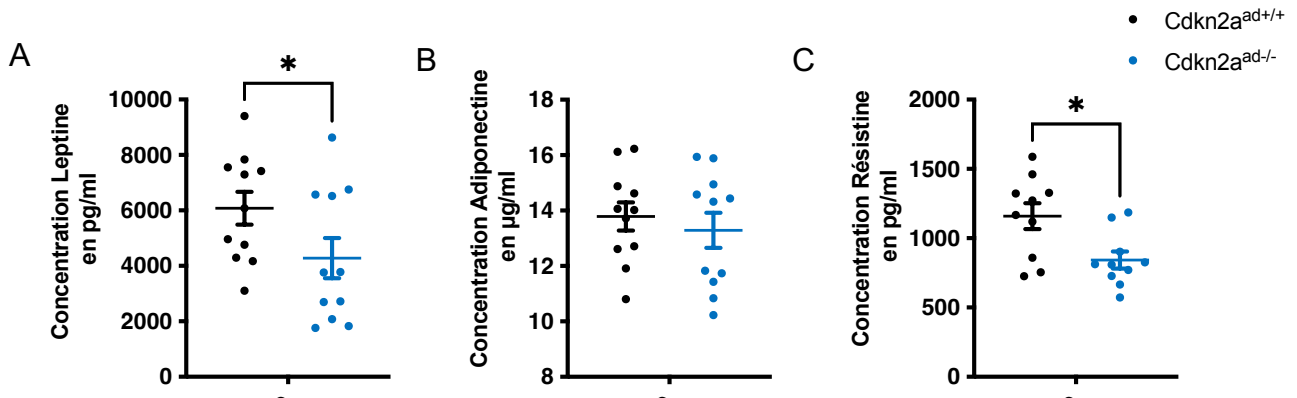


Figure 30. Les souris $Cdkn2a^{ad/-}$ présentent une hypoleptinémie et un taux réduit de résistine.

A : Taux circulant d'adiponectine des souris $Cdkn2a^{ad/-}$ et $Cdkn2a^{ad+/+}$ sous HFD (n=5/groupes). B : Taux circulant de leptine des souris $Cdkn2a^{ad/-}$ et $Cdkn2a^{ad+/+}$ sous HFD (n=5/groupes). C : Taux circulant de résistine des souris $Cdkn2a^{ad/-}$ et $Cdkn2a^{ad+/+}$ sous HFD (n=5/groupes). Les données sont exprimées sous formes de moyenne \pm SEM, $Cdkn2a^{ad/-}$ et $Cdkn2a^{ad+/+}$: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

V. Caractérisation histologique des dépôts de tissus adipeux suite à l'extinction de $Cdkn2a$ dans l'adipocyte mature et à un régime HFD.

A. Poids des tissus adipeux

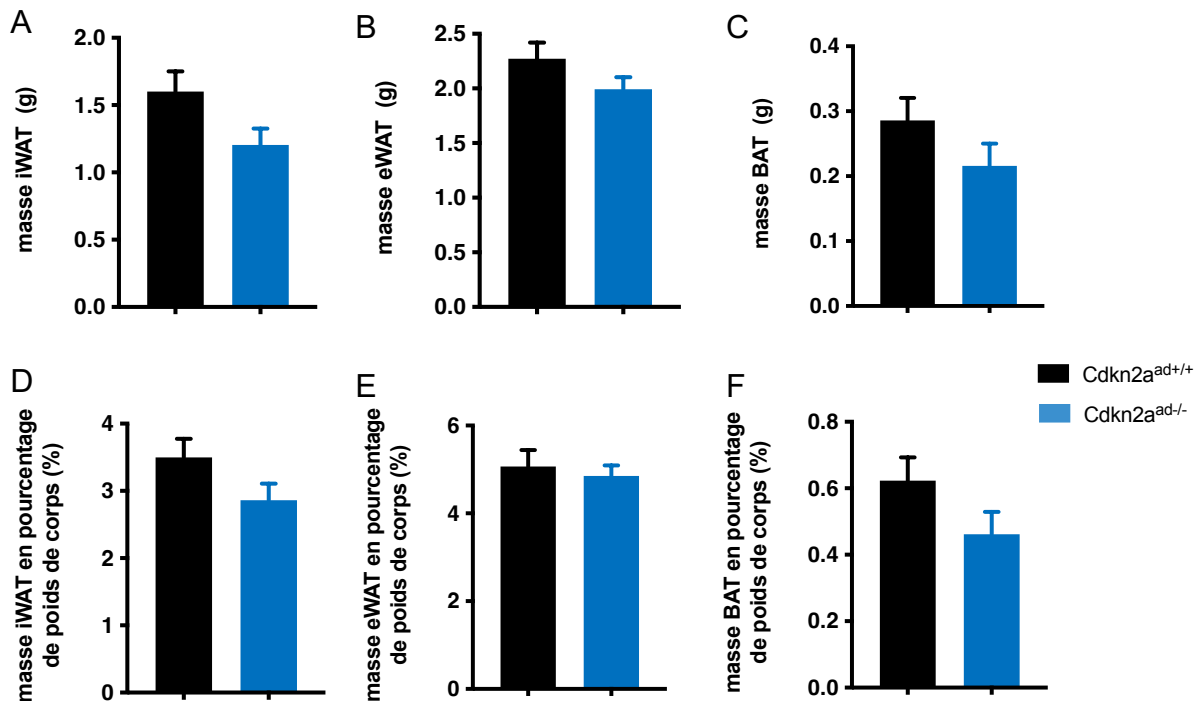


Figure 31. Masse des différents dépôts de tissus adipeux des souris $Cdkn2a^{ad/-}$ et $Cdkn2a^{ad+/+}$ à 12 semaines de HFD.

A : masse en gramme de l'iWAT (n=7/groupes). B : masse en gramme de l'eWAT (n=7/groupes). C : masse en gramme du BAT (n=7/groupes). D : masse en pourcentage de poids de corps de l'iWAT (n=7/groupes). E : masse en pourcentage de poids de corps de l'eWAT (n=7/groupes). F : masse en pourcentage de poids de corps du BAT (n=7/groupes). Les données sont exprimées sous formes de moyenne \pm SEM, $Cdkn2a^{ad/-}$ et $Cdkn2a^{ad+/+}$: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Lors du sacrifice des animaux, les tissus ont été pesés afin de déterminer leur masse. Comme le montre la figure 31, bien qu'une tendance à la diminution soit visible, aucune différence significative de masse de tissus adipeux entre les souris $Cdkn2a^{ad+/+}$ et $Cdkn2a^{ad-/-}$ n'est observée (Figure 31). Cette tendance à la diminution est cohérente avec l'hypoleptinémie observée chez ces animaux.

B. Hypertrophie de l'eWAT et hypoplasie de l'iWAT des souris $Cdkn2a^{ad-/-}$ suite à un régime HFD

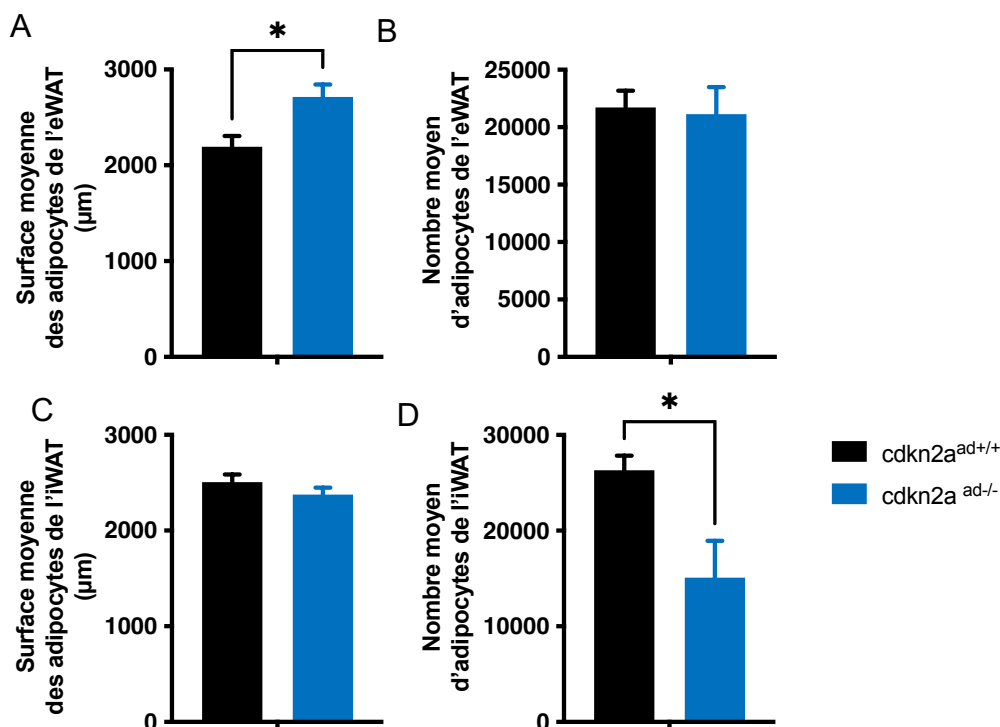


Figure 32. Hypertrophie de l'eWAT et hypoplasie de l'iWAT chez les souris $Cdkn2a^{ad-/-}$ suite à un HFD

A : Quantification de la taille des adipocytes en μm^2 dans l'eWAT ($n=7/\text{groupes}$). B : Quantification du nombre d'adipocytes dans l'eWAT ($n=7/\text{groupes}$). C : Quantification de la taille des adipocytes en μm^2 dans l'iWAT ($n=7/\text{groupes}$). D : Quantification du nombre d'adipocytes dans l'iWAT ($n=7/\text{groupes}$). Les données sont exprimées sous formes de moyenne \pm SEM, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

L'expansion du WAT se fait par l'élargissement des adipocytes préexistants par accumulation de lipides (hypertrophie) ou par l'augmentation du nombre d'adipocytes par le recrutement de pré-adipocytes dans le pool de cellules progénitrices résidant dans le tissu adipeux (hyperplasie). L'hypertrophie des adipocytes est associée à des altérations métaboliques telles que l'intolérance au glucose et l'hyperinsulinémie chez l'Homme (obèses et non obèses), qui augmentent le risque de développer un DT2 indépendamment de la masse grasse totale [298]. L'équilibre entre les tissus adipeux hyperplasiques et hypertrophiques est dicté par des modifications du métabolisme des adipocytes, notamment la lipogenèse, le catabolisme des lipides et l'adipogenèse.

Afin de déterminer si et comment l'extinction de *Cdkn2a* affecte l'expansion des différents tissu adipeux lors d'une alimentation riche en graisse, nous avons analysé la taille des adipocytes dans l'eWAT et l'iWAT des souris contrôles et *Cdkn2a*^{ad-/-} grâce à des coupes de paraffine colorée en H&E. Les souris *Cdkn2a*^{ad-/-} présentent une augmentation significative de la taille des adipocytes dans l'eWAT (Figure 32 A) et une diminution du nombre d'adipocytes dans l'iWAT (Figure 32 D) par rapport aux souris contrôles *Cdkn2a*^{ad+/+}.

Le tissu adipeux blanc étant composé, d'adipocytes blancs (dont la gouttelette lipidique peut contenir des contenus variables de triglycérides), de fibroblastes, de macrophages, de cellules sanguines et endothéliales et de préadipocytes, l'absence de changement significatif de masse des dépôts de tissus adipeux associée à l'hypertrophie de l'eWAT et l'hypoplasie de l'iWAT peut être expliquée par des changements dans la composition de celui-ci (Figure 33). Etant donné que l'extinction de *Cdkn2a* pourrait moduler le niveau d'inflammation dans ces tissus, il serait donc intéressant de caractériser les autres composants cellulaires de ces dépôts.

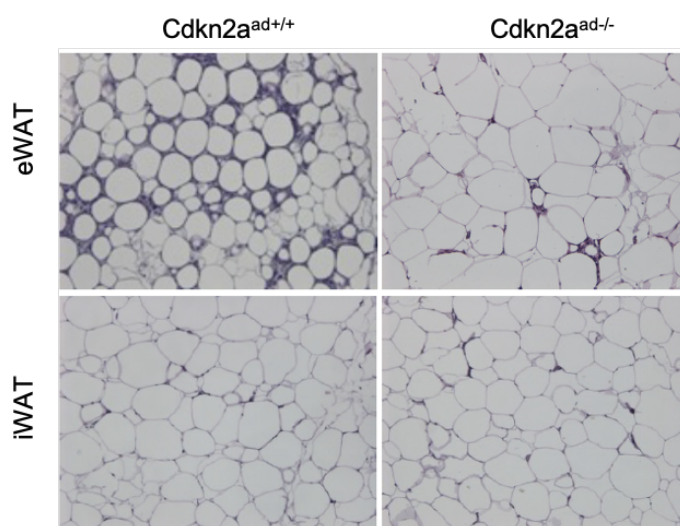


Figure 33. L'extinction spécifique du gène *Cdkn2a* dans l'adipocyte mature semble diminuer l'inflammation dans l'eWAT.

Images de microscopie représentatives de sections incluses en paraffine avec une coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E) dans eWAT et iWAT chez des souris *Cdkn2a*^{ad-/-} et *Cdkn2a*^{ad+/+} nourries avec HFD.

C. Conclusion

L'ensemble de ces données suggère que l'extinction de *Cdkn2a* dans l'adipocyte mature suite à un régime HFD modifie la cellularité du WAT montrant une hyperplasie dans l'eWAT et une hypoplasie dans l'iWAT.



VI. Caractérisation transcriptomique des dépôts de tissus adipeux suite à l'extinction de *Cdkn2a* dans l'adipocyte mature et à un régime HFD.

Afin d'établir les voies modulées par *Cdkn2a* dans l'adipocyte, une analyse du transcriptome par séquençage de seconde génération NGS (illumina) des 3 différents dépôts de tissus adipeux a été effectuée à la suite des différentes caractérisation métaboliques de notre modèle *Cdkn2a*^{ad-/-}.

L'analyse transcriptomique a révélé 3555 gènes exprimés de manière significativement différentielle dans l'eWAT (3444 régulés à la hausse et 111 régulés à la baisse), 496 dans le BAT et 11 dans l'iWAT (Figure 34). Aucune variation significative n'est observable dans l'iWAT, c'est pourquoi nous n'avons pas poursuivi l'étude de ce dépôt. Concernant l'eWAT et le BAT, les données ont été analysées *via* le logiciel Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Qiagen).

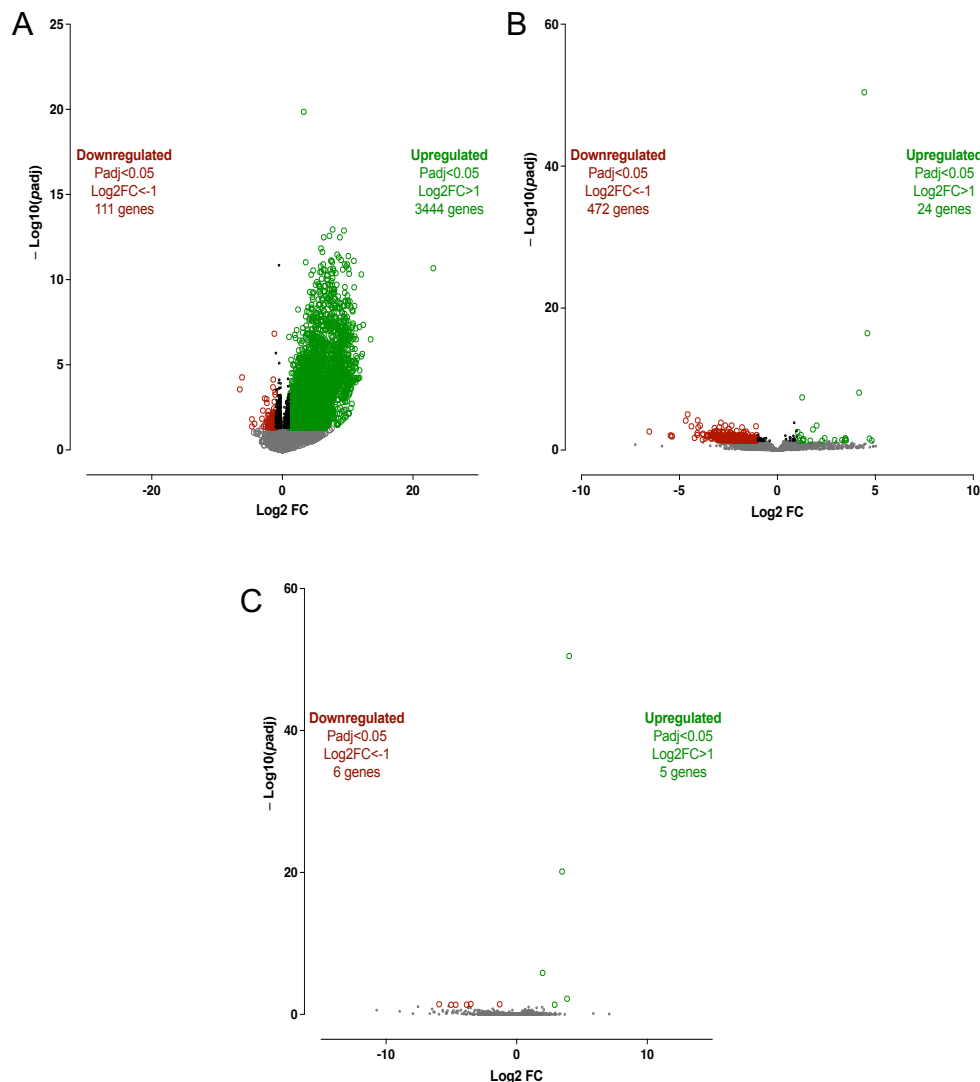


Figure 34. Volcano-plots de l'analyse transcriptomique des dépôts de TA des souris *Cdkn2a*^{ad-/-}.

A : Volcano-plot de l'analyse transcriptomique des souris *Cdkn2a*^{ad-/-} dans l'eWAT (n=5/groupes). B : Volcano-plot de l'analyse transcriptomique des souris *Cdkn2a*^{ad-/-} dans le BAT (n=5/groupes). C : Volcano-plot de l'analyse transcriptomique des souris *Cdkn2a*^{ad-/-} dans l'iWAT (n=5/groupes). En gris : les gènes avec une pvalue ajustée de $Padj > 0,05$, en noir : les gènes avec une pvalue ajustée de $Padj < 0,05$ et $-1 < Log2FC < 1$, en vert : les gènes avec une pvalue ajustée de $Padj < 0,05$ et $Log2FC > 1$ et en rouge : les gènes avec une pvalue ajustée de $Padj < 0,05$ et $Log2FC < -1$.

L'analyse des données transcriptomiques issues du BAT ont mis principalement en avant une diminution de la voie de la réponse inflammatoire (Figure 35), effectivement dans les voies principalement diminuées, on peut retrouver la voie de signalisation d'extravasation leucocytaire, de signalisation des récepteurs des cellules B. Une caractéristique de l'obésité est une inflammation de bas grade, probablement originaire de l'expansion du tissu adipeux par hypertrophie. Cela implique l'attraction chimiotactique des cellules du système immunitaire inné dans le tissu adipeux illustré par l'infiltration de cellules immunitaires, y compris les macrophages, les lymphocytes et les leucocytes [299]. A ce moment, les cellules immunitaires pro-inflammatoires surpassent les cellules anti-inflammatoires [90]. Les cytokines pro-inflammatoires libérées par les cellules immunitaires activées et les adipocytes peuvent altérer la signalisation de l'insuline dans les organes sensibles à l'insuline, favorisant la résistance systémique à l'insuline, ce qui augmente le risque de développer un diabète de type 2 (T2D) [300].

Dans les voies augmentées (Figure 35), on observe une augmentation de l'apoptose avec notamment la voie de signalisation de l'apoptose et du facteur de nécrose tumorale inducteur faible de l'apoptose (TWEAK, TNF-like weak inducer of apoptosis), une cytokine de la superfamille de la nécrose tumorale (TNF). Cette cytokine est multifonctionnelle, en effet, plusieurs rôles lui sont attribuée dans la littérature tel que la régulation de la prolifération, la migration, la différenciation, la survie et la mort cellulaires, ainsi que l'angiogenèse et l'inflammation [301]. Mais aussi une augmentation des voies pro-adipogénique (Figure 35) avec notamment les voies de signalisation des facteurs de transcription (PPAR, LXR/RXR, PPAR α /RXR α), qui sont les maîtres régulateurs de l'adipogénèse. Il a aussi été démontré que PPAR α /RXR α jouent un rôle important dans la régulation de l'expression de l'UCP1 et du métabolisme lipidique dans les adipocytes bruns [302].

Dans notre modèle, il semble que l'extinction de *Cdkn2a* dans l'adipocyte mature brun réduit la réponse inflammatoire suite à un développement d'obésité et active l'apoptose et l'activité métabolique de ce tissu suggérant une amélioration de l'état métabolique (Figure 35).

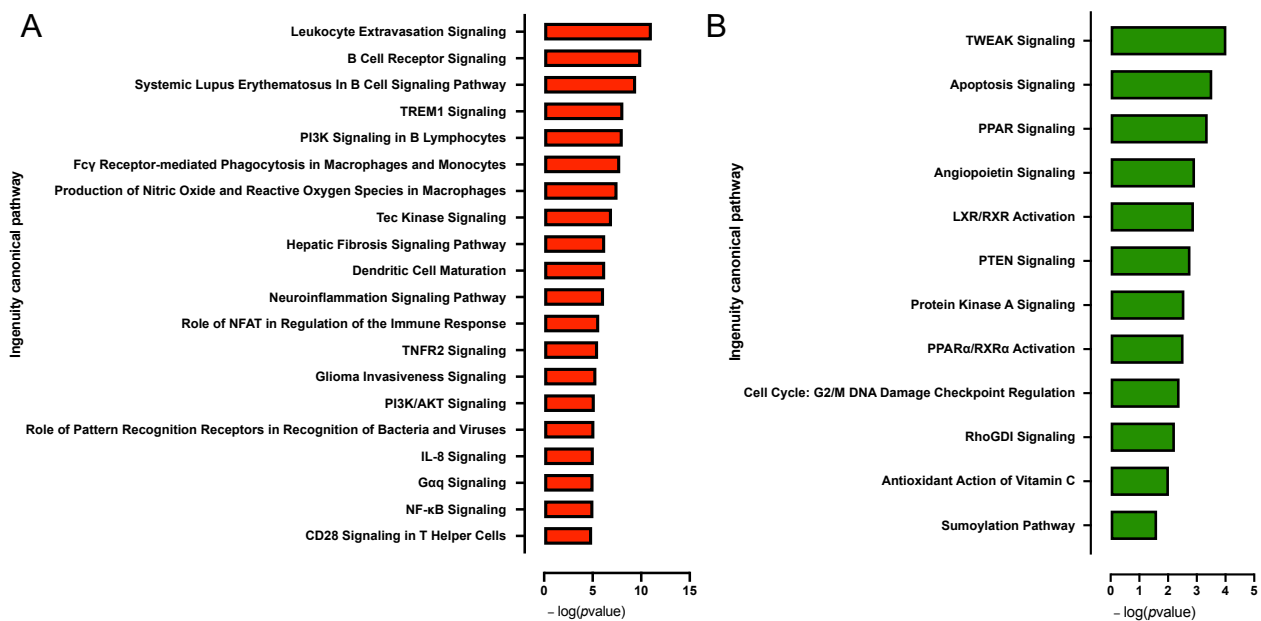


Figure 35. Profil transcriptomique des souris $Cdkn2a^{ad-/-}$ et $Cdkn2a^{ad+/+}$ dans le BAT.

A : Profil transcriptomique des souris $Cdkn2a^{ad-/-}$ diminué dans le BAT ($n=5$ /groupes). B : Profil transcriptomique des souris $Cdkn2a^{ad+/+}$ augmenté dans le BAT ($n=5$ /groupes).

Les résultats obtenus dans l'eWAT mettent en avant un tonus noradrénergique augmenté, puisqu'on peut observer entre autres une activation significative des voies de signalisations de biosynthèse des catécholamines, du système endocannabinoïdes et de rétroaction de la dopamine-DARPP32 dans la signalisation de l'AMPC (Figure 36). Il est connu qu'une stimulation chronique par la noradrénaline augmente l'utilisation de glucose indépendamment de l'insuline par le tissu adipeux blanc [303]. Cette action se fait *via* l'activation des récepteurs β adrénergique qui agiraient sur les transporteurs du glucose [304]. Nous observons aussi une augmentation du métabolisme des glucides notamment *via* l'activation des voies de la dégradation du glycérol et de la glycolyse associée à une meilleure capture du glucose (Figure 36). Ceci pourrait être associée à une amélioration de la sensibilité à l'insuline puisqu'on observe diminution de la voie de de la signalisation p70S6K, avec notamment la diminution des voies suivantes « regulation of eif4 and p70S6K signaling, PI3K/AKT, EIF2, mTOR signaling » (Figure 36), qui se trouve en aval de la voie de l'insuline.

En effet, l'activation de la signalisation mTORC1/p70S6K engendre une régulation de la voie PI3K/Akt *via* la phosphorylation et la dégradation de l' « insulin receptor substrate » (IRS1), engendrant une résistance à l'insuline. Ces voies sont aussi connues pour être impliquées dans le contrôle de la traduction. Effectivement, le facteur d'initiation de la traduction eucaryote 4 (eIF4) et p70S6K jouent un rôle critique dans la régulation translationnelle. Plusieurs stimuli, y compris les facteurs de croissance et les cytokines, régulent le complexe eIF4 et p70S6K en initiant une cascade de phosphorylation impliquant

l'activation séquentielle de PI3K, PDK1, AKT et mTOR conduisant ainsi à une augmentation de la synthèse protéique particulièrement impliqué dans la survie cellulaire.

De plus, l'activation de voies de dégradation des triacylglycérols met en avant une activité oxydative augmentée (Figure 36). De façon cohérente avec ce que nous observons dans les coupes histologiques, il semble aussi que la délétion de *Cdkn2a* engendre une diminution des voies de l'inflammation, avec notamment NF- κ B signaling et STAT3 pathway, et des voies HGF et VEGF qui sont connues pour être augmenté en cas de formation de tumeur.

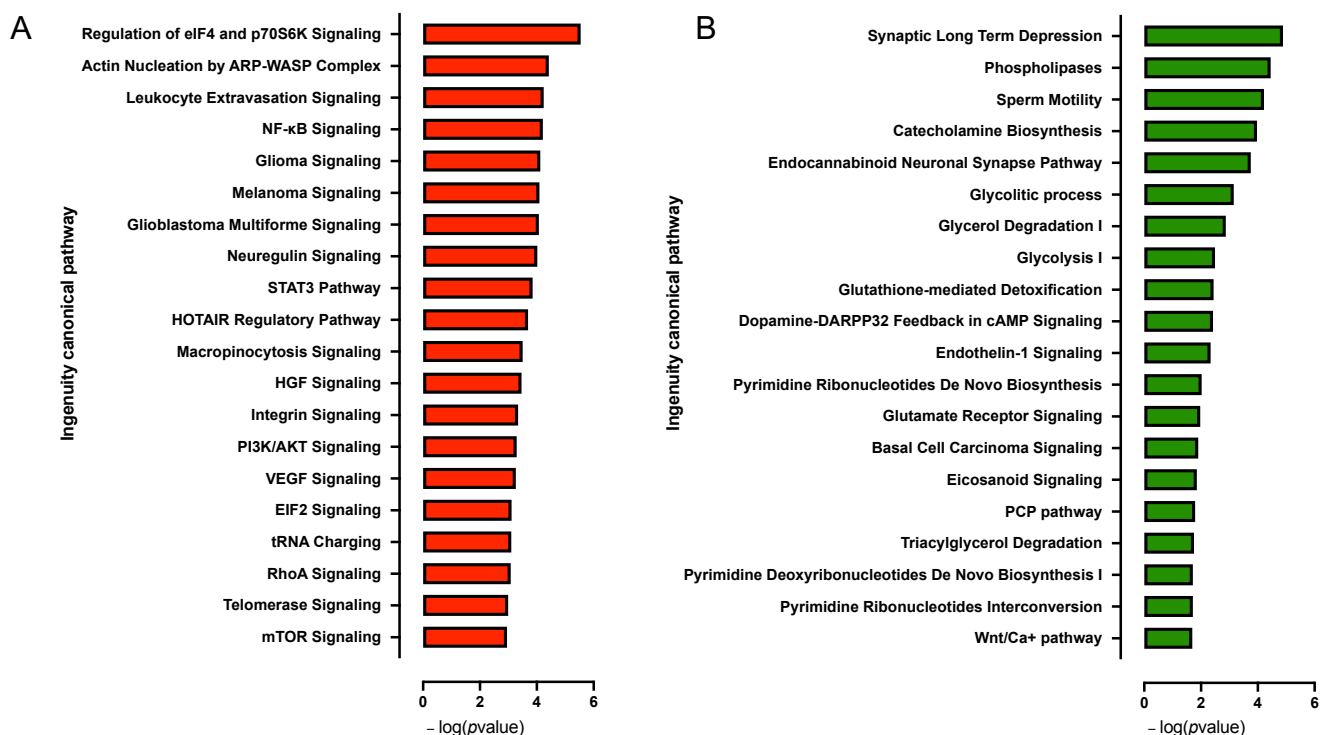


Figure 36. Les souris *Cdkn2a^{ad/-}* présentent un profil transcriptomique dans l'eWAT avec des expressions diminuées pour la voie de régulation *eif4* et *P70S6K* et augmentées pour la capture de glucose ainsi que pour sa capacité
A : Profil transcriptomique des souris *Cdkn2a^{ad/-}* diminué dans l'eWAT (n=5/groupes). B : Profil transcriptomique des souris *Cdkn2a^{ad/-}* augmenté dans le eWAT (n=5/groupes).

L'ensemble des résultats obtenus dans l'eWAT semble indiquer que la délétion de *Cdkn2a* dans ce tissu engendre une amélioration de l'activité métabolique de l'adipocyte et de l'utilisation des substrats énergétique ; en particulier, une amélioration de la capture du glucose et de son métabolisme possiblement associée à une meilleure sensibilité à l'insuline au niveau de l'adipocyte ainsi qu'une amélioration de sa capacité oxydative mettant en avant une prédisposition au brunissement de ce tissu même si aucun brunissement n'est observable.

VII. Étude de l'extinction de *Cdkn2a* dans un modèle d'adipocyte blanc *in vitro* : Les 3T3-L1.

Afin de valider les hypothèses issues de l'étude de notre modèle murin d'extinction de *Cdkn2a* dans l'adipocyte (*Cdkn2a^{ad/-}*), nous avons décidé d'utiliser un modèle d'adipocytes blancs largement utilisée *in vitro* dans l'étude de la biologie des adipocytes, les cellules 3T3-L1. Les adipocytes différenciés à partir des cellules fibroblastes 3T3-L1 sont un modèle d'adipocytes blancs largement utilisée *in vitro* dans l'étude de la biologie des adipocytes. Les cellules 3T3-L1 ont été isolées et développées à partir de cellules Swiss 3T3 pour leur capacité à accumuler les lipides. La différenciation de cette lignée cellulaire préadipocytaire en adipocytes matures est simple et implique un traitement avec un certain nombre d'agents de pro-différenciation après arrêt de croissance. Le protocole de différenciation le plus couramment utilisé dans la littérature utilise une combinaison de 3 agents que sont l'insuline, la dexaméthasone et l'IBMX. De plus, ce modèle a déjà été utilisé dans la littérature pour étudier *Cdkn2a* [290], ainsi que démontrer les effets des catécholamines (noradrénaline), du browning (avec notamment l'expression d'UCP1) et l'étude de la capture du glucose dans les adipocytes blancs [305].

A. Différenciation des 3T3-L1 en adipocyte mature

Dans un premier temps, afin de valider notre protocole de différenciation nous avons visualisé et mesuré la présence de triglycérides grâce à une coloration à l'huile rouge (Oil Red-O) (Figure). En effet, cette coloration permet de visualiser et de mesurer par un marquage rouge les lipides contenus dans les gouttelettes lipidiques des adipocytes. La teneur en lipides des cellules 3T3-L1 différenciés est largement augmentée par rapport au cellules non différencié (Figure 37), avec une augmentation d'environ 4 fois. Nous avons aussi étudié les niveaux d'expression d'ARNm de certains marqueurs de l'adipocyte mature tel que l'adiponectine qui est bien augmentée dans nos cellules différenciées.

L'ensemble de ces données, nous permet d'affirmer la validité de notre modèle d'adipocyte mature.

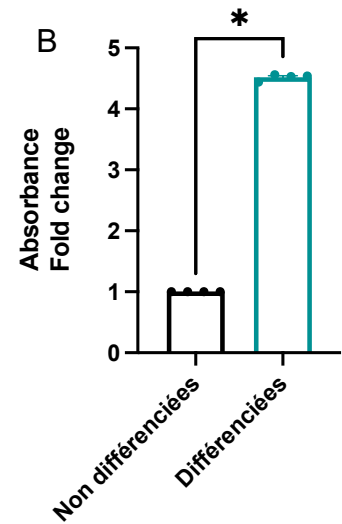
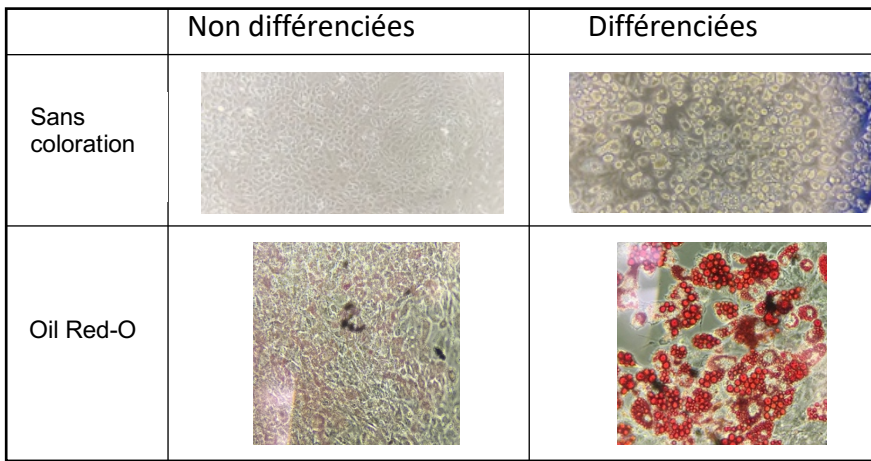


Figure 37. Validation du protocole de différenciation des cellules 3T3-L1.

A : Morphologie des cellules 3T3-L1 avant et après différenciation en adipocytes matures. B : Absorbance fold change oil Red-O. Les données sont exprimées sous formes de moyenne \pm SEM, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Puis, nous avons étudié les niveaux d'expression de l'ARNm de p16 (Figure 38), p19 (Figure 38) et de l'adiponectine (Figure 38) au cours de la différenciation. Comme on peut le voir dans la figure 38, l'expression de p16 et p19 est variable au cours de la différenciation adipocytaire avec globalement une diminution de l'expression de leur ARNm jusqu'à D8 ce qui est considéré comme le terme pour obtenir un adipocyte mature. Concernant l'expression de l'ARNm de l'adiponectine au cours de la différenciation, il commence à être exprimé à partir de D4 lorsqu'on commence à observer l'apparition des premières gouttelettes lipidiques et atteint un seuil maximal à D8. Ces analyses nous ont permis de déterminer le meilleur moment pour réaliser notre siRNA *Cdkn2a*, afin d'être dans les conditions les plus proches de celles de notre modèle *souris Cdkn2a^{ad-/-}*. Nous avons donc décidé de réaliser notre siRNA à D4 de différenciation puisque c'est à ce moment que l'adiponectine commence à être exprimée dans nos cellules et que l'expression de l'ARNm de p16 et p19 est aussi visible à D4.

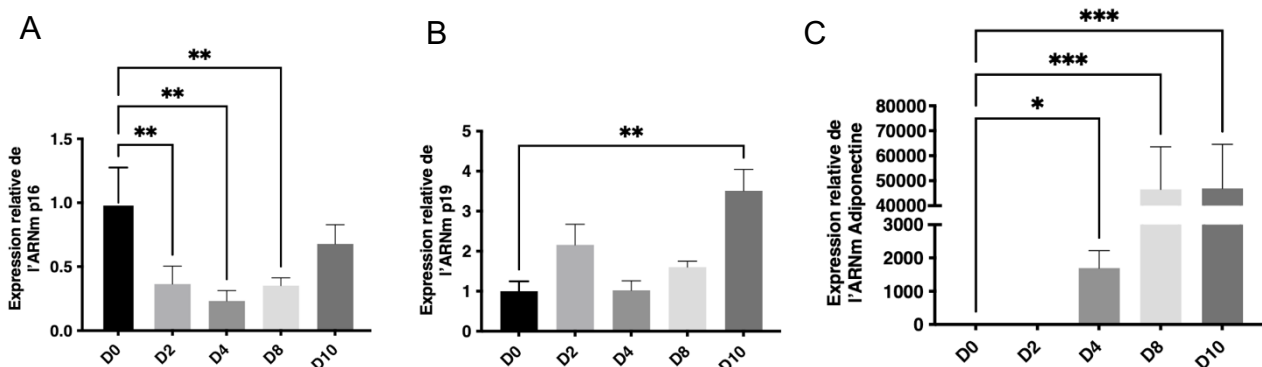


Figure 38. Expression de *Cdkn2a* et de l'adiponectine au cours de la différenciation des cellules 3T3-L1.

A : Expression relative ARNm p16. B : Expression relative ARNm p19. C : Expression relative ARNm Adiponectine. Les données sont exprimées sous formes de moyenne \pm SEM, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

B. Efficacité du siRNA

Nous avons d'abord validé l'efficacité d'extinction de notre gène cible par l'utilisation du siRNA pendant 24h, 48h et 72h. Nous avons déterminé que l'extinction la plus satisfaisante se produit après 48h d'exposition au siRNA *Cdkn2a* (Figure 39) avec un taux d'extinction d'environ 70% de p16 et p19.

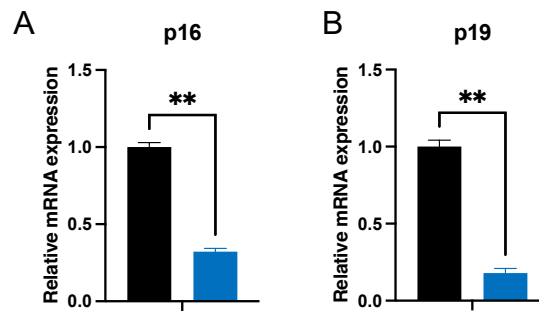


Figure 39. Validation du protocole d'extinction siRNA *Cdkn2a* à 48h.

A : Expression relative ARNm p16. B : Expression relative ARNm p19. Les données sont exprimées sous formes de moyenne \pm SEM, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

C. Teneur en lipides

L'effet de l'extinction de *Cdkn2a* sur la teneur en lipides des 3T3-L1 différenciées a été observé par coloration à l'Oil Red-O des cellules stimulées ou non avec de l'insuline 100nM comme cela sera utilisé dans les expériences suivantes (capture du glucose).

Les colorations à l'Oil Red-O étaient similaires, en effet aucune différence d'accumulation des gouttelettes lipidiques n'est observable entre les conditions contrôles et inhibées en *Cdkn2a* adipocytaire (Figure 40), ce qui suggère que *Cdkn2a* n'as pas de rôle dans l'accumulation lipidique.

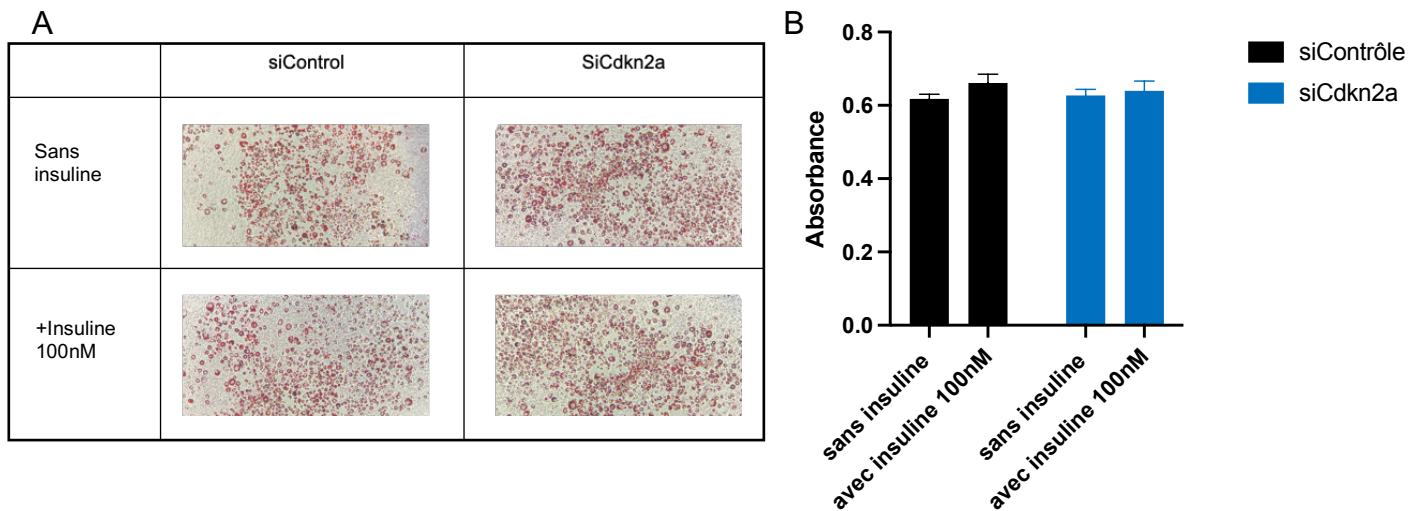


Figure 40. Effet de la délétion de *Cdkn2a* sur la teneur en triglycérides des cellules 3T3-L1 différenciées.

A : microscopie cellules siContrôle vs siCdkn2a. *B* : Absorbance fold change oil Red-O. Les données sont exprimées sous formes de moyenne \pm SEM, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

D. Étude de la respiration mitochondriale

Afin de mesurer les effets de l'extinction de *Cdkn2a* sur la respiration mitochondriale, le taux de consommation d'oxygène (OCR) et le taux d'acidification extracellulaire (ECAR), qui représente en grande partie la glycolyse, ont été mesurés grâce à la plateforme XF24e de Seahorse Biosciences. Des cellules 3T3-L1 ont été cultivées et différenciées dans une plaque seahorse V7. Après 4 jours de différenciation, nous avons réalisé le siRNA pendant 48h, puis à 8 jours de différenciation, le milieu de croissance des 3T3L-L1 a été remplacé par du DMEM fourni par Seahorse pendant 1h à 37°C sans CO₂ afin de réaliser une « starvation » et un équilibre des paramètres de respiration et de pH. Les mesures sont réalisées à 37°C et pH 7 en utilisant des intervalles de 3 minutes. La respiration basale a été mesurée, puis nous ajoutons 20mM de glucose et ensuite la respiration découplée (en bloquant l'activité de l'ATP synthase avec l'oligomycine) et maximale (en stimulant le processus de découplage avec le FCCP) ont été déterminées à l'aide de l'oligomycine (1 μ M) et du cyanure de carbone p-trifluorométhoxyphénylhydrazone (FCCP, 1 μ M). La respiration dépendant du complexe I et III est inhibée par l'utilisation de roténone et d'antimycine A (0,5 μ M) (Figure 41).

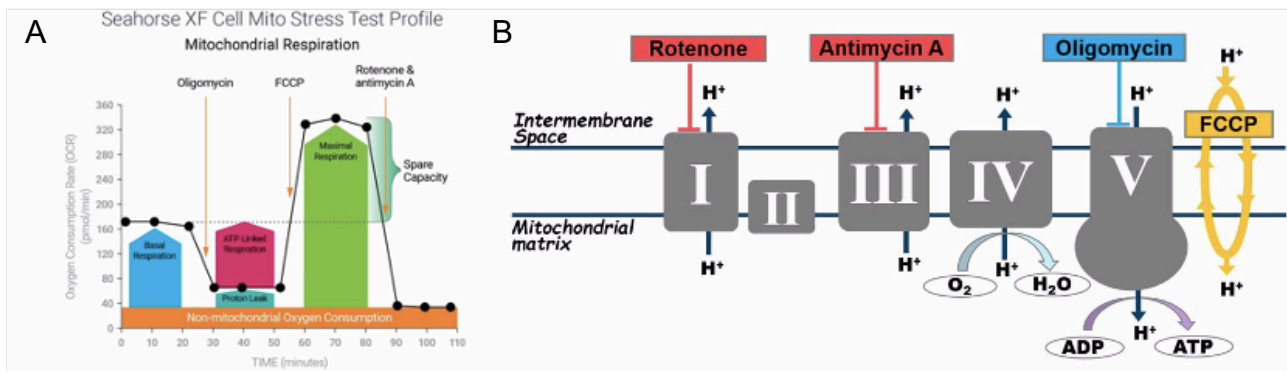


Figure 41. Mito Stress Test Assay Seahorse utilisé pour déterminer la fonction mitochondriale cellulaire.

A : Le profil du test de stress Seahorse XF Cell Mito illustre les paramètres clés de la fonction mitochondriale, à savoir la respiration basale, la production d'ATP, la fuite de protons, la respiration maximale et la capacité respiratoire de réserve. B : illustration des complexes de la chaîne de transport d'électrons et indique la cible d'action pour tous les modulateurs inclus dans le kit de test de stress Seahorse XF Cell Mito.

Les cellules sicontrol ont montré un profil bioénergétique typique (Figure 42). Le taux d'OCR diminue après l'injection d'oligomycine, ce qui révèle la quantité d'O₂ consommée par la fuite de H⁺, la synthèse d'ATP et d'autres oxydases. L'ajout de l'agent découplant FCCP a force la capacité respiratoire maximale des cellules. Enfin, le mélange de roténone et d'antimycine A bloque complètement la consommation mitochondriale d'O₂. En revanche, les cellules si*Cdkn2a* ont présenté une respiration basale, une capacité respiratoire maximale et une production d'ATP significativement plus élevée, corrélé avec un ECAR lui aussi significativement augmenté. L'inhibition des complexes respiratoires de la chaîne de transport d'électrons I, III et V a réussi à réduire la consommation d'O₂(Figure 42).

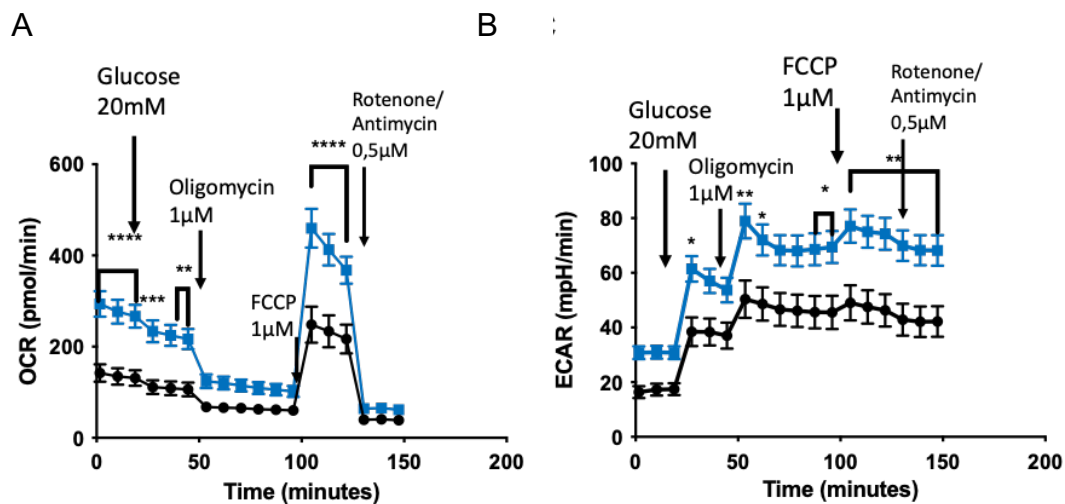


Figure 42. La respiration mitochondriale est améliorée dans les cellules 3T3-L1 si*Cdkn2a*.

A : Représente les courbes OCR mitochondriales obtenues dans différentes conditions. B : Représente les courbes ECAR obtenues dans différentes conditions. Les données sont représentées sous forme de moyenne \pm SEM. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$ versus groupe témoin.

E. Capture du glucose

Nous avons ensuite étudié l'effet de l'extinction de *Cdkn2a* sur l'absorption basale de glucose des adipocytes 3T3-L1 matures. Les résultats montrent une augmentation significative de l'absorption basale de glucose en l'absence de *Cdkn2a* par rapport aux témoins. De plus, dans nos conditions expérimentales, l'extinction de *Cdkn2a* n'a pas affecté l'absorption de glucose stimulée par l'insuline (Figure 43). Cette absence de réponse à l'insuline peut être due au fait que les cellules présentant l'extinction de *Cdkn2a* ont atteint le seuil de détection du kit.

Nous pouvons donc pour l'instant conclure que l'extinction de *Cdkn2a* améliore la capture du glucose sans stimulation à l'insuline l'effet de l'insuline reste encore à déterminer avec des expériences complémentaires.

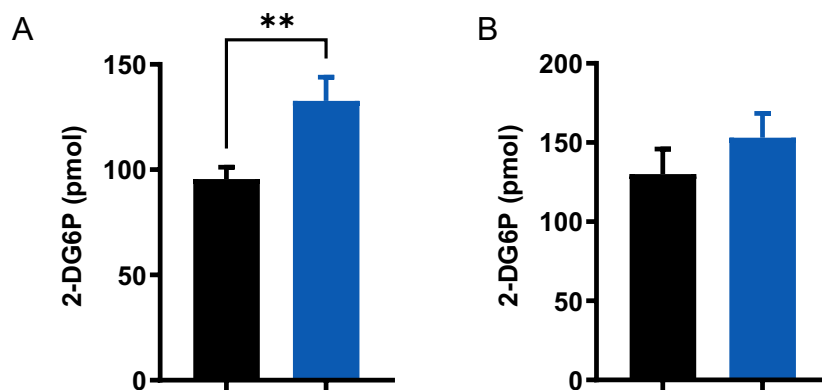


Figure 43. La capture du glucose est améliorée dans les cellules 3T3-L1 siCdkn2a.

A : Les taux d'absorption de 2DG dans les cellules 3T3-L1 différenciés en adipocytes avec une extinction partielle de *Cdkn2a* vs Contrôles ($n = 10$ /conditions). B : Les taux d'absorption de 2DG dans les cellules 3T3-L1 différenciés en adipocytes avec une extinction partielle de *Cdkn2a* vs Contrôles et stimulée à l'insuline (100nM) ($n = 10$ /conditions) Les données sont représentées sous forme de moyenne \pm SEM. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$ versus groupe témoin.

F. Analyse du kinome

Les kinases étant une famille de protéines jouant un rôle essentiel dans la transduction du signal qui sous-tend de nombreux processus cellulaires, et étant donné que les produits de *Cdkn2a* p16^{INK4a} et p19^{ARF} sont des régulateurs clés de l'activité des kinases impliquées dans la prolifération cellulaire et la sénescence [141], nous avons donc décidé d'étudier le kinome de ces cellules. Nous avons donc réalisé une analyse globale du kinome *via* la technologie Pamgene.

Le test de kinase fonctionnelle de PamGene est basé sur la détection l'activité de la protéine kinase directement dans les lysats cellulaires et tissulaires, en mesurant la phosphorylation des peptides par les protéines kinases.

La technologie de PamGene utilise des puces et des réactifs à base de phosphotyrosine kinase (PTK) ou de sérine-thréonine kinase (STK). La PamChip contient 4 puces peptidiques identiques, chaque puce contenant 144 (STK) ou 196 (PTK) séquences peptidiques de 13 acides aminés (Figure 44). Les peptides hébergent des sites de phosphorylation dérivés de la littérature ou des prédictions informatiques et sont corrélés avec une ou plusieurs kinases en amont.

Des anticorps anti-phospho marqués par fluorescence sont utilisés pour détecter l'activité de phosphorylation des kinases présentes dans l'échantillon. L'échantillon composé de protéines et d'anticorps marqués est distribué sur la PamChip, qui est placée dans la PamStation. Une fois à l'intérieur de l'instrument, l'échantillon est incubé à une température prédéterminée. Pendant l'incubation, l'échantillon est pompé dans les deux sens à travers le matériau poreux pour maximiser la cinétique de liaison et minimiser le temps de dosage. Les temps de réaction sont généralement de quelques minutes à une heure. Lors du mouillage, le matériau de surface des puces à ADN PamChip devient translucide, facilitant l'imagerie à l'aide d'un système d'imagerie à LED (Figure 44).

La ou les kinases présentes dans l'échantillon phosphorylent activement les substrats sur la PamChip, en présence d'ATP. Un anticorps PY20 conjugué au FITC, présent dans le mélange réactionnel, est utilisé pour détecter la Tyr phosphorylée afin de quantifier le signal de phosphorylation. Des images sont prises toutes les 5 minutes pour générer des données cinétiques en temps réel. Un mélange d'anticorps est utilisé pour détecter le Ser/Thr phosphorylé, et un 2^e anticorps conjugué au FITC est utilisé dans un mélange de détection pour quantifier le signal de phosphorylation. L'analyse des données, s'effectue *via* le logiciel BioNavigator fourni par Pamgene.



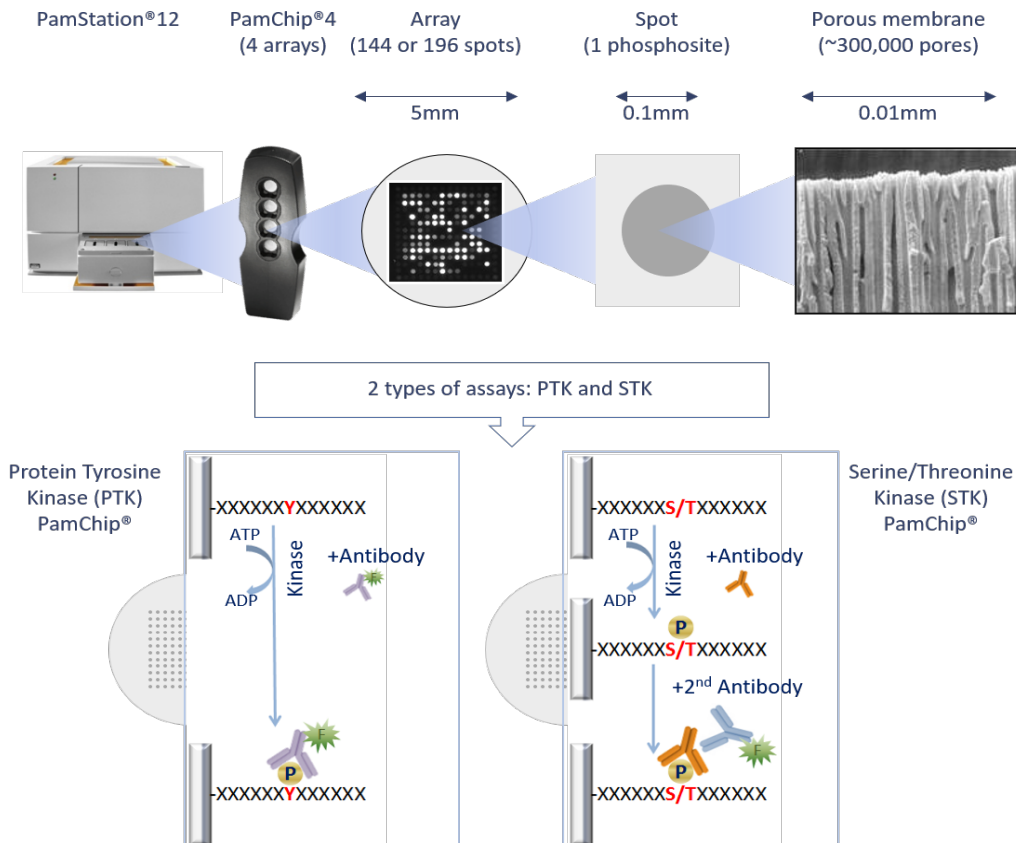


Figure 44. Présentation de la technologie PamGene et principe du test PamChip.

Nous pouvons voir que l'extinction de *Cdkn2a* dans les 3T3-L1 différenciées module de manière significative la phosphorylation de plusieurs sites de phosphorylation STK et PTK (Figure 45). Sur les 144 peptides STK sur la puce, 8 peptides sont modulés de manière significative. Pour la puce PTK, 36 peptides sur 196 sont significativement modulés. Lorsque l'on stimule ces cellules avec de l'insuline on observe la modulation significative de 3 peptides en PTK et 51 peptides en STK.

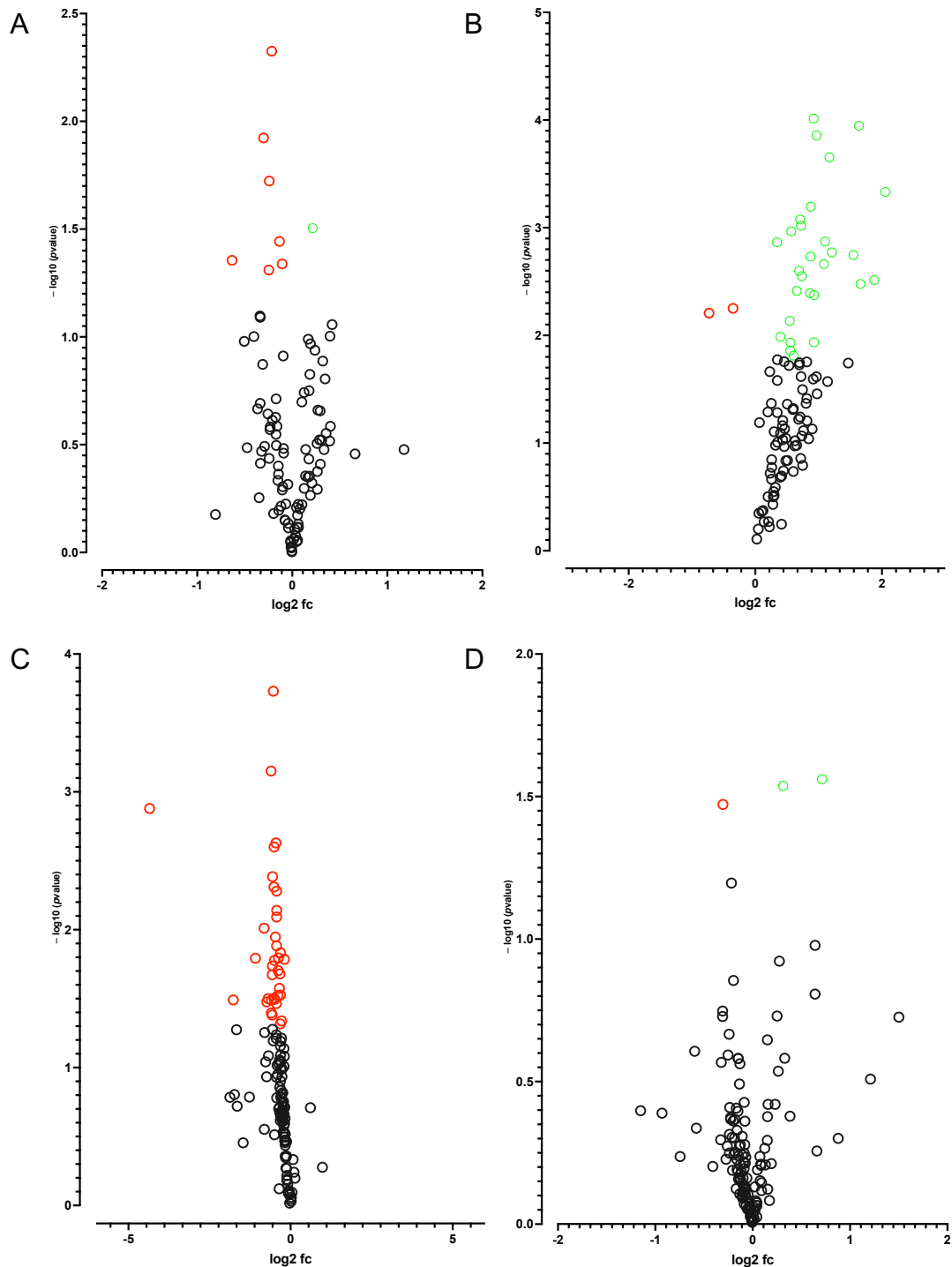


Figure 45. Analyse du kinome des cellules 3T3-L1 différenciées et déficientes en CDKN2A versus contrôles.

A : Volacano-plot de la phosphorylation peptidique STK dans les cellules 3T3-L1 différenciées en adipocytes avec une extinction partielle de Cdkn2a ($n = 3$ /conditions). B : Volacano-plot de la phosphorylation peptidique STK dans les cellules 3T3-L1 différenciées en adipocytes avec une extinction partielle de Cdkn2a et stimulée à l'insuline (100nM) ($n = 3$ /conditions). C : Volacano-plot de la phosphorylation peptidique PTK dans les cellules 3T3-L1 différenciées en adipocytes avec une extinction partielle de Cdkn2a ($n = 3$ /conditions). D : Volacano-plot de la phosphorylation peptidique PTK dans les cellules 3T3-L1 différenciées en adipocytes avec une extinction partielle de Cdkn2a et stimulée à l'insuline (100nM) ($n = 3$ /conditions). En noir : les peptides non significativement modulés, en vert : les peptides significativement modulés avec un $-\text{Log}_{10}(\text{pvalue}) \geq 1,3$ et hyperphosphorylés avec Log_2FC positif et en rouge : les peptides significativement modulés avec un $-\text{Log}_{10}(\text{pvalue}) \geq 1,3$ et hypophosphorylés avec Log_2FC négatif.

Ces sites de phosphorylation sont liés à des kinases putatives STK et PTK en amont par la technologie Pamgene (Tableau 4). Dans les kinases PTK significativement modulées, on observe que l'ensemble d'entre elles ont une activité diminuée chez les cellules présentant une extinction de *Cdkn2a* adipocytaire. Les familles de kinases PTK majoritairement représentées sont les Alk (kinase du lymphome anaplasique), Fak (Focal adhesion kinase), PDGFR (Platelet-Derived Growth Factor), Src et Trk (tropomyosin receptor kinase). La majorité des kinases en STK est significativement diminuée et fait partie principalement des familles de kinases CDK kinase dépendante des cyclines (CDK5, CDC2/CDK1, PCTAIRE2, CDK9, CDK4 et CDK3), CDKL (CDK-like) (CDKL2 et CDKL5) et MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) (ERK5, KNK1, ERK2 et JNK3). Les kinases dont l'activité est augmentée sont PKA (alpha), qui est associé au brunissement du tissu adipeux et a l'utilisation du glucose [306,307], et PKG2. On observe aussi une diminution de GSK3 qui est connu pour être impliqué dans le transport du glucose dans les 3T3L-1 différenciées. En effet, l'inhibition de GSK3 stimule la glycogène synthase et le transport du glucose dans des 3T3-L1 différenciées en adipocytes [308,309].

Rank	PTK			STK		
	Kinase Name	Kinase Score	Kinase Statistic	Kinase Name	Kinase Score	Kinase Statistic
1	CTK	2.42	-1.60	CDK5	2.91	-0.60
2	LTK	2.12	-1.51	GSK3[alpha]	2.56	-0.87
3	Fgr	2.11	-1.70	CDC2/CDK1	2.43	-0.43
4	Ros	2.06	-1.93	DYRK1A	2.22	-1.00
5	Src	1.95	-1.46	ROCK1	2.21	-0.95
6	Syk	1.92	-1.36	ADCK3	2.11	-0.61
7	ALK	1.92	-1.40	PCTAIRE2	1.95	-0.95
8	FAK1	1.90	-1.46	CDKL2	1.95	-0.87
9	FAK2	1.82	-1.41	ERK5	1.92	-0.36
10	TRKC	1.82	-1.51	DAPK1	1.92	-0.75
11	Fyn	1.74	-1.45	CDK9	1.90	-0.53
12	Yes	1.72	-1.53	CDK4	1.89	-0.64
13	PDGFR[alpha]	1.72	-1.71	CDK3	1.73	-0.37
14	TRKB	1.64	-1.42	CDKL5	1.71	-0.47
15	PDGFR[beta]	1.59	-1.44	RAF1	1.62	-0.36
16	FGFR1	1.55	-1.41	PKA[alpha]	1.54	0.16
17	Arg	1.50	-1.33	PKG2	1.53	0.23
18	ROR1	1.49	-1.47	JNK1	1.50	-0.27
19	CHK1	1.48	-1.43	ERK2	1.49	-0.29
20	KDR	1.43	-1.34	JNK3	1.47	-0.27

Tableau 4. Analyse du kinome des cellules 3T3-L1 différenciées et déficientes en CDKN2A versus contrôles. Prédiction des kinases les plus modulées dans les cellules *Cdkn2a*^{ad-/-}. La partie droite du tableau affiche les PTK en amont prédits classés par leur Kinase score. La partie gauche du tableau affiche les STK en amont prédits classés par leur Kinase score. La statistique de kinase (kinase statistic) reflète la différence d'activité après traitement (par exemple, des valeurs négatives représentent une activité de kinase inhibée). Le score de kinase (kinase score) indique la spécificité de la norme statistique de kinase par rapport au nombre de peptides utilisés pour prédire la kinase correspondante, il classe les kinases en fonction de leur importance et de leur spécificité. Les kinases en amont ont été identifiées à l'aide de la base de données de référence des protéines humaines. Les constituants de la statistique de kinase : Kinase Score et Kinase Statistic sont affichés sous forme de colonnes et les kinases les mieux classées sont présentées en gras dans les rangées (Kinase score >1,19). Le classement final des kinases était basé sur le score final médian.



Lors d'une stimulation à l'insuline, on observe une modification dans le profil de l'activité kinase. On observe notamment une augmentation de l'activité des kinases de la famille des Eph et STE7 et une diminution de l'activité des kinases de la familles Src pour les kinases PTK. Concernant les kinases STK, on observe une augmentation de l'activité de l'ensemble des kinases avec notamment l'activité des familles CAMKL, IKK, MAPK et MAPKAPK qui est significativement augmenté dans les cellules inhibées en *Cdkn2a* et stimulées à l'insuline.

L'une des kinases les plus activée par l'extinction partielle de *Cdkn2a* on retrouve DAPK2. DAPK2, également connue sous le nom de protéine kinase 2 associée à la mort, est une enzyme qui fait partie de la famille des protéines kinases impliquées dans la régulation de divers processus cellulaires, y compris l'apoptose et la migration cellulaire[310]. Bien que la majorité des recherches sur DAPK2 se soient concentrées sur son rôle dans le cancer et la fonction neuronale, il y a des preuves émergentes suggérant son implication dans la biologie et le métabolisme du tissu adipeux. Des études transcriptomiques ont identifié DAPK2 parmi les gènes du tissu adipeux les plus fortement réprimés chez les personnes obèses[311]. Plusieurs études ont montré que DAPK2 régule l'autophagie dans différents types cellulaires, y compris les adipocytes. En effet, DAPK2 participe à la régulation de l'autophagie médiée par les lysosomes dans l'obésité [312]. Ainsi, les adipocytes isolés de sujets obèses montrent une diminution marquée des niveaux de protéine DAPK2, ainsi qu'une réduction du flux d'autophagie[312].

Parmi ces kinases, on trouve aussi de façon intéressante une augmentation de l'activité kinase de $p38\beta$ et $AMPK\alpha$ (Tableau 5) qui sont des régulateurs clé dans les processus d'activation de l'oxydation des acides gras. L'activation de la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) conduit à la phosphorylation d'un certain nombre de protéines et module la transcription des gènes impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique pour activer les voies cataboliques qui produisent de l'ATP et désactiver les voies anaboliques qui consomment de l'ATP. L'activation de l'AMPK dans l'adipocytes entraîne une diminution du flux lipogène, de la synthèse des triglycérides et de l'adipogenèse du tissu adipeux blanc et augmente l'oxydation des acides gras et le transport du glucose [313]. Plusieurs études ont montré l'importances des membres de la famille de p38 dans la régulation du métabolisme dans différents organes métaboliques avec notamment dans le tissu adipeux des effets sur le processus de brunissement et de thermogenèse. On observe aussi dans les cellules présentant une extinction de *Cdkn2a* et stimulée à l'insuline une augmentation de l'activité de la $p70S6K$ est une kinase clés dans la cascade de signalisation de l'insuline et dont le rôle dans la voie de rétrocontrôle de l'insuline est très important. En effet, une voie de signalisation majeure qui est activée après la stimulation de l'insuline est la voie IRS1-PI3K-Akt dans

laquelle on retrouve p70S6K (Tableau 5). Une fois activé par l'insuline, mTOR/p70S6K phosphoryle le substrat du récepteur de l'insuline-1 (IRS-1) sur les résidus de sérine, ce qui entraîne son inhibition et sa réduction de la signalisation de l'insuline. p70S6K est connu pour réguler une variété de processus en plus du rétrocontrôle de la voie de l'insuline, y compris l'apoptose, la prolifération, l'organisation cytosquelettique, la synthèse des protéines, l'épissage de l'ARNm, la transcription et le métabolisme.

Rank	PTK			STK		
	Kinase Name	Kinase Score	Kinase Statistic	Kinase Name	Kinase Score	Kinase Statistic
1	Src	2.97	-0.32	DAPK2	2.94	4.88
2	EphA5	2.34	0.69	ERK7	2.77	4.85
3	CHK1	2.29	-0.81	ANP[alpha]	2.72	3.02
4	EphB1	1.95	0.61	p38[beta]	2.64	3.94
5	MEK1/MAP2K1	1.64	0.41	AlphaK1	2.63	4.84
6	BLK	1.37	-0.28	TBK1	2.63	4.92
7	Lyn	1.35	-0.24	p70S6K	2.44	3.15
8	KDR	1.31	-0.27	IKK[epsilon]	2.42	3.45
9	HCK	1.20	-0.25	SGK2	2.42	2.99
10	MKK3/MAP2K3	1.19	0.36	AMPK[alpha]1	2.39	3.21
11	MKK6/MAP2K6	1.19	0.36	AurB/Aur1	2.20	3.79
12	Fyn	1.13	-0.24	DCAMKL1	2.10	3.82
13	SEK1/MAP2K4	1.10	0.31	CK1[alpha]	2.02	2.82
14	Yes	1.09	-0.25	MAPKAPK3	1.99	2.43
15	Lck	1.06	-0.23	JNK2	1.97	2.70
16	Ros	1.03	-0.32	PKC[zeta]	1.94	2.94
17	JAK1~b	1.00	0.32	MAPKAPK2	1.91	2.48
18	Kit	0.99	-0.20	ROCK1	1.90	3.45
19	FGFR2	0.98	-0.28	CHK1	1.87	2.84
20	Fgr	0.96	-0.24	JNK3	1.87	2.51

Tableau 5. Analyse du kinome des cellules 3T3-L1 différenciées stimulées à l'insuline et déficientes en Cdkn2a versus contrôles.

Prédiction des kinases les plus modulées dans les cellules Cdkn2a^{ad/-} et stimulée avec 100nM d'insuline. La partie droite du tableau affiche les PTK en amont prédits classés par leur Kinase score. La partie gauche du tableau affiche les STK en amont prédits classés par leur Kinase score. La statistique de kinase (kinase statistic) reflète la différence d'activité après traitement (par exemple, des valeurs négatives représentent une activité de kinase inhibée). Le score de kinase (kinase score) indique la spécificité de la norme statistique de kinase par rapport au nombre de peptides utilisés pour prédire la kinase correspondante, il classe les kinases en fonction de leur importance et de leur spécificité. Les kinases en amont ont été identifiées à l'aide de la base de données de référence des protéines humaines. Les constituants de la statistique de kinase : Kinase Score et Kinase Statistic sont affichés sous forme de colonnes et les kinases les mieux classées sont présentées en gras dans les rangées (Kinase score >1,19). Le classement final des kinases était basé sur le score final médian.

VIII. Étude de l'extinction de *Cdkn2a* dans un modèle d'adipocyte blanc in vitro : Les 3T3-L1 sous traitement palmitate.

Afin de mimer l'effet de stress métabolique induit par la mise sous régime HFD, nous avons mis en place l'utilisation d'un acide gras saturé utilisé dans la littérature, le palmitate. En effet lors d'une l'hyperglycémie chronique induite dans le DT2, le taux élevé d'acide gras libres est connu pour provoquer une insulino-résistance des tissus périphériques.

Dans un premier temps, nous avons tenté de déterminer les concentrations et temps d'exposition les plus adéquats pour obtenir l'insulino-résistance des cellules 3T3-L1 différencié. Nous nous sommes basées sur les différentes concentrations et temps d'exposition décrits dans la littérature et avons utilisé la phosphorylation d'AKT en Western-blot comme témoins de l'induction de l'insulino-résistance. Les concentrations que nous avons utilisées sont les suivantes : 1mM, 1,5mM et 3mM pendant 48h d'expositions des 3T3-L1 différencié en adipocytes. Ensuite, les cellules ont été stimulées ou non avec 100nM d'insuline pendant 20 minutes avant l'extraction des protéines (Figure 46).

Après une exposition à une concentration de 3mM de palmitate pendant 48h avec une stimulation à l'insuline, une diminution de la p-AKT (d'environ 50%) est observable reflétant la mise en place d'une insulino-résistance. C'est pourquoi nous réaliserons la suite des expériences en exposants les cellules siControl vs si*Cdkn2a* à une concentration de 3mM de palmitate pendant 48h.

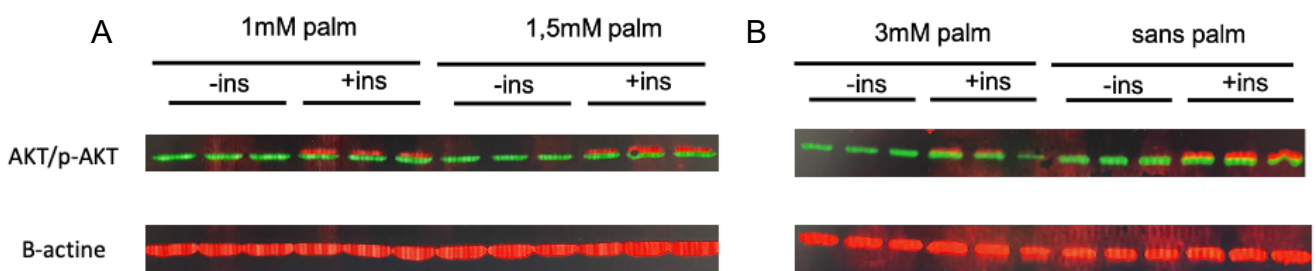


Figure 46. Effet du palmitate sur la sensibilité à l'insuline par mesure de la phosphorylation d'AKT.

A : Test Western blot montrant les niveaux de protéine p-AKT (Ser473, Cell Signaling 9271 dilution au 1/1000) (en vert) et AKT (Cell Signaling 9272 dilution au 1/1000) (rouge en haut) dans 3T3-L1 différenciées en phase terminale traité avec différentes concentrations de palmitate (1mM et 1,5mM). La β -Actin (Santa Cruz sc-47778 dilution au 1/500) (en rouge en bas) a été utilisée comme témoin de chargement. La différenciation a été induite dans des conditions standard. Les cellules différenciées en phase terminale (jour 12) ont été laissées non traitées (-ins) ou incubées pendant 20min avec 100nM d'insuline(+ins). B : Test Western blot montrant les niveaux de protéine p-AKT (Ser473, Cell Signaling 9271 dilution au 1/1000) (en vert) et AKT (Cell Signaling 9272 dilution au 1/1000) (rouge en haut) dans 3T3-L1 différenciées en phase terminale traité avec 3mM de palmitate ou non (sans palm).). La β -Actin (Santa Cruz sc-47778 dilution au 1/500) a été utilisée comme témoin de chargement. La différenciation a été induite dans des conditions standard. Les cellules différenciées en phase terminale (jour 12) ont été laissées non traitées (-ins) ou incubées pendant 20min avec 100nM d'insuline(+ins).

A. Teneur en lipides

Afin de valider l'effet du palmitate et de l'extinction de *Cdkn2a* sur l'accumulation lipidique dans les cellules 3T3-L1 différenciées, une coloration à l'Oil Red-O des cellules stimulées ou non avec de l'insuline 100nM a été réalisée. L'Oil Red O étant un composé chimique avec un pic d'absorbance de 515 nm cela permet de visualiser et de mesurer l'accumulation des lipides. En outre, l'accumulation de lipides dans les cellules a été quantifiée en éluant la coloration Oil Red O à l'aide de l'isopropanol et la densité optique (OD) a été mesurée.

On observe une augmentation dans la teneur en triglycérides des cellules traitées au palmitate (Figure 47) comparée aux cellules non traitées au palmitate (Figure 47). En Effet, les cellules traitées au palmitate présentent une absorbance d'environ 1,4 et d'environ 0,6 pour les cellules non traitées au palmitate.

Aucune différence d'accumulation des gouttelettes lipidiques n'est observable entre les conditions contrôles et inhibées en *Cdkn2a* adipocytaire (Figure 47), ce qui suggère que *Cdkn2a* n'as pas de rôle dans l'accumulation lipidique suite à une stimulation au palmitate.

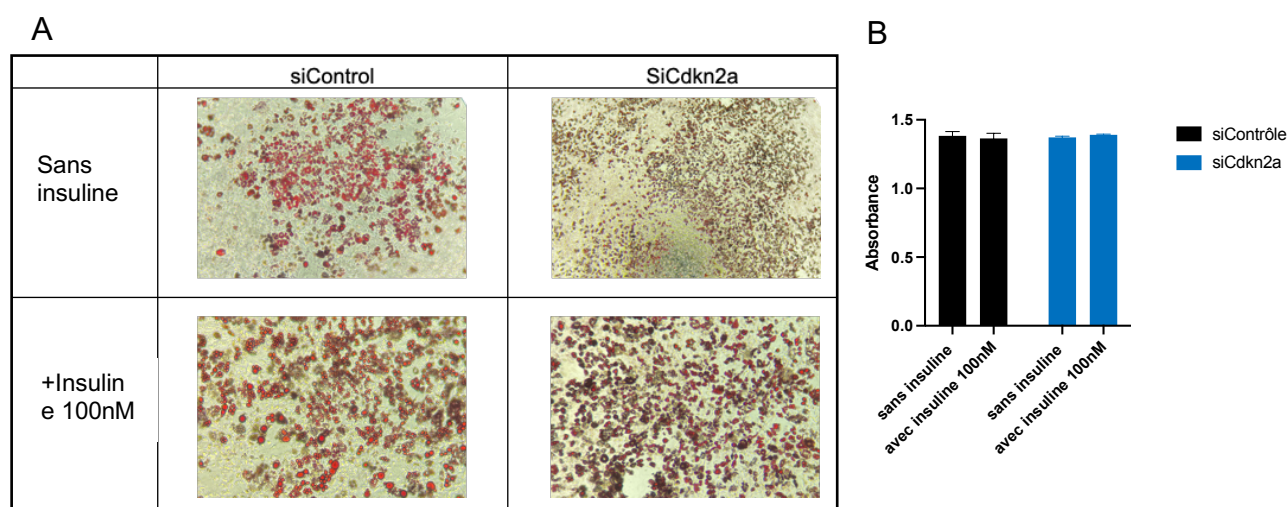


Figure 47. Effet de l'extinction de *Cdkn2a* sur la teneur en triglycérides des cellules 3T3-L1 différenciées.

A : microscopie cellulaire siContrôle vs siCdkn2a Des cellules 3T3-L1 en croissance ont été transfectées avec un siRNA *Cdkn2a* pendant 48h. La différenciation a été induite dans des conditions standard. Les cellules différenciées en phase terminale (jour 12) ont été laissées non traitées (basales) ou incubées pendant 20min avec 100nM d'insuline. B : Absorbance fold change oil Red-O. Les données sont exprimées sous formes de moyenne \pm SEM, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

B. Étude de la respiration mitochondriale

Malgré un traitement au palmitate, les cellules 3T3-L1 présentant une extinction en *Cdkn2a* présentent une meilleure respiration mitochondriale que les cellules témoins, avec principalement une augmentation significative de leur respiration maximale. Corrélée à cette

augmentation de la respiration mitochondriale on observe une augmentation de l'ECAR de ces cellules, c'est à dire une augmentation de l'acidité du milieu qui peut refléter une augmentation de la glycolyse dans ces cellules (Figure 48).

En conclusion, le traitement au palmitate ne modifie pas le profil bioénergétique activé des cellules présentant une extinction de *Cdkn2a* au niveau adipocytaire (Figure 48).

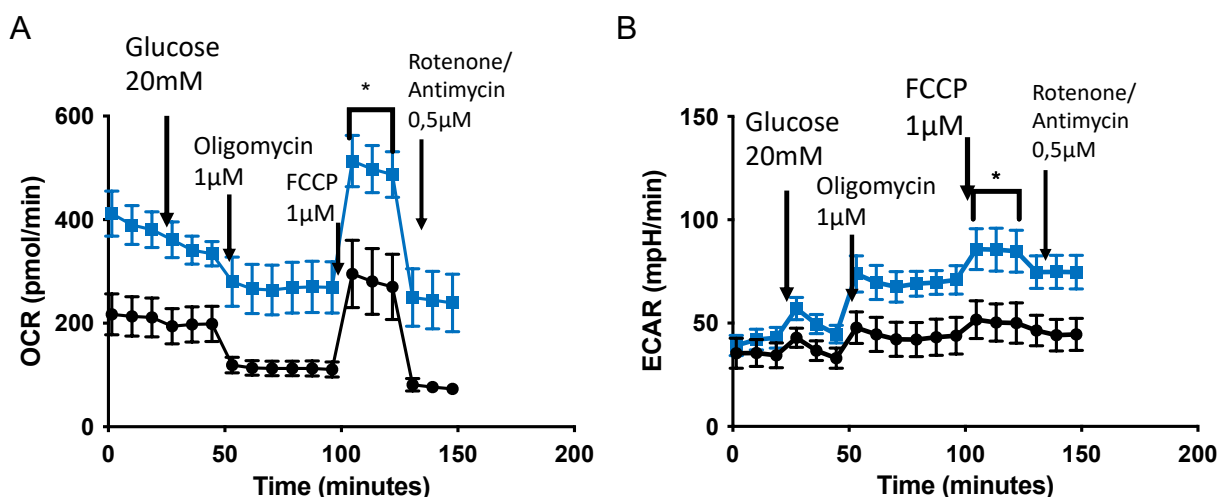


Figure 48. La respiration mitochondriale est améliorée dans les cellules 3T3-L1 siCdkn2a suite à une stimulation au palmitate.

A : Représente les courbes OCR mitochondriales obtenues dans différentes conditions. B : Représente les courbes ECAR obtenues dans différentes conditions. Les données sont représentées sous forme de moyenne \pm SEM. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$ versus groupe témoin.

C. Capture du glucose

En corrélation avec l'augmentation de l'ECAR observé dans les cellules présentant une extinction de *Cdkn2a*, on observe une augmentation significative de l'absorption basale de glucose des adipocytes 3T3-L1 matures (Figure 49), mais pas de changement lors d'une stimulation à l'insuline dans nos conditions expérimentales (Figure 49). Il semble que l'effet de l'extinction de *Cdkn2a* dans l'adipocyte sur l'absorption de glucose n'est pas inhibé par l'ajout du palmitate. Concernant l'effet de l'insuline sur cette absorption de glucose d'autres expériences doivent être réalisées avant de pouvoir conclure.

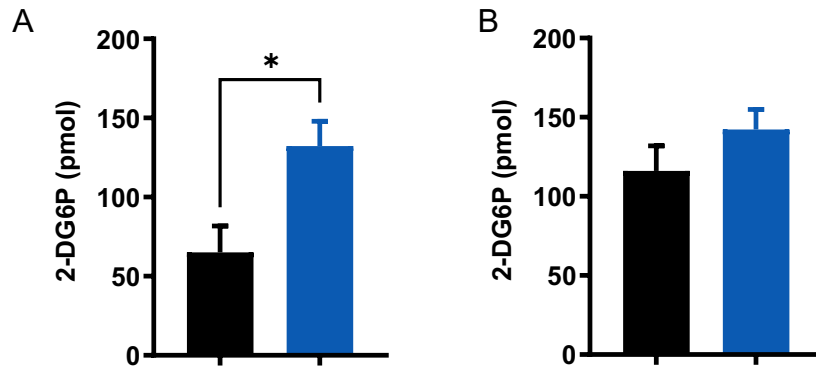


Figure 49. La capture du glucose est améliorée dans les cellules 3T3-L1 siCdkn2a.

A : Les taux d'absorption de 2DG dans les cellules 3T3-L1 différenciés en adipocytes avec une extinction partielle de *Cdkn2a* vs Contrôles avec un traitement palmitate (3mM) ($n = 10$ /conditions). B : Les taux d'absorption de 2DG dans les cellules 3T3-L1 différenciés en adipocytes avec une extinction partielle de *Cdkn2a* vs Contrôles avec un traitement palmitate (3mM) et stimulée à l'insuline (100nM) ($n = 10$ /conditions) Les données sont représentées sous forme de moyenne \pm SEM. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$ versus groupe témoin.

D. Analyse du kinome

Suite à une stimulation au palmitate, l'extinction de *Cdkn2a* dans les 3T3-L1 différenciées module de manière significative la phosphorylation de plusieurs sites de phosphorylation STK et PTK (Figure 50). Sur les 144 peptides STK sur la puce, 12 peptides sont modulés de manière significative. Pour la puce PTK, 26 peptides sur 196 sont significativement modulés. Lorsque l'on stimule ces cellules avec de l'insuline, on observe la modulation significative de 1 peptides en PTK et 31 peptides en STK (Figure 50).

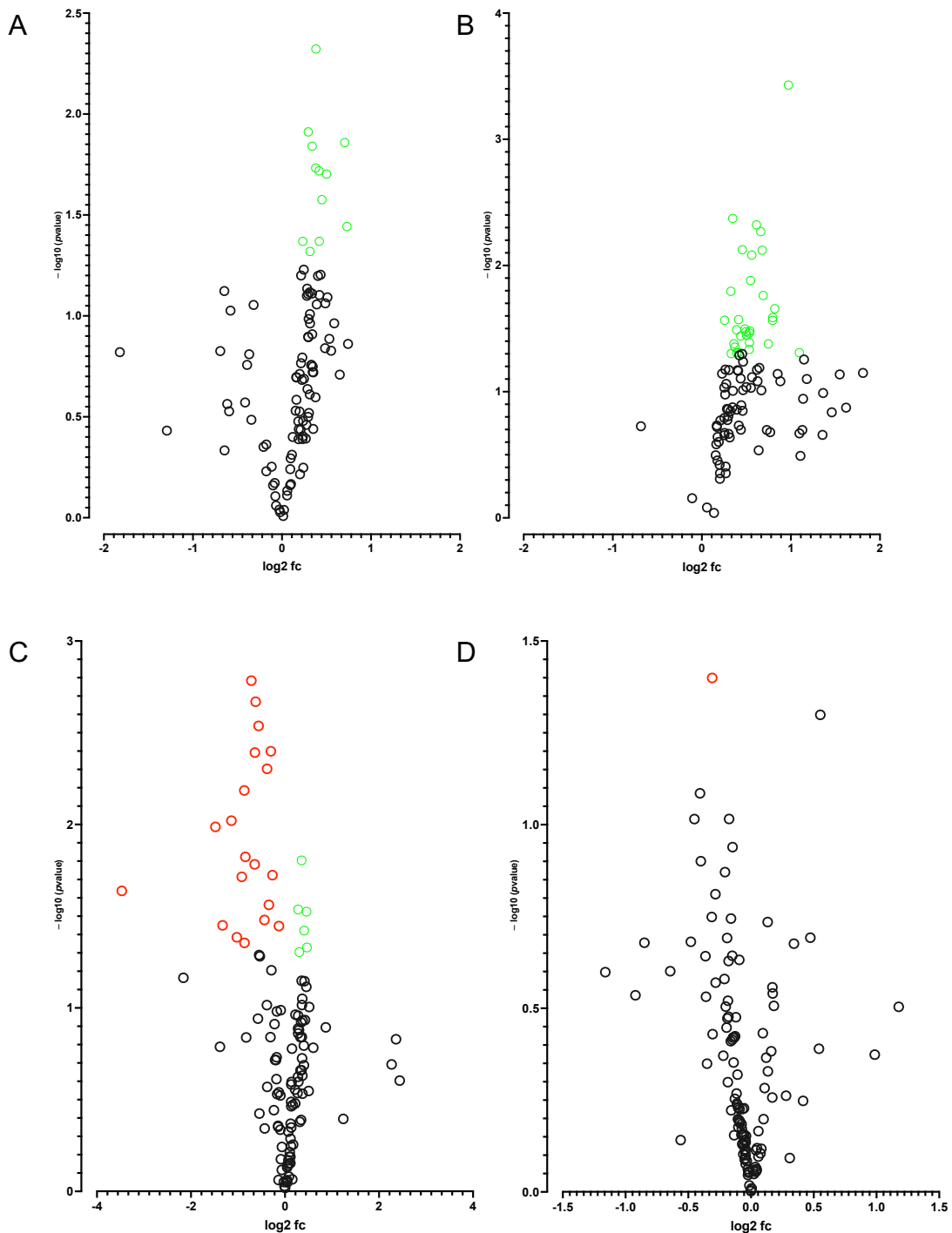


Figure 50. Analyse du kinome des cellules 3T3-L1 différenciées déficientes en CDKN2A versus contrôles après stimulation au palmitate.

A : Volcano-plot de la phosphorylation peptidique STK dans les cellules 3T3-L1 différenciées en adipocytes avec une extinction partielle de Cdkn2a et une stimulation au palmitate (3mM) (n = 3 /conditions). B : Volcano-plot de la phosphorylation peptidique STK dans les cellules 3T3-L1 différenciées en adipocytes avec une extinction partielle de Cdkn2a et une stimulation au palmitate (3mM) et à l'insuline (100nM) (n = 3 /conditions). C : Volcano-plot de la phosphorylation peptidique PTK dans les cellules 3T3-L1 différenciées en adipocytes avec une extinction partielle de Cdkn2a et une stimulation au palmitate (3mM) (n = 3 /conditions). D : Volcano-plot de la phosphorylation peptidique PTK dans les cellules 3T3-L1 différenciées en adipocytes avec une extinction partielle de Cdkn2a et une stimulation au palmitate (3mM) et à l'insuline (100nM) (n = 3 /conditions). En noir : les peptides non significativement modulés, en vert : les peptides significativement modulés avec un $-\text{Log}_{10}(\text{pvalue}) \geq 1,3$ et hyperphosphorylés avec Log_2FC positif et en rouge : les peptides significativement modulés avec un $-\text{Log}_{10}(\text{pvalue}) \geq 1,3$ et hypophosphorylés avec Log_2FC négatif.

L'analyse des kinases associées a mis en avant la modulation d'un certains de nombres de kinases qui sont notamment associées aux familles de kinases Alk, EGFR, Src, STE7 et Syk qui présentent une activité PTK diminuée dans les cellules si*Cdkn2a* (Tableau 6). Concernant les Kinases STK l'ensemble des kinases présente une activité augmentée (Tableau 6). Ces kinases font principalement partie des familles AKT, CDK, PIM, PKA, PKC et PKG.

De façon intéressante, l'implication de la voie de la PKA a été associée de nombreuses fois à l'action de *Cdkn2a* dans différents tissus avec notamment son action dans le l'iWAT lors de l'extinction global de *Cdkn2a* induisant un brunissement de ce tissu. En effet, les adipocytes issues de la SVF différenciées de l'iWAT ont affiché une activité oxydative élevée avec une régulation positive du gène spécifique de la graisse brune et une augmentation de l'activité PKA et des voies de signalisation des récepteurs adrénérgiques[141]. D'autres études ont démontré l'action de la PKA dans les processus de brunissement du TA, avec notamment l'activation de la signalisation de la PKA dans l'induction du brunissement du TA par une écorce de pin maritime français, le Pycnogenol[306].

On observe aussi une augmentation de l'activité de p70S6K et une diminution de l'activité du récepteur à l'insuline INSR (Tableau 6) ce qui semble indiqué une modulation de la voie de rétrocontrôle de l'insuline par l'extinction de *Cdkn2a* puisqu'on observe également une augmentation d'autres acteur de cette voie tel que AKT et mTOR (Tableau 6). Cela est intéressant puisque cette modification a lieu seulement suite à une stimulation au palmitate or il est connu qu'une stimulation au palmitate va induire une résistance à l'insuline avec notamment une diminution de la phosphorylation de AKT (comme vu en Western-Blot Figure 46).



Rank	PTK			STK		
	Kinase Name	Kinase Score	Kinase Statistic	Kinase Name	Kinase Score	Kinase Statistic
1	LTK	2.92	-1.13	Pim1	3.67	0.94
2	MKK3/MAP2K3	2.85	-3.09	Pim3	3.67	0.94
3	MKK6/MAP2K6	2.85	-3.09	PKG2	3.41	1.08
4	ALK	2.80	-0.66	PKG1	3.41	1.03
5	Ros	2.14	-1.82	AMPK[alpha]1	3.07	1.37
6	HER2	2.03	-0.61	Pim2	3.07	0.98
7	Yes	2.02	-0.81	DAPK3	2.90	1.80
8	SEK1/MAP2K4	1.93	-1.28	Akt1/PKB[alpha]	2.56	1.03
9	JAK2	1.87	1.06	ROCK2	2.53	1.62
10	Syk	1.86	-0.45	CDK10	2.47	1.42
11	EphA1	1.81	1.32	PKA[alpha]	2.32	0.88
12	Brk	1.70	-0.44	Akt2/PKB[beta]	2.20	0.92
13	ZAP70	1.66	-0.44	PFTAIRE2	1.93	1.26
14	FAK1	1.40	-0.45	PKC[alpha]	1.92	0.90
15	Ret	1.35	0.66	mTOR/FRAP	1.91	1.29
16	FmS/CSFR	1.30	0.73	PKC[zeta]	1.87	1.04
17	CTK	1.23	-0.54	PKC[theta]	1.85	0.89
18	FGFR3	1.22	0.86	PRKX	1.76	0.91
19	InSR	1.21	-0.55	PKC[eta]	1.75	0.97
20	HER3	1.15	-0.46	p70S6K[beta]	1.73	0.89

Tableau 6. Analyse du kinome des cellules 3T3-L1 différenciées stimulées au palmitate et déficientes en *Cdkn2a* versus contrôles.

Prédiction des kinases les plus modulées dans les cellules *Cdkn2a*^{ad-/-} stimulées avec 3mM de palmitate. La partie droite du tableau affiche les PTK en amont prédits classés par leur Kinase score. La partie gauche du tableau affiche les STK en amont prédits classés par leur Kinase score. La statistique de kinase (kinase statistic) reflète la différence d'activité après traitement (par exemple, des valeurs négatives représentent une activité de kinase inhibée). Le score de kinase (kinase score) indique la spécificité de la norme statistique de kinase par rapport au nombre de peptides utilisés pour prédire la kinase correspondante, il classe les kinases en fonction de leur importance et de leur spécificité. Les kinases en amont ont été identifiées à l'aide de la base de données de référence des protéines humaines. Les constituants de la statistique de kinase : Kinase Score et Kinase Statistic sont affichés sous forme de colonnes et les kinases les mieux classées sont présentées en gras dans les rangées (Kinase score >1,19). Le classement final des kinases était basé sur le score final médian.

L'ensemble des kinases PTK associées présentent une diminution de leur activité dans les cellules si*Cdkn2a* stimulées à l'insuline (Tableau 7). On retrouve parmi ces kinases les familles Alk, CAMKL, EGFR, PDGFR et Src. A l'inverse, l'ensemble des kinases STK associées présentent une activité augmentée dans les cellules si*Cdkn2a* stimulées à l'insuline (Tableau 7) avec notamment les kinases des familles AUR, CAMKL, CDK, IKK, MAPKAPK et PKA.

Comme observé dans les cellules avec traitement palmitate présentant une extinction de *Cdkn2a* une augmentation de l'activité de l'AMPK et de la PKA est aussi observé dans les cellules traitées au palmitate et présentant une extinction de *Cdkn2a* stimulées à l'insuline. Ces données suggèrent donc une stimulation des processus de brunissement dans les cellules présentant une extinction de *Cdkn2a* et stimulée au palmitate et à l'insuline.



Rank	PTK			STK		
	Kinase Name	Kinase Score	Kinase Statistic	Kinase Name	Kinase Score	Kinase Statistic
1	Yes	2.21	-0.44	CHK1	2.83	2.22
2	Fyn	2.03	-0.47	DCAMKL1	2.78	2.92
3	HER3	1.79	-0.37	ICK	2.67	2.96
4	ALK	1.53	-0.36	Nek2	2.53	2.80
5	Lyn	1.52	-0.40	MAPKAPK2	2.28	1.65
6	Ros	1.29	-0.53	AurA/Aur2	2.26	2.10
7	Fer	1.17	-0.46	PFTAIRE2	2.07	1.92
8	HER4	1.15	-0.34	ATR	2.06	1.87
9	ZAP70	1.01	-0.29	CDK10	2.06	1.91
10	BLK	0.94	-0.31	CDK9	2.04	1.79
11	CHK1	0.92	-0.48	AMPK[alpha]1	1.88	1.67
12	FRK	0.91	-0.29	AurB/Aur1	1.84	1.78
13	CTK	0.91	-0.32	IKK[alpha]	1.74	1.69
14	HER2	0.91	-0.29	PKA[alpha]	1.74	1.48
15	EGFR	0.85	-0.28	MAPKAPK3	1.72	1.50
16	Kit	0.85	-0.31	CK1[alpha]	1.70	1.59
17	LTK	0.85	-0.32	CDK5	1.69	1.58
18	FmS/CSFR	0.80	-0.39	PRKY	1.65	1.53
19	Brk	0.80	-0.27	RSKL1	1.62	1.66
20	TEC	0.79	-0.27	IKK[beta]	1.55	1.57

Tableau 7. Analyse du kinome des cellules 3T3-L1 différenciées stimulées au palmitate, à l'insuline et déficientes en Cdkn2a versus contrôles.

Prédiction des kinases les plus modulées dans les cellules *Cdkn2a^{ad-/-}* stimulées avec 3mM de palmitate et 100nM d'insuline. La partie droite du tableau affiche les PTK en amont prédits classés par leur Kinase score. La partie gauche du tableau affiche les STK en amont prédits classés par leur Kinase score. La statistique de kinase (kinase statistic) reflète la différence d'activité après traitement (par exemple, des valeurs négatives représentent une activité de kinase inhibée). Le score de kinase (kinase score) indique la spécificité de la norme statistique de kinase par rapport au nombre de peptides utilisés pour prédire la kinase correspondante, il classe les kinases en fonction de leur importance et de leur spécificité. Les kinases en amont ont été identifiées à l'aide de la base de données de référence des protéines humaines. Les constituants de la statistique de kinase : Kinase Score et Kinase Statistic sont affichés sous forme de colonnes et les kinases les mieux classées sont présentées en gras dans les rangées (Kinase score >1,19). Le classement final des kinases était basé sur le score final médian.

IX. Conclusion

Dans un premier temps, l'étude de l'extinction spécifique de *Cdkn2a* dans l'adipocyte chez la souris a mis en évidence l'effet métabolique de cette délétion suite à la mise sous HFD des animaux. En effet, les souris *Cdkn2a^{ad-/-}* présentent un profil métabolique amélioré avec une meilleure tolérance au glucose sans modification des paramètres insulinémiques, une hypoleptinémie et hyporésistinémie associées à une augmentation de la dépense énergétique.

L'étude histologique des tissus n'a montré aucun brunissement des tissus adipeux blancs, mettant en avant que l'extinction spécifique de *Cdkn2a* dans l'adipocyte mature ne soit pas suffisante. Nous émettons l'hypothèse que le brunissement du tissu adipeux inguinale observé dans le KO global n'est pas adipocyte spécifique mais qu'il est probablement dû à des



effets de la communication inter-organes ou dû à une action au niveau des précurseurs adipocytaires.

De plus, l'étude des mécanismes transcriptomiques régulés par *Cdkn2a* dans l'adipocyte mature montre une diminution de la réponse inflammatoire, une augmentation des voies pro-adipogéniques et de l'apoptose dans le BAT associée à une augmentation globale des voies métaboliques impliquées dans l'utilisation des substrats énergétiques, en particulier le métabolisme du glucose et l'activité oxydative dans l'eWAT.

L'étude de ces processus dans un modèle *in vitro* de 3T3-L1 a validé ces données avec notamment une augmentation de la respiration mitochondriale et de la capture du glucose en basal, suggérant un effet de *Cdkn2a* en basal probablement médié *via*, au moins en partie, par l'activité de l'AMPK, ou encore la PKA et la voie de p70S6K.

Malgré l'absence de brunissement dans notre modèle adipocyte spécifique, les différents résultats obtenus nous ont permis de montrer l'action de *Cdkn2a* au niveau de l'adipocyte mature dans le contrôle de l'homéostasie énergétique et lipidique par des voies différentes que celles utilisées pour réguler le cycle cellulaire, ainsi que son implication dans la régulation de la plasticité du tissu adipeux au cours de l'obésité.

Partie II : étude de l'extinction de *CDKN2A* dans les hiPSC-BAP 3D

Article : La délétion de *CDKN2A* dans les progéniteurs adipeux bruns dérivés des hiPSC 3D potentialise la différenciation, le métabolisme oxydatif et le processus de brunissement.

(Knocking Down *CDKN2A* in 3D hiPSC-Derived Brown Adipose Progenitors Potentiates Differentiation, Oxidative Metabolism and Browning Process)

Yasmina Kahoul, Xi Yao, Frédérik Oger, Maeva Moreno, Souhila Amanzougarene, Mehdi Derhourhi, Emmanuelle Durand, Raphael Boutry, Amélie Bonnefond, Philippe Froguel, Christian Dani, Jean-Sébastien Annicotte and Christophe Breton

Cells, 10 Mars 2023

DOI : <https://doi.org/10.3390/cells12060870>

Résumé de l'étude :

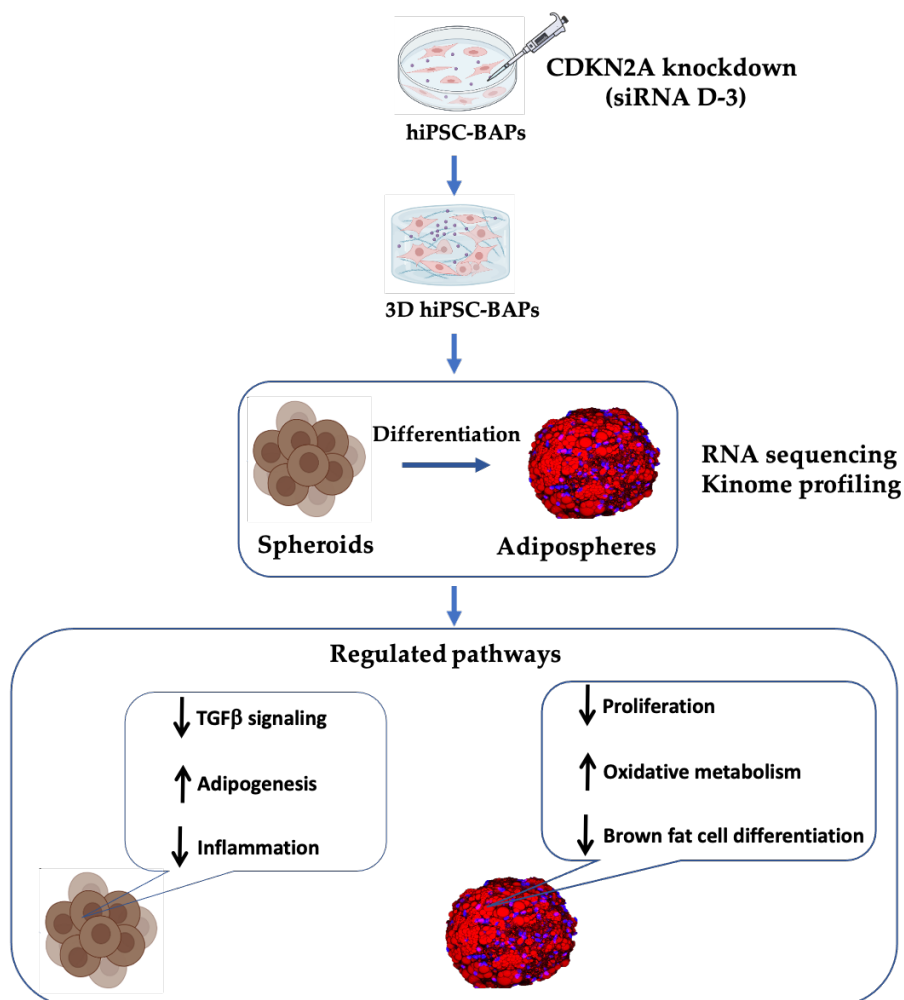


Figure 51. Graphical abstract Knocking Down *CDKN2A* in 3D hiPSC-Derived Brown Adipose Progenitors Potentiates Differentiation, Oxidative Metabolism and Browning Process.



Les données publiées précédemment par le laboratoire renforcent l'hypothèse que *CDKN2A* est une cible potentielle dans le traitement de l'obésité et le diabète de type 2 [141]. La modulation de la signalisation *CDKN2A* dans les adipocytes pourrait donc représenter une nouvelle stratégie thérapeutique. Il est donc intéressant de comprendre la modulation des cascades de signalisation régulées par *CDKN2A*. Les cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPSC) ont le potentiel d'être différenciées en n'importe quel type de cellules, faisant de ces cellules une source illimitée de cellules pour étudier la thérapie cellulaire de l'obésité. Plusieurs études ont établi le potentiel thérapeutique de différencier les hiPSC en adipocytes bruns (hiPSC-BAP). Mais malheureusement, il est bien connu qu'une limitation de l'utilisation des adipocytes bruns dérivés des hiPSCs dans les conditions 2D est due à leur faible capacité de différenciation adipocytaire et à leur faible niveau d'expression d'UCP-1 [314]. Afin de s'affranchir de cette limite, l'utilisation de nouvelle méthode de culture pour améliorer la pertinence physiologique et l'efficacité du modèle comme le développement de la culture 3D, qui permet la formation d'une structure de type organoïde, semble intéressante [315].

C'est pourquoi, nous avons étudié en collaboration avec l'équipe du Dr Christian Dani l'effet de l'extinction de *CDKN2A* dans les hiPSC-BAP 3D avant (D0) et après différenciation (D10).

Dans un premier temps, nous avons utilisé une approche génomique afin de déterminer les voies de signalisation modulées par *CDKN2A*. Ensuite, nous avons étudié le kinome de ces cellules, les kinases sont une famille de protéines jouant un rôle essentiel dans la transduction du signal et impliquées de nombreux processus cellulaires. En effet, les deux protéines pour lesquelles *CDKN2A* code p16^{INK4a} (inhibitor of kinase a) et p14^{ARF} (alternatif reading frame) sont des régulateurs clé de l'activité kinase. Nous avons donc réalisé une analyse globale du kinome dans des hiPSC-BAP non différencié (D0) et différencié (D10) *via* la technologie Pamgene.







Dans cette étude, nous avons démontré que *CDKN2A* joue un rôle important dans le recrutement et la maturation adipocytaire de type brun d'une manière cellulaire autonome. Nos données soulignent les effets potentiels de ce locus dans les cellules progénitrices sur le processus de brunissement, en utilisant des voies alternatives à celles utilisées pour réguler le cycle cellulaire. En particulier, nous avons montré que les voies de signalisation AMPK, p38 MAPK et Gas/cAMP/PKA sont des cibles clés suite à l'extinction de *CDKN2A*. Des études supplémentaires sont nécessaires pour mieux délimiter les contributions de ces kinases et pour identifier les activateurs directs et indirects sous-jacents à l'induction du processus de brunissement dans les cellules souches déficientes en *CDKN2A*. Ainsi, cibler des voies de signalisation alternatives *CDKN2A* qui ne sont pas impliquées dans les effets suppresseurs et

anti-prolifératifs des tumeurs, mais qui sont à l'origine du processus de brunissement des PA, peut représenter une nouvelle stratégie pour reprogrammer la réponse cellulaire et développer des approches thérapeutiques contre l'obésité et le DT2.



Article

Knocking Down *CDKN2A* in 3D hiPSC-Derived Brown Adipose Progenitors Potentiates Differentiation, Oxidative Metabolism and Browning Process

Yasmina Kahoul ^{1,†} , Xi Yao ^{2,†}, Frédérik Oger ¹ , Maeva Moreno ¹, Souhila Amanzougarene ¹, Mehdi Derhourhi ¹, Emmanuelle Durand ¹, Raphael Boutry ¹, Amélie Bonnefond ^{1,3} , Philippe Froguel ^{1,3}, Christian Dani ^{2,*} , Jean-Sébastien Annicotte ^{4,*}  and Christophe Breton ^{1,*} 

¹ Univ. Lille, INSERM, CNRS, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1283-UMR8199-EGID, F-59000 Lille, France

² Faculté de Médecine, CNRS, INSERM, iBV, Université Côte d'Azur, CEDEX 2, F-06107 Nice, France

³ Department of Metabolism, Imperial College London, London SW7 2BX, UK

⁴ Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur Lille, U1167 - RID-AGE - Facteurs de Risque et Déterminants Moléculaires des Maladies liées au Vieillessement, F-59000 Lille, France

* Correspondence: christian.dani@univ-cotedazur.fr (C.D.); jean-sebastien.annicotte@inserm.fr (J.-S.A.); christophe.breton@univ-lille.fr (C.B.)

† These authors contributed equally to this work.

‡ Co-senior author.

Abstract: Human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) have the potential to be differentiated into any cell type, making them a relevant tool for therapeutic purposes such as cell-based therapies. In particular, they show great promise for obesity treatment as they represent an unlimited source of brown/beige adipose progenitors (hiPSC-BAPs). However, the low brown/beige adipocyte differentiation potential in 2D cultures represents a strong limitation for clinical use. In adipose tissue, besides its cell cycle regulator functions, the cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (*CDKN2A*) locus modulates the commitment of stem cells to the brown-like type fate, mature adipocyte energy metabolism and the browning of adipose tissue. Here, using a new method of hiPSC-BAPs 3D culture, via the formation of an organoid-like structure, we silenced *CDKN2A* expression during hiPSC-BAP adipogenic differentiation and observed that knocking down *CDKN2A* potentiates adipogenesis, oxidative metabolism and the browning process, resulting in brown-like adipocytes by promoting UCP1 expression and beige markers. Our results suggest that modulating *CDKN2A* levels could be relevant for hiPSC-BAPs cell-based therapies.

Keywords: human induced pluripotent stem cells; adipocytes; brown adipose progenitor; browning; 3D culture; *CDKN2A*; UCP1; thermogenesis



Citation: Kahoul, Y.; Yao, X.; Oger, F.; Moreno, M.; Amanzougarene, S.; Derhourhi, M.; Durand, E.; Boutry, R.; Bonnefond, A.; Froguel, P.; et al. Knocking Down *CDKN2A* in 3D hiPSC-Derived Brown Adipose Progenitors Potentiates Differentiation, Oxidative Metabolism and Browning Process. *Cells* **2023**, *12*, 870. <https://doi.org/10.3390/cells12060870>

Academic Editor: Giovanni Amabile

Received: 31 January 2023

Revised: 1 March 2023

Accepted: 3 March 2023

Published: 10 March 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Obesity is considered the main risk factor for type 2 diabetes (T2D), mainly due to the excessive accumulation of adipose tissue (AT) [1]. The expansion of AT in obese individuals is a direct cause of the comorbidities, due to the excessive accumulation of triglycerides (TG) within adipocytes, leading to inflammation and insulin resistance. In mammals, there are two major types of AT that are anatomically and functionally distinct: white (WAT) and brown (BAT). White adipocytes store excess energy as TG and release free fatty acids as energy substrate during periods of negative energy balance. BAT differs from WAT by its cellular origin, and is specialized in energy expenditure and the production of heat, mainly through active fat oxidation [2]. Elevated energy expenditure in BAT is correlated with high expression levels of a specific mitochondrial protein named uncoupling protein 1 (UCP1). More recently, the presence of a subtype of thermogenic adipocytes within WAT that also expresses UCP1 has been reported. These inducible adipocytes, named beige, are

distinct from white and brown adipocytes. They mainly arise from noradrenergic stimulation or cold exposure. The conversion of white adipocytes into brown-like adipocytes is called browning [3]. Obese individuals are characterized by increased WAT mass and decreased brown and beige AT mass and activity [4]. Increasing energy expenditure by BAT activation or by promoting the browning of WAT may represent a new therapeutic avenue to prevent insulin resistance in obesity and T2D [5]. In humans, cold exposure enhances metabolic activity and thermogenesis in BAT. This increase is accompanied by increased insulin sensitivity in diabetic patients [6]. The transplantation of BAT or brown adipocytes isolated from human adipose progenitors (APs) into the visceral cavity of mice reverses metabolic syndrome and T2D, constituting a potential translatable therapeutic tool to improve metabolic health [7]. Since beige adipocytes can arise through de novo differentiation from undifferentiated APs or via the conversion of mature white adipocytes into UCP1-positive cells, referred to as transdifferentiation [8–10], the identification of selective molecular pathways and underlying mechanisms involved in beige adipocyte biogenesis may represent a first step towards innovative therapeutic options.

Genome-wide association studies have established that several single nucleotide polymorphisms, including loss-of function mutations in the cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (*CDKN2A*) locus, affect glycemia, insulin values and T2D risk, implying a role in glucose and insulin sensitivity regulation [11,12]. The human *CDKN2A* locus encodes two proteins, the Cyclin Dependent Kinase inhibitory (CDKI) p16INK4a protein and the p53 regulatory protein p14ARF (p19ARF in mice). The p16INK4a protein is a potent CDKI preventing the binding of CDK4/6 to Cyclin D, controlling the CDK4-pRB-E2F1 pathway; whereas p14ARF mainly exerts its activity via the inhibition of MDM2, a ubiquitin-ligase that promotes the degradation of p53 [11,12]. In AT, besides its cell cycle regulator functions (i.e., anti-proliferative and tumor suppressor), the *CDKN2A* locus also controls the commitment of stem cells to the brown-like type fate and mature adipocyte energy metabolism [13–15]. We have shown that mice with a germline disruption of the *Cdkn2a* gene (*Cdkn2a*^{-/-}) fed a high-fat diet are protected against diet induced obesity (DIO) by increasing thermogenesis via inguinal (ing) WAT beiging, resulting in improved insulin sensitivity associated with the activation of the PKA pathway [16]. In this study, we have also observed that *CDKN2A* expression is increased in adipocytes from obese, compared to lean, subjects [16]. Consistent with these findings, a recent study reported that silencing *Cdkn2a* expression in cold-inducible beige APs results in a rejuvenation of beige adipocyte formation, restoring cold-induced thermogenesis in old mice [13]. The authors also showed that silencing *Cdkn2a* expression in UCP1+ cells within ingWAT that display progenitor-like characteristics stimulates new beige fat formation through cell proliferation via a cell-autonomous role [17]. Overall, these data indicate the existence of an inverse correlation between the expression level of *CDKN2A* and beige adipocyte activity, further supporting the notion that cell-cycle genes may be involved in controlling a white-to-beige/brown fat transition that involves APs, beige adipocyte expansion and their activity in a cell-autonomous manner.

Human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) have the potential to be differentiated into any cell type, making these cells an unlimited source for studying cell-based therapy. In particular, several studies have established the therapeutic potential of hiPSCs differentiated into brown adipocytes progenitors (hiPSC-BAP) against obesity and associated metabolic disorders [18]. However, the limitation of the use of hiPSC-BAPs in 2D cultures is due to their low adipocyte capacity and their low expression levels of UCP1 [18]. Here, to overcome this limit, we report a new method of 3D culture, via the formation of an organoid-like structure, which enhances the capacity for differentiation and the browning process of hiPSC-BAPs [19]. We have previously reported that silencing *CDKN2A* expression during hiPSC-BAP adipogenic differentiation in 2D cultures promotes UCP1 expression [16]. In this study, we investigated the effects of *CDKN2A* silencing in hiPSC-BAP in improved 3D cultures. Understanding how *Cdkn2a* can relay to initiate a thermogenic program in hiPSC-BAPs is a first step to envisage activating beiging as a new putative therapy to alleviate the effects of obesity and to prevent insulin resistance and T2D. RNA-sequencing

(RNA-seq) analysis and kinase activity profiling of hiPSC-BAP further demonstrate that *CDKN2A* silencing enhances pathways involved in adipogenesis, oxidative metabolism and the browning process, resulting in the reprogramming of brown-like adipocytes by promoting UCP1 expression and beige markers.

2. Materials and Methods

2.1. Cell Culture and siRNA Experiments

hiPSC-BAPs, derived from the hiPSC line NOK6 were grown in standard tissue culture conditions at 37 °C with 5% CO₂ as previously described [20]. The growth medium was DMEM low glucose supplemented with L-glutamine (2 mM), penicillin–streptomycin 5000 IU/mL–5000 g/mL (Pen/Strep), 10% FBS and 2.5 ng/mL FGF2.

2.1.1. Generation of hiPSC-Derived Brown-like Adipospheres

The generation of spheroids and their adipogenic differentiation was performed as we recently described in detail [21]. Briefly, 1×10^6 hiPSC-BAPs were seeded per well of 24 well Ultra-Low Attachment (ULA) plate (Corning 3473, Fischer scientific, Illkirch-Graffenstaden, France) for three days for spheroid formation. Then, to differentiate spheroids, the growth medium was changed to a differentiation medium composed of EBM-2 (Lonza, Colmar, France) supplemented with 0.1% FCS, IBMX (0.5 mM), dexamethasone (0.25 μM), T3 (0.2 nM), insulin (170 nM), rosiglitazone (1 μM), SB431542 (5 μM), and a EGM-2 cocktail (Lonza, CC-3121) including ascorbic acid, hydrocortisone and EGF. IBMX and dexamethasone were maintained only for the first 3 days of differentiation. SB431542 and EGF were removed after the first 9 days of differentiation. Spheroids were maintained in the differentiation medium for up to 20 days, with the medium changed once a week.

2.1.2. siRNA Transfection

siRNAs (Human *CDKN2A* siRNASmart pool, GEHealth Bio-Sciences, Rosersberg, Sweden) were transfected at the time when hiPSC-BAPs were in suspension for spheroid formation. One hundred nM siRNAs were transfected in a medium containing 60% DMEM low glucose, 40% MCDB-201, 1×10^6 ITS, dexamethasone (10^{-9} M), and ascorbic sodium acid (100 mM) using HiPerFect (Qiagen, Courtaboeuf, France) transfection reagent as described by the supplier. Cells were then maintained in conditions to form spheroids and were induced to differentiate as described above.

2.2. RNA Extraction and RNA-Sequencing

Total RNA was extracted from the hiPSC-BAP 3D at D0 and D10 of differentiation using TRIzol™ Reagent (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). The quality of the RNAs was verified with RNA 6000 nanochips on the Agilent 2100 bioanalyser. Purified RNA (200 ng) was used for the library preparation. Briefly, RNA libraries were prepared using the TruSeq Stranded mRNA Library Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) following the manufacturer's instructions. The libraries were sequenced on the NextSeq system (Illumina) using a paired-end 2x75 bp protocol. Three biological replicates per condition were sequenced. The GEO accession number for the sequencing data was GSE223241.

2.3. Proteins Extraction and PamGene Kinase Assay

Proteins from spheroids and adipospheres were extracted for PamGene kinase assay as previously described [16]. Tyrosine (PTK) and serine/threonine kinase (STK) activity was investigated with PTK and STK microarrays purchased from PamGene (PamGene International BV, 's-Hertogenbosch, The Netherlands). The experiments were performed as described in the manufacturer's instructions.

2.4. Bioinformatic Analysis

For RNA sequencing, the demultiplexing of the sequence data was performed using bcl2fastq Conversion Software (Illumina; bcl2fastq v2.19.1). The trimming of adapter sequences was performed using cutadapt software (version 1.7.1). Reads quality control was assessed using FastQC (v0.11.5). Subsequently, sequence reads from FASTQ files were aligned to the human genome GRCh38, downloaded from Ensembl 108. Alignment was performed using STAR aligner (version 2.5.2b). Over 19 millions of 75 base pairs PE-reads reads were generated per sample. The normalized counts of the different genes and isoforms were performed using RSEM (v1.2.31) using a GTF from Ensembl 108. Finally differential expression was performed using R version 3.6.3 and DESeq2 package v1.24.0. An adjusted p -value < 0.05 , $\text{Log}_2\text{FC} > 1$ and $\text{Log}_2\text{FC} < -1$ were set as thresholds. We then performed pathway analysis using the core analysis function of Ingenuity Pathway analysis (IPA) (Qiagen) and the Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) was done using GSEA software version 4.3.2 (GSEA; <http://software.broadinstitute.org/gsea/> (accessed on 3 October 2022)). All GSEA data showed had a p -value < 0.05 .

For Pamgene analysis, image acquisition and data analysis were performed according to the manufacturer's instructions as previously described [16]. Data and upstream kinase analysis were conducted using the Bionavigator software v.6.3.67.0 developed by PamGene. Peptides and kinases with an adjusted p -value < 0.05 , $\text{Log}_2\text{FC} > 1$ and $\text{Log}_2\text{FC} < -1$ were set as thresholds.

2.5. Statistical Analysis

Data are presented as mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using unpaired two-tailed Student's t -test, using GraphPad Prism software. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$ (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$).

3. Results

3.1. Characterization of the Differentiation Process of hiPSC-BAPs into Adipocytes in 3D Culture

Adipogenic differentiation of hiPSC-BAPs was performed as summarized in Figure 1. Briefly, hiPSC-BAPs were plated, transfected with siRNA, and differentiation was triggered 3 days later, for 10 days. RNA-seq and Pamgene experiments were performed before (at D0) and after (at D10) differentiation.

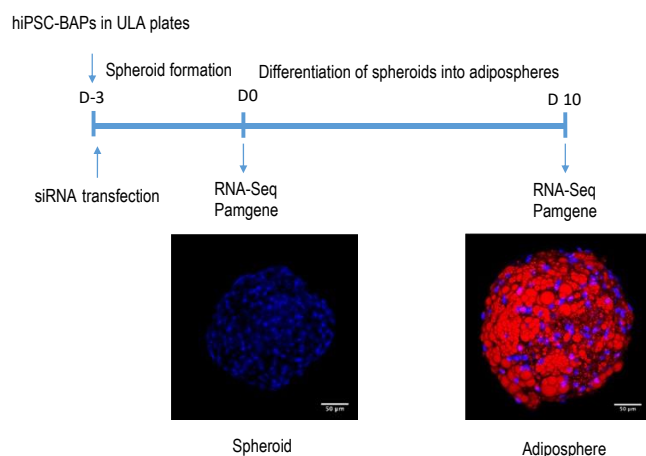


Figure 1. Protocol of hiPSC-BAP differentiation into adipospheres. hiPSC-BAPs were plated into low adherent plates (ULA) and transfected with the control siRNA or the *CDKN2A* siRNA. Three days (D-3) after, spheroids formed and then were induced to undergo differentiation into adipospheres. Confocal images are shown. Blue: DAPI for nuclei staining. Red: Oil Red O for lipid droplets staining. Scale: 50 μm . RNA-Seq and Pamgene analyses were performed at day 0 (D0) and day 10 (D10).

3.1.1. Transcriptome Analysis of the Adipogenic Differentiation of hiPSC-BAPs in 3D Culture

Expression profile differences in the transcriptome of spheroids before differentiation (D0) vs. adipospheres after differentiation (D10) were determined by RNA-seq analysis. The 3D culture markedly affects the hiPSC-BAP mRNA expression levels. Transcriptomic analysis revealed 3484 significantly differentially expressed genes (1644 up-regulated and 1840 down-regulated) between D0 and D10 groups (Figure 2A). Overall, RNA-seq analysis revealed that adipogenesis (i.e., upregulation of PPAR γ and CEBP α ; downregulation of DIO2), markers of mature adipocytes (i.e., upregulation of ADIPOQ and PLIN1), oxidative metabolism pathways and browning adipocyte capacity (i.e., upregulation of FABP4, CIDEA, PGC1 α and UCP1) are markedly activated in 10 days-differentiated 3D adipospheres (Figure S1). We also found that mRNA expression levels of DIO2, an enzyme that catalyzes T4 to T3 conversion [22], were markedly downregulated. Given that T3 is present in the differentiation medium of hiPSC-BAPs, the reduction of DIO2 may reflect active adipocyte differentiation which already adopts a brown-like phenotype [23].

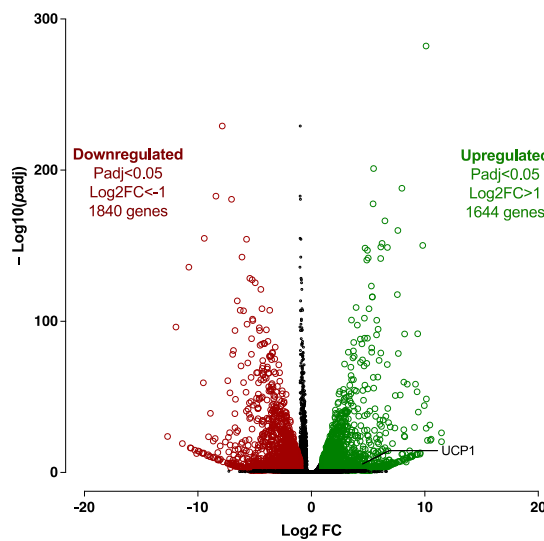
After IPA and GSEA analysis, we found that several pro-adipogenic pathways were markedly modified in the D10 vs. D0 groups. We observed the activation of the cholesterol biosynthesis, LXR/RXR and PPAR signaling pathways (Figures 2C and S3); and the repression of the sirtuin, matrix metalloprotease, acute phase response, osteoarthritis, hepatic fibrosis and TGF β signaling pathways (Figures 2B and S3). Rosiglitazone, CEBPs, IL4 and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) are major upstream regulators of up-regulated pathways (Figure S2). Other over-expressed pathways were those involved in cellular oxidative metabolism such as oxidative phosphorylation, fatty acid oxidation, ketogenesis, as well as amino acid and noradrenaline degradation pathways (Figures 2C and S3) which are essential for adipogenesis and browning adipocyte capacity [24,25].

3.1.2. Kinome Profiling of the Adipogenic Differentiation of hiPSC-BAPs in 3D Culture

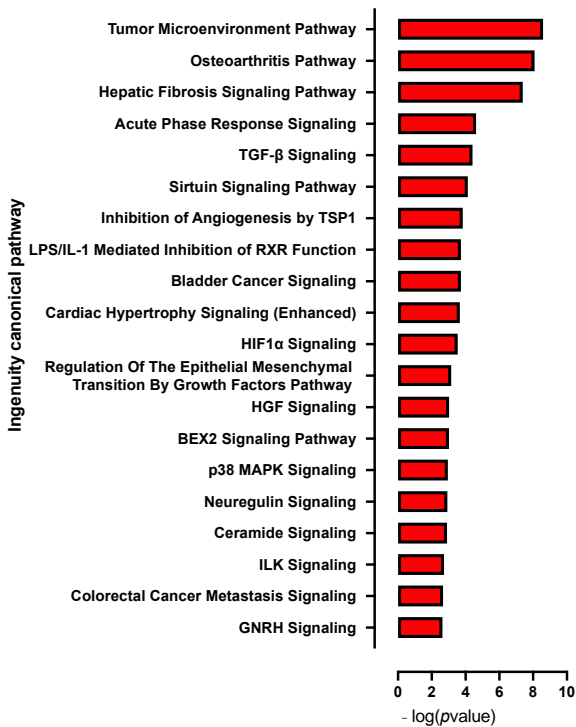
Then, we used Pamgene arrays containing serine/threonine (STK) and phosphotyrosine (PTK) peptides that were incubated with protein lysates of hiPSC-BAP adipospheres before (D0) and after differentiation (D10), as previously described [16].

A global decrease in phosphorylation of both phosphorylation sites was observed at D10 vs. D0 (Figure 3A,B). Significant differences in phosphorylation for 5 out of 144 peptides (STK, Figure 3A and Table S2) and for 14 out of 196 peptides (PTK, Figure 3B and Table S2) were evidenced. Using a combined Bionavigator and IPA analysis to identify potential upstream kinases, we found several kinases that displayed differential STK (Figure 3C and Table S1) and PTK (Figure 3D and Table S1) phosphorylation at D10 vs. D0.

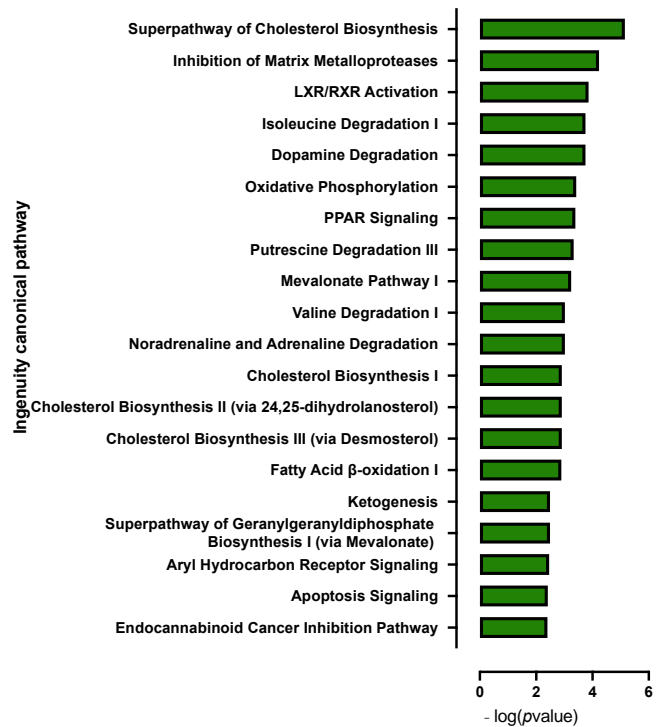
In line with RNA-seq analysis, global pro-adipogenic pathways whose phosphorylation levels were modified were identified, such as cell cycle regulation, adipogenesis, VEGF, fibroblast growth factor (FGF), as well as PTEN and JAK2/STAT3 signaling pathways (STK, Figure 4A and PTK, Figure 4B), which are implicated in proliferation/differentiation during the early stages of adipogenesis [24,25]. Among them, the intracellular mitogen-activated protein kinase (MAPK) and the three pathways: extracellular signal-regulated kinases (ERK1, 2, 5 and 7), Jun N-terminal kinases (JNKs) and p38 (Figure 3C and Table S1), as well as the FGF receptor family (FGFR 1, 2, 3 and 4) (Figure 3D and Table S1), involved in proliferative activity during adipogenesis [24], displayed lower phosphorylation.



(A)



(B)



(C)

Figure 2. Transcriptomic analysis of 10 days-differentiated 3D adipospheres (D10 vs. D0). (A) A volcano-plot of differentially regulated *gene* expression. UCP1 is indicated in black. Enrichment of IPA biological process terms for down-regulated (B) and up-regulated (C) genes following differentiation. IPA terms are plotted against the negative log of corrected *p*-values. Most down-regulated (B) and up-regulated (C) enriched pathways.

3.2. Knock-Down of *Cdkn2a* Potentiates the Capacity of Adipogenic Differentiation of Spheroids at D0

Given that *Cdkn2a* might be required in the APs-specific browning process, we decided to assess selective molecular pathways and the underlying mechanisms involved in this process in *CDKN2A*-deficient hiPSC-BAPs. Expression profile differences in spheroid

transcriptome at spheroid stages of differentiation (D0, progenitor stage) between *CDKN2A*-deficient and control spheroids were determined by RNA-seq. Transcriptomic analysis revealed 245 significantly differentially expressed genes (121 up-regulated and 124 down-regulated) between both groups (Figure 5A). The reduction in *CDKN2A* mRNA expression levels was validated in spheroids at D0 (Figure S4). Overall, RNA-seq analysis showed that *CDKN2A*-deficient spheroids exhibit greater adipogenic potential (i.e., downregulation of *DIO2*) with an anti-inflammatory profile (Figure S4). Computational analysis indicated that pro-adipogenic pathways such as LXR/RXR, PPAR and CXCR4 (chemokine receptor) are activated (Figures 5C and S5); whereas pathways involved in inflammatory response and TGF β signaling pathways were repressed (Figures 5B and S5) in *CDKN2A*-deficient vs. control spheroids [24]. Pro-adipogenic factors such as PTGER2 (prostaglandin receptor), VEGF, AREG (retinoic acid signaling) and FOXM1 (Forkhead Box M1) are major upstream regulators of up-regulated pathways (Figure S5), and pro-inflammatory signaling pathways (IL6, IL1 α , IL17 α , NF κ B, IL1 β , TNF) are major upstream regulators of down-regulated pathways (Figures S5 and S6) [24]. Up-regulation of the molecular pathways involved in oxidative activity was also observed (Figure S6); whereas no significant change was evidenced in UCP1 RNA expression levels at the D0 progenitor stage (Figure S4).

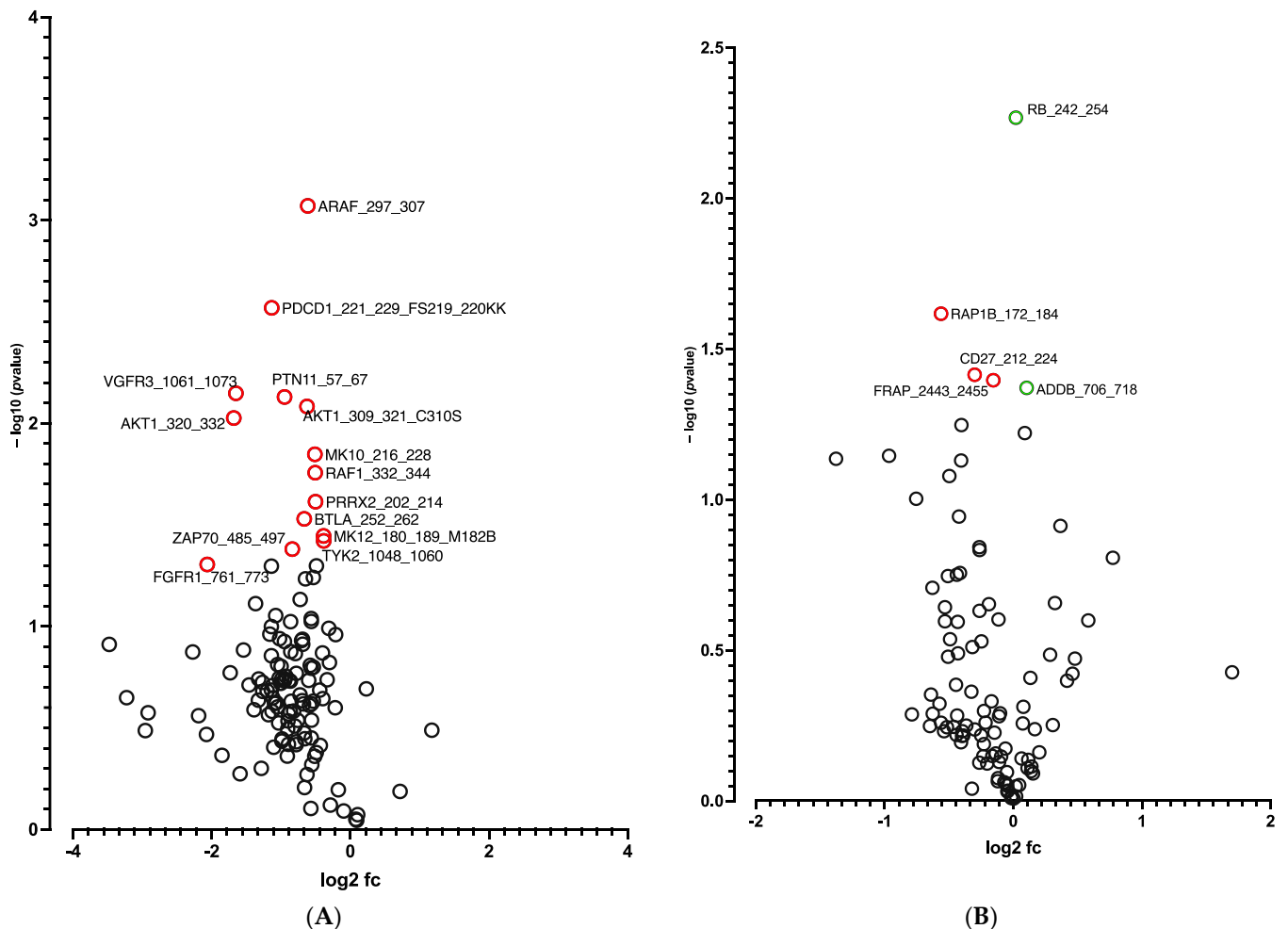


Figure 3. Cont.

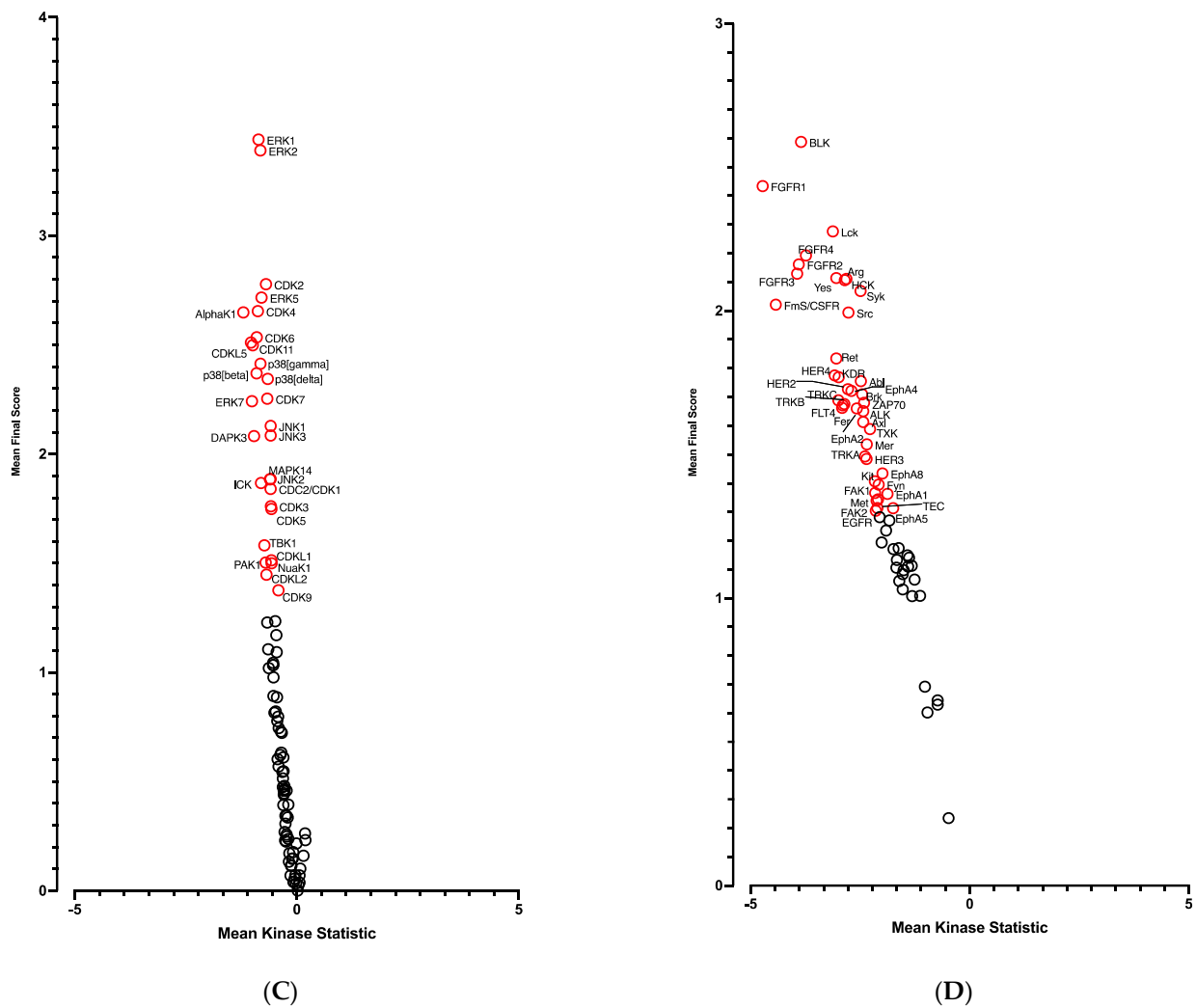


Figure 3. Kinome analysis in 10 days-differentiated 3D adipospheres (D10 vs. D0). Volcano-plots of STK (A), PTK (B)-modulated peptides and STK (C), PTK (D)-modulated kinases. Green circle: hyperphosphorylated peptide (A). Red circle: hypophosphorylated peptide (A,B) and kinase (C,D). Dark circle: unmodulated peptide (A,B) and kinase (C,D).

The *CDKN2A* products p16INK4a and p19ARF are key regulators of the activity of kinases involved in cell proliferation and senescence [16]. We postulated that modified kinase activity may be involved in the browning process and we performed a global kinome analysis in *CDKN2A*-deficient hiPSC-BAPs. Significant differences in phosphorylation levels for 1 out of 144 peptides (STK, Figure 6A and Table S4) and for 10 out of 196 peptides (PTK, Figure 6B and Table S4) were evidenced between *CDKN2A*-deficient and control spheroids. Using a combined Bionavigator and IPA analysis, we identified several potential modulated signaling pathways and upstream kinases (STK, Figure 6C; PTK, Figure 6D and Table S3). Among them, glucocorticoid (GC) receptor (GR) signaling pathways (STK, Figure 7A), immune pathways (CD28 signaling in T-helper cells, IL15 production, CTA4 signaling in cytotoxic T lymphocyte), as well as FGF, NGF, Focal Adhesion Kinase (FAK) and insulin receptor signaling (PTK, Figure 7B and Table S3), which are implicated in proliferation/differentiation during the early stages of adipogenesis [24], were evidenced.

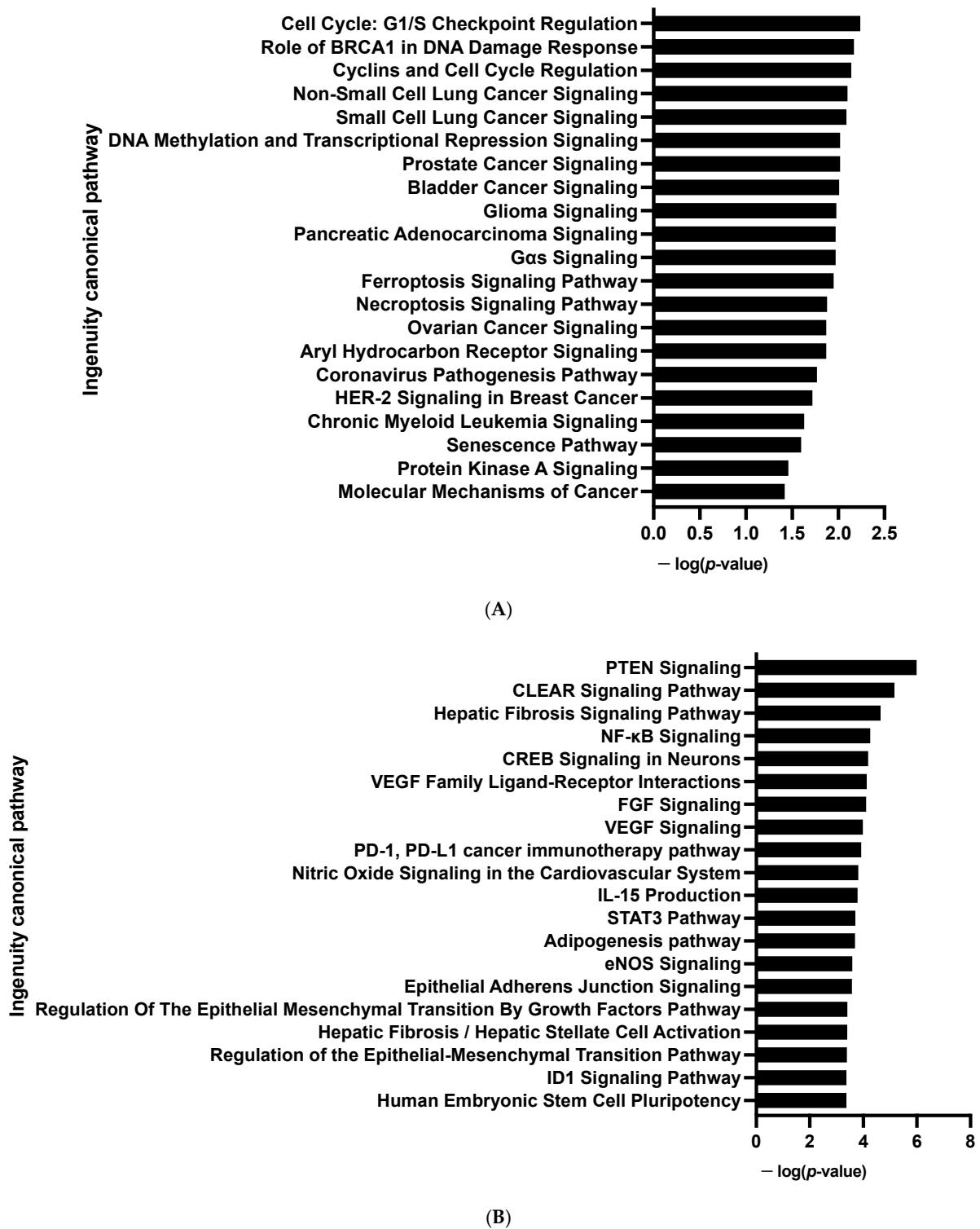


Figure 4. Enrichment of IPA biological process terms for kinome analysis in 10 days-differentiated 3D adipospheres (D10 vs. D0). IPA terms are plotted against the negative log of corrected p -values. Most modulated enriched pathways in STK (A) and in PTK (B).

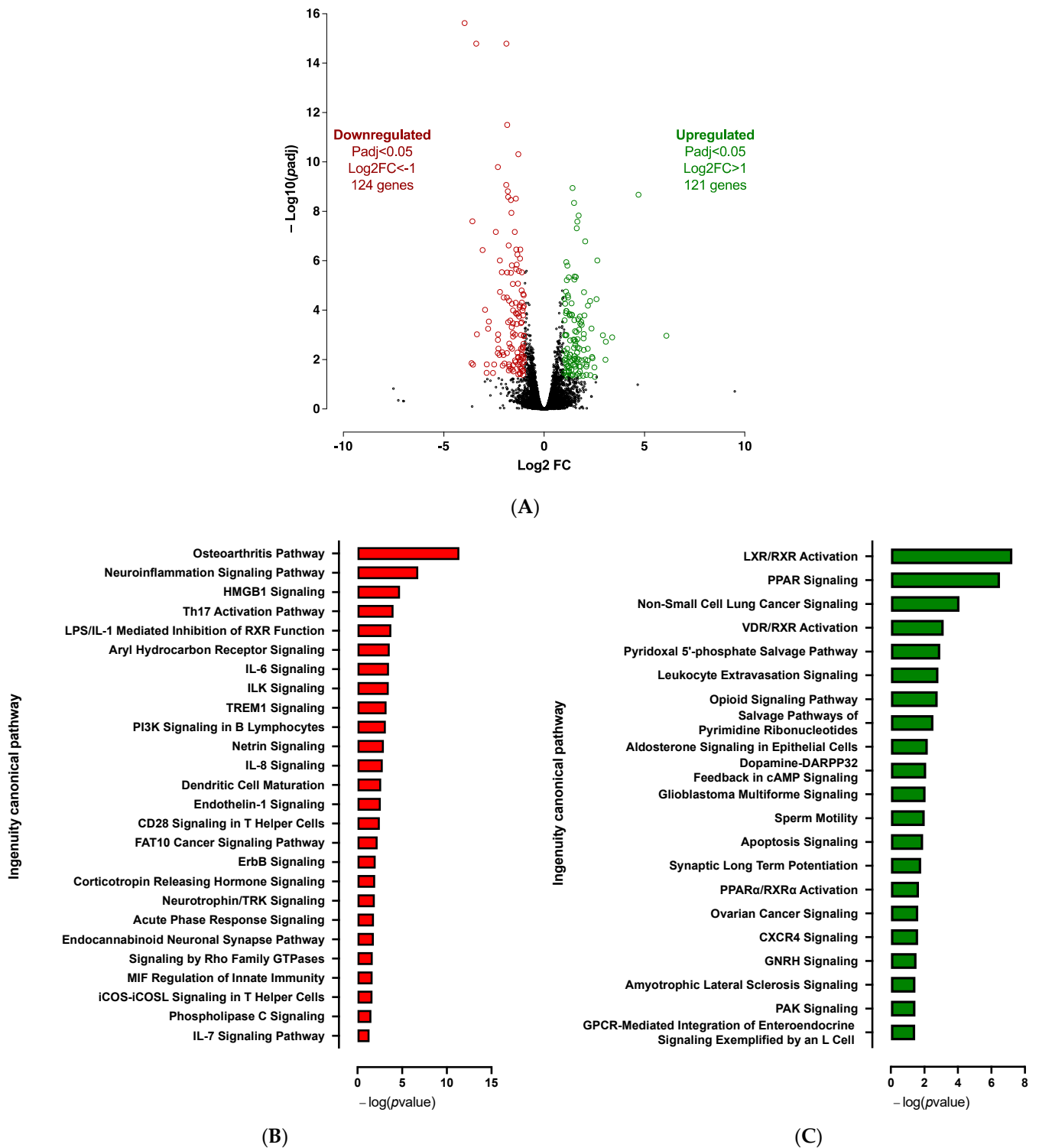


Figure 5. Transcriptomic analysis at spheroid stages of differentiation (D0) between *CDKN2A*-deficient and control hiPSC-BAPs. (A) A volcano-plot of differentially regulated gene expression. Enrichment of IPA biological process terms for down-regulated (B) and up-regulated (C) genes of *CDKN2A*-deficient D0 spheroids. IPA terms are plotted against the negative log of corrected *p*-values. Most down-regulated (B) and up-regulated (C) enriched pathways.

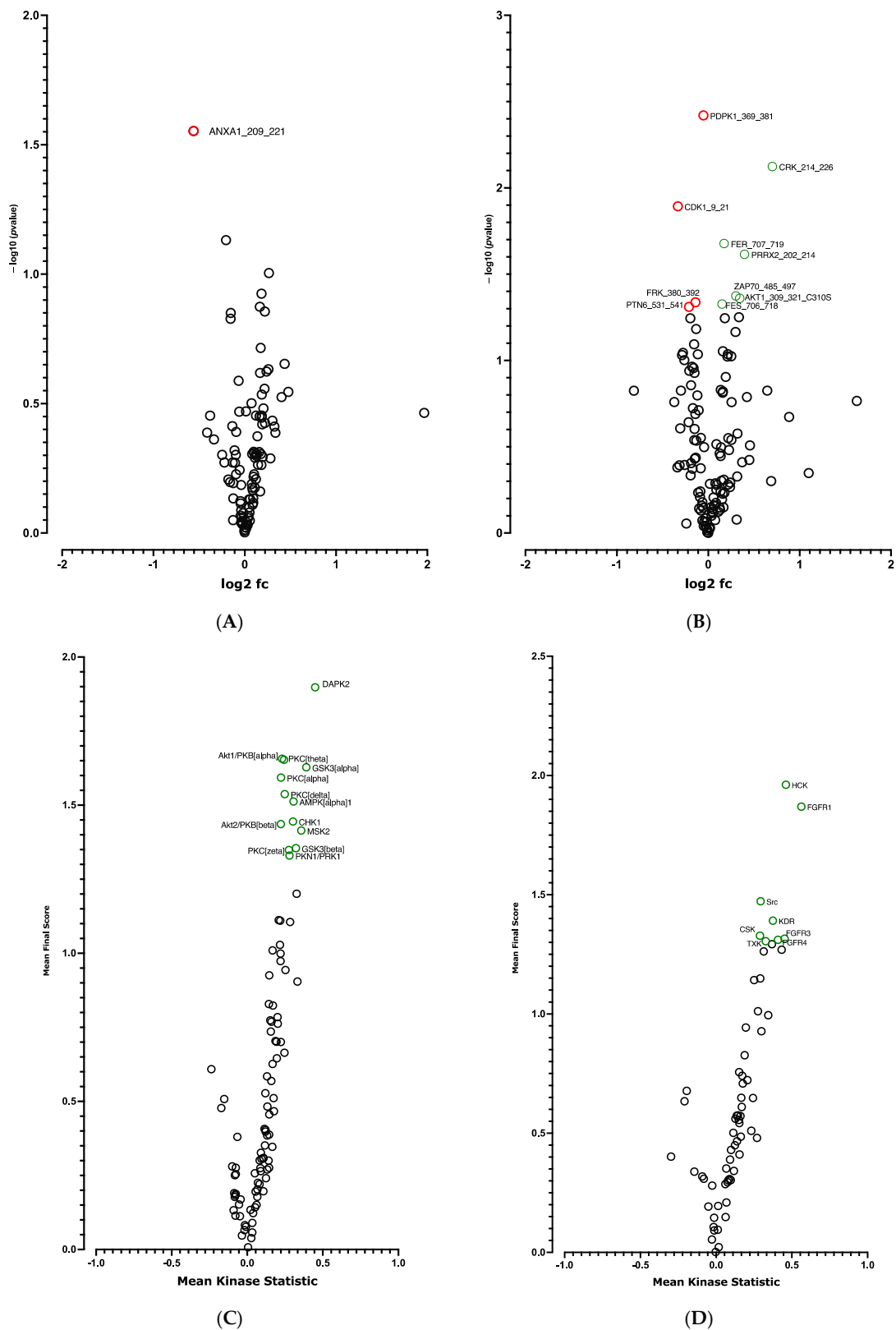
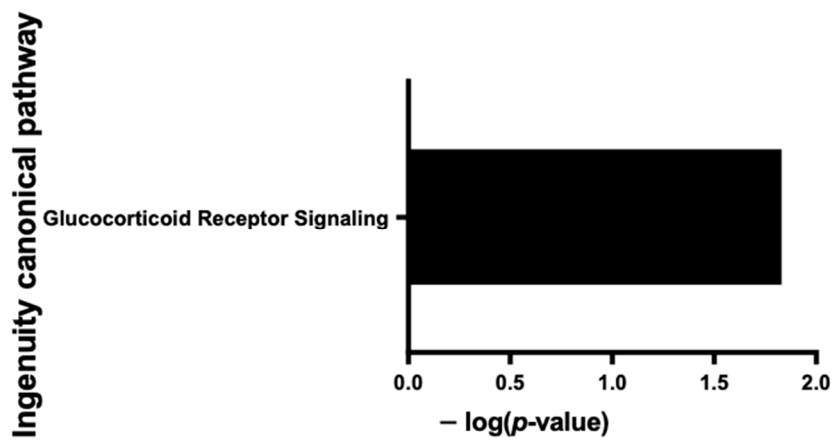
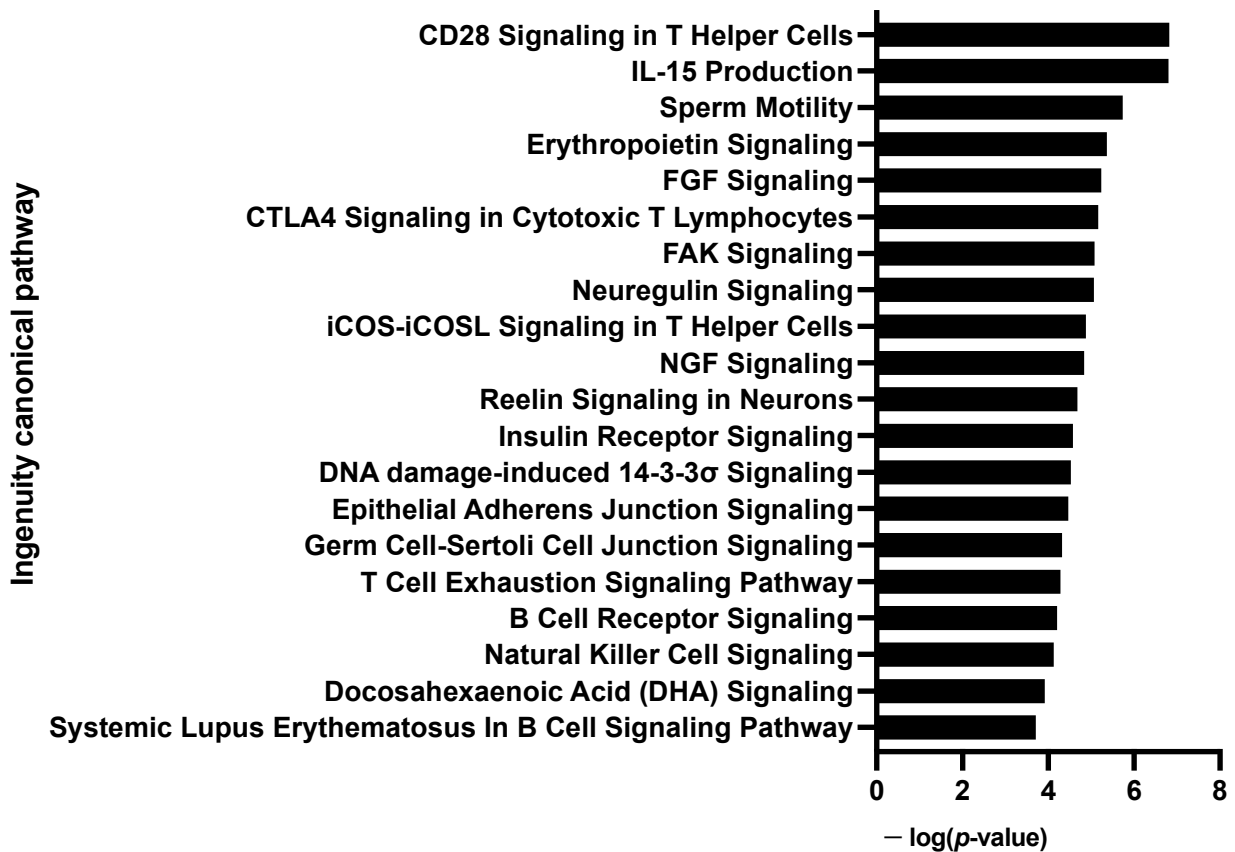


Figure 6. Kinome analysis at spheroid stages of differentiation (D0) between *CDKN2A*-deficient and control hiPSC-BAPs. Volcano-plots of STK (A), PTK (B)-modulated peptides and STK (C), PTK (D)-modulated kinases. Green circle: hyperphosphorylated peptide (B) and kinase (C,D). Red circle: hypophosphorylated peptide (A,B). Dark circle: unmodulated peptide (A,B) and kinase (C,D).



(A)



(B)

Figure 7. Enrichment of IPA biological process terms for kinome analysis at spheroid stages of differentiation (D0) between *CDKN2A*-deficient and control hiPSC-BAPs. IPA terms are plotted against the negative log of corrected *p*-values. Most modulated enriched pathways in STK (A) and in PTK (B).

3.3. *CDKN2A* Invalidation Potentiates Cellular Oxidative Metabolism and Browning Process of Adipospheres at D10

The silencing of *CDKN2A* significantly affects the adiposphere mRNA expression levels at D10 (Figure S7). Transcriptomic analysis revealed 610 significantly differentially expressed genes (406 up-regulated and 204 down-regulated) between *CDKN2A*-deficient and control adipospheres (Figure 8A). The reduction of *CDKN2A* mRNA expression levels was validated in spheroids at D10 (Figure S7). Overall, RNA-seq analysis revealed that adipogenesis (i.e., upregulation of *PPAR γ* and *CEBP α*), markers of mature adipocyte (i.e., upregulation of *ADIPOQ* and *PLIN1*), oxidative metabolism and browning process pathways (i.e., upregulation of *FABP4*, *SREBF1*, *CIDEA*, *PGC1 α* , *UCP1*) are markedly activated in 10 days-differentiated *CDKN2A*-deficient 3D adipospheres (Figure S7).

Computational analysis revealed that, in addition to pro-adipogenic pathways already highlighted at D0, global cellular oxidative metabolism (glycolysis, oxidative phosphorylation, TCA cycle, fatty acid β oxidation, ketogenesis, leucine and valine degradation) and the browning process (white adipose tissue browning pathway, AMPK signaling) are markedly activated [25] (Figures 8C and S9). *PPAR γ* and Sterol Regulatory Element Binding Transcription Factor (*SREBF 1* and *2*) are major upstream regulators of up-regulated pathways (Figure S8). Several kinase pathways such as *p70S6K* and *PI3K/AKT* signaling and sirtuin signaling pathway, which affect the proliferation and differentiation of pre-adipocytes, are repressed [24] (Figure 8B).

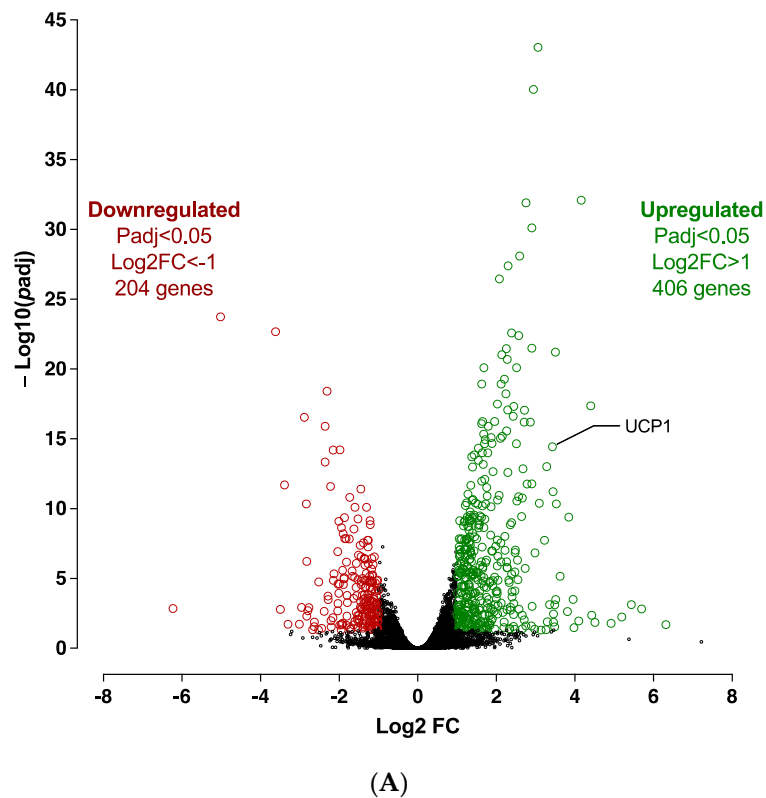


Figure 8. Cont.

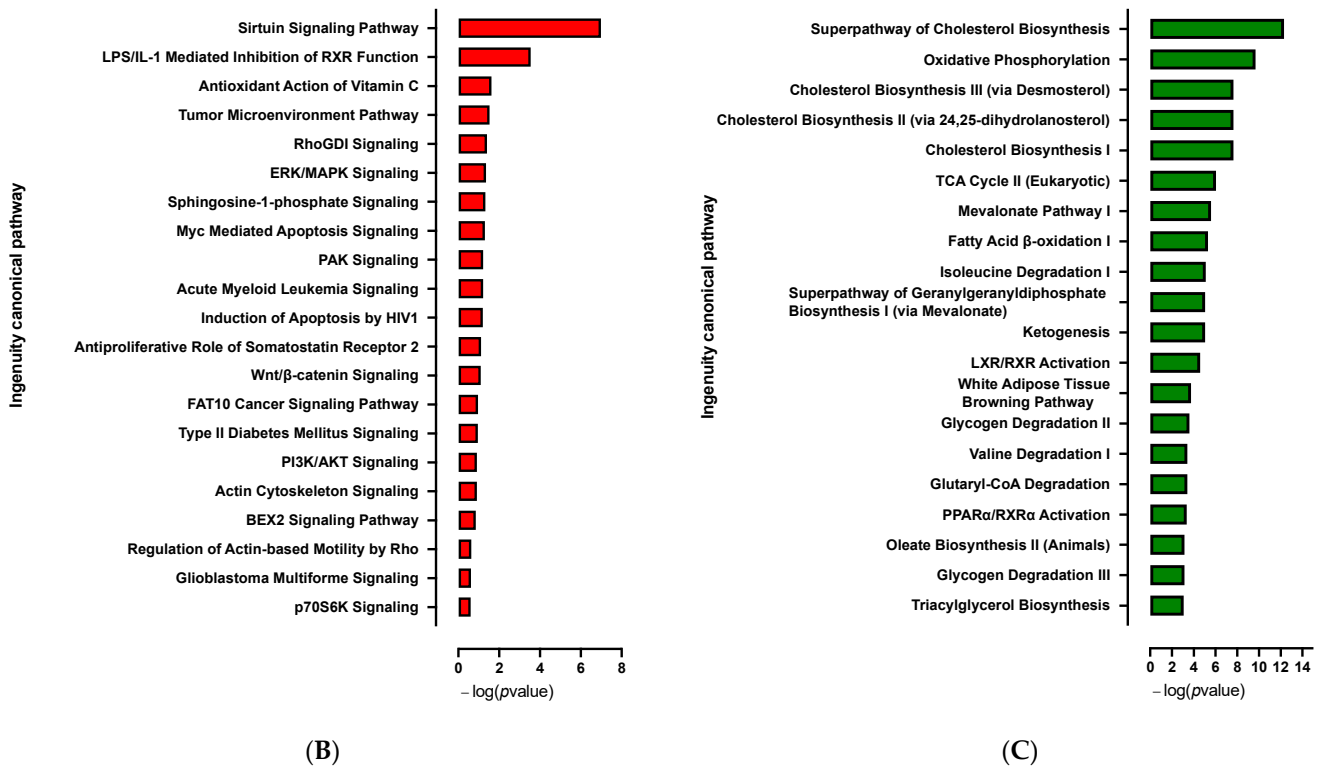


Figure 8. Transcriptomic analysis in 10 days-differentiated (D10) 3D adipospheres following *siCDKN2A* silencing performed at the progenitor stage 3 days before differentiation. (A) A volcano-plot of differentially regulated gene expression. UCP1 is indicated in black. Enrichment of IPA biological process terms for down-regulated (B) and up-regulated (C) genes of *CDKN2A*-deficient D10 adipospheres. IPA terms are plotted against the negative log of corrected *p*-values. Most down-regulated (B) and up-regulated (C) enriched pathways.

We then analyzed the effect of the knock-down of *CDKN2A* on the kinome of adipospheres. Significant differences in phosphorylation for 6 out of 144 peptides (STK, Figure 9A and Table S6) and for 8 out of 196 peptides (PTK, Figure 9B and Table S6) were evidenced. Using the Bionavigator analysis to identify potential upstream kinases, we identified several signaling pathways that displayed modified STK (Figure 9C and Table S5) and PTK (Figure 9D and Table S5) phosphorylation. Following combined computational analysis, we observed that, in addition to pro-adipogenic and kinase pathways already highlighted by RNA-seq, AMPK and p38 MAPK which are key players of the browning process [25], are markedly modulated. Differences in phosphorylation linked to the modulation of G α q- and G α s-coupled G protein-coupled receptors (GPCR) (STK, Figure 10A) and pro-inflammatory signaling pathways (IL15, IL7) (PTK, Figure 10B) are also modulated [24].

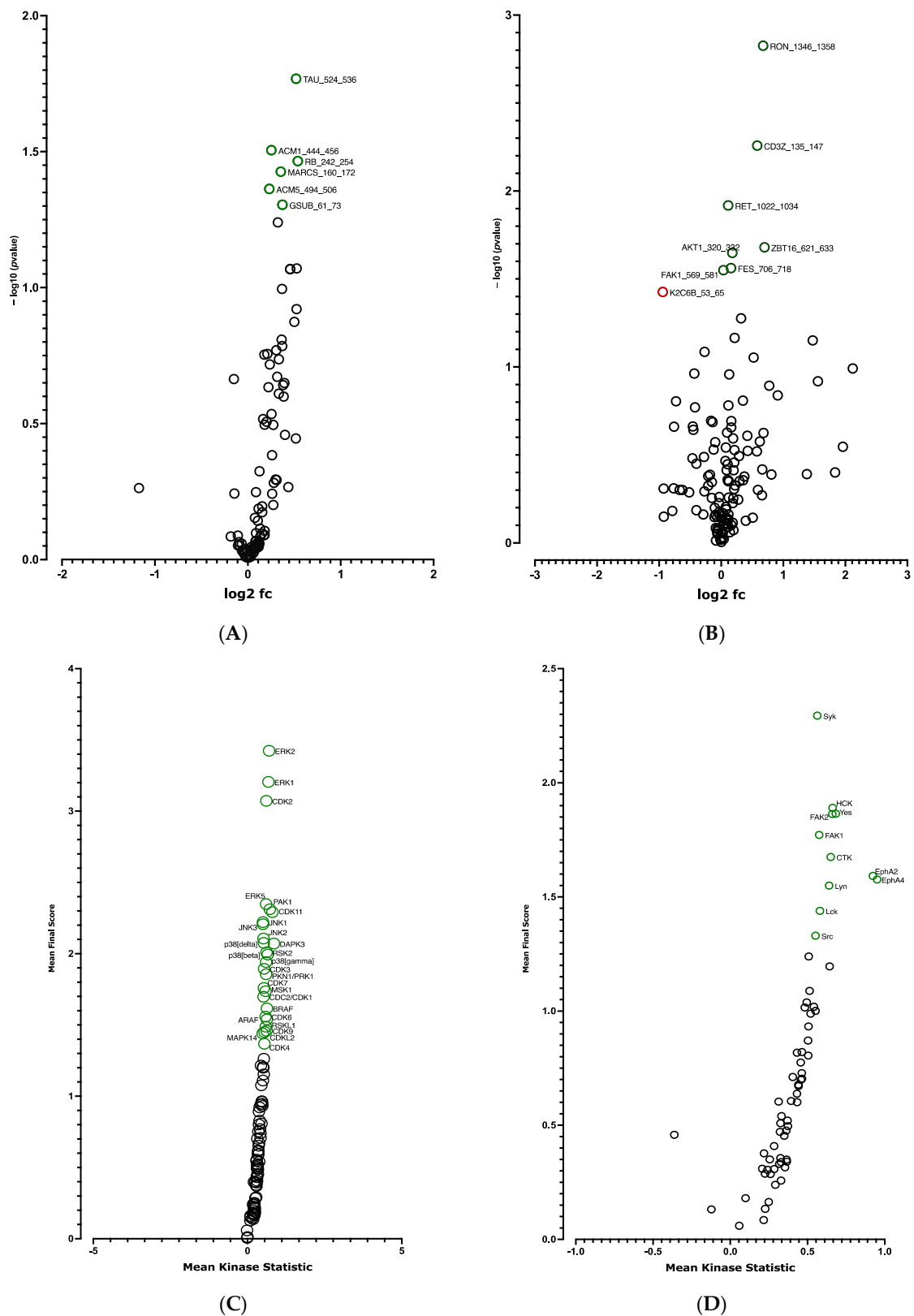


Figure 9. Kinome analysis in 10 days-differentiated (D10) 3D adipospheres following siCDKN2A silencing performed at the progenitor stage 3 days before differentiation. Volcano-plots illustrating STK (A), PTK (B)-modulated peptides and STK (C), PTK (D)-modulated kinases. Green circle: hyperphosphorylated peptide (A,B) and kinase (C,D). Red circle: hypophosphorylated peptide (B). Dark circle: unmodulated peptide (A,B) and kinase (C,D).

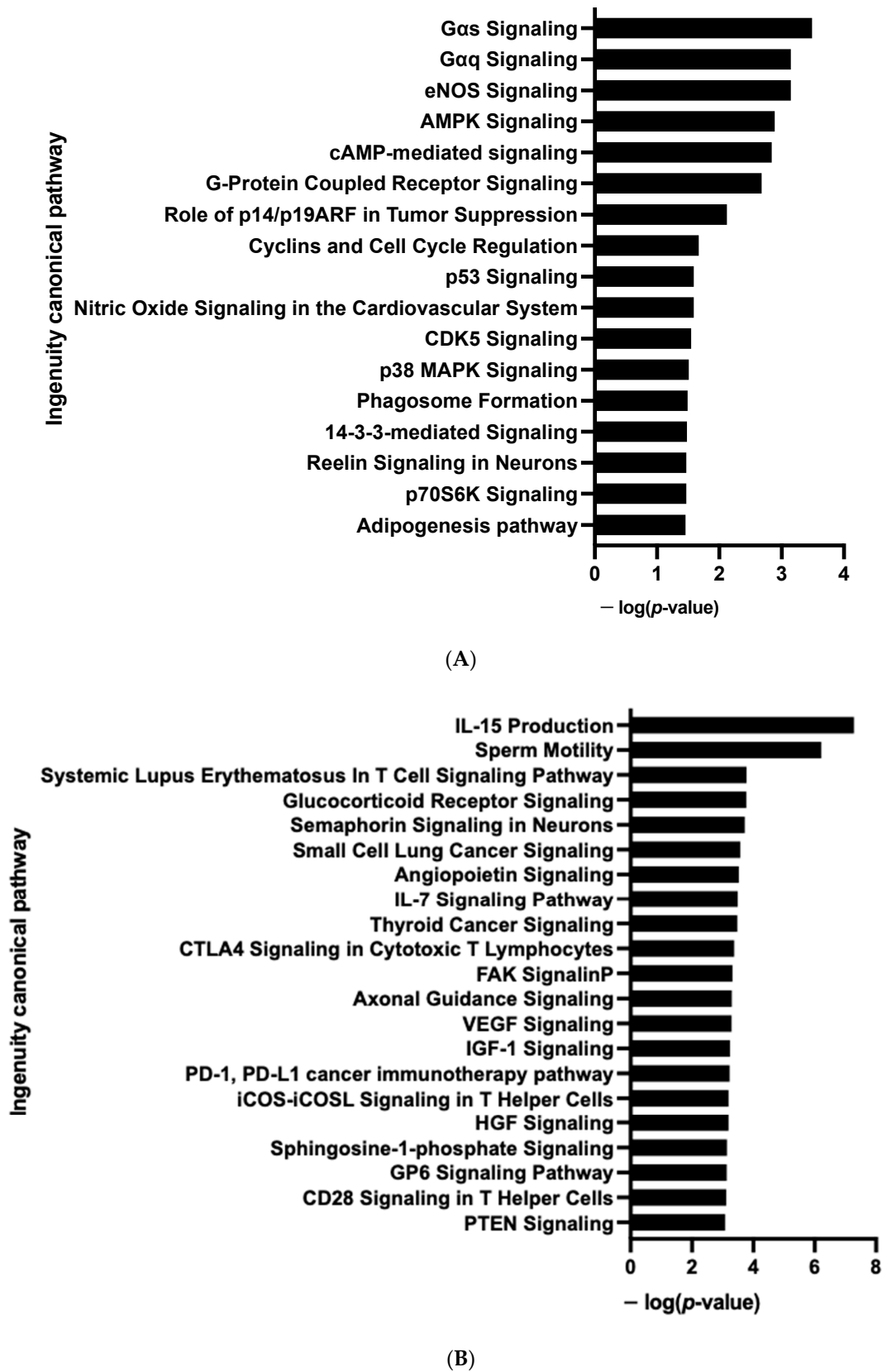


Figure 10. Enrichment of IPA biological process terms for kinome analysis in 10 days-differentiated (D10) 3D adipospheres following *siCDKN2A* silencing performed at the progenitor stage 3 days before differentiation. IPA terms are plotted against the negative log of corrected p-values. Most modulated enriched pathways in STK (A) and in PTK (B).

4. Discussion

Several studies have pointed out the therapeutic potential of hiPSC-BAP as a promising novel therapy to alleviate the effects of obesity and T2D [18,19]. However, their low capacity for differentiation in brown-like adipocytes in 2D cultures hampers their use for further therapeutic approaches [19]. In recent years, 3D cell culture techniques have received much attention, as these might provide more accurate models of tissues. Indeed, 3D cultures generate changes in lipid accumulation and gene expression, which may lead to a better and closer *in vivo* differentiation [26]. In order to improve the differentiation capacity of 2D cultures, we developed a novel and more efficient method of using 3D cultures of hiPSC-BAPs, via the formation of an organoid-like structure [19]. Our data confirm previous experiments showing that differentiation into adipospheres improves adipogenesis and browning process capacities compared to conventional monolayer BAP differentiation [16].

Fate decisions of multipotent progenitor cells to differentiate into adipocytes are driven by specific signaling pathways. In particular, the adipogenic process occurs in two major phases: commitment to APs and terminal differentiation, which are determined by modified transcriptional, epigenomic and metabolic activities [24]. Here, we showed that the differentiation of hiPSC-BAP from spheroids to adipospheres in a 3D culture results in marked transcriptomic and phosphorylation changes. Comparative transcriptome and kinome analyses of spheroids before differentiation (D0) vs. adipospheres after differentiation (D10) revealed that adipogenesis, oxidative metabolism pathways and browning adipocyte capacity are markedly activated in 10 days-differentiated 3D adipospheres.

RNA-seq analysis revealed the dynamic expression changes that occur during the commitment of APs toward adipocyte differentiation (i.e., repression of osteoarthritis and hepatic fibrosis pathways). TGF β and sirtuin signaling pathways, which have emerged as critical anti-adipogenic players, were downregulated. TGF β 1 and 2 and SIRT1 inhibit PPAR γ and CEBP α expression [27,28]. TGF- β 1 inhibition suppresses the proliferation and induces the differentiation of hiPSC [19]. By contrast, transcription factor signaling pathways (LXR/RXR, CEBPs and PPAR γ), which are the master regulators of adipogenesis [29], were activated. These events are required to promote the growth arrest and differentiation of pre-adipocytes and the progressive expression of a lipogenic transcriptional program (activation of glycolysis, oxidative phosphorylation, fatty acid oxidation and ketogenesis pathways). In line with these findings, the decrease in levels of phosphorylation of MAPK and ERK, JNK, p38 signal-regulated kinases as well as the FGF pathway, which are key regulators of early adipogenic events [24], was evidenced by Pamgene. This might reflect the terminal differentiation of 3D adipospheres into mature adipocytes. In basal 3D culture conditions, the increase in UCP1 [25], IL4 [30] and VEGF [31] expression levels, which is key to the brown adipocyte lineage, suggests that adipocytes already adopt a brown-like phenotype. Indeed, IL-4 enhances the differentiation of APs into committed beige adipogenic precursors [32], and VEGF is synthesized and promotes the angiogenesis in BAT [33]. The activation of cholesterol biosynthesis [34] and angiogenesis (i.e., upregulation of VEGF) [33], and the repression of matrix metalloprotease [35] and hypoxia/inflammation (i.e., downregulation of HIF1 α [36] and acute phase response (APR)) enriched pathways, might reflect an active adipocyte-like remodeling and expansion of the adiposphere. The APR is an early response to inflammation which hampers lipid and glucose utilization in adipocytes [37].

In line with its canonical role in cell-cycle progression and differentiation, the *CDKN2A* locus is well known to promote adipogenesis [15]. It might also be a key determinant of brown adipocyte fate, although underlying mechanisms and cellular pathways remain elusive [13,15]. Thus, we next assessed molecular pathways involved in the browning process in *CDKN2A*-deficient hiPSC-BAPs. *CDKN2A*-deficient spheroids at D0 exhibit greater adipogenic potential with an anti-inflammatory profile (Figure 11). However, no increase in the browning process was evidenced at this stage. In addition to repressed TGF β and activated adipogenic pathways already highlighted in basal conditions, the most striking observations were the identification of additional modulated signaling pathways,

namely the activation of the CXCR4 and the repression of multiple pro-inflammatory signaling pathways. GR and insulin signaling pathways also displayed significant differences in phosphorylation levels. GCs, present in most adipogenic differentiation cocktails, are potent inducers of adipogenesis *in vitro*. Pre-adipocytes from humans express GR through which GCs stimulate the expression of PPAR γ and C/EBP α during adipogenesis [38,39]. Activation of GR decreases pro-inflammatory cytokine expression [40] which is known to inhibit adipogenesis through various pathways, thus constraining the hyperplastic expandability of AT [41]. Insulin is also a powerful inducer of stem cell commitment to adipogenesis via the activation of the PI3K/Akt and MAPK signaling pathways to promote *pro*-adipogenic transcription [42]. CXCR4 promotes proliferation of APs and is required for the acquisition of brown adipocyte features. It also prevents inflammation [43,44].

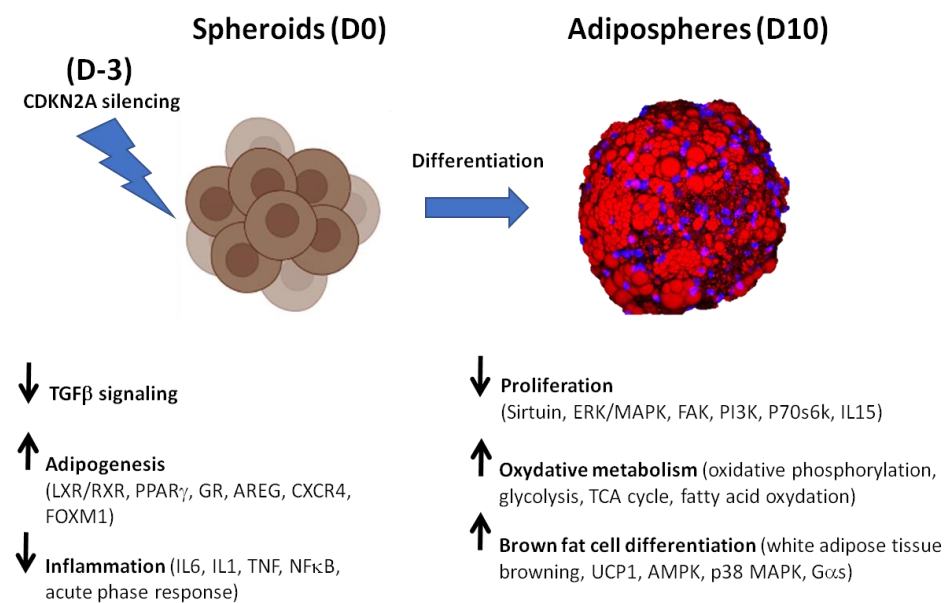


Figure 11. Effects on silencing *CDKN2A* expression during hiPSC-BAP adipogenic differentiation in a 3D model: from spheroids (D0) to adipospheres (D10).

Strikingly, a marked enrichment of oxidative metabolism and browning process pathways was observed in 10 days-differentiated *CDKN2A*-deficient 3D adipospheres (Figure 11). Although a global increase in adipogenesis and cellular oxidative pathways was already evidenced in basal conditions, the silencing of *CDKN2A* potentiates these pathways along with WAT browning pathways at adiposphere stages of differentiation. The findings of SREBF1 and PPAR γ /RXR as major upstream regulators of up-regulated pathways might reflect their dual role in regulating adipogenic and lipogenic pathways [45]. The marked transcriptional activation of AMPK and p38 MAPK and the modulation of the levels of phosphorylation of AMPK and G α signaling pathways reinforce the idea that adipospheres are fully committed to differentiate into mature brown-like adipocytes [25]. In line with these findings, most of the molecular pathways (i.e., sirtuin, ERK/MAPK, FAK, PI3K, p70S6K) that control pre-adipocyte proliferation [24] were down-regulated, suggesting the terminal differentiation of mature adipocytes (Figure 11). IL15, whose production pathway displays differential phosphorylation, is also known to lower the proliferation rate of pre-adipocytes [46]. On the one hand, AMPK inhibits adipogenesis via blocking the early mitotic clonal expansion. AMPK has a dual role in adipogenesis. AMPK blocks the early mitotic clonal expansion, and later activates the differentiation of pre-adipocytes into mature brown adipocytes [47]. Several studies have reported that AMPK signaling is instrumental in the browning as well as in the energy expenditure of beige adipocytes [48]. Activating intracellular AMPK increases intracellular cAMP and phosphorylates PKA resulting in induced intracellular lipolysis in BAT [48]. p38 MAPK signaling is also a key player in browning [49]. p38 MAPK is a downstream effector kinase of cAMP/PKA signal-

ing in brown adipocytes [50]. During the early phase of adipogenesis, both cAMP and GC signalling pathways promote transcriptional activation, resulting in the commitment of APs to a pre-adipocyte fate and the differentiation of pre-adipocytes [51]. $G\alpha s$ signaling via GPCRs that activate cAMP/PKA signalling and UCP1-dependent thermogenesis also regulates brown/beige adipocytes [52].

One limitation of our study is the lack of functional tests to further investigate the brown fat properties of *CDKN2A*-deficient adipospheres at the cellular level. Additional experiments to compare phenotypic differences in control and *CDKN2A*-deficient adipospheres are also needed to better appreciate whether *CDKN2A* contributes to increased BAT functions and/or morphology. Moreover, at this stage, we cannot rule out that knocking-down *CDKN2A* in hiPSC-BAPs could stimulate cell proliferation. However, no difference in size or cell phenotype was observed microscopically between control and *CDKN2A*-deficient adipospheres throughout the differentiation process and up to 21 days of culture (data not shown). In addition, the RNA-seq data of control and *CDKN2A*-deficient spheroids and adipospheres did not reveal marked modifications in the expression levels of genes involved in signaling pathways that control proliferation. Thus, it suggests that modulating *CDKN2A* expression in hiPSC-BAPs does not lead to uncontrolled proliferation of adipospheres. Given that silencing *CDKN2A* expression in hiPSC-BAPs has limited effect on cell proliferation, it is tempting to speculate that this locus indeed drives alternative pathways from those used for regulating the cell cycle to potentiate the browning process in a 3D system.

Here, we demonstrated that *CDKN2A* plays an important role in brown-like adipogenic recruitment and maturation in a cell-autonomous manner. Our data emphasize the potential effects of this locus in progenitor cells on the browning process, using alternative pathways from those used for regulating the cell cycle. In particular, we showed that AMPK, p38 MAPK and $G\alpha s$ /cAMP/PKA signaling pathways are key targets of *CDKN2A* silencing (Figure 11). Thus, additional studies are needed to further delineate the contributions of these kinases and to identify both direct and indirect activators underlying the induction of the browning process in *CDKN2A*-deficient stem cells. Thus, targeting alternative *CDKN2A* signaling pathways that may not be involved in tumor suppressive and anti-proliferative effects, but which are driving the browning process in APs, may represent a new strategy to reprogram the cellular response and develop therapeutic approaches against obesity and T2D.

5. Conclusions

In conclusion, our results suggest that the *CDKN2A* locus is an important regulator of adipogenesis, oxidative metabolism and the browning process in a cell-autonomous manner.

Supplementary Materials: The following supporting information is available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cells12060870/s1>, Figure S1. Comparative analysis of mRNA expression levels (i.e., Transcripts Per Million (TPM)) between D0 spheroids and D10 adipospheres in 3D hiPSC-BAPs. Figure S2. Upstream regulator analysis of differentially regulated pathways in 10 days-differentiated 3D adipospheres (D10 vs. D0). Figure S3. Gene set enrichment pathway analysis (GSEA)-enrichment plots of representative gene sets from differentially regulated gene expression in 10 days-differentiated 3D adipospheres (D10 vs. D0). Figure S4. Comparative analysis of mRNA expression levels (i.e., Transcripts Per Million (TPM)) between control and *CDKN2A*-deficient D0 spheroids in 3D hiPSC-BAPs. Figure S5. Upstream regulators analysis of differentially regulated pathways between control and *CDKN2A*-deficient D0 spheroids. Figure S6. Gene set enrichment pathway analysis (GSEA)-enrichment plots of representative gene sets from differentially regulated gene expression between control and *CDKN2A*-deficient D0 spheroids. Figure S7. Comparative analysis of mRNA expression levels (i.e., Transcripts Per Million (TPM)) between control and *CDKN2A*-deficient D10 adipospheres in 3D hiPSC-BAPs. Figure S8. Upstream regulator analysis of differentially regulated pathways between control and *CDKN2A*-deficient D10 adipospheres. Figure S9. Gene set enrichment pathway analysis (GSEA)-enrichment plots of representative gene sets from differentially regulated gene expression between control and *CDKN2A*-deficient D10 adipospheres. Table S1.

Kinases score table (PTK and STK) D0 spheroids vs. D10 adipospheres. Table S2. Peptides score table (PTK and STK) D0 spheroids vs. D10 adipospheres. Table S3. Kinases score table (PTK and STK) control vs. *CDKN2A*-deficient D0 spheroids. Table S4. Peptides score table (PTK and STK) control vs. *CDKN2A*-deficient D0 spheroids. Table S5. Kinases score table (PTK and STK) control vs. *CDKN2A*-deficient D10 adipospheres. Table S6. Peptides score table (PTK and STK) control vs. *CDKN2A*-deficient D10 adipospheres.

Author Contributions: Conceptualization, C.D., J.-S.A. and C.B.; Methodology, X.Y., C.D. and J.-S.A.; Validation, Y.K., X.Y., C.D., J.-S.A. and C.B.; Formal analysis, Y.K., F.O., S.A., M.D. and R.B.; Investigation, Y.K., X.Y., M.M., E.D. and R.B.; Resources, A.B. and P.F.; Data curation, S.A., M.D. and A.B.; Writing—original draft, Y.K. and C.B.; Writing—Review & Editing, C.D. and J.-S.A.; Visualization, Y.K., J.-S.A. and C.B.; Supervision, C.D., J.-S.A. and C.B.; Project administration, C.D., J.-S.A. and C.B.; Funding acquisition, C.D., J.-S.A. and C.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by grants from the National Research Agency (E.G.I.D, ANR-10-LABX-46 and ANR-17-CE14-0034), Institut Pasteur de Lille (grant CPER CTRL Melodie), Fondation pour la Recherche Médicale (grant EQU202103012732), INSERM, CNRS, Université de Lille, Métropole Européenne de Lille and Société Francophone du Diabète. This project was funded by the French Government (National Research Agency, hiPS-Adipospheres ANR, CE18-0006) and the University Cote d’Azur through the “Investments for the Future” programs LABEX SIGNALIFE ANR-11-LABX-0028-01 and IDEX UCAJedi ANR-15-IDEX-01.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We thank Jérôme Eeckhoutte, Corinne Vigouroux, members of the INSERM U1283/CNRS UMR 8199/EGID, INSERM UMR1167/RID-AGE and members of the Institut de Biologie Valrose for helpful discussions and critical reading of our manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Qasim, A.; Turcotte, M.; de Souza, R.J.; Samaan, M.C.; Champredon, D.; Dushoff, J.; Speakman, J.R.; Meyre, D. On the Origin of Obesity: Identifying the Biological, Environmental and Cultural Drivers of Genetic Risk among Human Populations. *Obes. Rev.* **2018**, *19*, 121–149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Goodpaster, B.H.; Sparks, L.M. Metabolic Flexibility in Health and Disease. *Cell Metab.* **2017**, *25*, 1027–1036. [[CrossRef](#)]
- Herz, C.T.; Kiefer, F.W. Adipose Tissue Browning in Mice and Humans. *J. Endocrinol.* **2019**, *241*, R97–R109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kajimura, S.; Spiegelman, B.M.; Seale, P. Brown and Beige Fat: Physiological Roles beyond Heat Generation. *Cell Metab.* **2015**, *22*, 546–559. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- 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. Beige Adipocytes Are a Distinct Type of Thermogenic Fat Cell in Mouse and Human. *Cell* **2012**, *150*, 366–376. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hanssen, M.J.W.; Hoeks, J.; Brans, B.; van der Lans, A.A.J.J.; Schaart, G.; van den Driessche, J.J.; Jörgensen, J.A.; Boekschoten, M.V.; Hesselink, M.K.C.; Havekes, B.; et al. Short-Term Cold Acclimation Improves Insulin Sensitivity in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 863–865. [[CrossRef](#)]
- White, J.D.; Dewal, R.S.; Stanford, K.I. The Beneficial Effects of Brown Adipose Tissue Transplantation. *Mol. Aspects Med.* **2019**, *68*, 74–81. [[CrossRef](#)]
- Hepler, C.; Vishvanath, L.; Gupta, R.K. Sorting out Adipocyte Precursors and Their Role in Physiology and Disease. *Genes Dev.* **2017**, *31*, 127–140. [[CrossRef](#)]
- Berry, R.; Rodeheffer, M.S. Characterization of the Adipocyte Cellular Lineage in Vivo. *Nat. Cell Biol.* **2013**, *15*, 302–308. [[CrossRef](#)]
- Gao, H.; Volat, F.; Sandhow, L.; Galitzky, J.; Nguyen, T.; Esteve, D.; Åström, G.; Mejhert, N.; Ledoux, S.; Thalamas, C.; et al. CD36 Is a Marker of Human Adipocyte Progenitors with Pronounced Adipogenic and Triglyceride Accumulation Potential. *Stem Cells* **2017**, *35*, 1799–1814. [[CrossRef](#)]
- Hannou, S.A.; Wouters, K.; Paumelle, R.; Staels, B. Functional Genomics of the *CDKN2A/B* Locus in Cardiovascular and Metabolic Disease: What Have We Learned from GWASs? *Trends Endocrinol. Metab.* **2015**, *26*, 176–184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Morris, A.P.; Voight, B.F.; Teslovich, T.M.; Ferreira, T.; Segrè, A.V.; Steinthorsdottir, V.; Strawbridge, R.J.; Khan, H.; Grallert, H.; Mahajan, A.; et al. Large-Scale Association Analysis Provides Insights into the Genetic Architecture and Pathophysiology of Type 2 Diabetes. *Nat. Genet.* **2012**, *44*, 981–990. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

13. Berry, D.C.; Jiang, Y.; Arpke, R.W.; Close, E.L.; Uchida, A.; Reading, D.; Berglund, E.D.; Kyba, M.; Graff, J.M. Cellular Aging Contributes to Failure of Cold-Induced Beige Adipocyte Formation in Old Mice and Humans. *Cell Metab.* **2017**, *25*, 166–181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Svensson, P.-A.; Wahlstrand, B.; Olsson, M.; Froguel, P.; Falchi, M.; Bergman, R.N.; McTernan, P.G.; Hedner, T.; Carlsson, L.M.S.; Jacobson, P. CDKN2B Expression and Subcutaneous Adipose Tissue Expandability: Possible Influence of the 9p21 Atherosclerosis Locus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *446*, 1126–1131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Kahoul, Y.; Oger, F.; Montaigne, J.; Froguel, P.; Breton, C.; Annicotte, J.-S. Emerging Roles for the INK4a/ARF (CDKN2A) Locus in Adipose Tissue: Implications for Obesity and Type 2 Diabetes. *Biomolecules* **2020**, *10*, 1350. [[CrossRef](#)]
16. Rabhi, N.; Hannou, S.A.; Gromada, X.; Salas, E.; Yao, X.; Oger, F.; Carney, C.; Lopez-Mejia, I.C.; Durand, E.; Rabearivelo, I.; et al. Cdkn2a Deficiency Promotes Adipose Tissue Browning. *Mol. Metab.* **2018**, *8*, 65–76. [[CrossRef](#)]
17. Park, J.; Shin, S.; Liu, L.; Jahan, I.; Ong, S.-G.; Xu, P.; Berry, D.C.; Jiang, Y. Progenitor-like Characteristics in a Subgroup of UCP1+ Cells within White Adipose Tissue. *Dev. Cell* **2021**, *56*, 985–999.e4. [[CrossRef](#)]
18. Hafner, A.-L.; Contet, J.; Ravaud, C.; Yao, X.; Villageois, P.; Suknuntha, K.; Annab, K.; Peraldi, P.; Binetruy, B.; Slukvin, I.I.; et al. Brown-like Adipose Progenitors Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells: Identification of Critical Pathways Governing Their Adipogenic Capacity. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 32490. [[CrossRef](#)]
19. Yao, X.; Dani, V.; Dani, C. Human Pluripotent Stem Cells: A Relevant Model to Identify Pathways Governing Thermogenic Adipocyte Generation. *Front. Endocrinol.* **2020**, *10*, 932. [[CrossRef](#)]
20. Mohsen-Kanson, T.; Hafner, A.-L.; Wdziekonski, B.; Takashima, Y.; Villageois, P.; Carrière, A.; Svensson, M.; Bagnis, C.; Chignon-Sicard, B.; Svensson, P.-A.; et al. Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells into Brown and White Adipocytes: Role of Pax3. *Stem Cells* **2014**, *32*, 1459–1467. [[CrossRef](#)]
21. Yao, X.; Dani, C. A Simple Method for Generating, Clearing, and Imaging Pre-Vascularized 3D Adipospheres Derived from Human IPS Cells. *Methods Mol. Biol.* **2022**, *2454*, 495–507. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Bianco, A.C.; Salvatore, D.; Gereben, B.; Berry, M.J.; Larsen, P.R. Biochemistry, Cellular and Molecular Biology, and Physiological Roles of the Iodothyronine Selenodeiodinases. *Endocr. Rev.* **2002**, *23*, 38–89. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Wagner, M.S.; Wajner, S.M.; Dora, J.M.; Maia, A.L. Regulation of Dio2 Gene Expression by Thyroid Hormones in Normal and Type 1 Deiodinase-Deficient C3H Mice. *J. Endocrinol.* **2007**, *193*, 435–444. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Ambele, M.A.; Dhanraj, P.; Giles, R.; Pepper, M.S. Adipogenesis: A Complex Interplay of Multiple Molecular Determinants and Pathways. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 4283. [[CrossRef](#)]
25. Machado, S.A.; Pasquarelli-do-Nascimento, G.; da Silva, D.S.; Farias, G.R.; de Oliveira Santos, I.; Baptista, L.B.; Magalhães, K.G. Browning of the White Adipose Tissue Regulation: New Insights into Nutritional and Metabolic Relevance in Health and Diseases. *Nutr. Metab.* **2022**, *19*, 61. [[CrossRef](#)]
26. Shen, J.X.; Couchet, M.; Dufau, J.; de Castro Barbosa, T.; Ulbrich, M.H.; Helmstädter, M.; Kemas, A.M.; Zandi Shafagh, R.; Marques, M.-A.; Hansen, J.B.; et al. 3D Adipose Tissue Culture Links the Organotypic Microenvironment to Improved Adipogenesis. *Adv. Sci.* **2021**, *8*, 2100106. [[CrossRef](#)]
27. Ahdjoudj, S.; Kaabeche, K.; Holy, X.; Fromigué, O.; Modrowski, D.; Zérath, E.; Marie, P.J. Transforming Growth Factor-Beta Inhibits CCAAT/Enhancer-Binding Protein Expression and PPAR γ Activity in Unloaded Bone Marrow Stromal Cells. *Exp. Cell Res.* **2005**, *303*, 138–147. [[CrossRef](#)]
28. Majeed, Y.; Halabi, N.; Madani, A.Y.; Engelke, R.; Bhagwat, A.M.; Abdesselem, H.; Agha, M.V.; Vakayil, M.; Courjaret, R.; Goswami, N.; et al. SIRT1 Promotes Lipid Metabolism and Mitochondrial Biogenesis in Adipocytes and Coordinates Adipogenesis by Targeting Key Enzymatic Pathways. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 8177. [[CrossRef](#)]
29. Lefterova, M.I.; Haakonsson, A.K.; Lazar, M.A.; Mandrup, S. PPAR γ and the Global Map of Adipogenesis and Beyond. *Trends Endocrinol. Metab.* **2014**, *25*, 293–302. [[CrossRef](#)]
30. 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. A Renewable Source of Human Beige Adipocytes for Development of Therapies to Treat Metabolic Syndrome. *Cell Rep.* **2018**, *25*, 3215–3228.e9. [[CrossRef](#)]
31. Nishio, M.; Yoneshiro, T.; Nakahara, M.; Suzuki, S.; Saeki, K.; Hasegawa, M.; Kawai, Y.; Akutsu, H.; Umezawa, A.; Yasuda, K.; et al. Production of Functional Classical Brown Adipocytes from Human Pluripotent Stem Cells Using Specific Hemopoietin Cocktail without Gene Transfer. *Cell Metab.* **2012**, *16*, 394–406. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Lizcano, F.; Vargas, D.; Gómez, Á.; Torrado, A. Human ADMC-Derived Adipocyte Thermogenic Capacity Is Regulated by IL-4 Receptor. *Stem Cells Int.* **2017**, *2017*, 2767916. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Jin, H.; Li, D.; Wang, X.; Jia, J.; Chen, Y.; Yao, Y.; Zhao, C.; Lu, X.; Zhang, S.; Togo, J.; et al. VEGF and VEGFB Play Balancing Roles in Adipose Differentiation, Gene Expression, and Function. *Endocrinology* **2018**, *159*, 2036–2049. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Chung, S.; Parks, J.S. Dietary Cholesterol Effects on Adipose Tissue Inflammation. *Curr. Opin. Lipidol.* **2016**, *27*, 19–25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Chavey, C.; Mari, B.; Monthouel, M.-N.; Bonnafous, S.; Anglard, P.; Van Obberghen, E.; Tartare-Deckert, S. Matrix Metalloproteinases Are Differentially Expressed in Adipose Tissue during Obesity and Modulate Adipocyte Differentiation. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 11888–11896. [[CrossRef](#)]

36. Wagegg, M.; Gaber, T.; Lohanatha, F.L.; Hahne, M.; Strehl, C.; Fangradt, M.; Tran, C.L.; Schönbeck, K.; Hoff, P.; Ode, A.; et al. Hypoxia Promotes Osteogenesis but Suppresses Adipogenesis of Human Mesenchymal Stromal Cells in a Hypoxia-Inducible Factor-1 Dependent Manner. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e46483. [[CrossRef](#)]
37. Venteclef, N.; Jakobsson, T.; Steffensen, K.R.; Treuter, E. Metabolic Nuclear Receptor Signaling and the Inflammatory Acute Phase Response. *Trends Endocrinol. Metab.* **2011**, *22*, 333–343. [[CrossRef](#)]
38. Wu, Z.; Bucher, N.L.; Farmer, S.R. Induction of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma during the Conversion of 3T3 Fibroblasts into Adipocytes Is Mediated by C/EBPbeta, C/EBPdelta, and Glucocorticoids. *Mol. Cell Biol.* **1996**, *16*, 4128–4136. [[CrossRef](#)]
39. Smas, C.M.; Chen, L.; Zhao, L.; Latasa, M.J.; Sul, H.S. Transcriptional Repression of Pref-1 by Glucocorticoids Promotes 3T3-L1 Adipocyte Differentiation. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 12632–12641. [[CrossRef](#)]
40. Desarzens, S.; Faresse, N. Adipocyte Glucocorticoid Receptor Has a Minor Contribution in Adipose Tissue Growth. *J. Endocrinol.* **2016**, *230*, 1–11. [[CrossRef](#)]
41. Jiang, N.; Li, Y.; Shu, T.; Wang, J. Cytokines and Inflammation in Adipogenesis: An Updated Review. *Front. Med* **2019**, *13*, 314–329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Cignarelli, A.; Genchi, V.A.; Perrini, S.; Natalicchio, A.; Laviola, L.; Giorgino, F. Insulin and Insulin Receptors in Adipose Tissue Development. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 759. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. van den Berg, S.M.; van Dam, A.D.; Rensen, P.C.N.; de Winther, M.P.J.; Lutgens, E. Immune Modulation of Brown(Ing) Adipose Tissue in Obesity. *Endocr. Rev.* **2017**, *38*, 46–68. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Kurita, K.; Ishikawa, K.; Takeda, K.; Fujimoto, M.; Ono, H.; Kumagai, J.; Inoue, H.; Yokoh, H.; Yokote, K. CXCL12-CXCR4 Pathway Activates Brown Adipocytes and Induces Insulin Resistance in CXCR4-Deficient Mice under High-Fat Diet. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 6165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Ahmadian, M.; Suh, J.M.; Hah, N.; Liddle, C.; Atkins, A.R.; Downes, M.; Evans, R.M. PPAR γ Signaling and Metabolism: The Good, the Bad and the Future. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 557–566. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Fuster, G.; Almendro, V.; Fontes-Oliveira, C.C.; Toledo, M.; Costelli, P.; Busquets, S.; López-Soriano, F.J.; Argilés, J.M. Interleukin-15 Affects Differentiation and Apoptosis in Adipocytes: Implications in Obesity. *Lipids* **2011**, *46*, 1033–1042. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Ahmad, B.; Serpell, C.J.; Fong, I.L.; Wong, E.H. Molecular Mechanisms of Adipogenesis: The Anti-Adipogenic Role of AMP-Activated Protein Kinase. *Front. Mol. Biosci.* **2020**, *7*, 76. [[CrossRef](#)]
48. van der Vaart, J.I.; Boon, M.R.; Houtkooper, R.H. The Role of AMPK Signaling in Brown Adipose Tissue Activation. *Cells* **2021**, *10*, 1122. [[CrossRef](#)]
49. Leiva, M.; Matesanz, N.; Pulgarín-Alfaro, M.; Nikolic, I.; Sabio, G. Uncovering the Role of P38 Family Members in Adipose Tissue Physiology. *Front. Endocrinol.* **2020**, *11*, 572089. [[CrossRef](#)]
50. Bordicchia, M.; Liu, D.; Amri, E.-Z.; Ailhaud, G.; Dessì-Fulgheri, P.; Zhang, C.; Takahashi, N.; Sarzani, R.; Collins, S. Cardiac Natriuretic Peptides Act via P38 MAPK to Induce the Brown Fat Thermogenic Program in Mouse and Human Adipocytes. *J. Clin. Investig.* **2012**, *122*, 1022–1036. [[CrossRef](#)]
51. Petersen, R.K.; Madsen, L.; Pedersen, L.M.; Hallenborg, P.; Hagland, H.; Viste, K.; Døskeland, S.O.; Kristiansen, K. Cyclic AMP (cAMP)-Mediated Stimulation of Adipocyte Differentiation Requires the Synergistic Action of Epac- and cAMP-Dependent Protein Kinase-Dependent Processes. *Mol. Cell Biol.* **2008**, *28*, 3804–3816. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Klepac, K.; Kilić, A.; Gnad, T.; Brown, L.M.; Herrmann, B.; Wilderman, A.; Balkow, A.; Glöde, A.; Simon, K.; Lidell, M.E.; et al. The Gq Signalling Pathway Inhibits Brown and Beige Adipose Tissue. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 10895. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Conclusion générale

L'ensemble des données obtenues au cours de cette thèse ont mis en évidence une action de *Cdkn2a* dans l'adipocyte.

La première partie de cette étude c'est intéressé à comprendre l'action de *Cdkn2a* sur la capacité de brunissement, les mécanismes métaboliques et voies de signalisations impliquées dans l'adipocyte mature à l'aide d'un modèle de souris déficiente pour *Cdkn2a* dans l'adipocyte mature (*Cdkn2a*^{ad-/-}). Nos résultats ont permis de démontrer l'effet métabolique de l'extinction de *Cdkn2a* suite à la mise sous HFD des animaux. En effet, les souris *Cdkn2a*^{ad-/-} présentent un profil métabolique amélioré avec une meilleure tolérance au glucose sans modification des paramètres insulinémiques, une hypoleptinémie et hyporésistinémie associées à une augmentation de la dépense énergétique, sans brunissement. De plus, l'étude des mécanismes transcriptomiques régulés par *Cdkn2a* dans l'adipocyte mature montre une action dépôt-spécifique de *Cdkn2a*. En effet, on observe une diminution de la réponse inflammatoire, une augmentation des voies pro-adipogéniques et de l'apoptose dans le BAT. En revanche, dans l'eWAT l'extinction de *Cdkn2a* conduit à une augmentation globale des voies métaboliques impliquées dans l'utilisation des substrats énergétiques, en particulier le métabolisme du glucose et l'activité oxydative avec aussi une diminution de la réponse inflammatoire. L'étude de ces processus dans un modèle *in vitro* de 3T3-L1 a validé ces données avec notamment une augmentation de la respiration mitochondriale et de la capture du glucose en basal, suggérant un effet de *Cdkn2a* en basal probablement médié *via*, au moins en partie, par l'activité de l'AMPK, ou encore la PKA et la voie de p70S6K. Malgré l'absence de brunissement dans notre modèle adipocyte spécifique, les différents résultats obtenus nous ont permis de montrer l'action de *Cdkn2a* au niveau de l'adipocyte mature, avec des effets dépôts spécifique, dans le contrôle de l'homéostasie énergétique et lipidique par des voies différentes que celles utilisées pour réguler le cycle cellulaire, ainsi que son implication dans la régulation de la plasticité du tissu adipeux au cours de l'obésité.

Dans la seconde partie de cette étude, en parallèle du modèle souris, nous avons examiné l'implication de *CDKN2A* dans l'initiation d'un programme thermogénique au stade progéniteur grâce à l'utilisation d'un modèle hiPSC-BAPs différenciés en sphéroïdes 3D. Les analyses du transcriptome et de l'activité kinase ont montré que l'extinction de *CDKN2A* active les voies impliquées dans l'adipogenèse, le métabolisme oxydatif et potentialise le processus de brunissement, entraînant une reprogrammation des hiPSC-BAPs différenciés en adipocytes de type brun.

L'ensemble de ces données suggère que le brunissement observé lors de l'inactivation globale de *Cdkn2a* chez la souris n'est pas dû à une transdifférenciation des adipocytes. Cependant, l'extinction *Cdkn2a* activerait les voies du métabolisme énergétique et potentialiserait le brunissement de l'adipocyte par des voies indépendantes de celles utilisées pour moduler le cycle cellulaire. De plus, l'extinction de *CDKN2A* dans les hiPSC-BAPs montre que cet effet cellulaire est autonome. La combinaison des différentes approches utilisées lors de cette thèse ont permis de mettre en évidence, que malgré une action spécifique, des voies adipocytaires communes sous le contrôle de *CDKN2A* (telles que l'AMPK, PKA et la p70S6K) associées au brunissement adipocytaire. La mise en évidence des voies moléculaires contrôlées par *CDKN2A* dans l'adipocyte impliquées dans le brunissement est une première étape pour la mise en place d'approches thérapeutiques visant à activer le brunissement afin d'atténuer les effets délétères de l'obésité sur la résistance à l'insuline et de DT2.

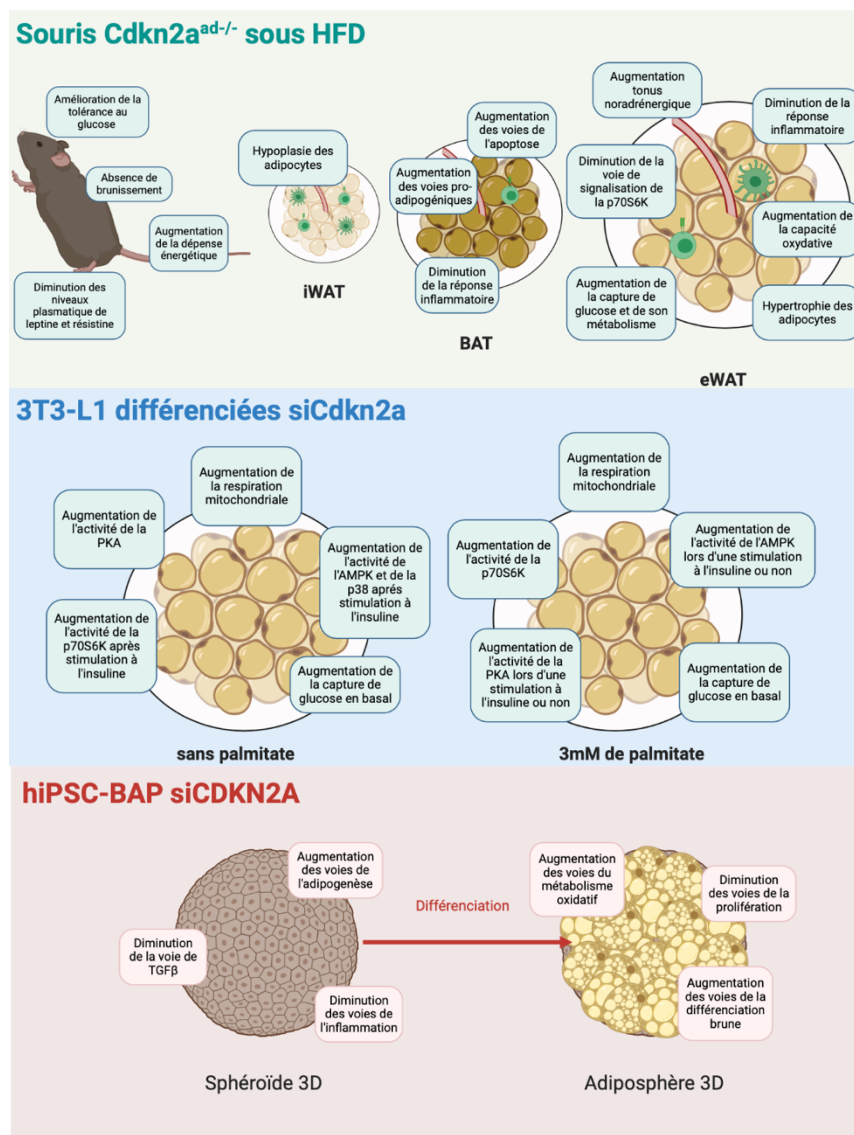


Figure 52. Représentation schématique de la conclusion de cette étude.

Discussion

Cette thèse avait pour objectif de déterminer si les modifications métaboliques observées dans le KO global de *Cdkn2a* sont liées à un effet direct de la délétion de *Cdkn2a* dans l'adipocyte mature, ainsi que son impact sur l'obésité et sur les conséquences métaboliques de l'obésité mais aussi d'étudier l'implication de *CDKN2A* dans le développement et la fonction de l'adipocyte.

Pour ce faire, nous avons dans un premier temps utilisé un modèle murin dans lequel le locus *Cdkn2a* est inactivée spécifiquement dans l'adipocyte mature (*Cdkn2a*^{ad-/-}).

L'un des premiers objectifs de cette thèse était de caractériser phénotypiquement notre modèle de délétion de *Cdkn2a* dans l'adipocyte mature. Nous avons mis en évidence que l'absence de *Cdkn2a* au sein de l'adipocyte mature engendre des modifications des paramètres métaboliques suite à un stress métabolique. En effet, lors de test de tolérance au glucose, nous avons constaté une amélioration de la tolérance au glucose chez les souris *Cdkn2a*^{ad-/-} sous régime HFD sans modifications des paramètres insulinémiques (concentration plasmatique et sensibilité). De plus, ces résultats sont opposés de ceux publiés par notre équipe dans le modèle de délétion globale de *Cdkn2a*. En effet, la délétion globale de *Cdkn2a* engendre une amélioration de la sensibilité à l'insuline chez les souris sous HFD sans modifier la tolérance au glucose. L'ensemble de ces résultats semble démontrer que la délétion de *Cdkn2a* dans l'adipocyte mature ne conduit pas à l'amélioration de la sensibilité à l'insuline, reste à savoir par quels mécanismes l'absence de *Cdkn2a* conduit à une meilleure tolérance au glucose chez les souris *Cdkn2a*^{ad-/-}.

Dans le modèle de délétion globale de *Cdkn2a*, en plus d'une amélioration de la sensibilité à l'insuline une protection des souris sous HFD contre l'obésité a été observée ainsi qu'une augmentation de la dépense énergétique. En revanche, dans le modèle de délétion spécifique de *Cdkn2a* dans les adipocytes matures, nous n'observons aucune modification de la prise de poids chez les souris sous HFD. Les souris *Cdkn2a*^{ad-/-} présentent également une augmentation de la dépense énergétique corrélée à une prise alimentaire inchangée.

On observe aussi chez ces souris *Cdkn2a*^{ad-/-} une hypoléptinémie et hyporésistinémie associée à une diminution de l'expression ARNm de ces adipokines (données non présentées) dans les différents dépôts de tissu adipeux. Il est connu que les taux de leptine et résistine sont élevés chez les souris ou une obésité a été induite par un régime riche en graisse. De plus, la sécrétion excessive de résistine dans le modèle murin représente un lien

physiopathologique entre obésité et diabète de type 2. La diminution des niveaux plasmatiques de résistine chez les souris *Cdkn2a*^{ad-/-} est cohérente avec le profil métabolique amélioré observé chez ces animaux. Il en est de même pour la diminution des niveaux plasmatique de la leptine. En effet, la leptine module la réponse pro-inflammatoire en augmentant la production de cytokines pro-inflammatoires or il semble que les souris *Cdkn2a*^{ad-/-} présentent une diminution de la réponse inflammatoire notamment observées dans les données RNA-seq de l'eWAT et du BAT mais aussi lorsque nous observons les coupes histologiques de l'eWAT en coloration à l'hématoxyline et à l'éosine. En revanche ce qui est surprenant ici c'est que malgré une diminution des taux de leptine et une balance énergétique augmentée nous n'observons aucun changement dans la prise alimentaire ni même dans le poids des tissus adipeux.

Nous avons également étudié la masse et la composition, plus précisément la taille et le nombre des adipocytes présent au sein des deux dépôts de WAT puisqu'il est connu que l'hypertrophie des adipocytes est un déclencheur et un marqueur de la dysfonction du tissu adipeux chez les personnes obèses ou non [316]. Nos résultats montrent que la perte de *Cdkn2a* dans l'adipocyte mature est suffisante pour engendrer une augmentation significative de la taille des adipocytes (hypertrophie) dans l'eWAT ainsi qu'une diminution du nombre d'adipocytes dans l'iWAT (hypoplasie). Néanmoins aucune différence du poids des dépôts de tissu adipeux n'a été observée entre les contrôles et les *Cdkn2a*^{ad-/-}.

Afin de caractériser au niveau moléculaire notre modèle, nous avons étudié l'expression de différents gènes cibles de l'adipocyte et du brunissement. En effet, dans le modèle murin de délétion globale de *Cdkn2a*, un brunissement du tissu adipeux inguinal a été observé en corrélation avec une augmentation significative de certains gènes du brunissement tel que UCP1, PPAR γ ou encore Prdm16 (données non présentées). Dans notre modèle de délétion de *Cdkn2a* spécifique de l'adipocyte mature, nous n'observons aucune modification significative du taux d'expression d'ARNm de ces marqueurs du brunissement au niveau des WAT, suggérant ainsi que la délétion de *Cdkn2a* au niveau de l'adipocyte mature n'est pas suffisante pour induire le brunissement du tissu adipeux. Ces données moléculaires sont cohérentes avec les données d'immunohistochimie dans les différents dépôts de TA ou on n'observe aucune différence d'UCP1 (données non présentées).

L'analyse plus approfondie des mécanismes moléculaire régulée par *Cdkn2a* dans l'adipocyte par analyse du transcriptome par séquençage de seconde génération NGS (illumina) des 3 différents dépôts de tissus adipeux a été effectuée. Ces résultats ont confirmé



l'absence d'action significative de l'extinction de *Cdkn2a* dans l'iWAT au niveau transcriptomique puisque seulement 11 gènes sont modulés de façon significative dans ce tissu. Concernant le BAT, l'effet principal observé est une diminution de la réponse inflammatoire. A la suite de l'analyse de ces résultats nous avons décidé de concentrer l'étude sur l'eWAT qui semble être le TA le plus impacté par l'extinction de *Cdkn2a* au niveau transcriptomique. L'ensemble des résultats obtenus dans l'eWAT semble indiquer que la délétion de *Cdkn2a* dans ce tissu engendre une amélioration de l'activité métabolique de l'adipocyte et de l'utilisation des substrats énergétiques ; en particulier, une amélioration de la capture du glucose et de son métabolisme possiblement associé à une meilleure sensibilité à l'insuline au niveau de l'adipocyte, mais que cette amélioration n'est pas visible au niveau globale car pas assez prononcée. En effet, aucunes différences des paramètres insulinémique au niveau globale n'as était observé mais en revanche dans l'eWAT une diminution possible de la voie de rétrocontrôle de l'insuline semble avoir lieu lors de l'extinction de *Cdkn2a* puisque lors de l'étude transcriptomique de ce tissu nous observons la diminution de la voie « regulation of eIF4 and p70S6K signalisation ». De plus, plusieurs études ont montré que l'inhibition pharmacologique de CDK4 (p16^{INK4a} se lie à CDK4/6, inhibant la formation du complexe cycline D-CDK4/6 et la phosphorylation médiée par CDK4/6 des membres de la famille Rb) dans les adipocytes 3T3-L1 entièrement différenciés diminue la sensibilité à l'insuline et réduit le transport du glucose [169,317,318]. Une analyse globale du kinome de souris déficientes en CDK4 suite à une stimulation à l'insuline a révélé que la signalisation de l'insuline est altérée chez ces animaux [319]. L'ensemble de ces études semble suggérer une action de la voie de p16 dans la sensibilité insuline au niveau de l'adipocyte. On observe aussi une amélioration de sa capacité oxydative mettant en avant une prédisposition au brunissement de ce tissu même si aucun brunissement n'est observable.

Afin de mesurer les effets de la délétion de *Cdkn2a* sur la respiration mitochondriale, le taux de consommation d'oxygène (OCR) et le taux d'acidification extracellulaire (ECAR), qui représente en grande partie la glycolyse, ont été mesurés grâce à la plateforme XF24e de Seahorse Biosciences. Les cellules si*Cdkn2a* présentent une respiration basale, une capacité respiratoire maximale et une production d'ATP significativement plus élevée avec une stimulation au palmitate ou non, corrélée avec un ECAR lui aussi significativement augmenté. Associée à l'augmentation de l'ECAR, on observe une augmentation de la capture du glucose sans stimulation à l'insuline suggérant que *Cdkn2a* modulerait la capture de glucose en basale. En effet, on observe dans l'eWAT une augmentation de l'expression de l'ARNm de certains membres de la famille des facilitateurs du transport du glucose les GLUT, qui régule le

transport du glucose et d'autres monosaccharides dans et hors des cellules des mammifères et jouent donc un rôle central dans le maintien des concentrations de glucose dans le sang. Slc2a3 (solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3), aussi connu sous le nom de GLUT3, et Slc2a5 ou GLUT5 ont tous les deux une augmentation de l'expression de leur ARNm dans l'eWAT des souris *Cdkn2a*^{ad-/-}. GLUT 3 et GLUT 5 sont connus pour avoir une activité insulino-indépendante sur la capture de glucose et fructose respectivement avec une forte affinité de GLUT3 pour le glucose[320–322].

Dans un second modèle d'étude nous avons étudié les effets de *CDKN2A* dans les progéniteurs adipeux ainsi que sur la potentialisation de l'activité BAT.

Nous avons dans un premier temps démontré l'efficacité de notre modèle d'étude, en effet la différenciation en adiposphères améliore les capacités d'adipogénèse et de brunissement des cellules hiPSC-BAP en 3D.

L'étude de l'extinction de *CDKN2A* au stade de progéniteurs dans les hiPSC-BAPs a mis en évidence l'importance de *CDKN2A* dans l'adipogénèse, le métabolisme oxydatif et l'activité de brunissement.

Notre étude pose un certain nombre de questions :

1) Pourquoi la souris *Cdkn2a*^{ad-/-} présente-t-elle un profil métabolique et une homéostasie glucidique différente de la souris présentant une invalidation globale ?

L'une des hypothèses est que cette modification dans le modèle d'invalidation globale est la résultante d'une communication inter-organes, notamment entre les organes métaboliques et plus précisément le tissu adipeux et le pancréas. En effet, dans le modèle d'invalidation globale l'ensemble des organes subissent l'extinction de *Cdkn2a* notamment le pancréas or plusieurs études de perte ou de gain de fonction de *CDKN2A* ont montré que ce locus est impliqué dans les fonctions des cellules β [277–279], l'étude de l'inactivation de *CDKN2A* dans la lignée de cellules β EndoC- β H1 entraîne une augmentation de la sécrétion d'insuline. Le pancréas et le TA sont tous les deux des organes endocrines sécréteurs et sont connus pour interagir ensemble dans la régulation de l'homéostasie métabolique. Effectivement, la sécrétion d'insuline par le pancréas est connue pour induire une

augmentation de la capture du glucose mais aussi du stockage des TG dans le TA. Cette interaction est aussi effective dans l'autre sens avec notamment une régulation négative des fonctions des cellules β par la production entre autres de la leptine et $\text{TNF}\alpha$, en revanche la production de visfatine et d'adiponectine améliore les fonctions de ces cellules. Effectivement, dans des ilots isolés de souris sous HFD l'adiponectine stimule la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (GSIS)[323], en revanche la leptine elle est connue pour inhiber la sécrétion d'insuline par les cellules β du pancréas *in vivo* et *in vitro*[324]. Il a aussi été montré que la Visfatin augmente la sécrétion d'insuline dans les cellules β et βTC6 [325,326] et que $\text{TNF}\alpha$ induit l'apoptose des cellules β [327].

Une autre hypothèse serait en lien avec l'effet de la délétion de *Cdkn2a* au niveau des précurseurs adipocytaires, qui, dans notre modèle *Cdkn2a*^{ad-/-}, ne sont pas ciblés et expriment donc *Cdkn2a*. En effet, le rôle et le niveau d'expression de ce locus semble être différents entre les précurseurs adipocytaires et l'adipocyte mature. Dans les précurseurs *Cdkn2a* semble être plus exprimé que dans l'adipocyte mature[328] et va jouer sur la prolifération et la différenciation de ces précurseurs[317,329]. Or dans l'adipocyte mature *Cdkn2a* ne semble pas avoir d'effet sur la prolifération dans notre modèle *Cdkn2a*^{ad-/-}. Il se peut donc que comme ces effets sur la prolifération, ces effets métaboliques soient différents entre les précurseurs adipocytaires et l'adipocyte mature. De plus, l'étude de l'inhibition de CDK4/6 a montré des différences d'effets de cette inhibition sur la SVF et les adipocytes matures. Effectivement, dans la SVF cette inhibition va réduire le nombre de précurseurs adipeux beige ainsi que le potentiel de brunissement de cette SVF, alors que dans l'adipocyte mature cette inhibition va réduire le pourcentage d'expression d'UCP1 et le profil thermogénique de ces adipocytes[330].

En plus d'une action probable sur les cellules progénitrices du tissu adipeux, il est possible que le brunissement de l'iWAT observé dans le modèle de délétion globale provienne d'une communication inter-organes, notamment le cœur, qui présente une hypertrophie dans ce modèle (données non publiées). En effet, les oreillettes cardiaques sont connues pour produire les peptides natriurétiques ANP (Atrial Natriuretic Peptide) et BNP (Brain Natriuretic Peptide) impliqués dans le brunissement du tissu adipeux [331].

2) L'extinction de *CDKN2A* au niveau du précurseur adipocytaire et de l'adipocyte mature a-t-elle les mêmes conséquences ? Quelles sont les mécanismes cellulaires impliqués ?

L'ensemble des données obtenues au cours de cette thèse a permis de mettre en évidence les rôles de *Cdkn2a* dans l'adipocyte mature mais aussi dans les hiPSC-BAPs. Nos résultats démontrent que les produits du gène *CDKN2A* p16^{INK4A} et p19^{ARF} sont, en plus de leur rôle connu de protéines régulatrices du cycle cellulaire, des régulateurs cruciaux de la fonction des adipocytes et de l'adaptation au stress métabolique. Les données obtenues dans le modèle *Cdkn2a*^{ad-/-} suggèrent que *Cdkn2a* peut ne pas contrôler la plasticité du TA par transdifférenciation dans des adipocytes entièrement différenciées, soulevant l'hypothèse d'effets potentiels sur les cellules progénitrices.

Une des limites de notre modèle *Cdkn2a*^{ad-/-} est qu'il ne cible que les adipocytes matures, il serait donc intéressant d'étudier l'effet de la délétion de *Cdkn2a* au niveau des précurseurs adipocytaires.

Pour ce faire, une première option est que, suite aux prélèvements des tissus adipeux de nos souris *Cdkn2a*^{ad+/+} et *Cdkn2a*^{ad-/-}, un fractionnement cellulaire sera effectué afin de séparer les adipocytes matures de la fraction stromale vasculaire, où se trouve les précurseurs. Nous inhiberons l'expression de *Cdkn2a* par siRNA ou encore par la technique de CRISPR/Cas9. Nous pourrons ensuite, réaliser une culture primaire de ces précurseurs, pour notamment étudier les différents gènes cibles du brunissement.

La seconde option, serait de développer un modèle murin de délétion génique spécifique des précurseurs adipocytaires en utilisant le système Cre/LoxP. Pour ce faire l'utilisation de Cre spécifique des précurseurs sera nécessaire, avec notamment l'utilisation de promoteur de la Cre SM22 ou encore *Pdgfr*, qui sont des marqueurs embryonnaires précoces du tissu adipeux, [332] modèles de souris disponible sur le marché.

3) Pourquoi la souris *Cdkn2a*^{ad-/-} présente des effets spécifiques à chaque dépôt de tissu adipeux sans brunissement visible?

Les modifications de la taille et du nombre d'adipocytes observé indépendamment d'une modification de poids peuvent être justifiées par l'expression de facteurs pro-inflammatoires exprimés en cas d'obésité, comme observé chez les souris GPS2 AKO ou la perte de GPS2 adipocytaire suffit à provoquer une hypertrophie du WAT sans changement de la prise de poids [333]. Dans ce modèle GPS2 AKO cette hypertrophie est justifiée par l'activation incontrôlée du facteur de transcription HIF1 α suite à la perte de GPS2 [333]. De plus, l'analyse des coupes histologiques en coloration à l'hématoxyline et à l'éosine dans notre modèle semble confirmer cette hypothèse dans l'eWAT. Dans ce contexte, l'étude des facteurs pro-inflammatoires

devrait nous permettre de mieux appréhender ces variations de cellularité au niveau du tissu adipeux des souris *Cdkn2a*^{ad-/-}.

De plus, les modulations que nous observons dans notre modèle *Cdkn2a*^{ad-/-} se réalise principalement au niveau du eWAT et non dans l'iWAT comme dans le modèle d'invalidation globale. Il est bien connu que ces deux tissus sont distincts tant dans leur localisation, fonctions et implications dans le développements de maladies métaboliques [334,335] que leur profil transcriptomique [328,336] ce qui peut expliquer l'absence de brunissement dans le modèle *Cdkn2a*^{ad-/-}. Une étude récente a mis en avant que l'exposition au froid des souris induit un profil transcriptomique différents entre les dépôts d'eWAT et iWAT. En effet, dans cette étude le froid induit une augmentation des niveau d'expression de l'ensemble des gènes impliqué dans la thermogénèse et de la mitochondrie dans l'iWAT mais pas dans l'eWAT ou on observe quand même l'augmentation de UCP1, Prdm16 et Cox8b[330]. De nombreuses études ont démontré la capacité de l'eWAT et de l'iWAT à brunir mais dans la plupart des études un seul des dépôts présente un brunissement [141,337–339].

4) Quels sont les mécanismes cellulaires conduisant à l'augmentation globale des voies contrôlant l'activité du métabolisme oxydatif dans l'adipocyte présentant une extinction de *CDKN2A* ?

Malgré les différences que nous avons pu observer entre les différents dépôts de tissu adipeux ou les différents modèles présentés dans ce manuscrit, il semble que l'extinction de *CDKN2A* cible des voies communes dans l'ensemble de ces modèles, ce qui suggérer une action conservée dans les différents modèles. En effet, dans un premier temps nous avons pu observer une diminution de la réponse immunitaire autant dans les hiPSC-BAP présentant l'extinction de *CDKN2A* que dans l'eWAT et le BAT des souris *Cdkn2a*^{ad-/-}. Dans la littérature il a déjà été démontré l'effet de p53 et p16 sur le développement de l'inflammation du TA et notamment leur action sur la polarisation des macrophages [292,340–342]. De plus, il semble que l'action de l'extinction de *CDKN2A* dans les différents modèles va activer l'activité du métabolisme oxydatif dans l'adipocyte. Il est probable que cette activation est lieu au moins en partie grâce à l'action de l'AMPK. En effet, on retrouve une augmentation de l'activité AMPK dans les données hiPSC-BAPs mais aussi dans l'analyse du kinome des cellules 3T3-L1 présentant une extinction de *Cdkn2a*. L'action de l'AMPK sur l'activité du métabolisme oxydatif a été proposé de nombreuses fois dans la littérature. Effectivement, l'activation de l'AMPK dans l'adipocytes entraîne une diminution du flux lipogène, de la synthèse des triglycérides et de l'adipogénèse du tissu adipeux blanc et augmente l'oxydation des acides gras et le transport

du glucose [142,313]. Une autre voie qui semble être commune à l'ensemble des modèles étudié ici mais aussi lors du KO global est la voie de la PKA. L'activité de la PKA a été de nombreuses fois associée à l'action de *Cdkn2a* et ceux dans différents tissus, notamment dans le foie [141,272]. La PKA est aussi associée à une augmentation sur l'activité du métabolisme oxydatif avec notamment un effet sur le brunissement du TA [141,306]. L'activité d'une autre kinase la p70S6K qui est une kinase clés dans la cascade de signalisation de l'insuline et dont le rôle dans la voie de rétrocontrôle de l'insuline est très important est modulé dans les données hiPSC-BAP et dans l'analyse du kinome des cellules 3T3-L1 présentant une extinction de *Cdkn2a*. En plus de son action sur la voie de l'insuline cette kinase à un rôle clé dans la régulation de nombreux processus, y compris l'apoptose, la prolifération, l'organisation cytosquelettique, la synthèse des protéines, l'épissage de l'ARNm, la transcription et le métabolisme[343,343,344]. De plus, son action sur la résistance à l'insuline dans le tissu adipeux a elle aussi été démontré [343]. Il serait donc intéressant de définir par quel mécanisme *CDKN2A* régule l'activité de l'AMPK, la PKA et la p70S6K, notamment en essayant de déchiffrer les mécanismes de phosphorylation qui peuvent interagir. Les deux protéines pour lesquelles *CDKN2A* code p16^{INK4a} et p14/p19^{ARF} sont des régulateurs clé de l'activité kinase, il n'est donc pas surprenant qu'il puisse interagir sur ces kinases une kinase par des actions d'inhibitions ou d'activation des cascades de phosphorylation.

5) L'augmentation de la capture du glucose et de l'activité oxydative est-elle dépendante de l'action de l'insuline ? Quelles sont les voies cellulaires impliquées ?

Nous supposons que malgré l'absence de modification au niveau global des paramètres insulinémiques, la délétion de *Cdkn2a* dans l'adipocyte mature de l'eWAT module l'action de la voie de régulation de la p70S6K sur la voie de rétrocontrôle de l'insuline. p70S6K est une des kinases clés impliquée dans la cascade de signalisation de l'insuline et est connue pour réguler une variété de processus, y compris l'apoptose, la prolifération, l'organisation du cytosquelette, la synthèse des protéines, l'épissage de l'ARNm, la transcription, le métabolisme et le rétrocontrôle dans la voie de l'insuline. Afin de valider cette hypothèse il serait intéressant de valider la modulation de cette voie spécifiquement sur le rétrocontrôle de l'insuline. Dans un premier temps, la validation par Western-Blot de l'activation de cette voie, en étudiant notamment la phosphorylation des molécules de signalisation sensibles à l'insuline qui comprennent les substrats des récepteurs de l'insuline (IRS) -1 et -2, la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) et la protéine kinase B (PKB; également connue sous le nom d'Akt) serait

intéressante. De plus, comme décrit précédemment des études ont mis en avant l'action de Cdk4 sur la sensibilité à l'insuline et la voie de signalisation de l'insuline [169,317–319].

Nous pouvons aussi envisager que l'adipocyte mature délété en *Cdkn2a* a développé des mécanismes qui ne sont pas dépendant de la voie de l'insuline notamment en modulant les voies en aval des récepteurs β adrénergique (mTORC2) [345], favorisant ainsi la capture du glucose sans amélioration de la sensibilité à l'insuline.

Nous avons pu constater lors de l'analyse RNA-seq du eWAT que les souris *Cdkn2a*^{ad-/-} présentent notamment une augmentation du tonus noradrénergique et augmentation des enzymes de synthèse des catécholamines, avec notamment une augmentation de la tyrosine hydroxylase (TH) observée dans les coupes histologiques de l'eWAT (données non présentées), suggérant la possibilité d'une action des voies β adrénergiques sur l'amélioration de la capture de glucose observée. En effet, la perfusion chronique de noradrénaline imite l'effet de l'exposition au froid sur la stimulation de l'absorption du glucose dans le BAT et le WAT [303,346]. Il semble qu'une partie de la cascade impliquée dans cette augmentation de la capture de glucose soit commune avec la voie insulino-dépendante. En effet, il a été suggéré que l'activation des voies β adrénergique dans le muscle et le BAT est une activité concomitante avec celle de l'insuline dans la capture du glucose avec notamment une action de mTORC2. En effet il est suggéré que l'activation de mTORC2 pourrait avoir lieu par l'action des voies β adrénergique et de l'insuline et que mTORC2 à son tour agirait sur la voie de l'insuline en ciblant la phosphorylation d'AKT. Il serait donc intéressant d'étudier plus en détail ces voies dans notre modèle avec notamment l'utilisation d'activateur et d'inhibiteurs spécifiques et d'observer en Western-blot l'activation ou non des différents acteurs de ces voies. En effet, il est possible d'inhiber la voie des récepteur β adrénergique en provoquant une désensibilisation homologue du récepteur par traitement au CL-316243 un agoniste β -3 thermogénique [347], ce qui produit une résistance aux catécholamines et inhiberait cette voie nous permettant d'étudier spécifiquement l'effet de *Cdkn2a* spécifiquement sur un mécanisme insulino-dépendant. L'utilisation d'inhibiteur tel que la wortmannine qui cible spécifiquement la PI3K ou rapamycine qui inhibe mTOR permettrait aussi de mieux comprendre l'action de l'absence de *Cdkn2a* sur cette voie.

GLUT3 est connu pour être présent dans des cellules ayant des besoins énergétiques très spécifiques et élevés. Comme décrit précédemment nous observons une augmentation de l'expression de l'ARNm de GLUT3 et GLUT5 dans l'eWAT des souris *Cdkn2a*^{ad-/-}. Dans les cellules souches adipeuses (ASC), il a été observé que l'hypoxie augmentait significativement l'absorption de glucose dans les ASC et que l'expression des transporteurs de glucose GLUT1 et GLUT3 était régulée positivement en cas d'hypoxie. L'inhibition pharmacologique des voies

de signalisation HIF-1 α atténuée également l'expression de GLUT1 et GLUT3 induite par l'hypoxie. Ces résultats indiquent que l'hypoxie augmente l'absorption de glucose *via* la régulation à la hausse de GLUT1 et GLUT3 [348]. GLUT 5 lui est un transporteur spécifique du fructose, une étude a démontré que le tissu adipeux blanc épидymal a été réduit chez les souris *Glut5*^{-/-} par rapport aux souris contrôle [321] montrant ainsi l'importance de ce transporteur dans ce tissu. L'absence de réponse à la stimulation à l'insuline des cellules avec l'extinction de *Cdkn2a* peut être expliquée par plusieurs hypothèses, la première est que cette amélioration de la capture de glucose utilise principalement GLUT 3 qui n'a pas besoin de stimulation de l'insuline pour son action et qui est induit par la voie de l'AMPK [349]. En effet, lors de l'étude du kinome des cellules présentant l'extinction de *Cdkn2a* nous avons pu observer une augmentation de l'activité kinasique de l'AMPK. L'étude de la capture du glucose avec l'utilisation d'inhibiteurs de l'AMPK tel que le composé C et l'extinction de GLUT3 par siRNA prends ici tout son sens afin de pouvoir valider une action de ces voies sur l'augmentation de la capture de glucose observé dans notre modèle. La seconde, est que nous avons atteint le seuil de détection du kit colorimétrique que nous utilisons actuellement et qu'il faudrait utiliser le kit fluorimétrique dont la sensibilité de détection supérieure. Effectivement, la capture de glucose est mesurée à l'aide de l'analogue du glucose, le 2-désoxyglucose (2-DG), qui est absorbé par les cellules et phosphorylé par l'hexokinase en 2-DG6P. Le 2-DG6P ne peut plus être métabolisé et s'accumule dans les cellules, directement proportionnellement à l'absorption de glucose par les cellules. Dans ce test, l'absorption de 2-DG est déterminée par un test enzymatique couplé dans lequel le 2-DG6P est oxydé, entraînant la génération de NADPH, qui est ensuite déterminée par une réaction d'amplification de recyclage dans laquelle le NADPH est utilisé par la glutathion réductase dans une réaction enzymatique couplée qui produit du glutathion. Le glutathion réagit avec le DTNB pour produire du TNB, qui est détecté à 412 nm. L'utilisation de la réaction d'amplification de recyclage dans le test colorimétrique entraîne une limite de détection 10 fois inférieure (20-100 pmole) par rapport au test de fluorescence (200-1 000 pmole, MAK084). La dernière, est que notre stimulation à l'insuline n'est pas efficace dans les cellules où l'extinction de *Cdkn2a* est réalisée, nous sommes actuellement en train d'étudier l'efficacité de cette stimulation par Western-blot avec notamment l'activation de la phosphorylation d'AKT. Nous ne pouvons donc pour l'instant pas conclure concernant l'action de l'insuline sur cette augmentation de la capture du glucose.

6) Quels sont les effets de l'extinction de *Cdkn2a* sur l'adipogenèse et l'homéostasie lipidique ?



Nous ne pouvons pas exclure que l'extinction de ce locus entraîne une augmentation de la prolifération cellulaire. En effet l'initiation de la différenciation des préadipocytes en adipocyte est caractérisée par une phase d'expansion clonale mitotique, dont le blocage peut inhiber l'adipogénèse [350]. Cette phase est marquée par l'expression de facteurs adipogéniques et de régulateurs du cycle cellulaire, qui vont interagir les uns avec les autres afin d'inhiber la prolifération et d'activer la différenciation. *Cdkn2a* étant impliqué dans la régulation du cycle cellulaire il se peut que son extinction modifie l'adipogénèse. En effet, des études sur les 3T3-L1 et notamment notre étude dans les hiPSC-BAPs ont démontré l'effet de p16 et p53 sur l'adipogénèse [317,329,351]. Conformément à cette notion, l'analyse RT-qPCR dans les hiPSC-BAPs a montré que l'expression du gène KI67 (un marqueur cellulaire clé de la prolifération) était stimulée environ par deux dans les sphéroïdes 2 jours après l'inactivation de *Cdkn2a*. Cependant, aucune différence de taille ni de phénotype cellulaire n'a été observée au microscope entre les adiposphères témoins et déficientes en *CDKN2A* tout au long du processus de différenciation et jusqu'à 21 jours de culture. De plus, l'analyse RNA-seq des sphéroïdes ou adiposphères témoins et déficients en *CDKN2A* n'a pas révélé de modulation marquée de l'expression des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire. De façon intéressante, les données obtenues dans les souris *Cdkn2a*^{ad-/-} semblent suggérer que la suppression de *Cdkn2a* dans l'adipocyte mature n'a elle aussi pas induit une prolifération exacerbée des adipocytes puisque nous observons notamment une diminution du nombre d'adipocytes dans l'iWAT et pas de changement dans l'eWAT. Ainsi, nos données suggèrent que la modulation de l'expression de *CDKN2A* dans les hiPSC-BAP ne conduit pas une prolifération incontrôlée des adiposphères tout comme dans le modèle souris *Cdkn2a*^{ad-/-}. De plus, les données récentes démontrent également que l'absence de *Cdkn2a* dans les cellules beiges positives pour UCP1 ne modifie pas les capacités d'adipogénèse [352]. Cela peut s'expliquer par le moment où l'extinction de ce locus est réalisée en effet dans notre modèle de souris et celui des cellules beiges positives pour UCP1, nous cibons des adipocytes qui ont déjà passé le stade d'expansion clonale or dans les hiPSC-BAPs et l'article de Wouters *et al* l'extinction est réalisée avant cette phase d'expansion clonale. Ces données mettent donc en avant un rôle différent de *Cdkn2a* dans les adipocytes et les progéniteurs [317,329,352]

Étant donné que l'extinction de l'expression de *CDKN2A* dans les hiPSC-BAPs et dans le modèle *Cdkn2a*^{ad-/-} a un effet limité sur la prolifération cellulaire, il est tentant de supposer que ce locus entraîne en effet des voies alternatives à celles classiquement utilisées pour réguler le cycle cellulaire afin de potentialiser le processus de brunissement dans un système 3D et l'homéostasie énergétique dans les souris *Cdkn2a*^{ad-/-}.

La lipolyse et la lipogenèse étant deux mécanismes importants dans l'homéostasie lipidique du tissu adipeux, il serait intéressant d'aller examiner l'effet de l'extinction de *Cdkn2a* plus en profondeur dans ces phénomènes puisque l'analyse des données RNA-seq de l'eWAT semble démontré une augmentation du métabolisme catabolique. De plus, des données de la littérature démontre l'effet de p53 et de p16 sur ces processus [273,353]. En effet, le glucose est un élément important dans la lipogenèse *de novo* qui permet la production d'acide gras. Dans les adipocytes, le glucose va être utilisé dans deux voies principales, soit produire du G3-P pour la synthèse de triglycéride, soit être utilisé dans la glycolyse puis dans la lipogenèse *de novo* pour former des acides gras qui vont s'estérifier au G3-P pour former des triglycérides. Les données obtenues avec la coloration oil-red-O et l'immunohistochimie de la périlipine 1 semble indiqué qu'il n'y a pas d'effet de l'extinction de *Cdkn2a* sur ce processus. La lipolyse, elle, aboutit à la formation de glycérol et d'acides gras. Les acides gras subiront la β -oxydation au sein des mitochondries et le cycle de Krebs ce qui conduira *in fine* à la production d'ATP. Les catécholamines sont des effecteurs essentiels de la lipolyse. D'après notre analyse RNA-seq, l'ensemble de ces processus, qui sont activé durant la lipolyse et la lipogenèse, semble être modulés par l'extinction de *Cdkn2a* dans l'adipocyte mature avec notamment une augmentation des voies de « triacylglycerol degradation », « glycerol degradation I » et « glycolysis I » mais aussi «catécholamine biosynthesis ».En effet, on pourrait penser que l'augmentation de la synthèse des catécholamines dans notre modèle pourrais engendrer une augmentation de la lipolyse, mais aussi que l'augmentation de la capture de glucose activerais le processus de lipogenèse. L'étude des principales lipases impliquées dans la lipolyse telles que la lipase de triglycéride adipeux (ATGL) et la lipase sensible aux hormones (HSL). L'utilisation d'un kit de lipolyse serait un bon moyen de déterminer l'effet de *Cdkn2a* sur la lipolyse.

7) Est-ce que l'extinction de *Cdkn2a* dans l'adipocyte mature a un effet sur la régulation du cycle cellulaire ?

Le locus *Cdkn2a* étant impliqué dans la régulation du cycle cellulaire et le fait que la sénescence soit définie comme un état d'arrêt permanent du cycle cellulaire a conduit à l'hypothèse d'un rôle de ce locus dans l'établissement de la sénescence. De plus, il est connu que p16 et p19 sont exprimés à des niveaux élevés dans les cellules cultivées sénescents. La sénescence cellulaire, dans les cellules mitotiques et post-mitotiques, peut être déclenchée

par divers stimuli exogènes et endogènes tels que les dommages à l'ADN, l'activation des oncogènes, le stress oxydatif, le dysfonctionnement des télomères et les médicaments chimiothérapeutiques. Alors que la sénescence cellulaire empêche la prolifération des cellules mitotiques endommagées, des preuves récentes suggèrent un rôle potentiel de la sénescence cellulaire post-mitotique (PoMiCS) dans la santé et la maladie. L'induction de PoMiCS, comme la sénescence cellulaire déclenchée dans les cellules mitotiques, engage de nombreux suppresseurs de tumeurs impliqués dans les voies p53/p21 et p16INK4A/Rb. De la même manière que les cellules mitotiques en cours de sénescence, les cellules du PoMiCS sécrètent une combinaison de métalloprotéases matricielles, de facteurs de croissance et de cytokines pro-inflammatoires, un phénomène appelé phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP). Les cellules sénescents favorisent la reprogrammation cellulaire des cellules voisines à la fois *in vitro* et *in vivo* et pourraient donc, par le biais de PoMiCS, jouer un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité des tissus postmitotiques en réponse au stress. Les PoMiCS peuvent également influencer les syndromes métaboliques *via* les adipocytes post-mitotiques. La prévalence des troubles métaboliques, comme le diabète de type 2, augmente avec l'âge [354]. Les adipocytes matures sont post-mitotiques, tandis que les nouveaux adipocytes sont dérivés de cellules précurseurs d'adipocytes qui résident dans le stroma du tissu adipeux blanc (TA) [355]. L'augmentation de la sénescence dans le TAB de souris âgées a été démontré par l'augmentation du marqueur de sénescence SA-b-gal par rapport au TAB de souris jeunes [356]. De même, les souris Ay, qui présentent des perturbations dans leur voie centrale de mélanocortine (devenant par conséquent obèses et diabétiques, secondaires à un apport calorique excessif [259]), ont une expression accrue de marqueurs de sénescence à la fois dans la fraction vasculaire stromale et dans la fraction riche en graisse de leur TA, suggérant que les macrophages et les adipocytes post-mitotiques subissent une sénescence cellulaire [259]. Il est possible que l'induction de la sénescence cellulaire dans le TA des souris Ay se produit par p53, puisque les animaux Ay tp53+/ présentent des niveaux significativement inférieurs de marqueurs de sénescence. Par conséquent, les souris Ay tp53 + / ont une tolérance au glucose et une sensibilité à l'insuline améliorées par rapport à leurs homologues Ay tp53 + / + [259], indiquant que la sénescence cellulaire, et probablement PoMiCS, ont des effets néfastes sur l'obésité et le diabète de type 2.

Il serait intéressant de tester l'effet de l'extinction de *Cdkn2a* sur la sénescence dans notre modèle *via* SA-b-gal, le biomarqueur le plus largement utilisé pour les cellules sénescents et vieillissantes, car il est facile à détecter et fiable à la fois *in situ* et *in vitro*.

8) Quelles sont les limites de cette étude ?

Une des limitations notre étude est le manque de tests fonctionnels dans le modèle hiPSC-BAPs. Ainsi, d'autres expériences sont nécessaires pour étudier les propriétés brunes des adiposphères déficientes en *CDKN2A* au niveau cellulaire. Tel que la mesure de la respiration mitochondriale par Seahorse ou encore la caractérisation des mitochondries (nombre, taille, forme, ...). Il serait aussi intéressant de réaliser des études histologiques permettant de mettre en avant l'effet de l'extinction de *CDKN2A* sur la taille, le nombre d'adipocyte mais aussi sur l'expression d'UCP1.

Une autre des limites de cette étude est l'utilisation uniquement de l'extinction globale du locus *CDKN2A* c'est à dire que l'extinction cible les deux produits de ce locus p16^{INK4A} et p19^{ARF}. En effet, dans ces conditions il nous est impossible de savoir si les résultats que nous observons sont la résultante de l'absence de la régulation de la voie de p16^{INK4A} ou de la voie de p19^{ARF}. Il se peut aussi que les données obtenues soient le produit d'un mécanisme de compensation mis en place par la cellule suite à la perte de ces deux protéines. Il serait donc intéressant d'étudier de manière spécifique l'effet de l'extinction de p16 seul et de p19 seul dans l'adipocyte mature et de croiser ces données avec celle obtenue dans notre modèle de souris *Cdkn2a*^{ad/-}. De plus, d'autres études ont déjà montré l'implication séparé de ces deux protéines dans l'adipocyte. Effectivement, l'implication de la protéine p53 dans l'adipogénèse du TAB, la lipolyse, la différenciation du BAT et son action sur le brunissement du TAB ont déjà été démontré[273,351]. Les études concernant p16 ont étayé le rôle de cette protéine sur la régulation de l'adipogénèse, l'inflammation, la sensibilité à l'insuline et le brunissement du TAB [273]. Bien que différentes études aient démontré le rôle de p53 et p16 dans l'adipocyte et sa fonction, l'analyse transcriptionnelle et l'action moléculaire détaillé de p53 et p16 au cours de ces processus n'a pas été suffisamment étudiée.

Le manque de validation des processus cellulaires spécifique par lesquels l'extinction de *CDKN2A* module le métabolisme énergétique est une autre des limitations de cette étude. En effet, il serait notamment intéressant de déterminer dans le modèle souris *Cdkn2a*^{ad/-} précisément l'action de l'insuline, de la voie de l'insuline (P70S6K) et de la voie des récepteurs β adrénergique sur l'augmentation de la tolérance au glucose et la capture de glucose (Figure 53).

L'utilisation de la culture primaire d'adipocyte issue de la SVF des souris *Cdkn2a*^{ad+/+} et *Cdkn2a*^{ad/-} plutôt que le modèle d'étude 3T3-L1 serait lui aussi pertinent. En effet, malgré un profil semblable à celui d'un adipocyte blanc suite à leurs différenciation les 3T3-L1 présentent des variations par rapport aux adipocytes issue de la SVF, avec notamment une

expression de Mdm2 plus importante [357]. Il serait donc intéressant de réaliser une étude du transcriptome de ces cellules 3T3-L1 présentant une extinction de Cdkn2a.

Nous avons conscience que la modification d'un gène suppresseur de tumeur et anti-prolifératif ne peut être considéré comme cible thérapeutique. C'est pourquoi la stratégie thérapeutique envisagé n'est pas l'extinction de ce locus mais de cibler d'autres voies de signalisation *CDKN2A* impliquées dans le processus de brunissement et non dans le contrôle du cycle cellulaire, comme identifié ici. En effet, le potentiel thérapeutique du brunissement des adipocytes contre l'obésité et le DT2 est actuellement limité car les origines des adipocytes beiges ainsi que les mécanismes sous-jacents et les voies cellulaires restent à déterminer, tant chez la souris que chez l'Homme. Il est donc intéressant de poursuivre cette étude en développant une approche pharmacologique avec notamment l'utilisation d'inhibiteurs et d'activateurs des voies identifié dans ce manuscrit avec notamment la voie de l'AMPK, p70S6K ou encore des récepteurs β -adrénergiques.

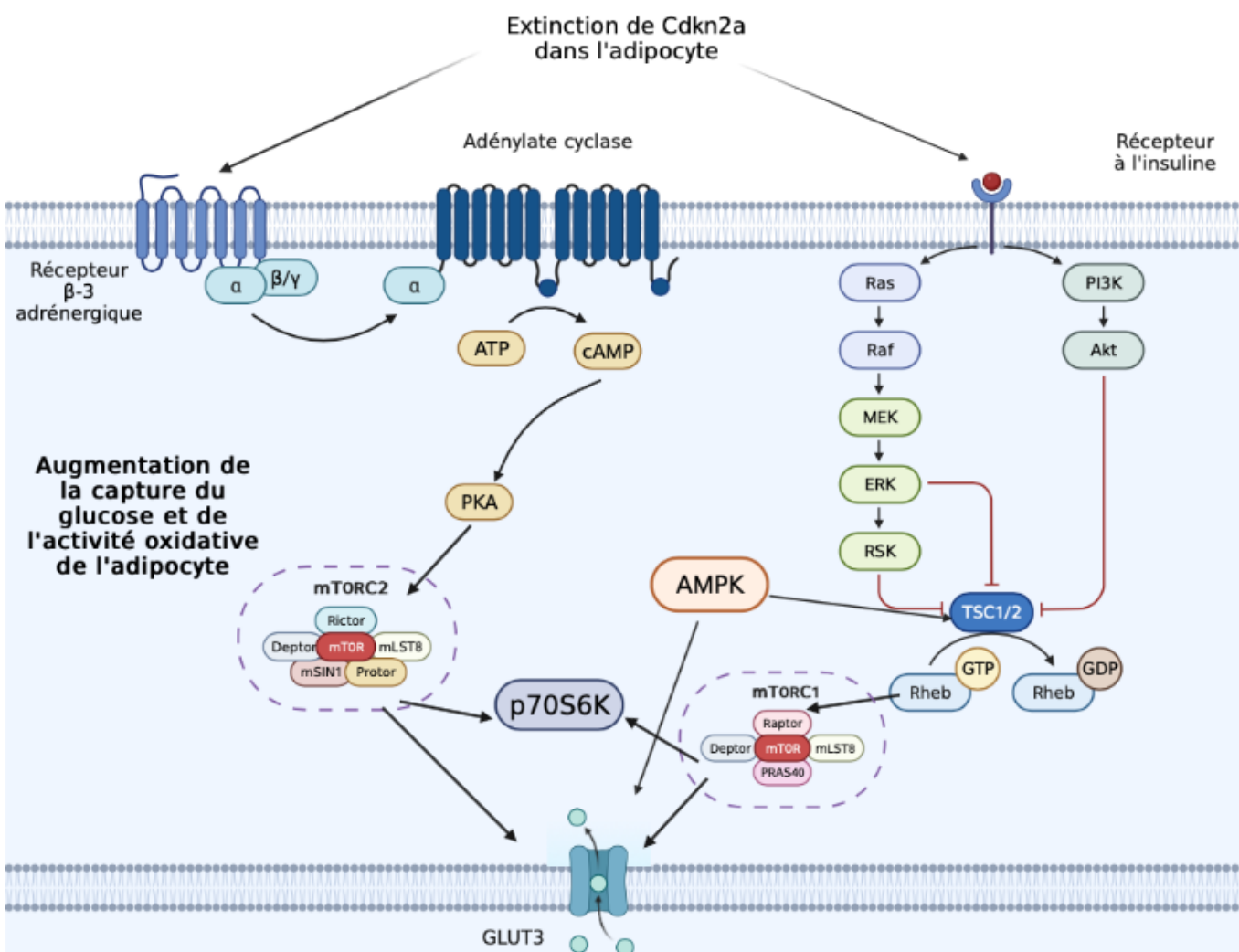


Figure 53. Mécanismes d'action possible de l'extinction de Cdkn2a dans l'adipocyte mature.

Références bibliographiques

1. Lam, Y.Y.; Ravussin, E. Indirect Calorimetry: An Indispensable Tool to Understand and Predict Obesity. *Eur J Clin Nutr* **2017**, *71*, 318–322, doi:10.1038/ejcn.2016.220.
2. González-Muniesa, P.; Martínez-González, M.-A.; Hu, F.B.; Després, J.-P.; Matsuzawa, Y.; Loos, R.J.F.; Moreno, L.A.; Bray, G.A.; Martínez, J.A. Obesity. *Nat Rev Dis Primers* **2017**, *3*, 17034, doi:10.1038/nrdp.2017.34.
3. Reilly, S.M.; Saltiel, A.R. Adapting to Obesity with Adipose Tissue Inflammation. *Nat Rev Endocrinol* **2017**, *13*, 633–643, doi:10.1038/nrendo.2017.90.
4. Wu, H.; Ballantyne, C.M. Metabolic Inflammation and Insulin Resistance in Obesity. *Circ Res* **2020**, *126*, 1549–1564, doi:10.1161/CIRCRESAHA.119.315896.
5. Zatterale, F.; Longo, M.; Naderi, J.; Raciti, G.A.; Desiderio, A.; Miele, C.; Beguinot, F. Chronic Adipose Tissue Inflammation Linking Obesity to Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Front Physiol* **2019**, *10*, 1607, doi:10.3389/fphys.2019.01607.
6. Qasim, A.; Turcotte, M.; Souza, R.J. de; Samaan, M.C.; Champredon, D.; Dushoff, J.; Speakman, J.R.; Meyre, D. On the Origin of Obesity: Identifying the Biological, Environmental and Cultural Drivers of Genetic Risk among Human Populations. *Obesity Reviews* **2018**, *19*, 121–149, doi:10.1111/obr.12625.
7. Longo, M.; Zatterale, F.; Naderi, J.; Parrillo, L.; Formisano, P.; Raciti, G.A.; Beguinot, F.; Miele, C. Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. *International Journal of Molecular Sciences* **2019**, *20*, 2358, doi:10.3390/ijms20092358.
8. Kwok, K.H.M.; Lam, K.S.L.; Xu, A. Heterogeneity of White Adipose Tissue: Molecular Basis and Clinical Implications. *Exp Mol Med* **2016**, *48*, e215, doi:10.1038/emm.2016.5.
9. Obésité et surpoids Available online: <https://www.who.int/fr/news-room/factsheets/detail/obesity-and-overweight> (accessed on 5 March 2023).
10. R21-744-Syn.Pdf.
11. Forte progression de l'obésité en France en 2020. Available online: <https://liguecontrelobesite.org/actualite/forte-progression-de-lobesite-en-france-en-2020/> (accessed on 14 February 2023).
12. American Diabetes Association 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2018. *Diabetes Care* **2017**, *41*, S13–S27, doi:10.2337/dc18-S002.
13. American Diabetes Association Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* **2013**, *37*, S81–S90, doi:10.2337/dc14-S081.
14. Saedi, P.; Petersohn, I.; Salpea, P.; Malanda, B.; Karuranga, S.; Unwin, N.; Colagiuri, S.; Guariguata, L.; Motala, A.A.; Ogurtsova, K.; et al. Global and Regional Diabetes Prevalence Estimates for 2019 and Projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th Edition. *Diabetes Res Clin Pract* **2019**, *157*, 107843, doi:10.1016/j.diabres.2019.107843.
15. Le diabète en France : les chiffres 2020 Available online: <https://www.santepubliquefrance.fr/les-actualites/2021/le-diabete-en-france-les-chiffres-2020> (accessed on 8 March 2023).
16. Atkinson, M.A.; Eisenbarth, G.S.; Michels, A.W. Type 1 Diabetes. *The Lancet* **2014**, *383*, 69–82, doi:10.1016/S0140-6736(13)60591-7.
17. Craig, M.E.; Hattersley, A.; Donaghue, K.C. Definition, Epidemiology and Classification of Diabetes in Children and Adolescents. *Pediatr Diabetes* **2009**, *10 Suppl 12*, 3–12, doi:10.1111/j.1399-5448.2009.00568.x.
18. Basu, S.; Yoffe, P.; Hills, N.; Lustig, R.H. The Relationship of Sugar to Population-Level Diabetes Prevalence: An Econometric Analysis of Repeated Cross-Sectional Data. *PLOS ONE* **2013**, *8*, e57873, doi:10.1371/journal.pone.0057873.
19. WHO_NM_H_MND_13.2_eng.Pdf.
20. Hod, M.; Kapur, A.; Sacks, D.A.; Hadar, E.; Agarwal, M.; Di Renzo, G.C.; Cabero Roura, L.; McIntyre, H.D.; Morris, J.L.; Divakar, H. The International Federation of Gynecology and Obstetrics

- (FIGO) Initiative on Gestational Diabetes Mellitus: A Pragmatic Guide for Diagnosis, Management, and Care. *Int J Gynaecol Obstet* **2015**, *131 Suppl 3*, S173-211, doi:10.1016/S0020-7292(15)30033-3.
21. Immanuel, J.; Simmons, D. Screening and Treatment for Early-Onset Gestational Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Curr Diab Rep* **2017**, *17*, 115, doi:10.1007/s11892-017-0943-7.
22. Guariguata, L.; Linnenkamp, U.; Beagley, J.; Whiting, D.R.; Cho, N.H. Global Estimates of the Prevalence of Hyperglycaemia in Pregnancy. *Diabetes Res Clin Pract* **2014**, *103*, 176–185, doi:10.1016/j.diabres.2013.11.003.
23. Hattersley, A.T.; Greeley, S.A.W.; Polak, M.; Rubio-Cabezas, O.; Njølstad, P.R.; Mlynarski, W.; Castano, L.; Carlsson, A.; Raile, K.; Chi, D.V.; et al. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2018: The Diagnosis and Management of Monogenic Diabetes in Children and Adolescents. *Pediatr Diabetes* **2018**, *19 Suppl 27*, 47–63, doi:10.1111/pedi.12772.
24. Vaxillaire, M.; Bonnefond, A.; Froguel, P. The Lessons of Early-Onset Monogenic Diabetes for the Understanding of Diabetes Pathogenesis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **2012**, *26*, 171–187, doi:10.1016/j.beem.2011.12.001.
25. Cnop, M.; Toivonen, S.; Igoillo-Esteve, M.; Salpea, P. Endoplasmic Reticulum Stress and EIF2 α Phosphorylation: The Achilles Heel of Pancreatic β Cells. *Mol Metab* **2017**, *6*, 1024–1039, doi:10.1016/j.molmet.2017.06.001.
26. Flannick, J.; Johansson, S.; Njølstad, P.R. Common and Rare Forms of Diabetes Mellitus: Towards a Continuum of Diabetes Subtypes. *Nat Rev Endocrinol* **2016**, *12*, 394–406, doi:10.1038/nrendo.2016.50.
27. World Health Organization *Classification of Diabetes Mellitus*; World Health Organization, 2019; ISBN 978-92-4-151570-2.
28. Gregg, E.W.; Li, Y.; Wang, J.; Burrows, N.R.; Ali, M.K.; Rolka, D.; Williams, D.E.; Geiss, L. Changes in Diabetes-Related Complications in the United States, 1990-2010. *N Engl J Med* **2014**, *370*, 1514–1523, doi:10.1056/NEJMoa1310799.
29. King, P.; Peacock, I.; Donnelly, R. The UK Prospective Diabetes Study (UKPDS): Clinical and Therapeutic Implications for Type 2 Diabetes. *Br J Clin Pharmacol* **1999**, *48*, 643–648, doi:10.1046/j.1365-2125.1999.00092.x.
30. Stumvoll, M.; Goldstein, B.J.; Hafsten, T.W. van Type 2 Diabetes: Principles of Pathogenesis and Therapy. *The Lancet* **2005**, *365*, 1333–1346, doi:10.1016/S0140-6736(05)61032-X.
31. Chew, N.W.S.; Ng, C.H.; Tan, D.J.H.; Kong, G.; Lin, C.; Chin, Y.H.; Lim, W.H.; Huang, D.Q.; Quek, J.; Fu, C.E.; et al. The Global Burden of Metabolic Disease: Data from 2000 to 2019. *Cell Metabolism* **2023**, *35*, 414-428.e3, doi:10.1016/j.cmet.2023.02.003.
32. Giralt, M.; Villarroya, F. White, Brown, Beige/Brite: Different Adipose Cells for Different Functions? *Endocrinology* **2013**, *154*, 2992–3000, doi:10.1210/en.2013-1403.
33. Poissonnet, C.M.; Burdi, A.R.; Garn, S.M. The Chronology of Adipose Tissue Appearance and Distribution in the Human Fetus. *Early Human Development* **1984**, *10*, 1–11, doi:10.1016/0378-3782(84)90106-3.
34. Majka, S.M.; Fox, K.E.; Psilas, J.C.; Helm, K.M.; Childs, C.R.; Acosta, A.S.; Janssen, R.C.; Friedman, J.E.; Woessner, B.T.; Shade, T.R.; et al. De Novo Generation of White Adipocytes from the Myeloid Lineage via Mesenchymal Intermediates Is Age, Adipose Depot, and Gender Specific. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2010**, *107*, 14781–14786, doi:10.1073/pnas.1003512107.
35. Gesta, S.; Tseng, Y.-H.; Kahn, C.R. Developmental Origin of Fat: Tracking Obesity to Its Source. *Cell* **2007**, *131*, 242–256, doi:10.1016/j.cell.2007.10.004.
36. Ailhaud, G.; Grimaldi, P.; Nègrel, R. Cellular and Molecular Aspects of Adipose Tissue Development. *Annu Rev Nutr* **1992**, *12*, 207–233, doi:10.1146/annurev.nu.12.070192.001231.
37. Hausman, D.B.; DiGirolamo, M.; Bartness, T.J.; Hausman, G.J.; Martin, R.J. The Biology of White Adipocyte Proliferation. *Obesity Reviews* **2001**, *2*, 239–254, doi:10.1046/j.1467-789X.2001.00042.x.
38. Rosen, E.D.; MacDougald, O.A. Adipocyte Differentiation from the inside Out. *Nat. Rev. Mol.*

Cell Biol. **2006**, *7*, 885–896, doi:10.1038/nrm2066.

39. Fève, B. Adipogenesis: Cellular and Molecular Aspects. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* **2005**, *19*, 483–499, doi:10.1016/j.beem.2005.07.007.
40. Ambele, M.A.; Dhanraj, P.; Giles, R.; Pepper, M.S. Adipogenesis: A Complex Interplay of Multiple Molecular Determinants and Pathways. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*, 4283, doi:10.3390/ijms21124283.
41. Zamani, N.; Brown, C.W. Emerging Roles for the Transforming Growth Factor- β Superfamily in Regulating Adiposity and Energy Expenditure. *Endocrine Reviews* **2011**, *32*, 387–403, doi:10.1210/er.2010-0018.
42. Suh, J.M.; Gao, X.; McKay, J.; McKay, R.; Salo, Z.; Graff, J.M. Hedgehog Signaling Plays a Conserved Role in Inhibiting Fat Formation. *Cell Metab* **2006**, *3*, 25–34, doi:10.1016/j.cmet.2005.11.012.
43. Kanazawa, A.; Tsukada, S.; Kamiyama, M.; Yanagimoto, T.; Nakajima, M.; Maeda, S. Wnt5b Partially Inhibits Canonical Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway and Promotes Adipogenesis in 3T3-L1 Preadipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2005**, *330*, 505–510, doi:10.1016/j.bbrc.2005.03.007.
44. Bost, F.; Aouadi, M.; Caron, L.; Binétruy, B. The Role of MAPKs in Adipocyte Differentiation and Obesity. *Biochimie* **2005**, *87*, 51–56, doi:10.1016/j.biochi.2004.10.018.
45. Aouadi, M.; Laurent, K.; Prot, M.; Le Marchand-Brustel, Y.; Binétruy, B.; Bost, F. Inhibition of P38MAPK Increases Adipogenesis From Embryonic to Adult Stages. *Diabetes* **2006**, *55*, 281–289, doi:10.2337/diabetes.55.02.06.db05-0963.
46. Rodriguez, A.-M.; Elabd, C.; Amri, E.-Z.; Ailhaud, G.; Dani, C. The Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Biochimie* **2005**, *87*, 125–128, doi:10.1016/j.biochi.2004.11.007.
47. Longo, K.A.; Wright, W.S.; Kang, S.; Gerin, I.; Chiang, S.-H.; Lucas, P.C.; Opp, M.R.; MacDougald, O.A. Wnt10b Inhibits Development of White and Brown Adipose Tissues. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 35503–35509, doi:10.1074/jbc.M402937200.
48. Arrighi, N.; Lypovetska, K.; Moratal, C.; Giorgetti-Peraldi, S.; Dechesne, C.A.; Dani, C.; Peraldi, P. The Primary Cilium Is Necessary for the Differentiation and the Maintenance of Human Adipose Progenitors into Myofibroblasts. *Sci Rep* **2017**, *7*, 15248, doi:10.1038/s41598-017-15649-2.
49. Rosen, E.D.; Sarraf, P.; Troy, A.E.; Bradwin, G.; Moore, K.; Milstone, D.S.; Spiegelman, B.M.; Mortensen, R.M. PPAR Gamma Is Required for the Differentiation of Adipose Tissue in Vivo and in Vitro. *Mol Cell* **1999**, *4*, 611–617, doi:10.1016/s1097-2765(00)80211-7.
50. Wang, F.; Mullican, S.E.; DiSpirito, J.R.; Peed, L.C.; Lazar, M.A. Lipoatrophy and Severe Metabolic Disturbance in Mice with Fat-Specific Deletion of PPAR γ . *Proc Natl Acad Sci U S A* **2013**, *110*, 18656–18661, doi:10.1073/pnas.1314863110.
51. Hu, E.; Tontonoz, P.; Spiegelman, B.M. Transdifferentiation of Myoblasts by the Adipogenic Transcription Factors PPAR Gamma and C/EBP Alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**, *92*, 9856–9860, doi:10.1073/pnas.92.21.9856.
52. Hwang, C.S.; Loftus, T.M.; Mandrup, S.; Lane, M.D. Adipocyte Differentiation and Leptin Expression. *Annu Rev Cell Dev Biol* **1997**, *13*, 231–259, doi:10.1146/annurev.cellbio.13.1.231.
53. Sarjeant, K.; Stephens, J.M. Adipogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2012**, *4*, a008417, doi:10.1101/cshperspect.a008417.
54. 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. Dynamics of Fat Cell Turnover in Humans. *Nature* **2008**, *453*, 783–787, doi:10.1038/nature06902.
55. Arner, P.; Spalding, K.L. Fat Cell Turnover in Humans. *Biochem Biophys Res Commun* **2010**, *396*, 101–104, doi:10.1016/j.bbrc.2010.02.165.
56. Rigamonti, A.; Brennand, K.; Lau, F.; Cowan, C.A. Rapid Cellular Turnover in Adipose Tissue. *PLoS One* **2011**, *6*, e17637, doi:10.1371/journal.pone.0017637.
57. Tang, W.; Zeve, D.; Seo, J.; Jo, A.-Y.; Graff, J.M. Thiazolidinediones Regulate Adipose Lineage Dynamics. *Cell Metabolism* **2011**, *14*, 116–122, doi:10.1016/j.cmet.2011.05.012.
58. Corvera, S. Cellular Heterogeneity in Adipose Tissues. *Annu Rev Physiol* **2021**, *83*, 257–278,

doi:10.1146/annurev-physiol-031620-095446.

59. Géloën, A.; Roy, P.E.; Bukowiecki, L.J. Regression of White Adipose Tissue in Diabetic Rats. *Am J Physiol* **1989**, *257*, E547-553, doi:10.1152/ajpendo.1989.257.4.E547.
60. Mariman, E.C.M.; Wang, P. Adipocyte Extracellular Matrix Composition, Dynamics and Role in Obesity. *Cell Mol Life Sci* **2010**, *67*, 1277–1292, doi:10.1007/s00018-010-0263-4.
61. Sárvári, A.K.; Van Hauwaert, E.L.; Markussen, L.K.; Gammelmark, E.; Marcher, A.-B.; Ebbesen, M.F.; Nielsen, R.; Brewer, J.R.; Madsen, J.G.S.; Mandrup, S. Plasticity of Epididymal Adipose Tissue in Response to Diet-Induced Obesity at Single-Nucleus Resolution. *Cell Metab* **2021**, *33*, 437-453.e5, doi:10.1016/j.cmet.2020.12.004.
62. Bäckdahl, J.; Franzén, L.; Massier, L.; Li, Q.; Jalkanen, J.; Gao, H.; Andersson, A.; Bhalla, N.; Thorell, A.; Rydén, M.; et al. Spatial Mapping Reveals Human Adipocyte Subpopulations with Distinct Sensitivities to Insulin. *Cell Metab* **2021**, *33*, 1869-1882.e6, doi:10.1016/j.cmet.2021.07.018.
63. Rondini, E.A.; Ramseyer, V.D.; Burl, R.B.; Pique-Regi, R.; Granneman, J.G. Single Cell Functional Genomics Reveals Plasticity of Subcutaneous White Adipose Tissue (WAT) during Early Postnatal Development. *Mol Metab* **2021**, *53*, 101307, doi:10.1016/j.molmet.2021.101307.
64. Min, S.Y.; Desai, A.; Yang, Z.; Sharma, A.; DeSouza, T.; Genga, R.M.J.; Kucukural, A.; Lifshitz, L.M.; Nielsen, S.; Scheele, C.; et al. Diverse Repertoire of Human Adipocyte Subtypes Develops from Transcriptionally Distinct Mesenchymal Progenitor Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2019**, *116*, 17970–17979, doi:10.1073/pnas.1906512116.
65. Emont, M.P.; Jacobs, C.; Essene, A.L.; Pant, D.; Tenen, D.; Colleluori, G.; Di Vincenzo, A.; Jørgensen, A.M.; Dashti, H.; Stefek, A.; et al. A Single-Cell Atlas of Human and Mouse White Adipose Tissue. *Nature* **2022**, *603*, 926–933, doi:10.1038/s41586-022-04518-2.
66. Kazak, L.; Chouchani, E.T.; Jedrychowski, M.P.; Erickson, B.K.; Shinoda, K.; Cohen, P.; Vetrivelan, R.; Lu, G.Z.; Laznik-Bogoslavski, D.; Hasenfuss, S.C.; et al. A Creatine-Driven Substrate Cycle Enhances Energy Expenditure and Thermogenesis in Beige Fat. *Cell* **2015**, *163*, 643–655, doi:10.1016/j.cell.2015.09.035.
67. Mottillo, E.P.; Balasubramanian, P.; Lee, Y.-H.; Weng, C.; Kershaw, E.E.; Granneman, J.G. Coupling of Lipolysis and de Novo Lipogenesis in Brown, Beige, and White Adipose Tissues during Chronic B3-Adrenergic Receptor Activation. *J Lipid Res* **2014**, *55*, 2276–2286, doi:10.1194/jlr.M050005.
68. Ikeda, K.; Kang, Q.; Yoneshiro, T.; Camporez, J.P.; Maki, H.; Homma, M.; Shinoda, K.; Chen, Y.; Lu, X.; Maretich, P.; et al. UCP1-Independent Signaling Involving SERCA2b-Mediated Calcium Cycling Regulates Beige Fat Thermogenesis and Systemic Glucose Homeostasis. *Nat Med* **2017**, *23*, 1454–1465, doi:10.1038/nm.4429.
69. CL316,243 and Cold Stress Induce Heterogeneous Expression of UCP1 mRNA and Protein in Rodent Brown Adipocytes - Saverio Cinti, Raffaella Canello, Maria Cristina Zingaretti, Enzo Ceresi, Rita De Matteis, Antonio Giordano, Jean Himms-Hagen, Daniel Ricquier, 2002 Available online: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/002215540205000103> (accessed on 1 August 2023).
70. Spaethling, J.M.; Sanchez-Alavez, M.; Lee, J.; Xia, F.C.; Dueck, H.; Wang, W.; Fisher, S.A.; Sul, J.-Y.; Seale, P.; Kim, J.; et al. Single-Cell Transcriptomics and Functional Target Validation of Brown Adipocytes Show Their Complex Roles in Metabolic Homeostasis. *FASEB J* **2016**, *30*, 81–92, doi:10.1096/fj.15-273797.
71. Song, A.; Dai, W.; Jang, M.J.; Medrano, L.; Li, Z.; Zhao, H.; Shao, M.; Tan, J.; Li, A.; Ning, T.; et al. Low- and High-Thermogenic Brown Adipocyte Subpopulations Coexist in Murine Adipose Tissue. *J Clin Invest* **2020**, *130*, 247–257, doi:10.1172/JCI129167.
72. Sun, W.; Dong, H.; Balaz, M.; Slyper, M.; Drokhlyansky, E.; Colleluori, G.; Giordano, A.; Kovanicova, Z.; Stefanicka, P.; Balazova, L.; et al. SnRNA-Seq Reveals a Subpopulation of Adipocytes That Regulates Thermogenesis. *Nature* **2020**, *587*, 98–102, doi:10.1038/s41586-020-2856-x.
73. Sun, W.; Dong, H.; Wolfrum, C. Local Acetate Inhibits Brown Adipose Tissue Function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2021**, *118*, e2116125118, doi:10.1073/pnas.2116125118.
74. Petrovic, N.; Walden, T.B.; Shabalina, I.G.; Timmons, J.A.; Cannon, B.; Nedergaard, J.

- Chronic Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPARgamma) Activation of Epididymally Derived White Adipocyte Cultures Reveals a Population of Thermogenically Competent, UCP1-Containing Adipocytes Molecularly Distinct from Classic Brown Adipocytes. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 7153–7164, doi:10.1074/jbc.M109.053942.
75. Kir, S.; White, J.P.; Kleiner, S.; Kazak, L.; Cohen, P.; Baracos, V.E.; Spiegelman, B.M. Tumour-Derived PTH-Related Protein Triggers Adipose Tissue Browning and Cancer Cachexia. *Nature* **2014**, *513*, 100–104, doi:10.1038/nature13528.
76. Petruzzelli, M.; Schweiger, M.; Schreiber, R.; Campos-Olivas, R.; Tsoli, M.; Allen, J.; Swarbrick, M.; Rose-John, S.; Rincon, M.; Robertson, G.; et al. A Switch from White to Brown Fat Increases Energy Expenditure in Cancer-Associated Cachexia. *Cell Metab.* **2014**, *20*, 433–447, doi:10.1016/j.cmet.2014.06.011.
77. Cohen, P.; Spiegelman, B.M. Brown and Beige Fat: Molecular Parts of a Thermogenic Machine. *Diabetes* **2015**, *64*, 2346–2351, doi:10.2337/db15-0318.
78. Wang, H.; Liu, L.; Lin, J.Z.; Aprahamian, T.R.; Farmer, S.R. Browning of White Adipose Tissue with Roscovitine Induces a Distinct Population of UCP1+ Adipocytes. *Cell Metab.* **2016**, *24*, 835–847, doi:10.1016/j.cmet.2016.10.005.
79. Thermal Stress Induces Glycolytic Beige Fat Formation via a Myogenic State | Nature Available online: <https://www.nature.com/articles/s41586-018-0801-z> (accessed on 1 August 2023).
80. Eto, H.; Suga, H.; Matsumoto, D.; Inoue, K.; Aoi, N.; Kato, H.; Araki, J.; Yoshimura, K. Characterization of Structure and Cellular Components of Aspirated and Excised Adipose Tissue. *Plast Reconstr Surg* **2009**, *124*, 1087–1097, doi:10.1097/PRS.0b013e3181b5a3f1.
81. 2013mla.Pdf.
82. Joe, A.W.B.; Yi, L.; Even, Y.; Vogl, A.W.; Rossi, F.M.V. Depot-Specific Differences in Adipogenic Progenitor Abundance and Proliferative Response to High-Fat Diet. *Stem Cells* **2009**, *27*, 2563–2570, doi:10.1002/stem.190.
83. Macotela, Y.; Emanuelli, B.; Mori, M.A.; Gesta, S.; Schulz, T.J.; Tseng, Y.-H.; Kahn, C.R. Intrinsic Differences in Adipocyte Precursor Cells from Different White Fat Depots. *Diabetes* **2012**, *61*, 1691–1699, doi:10.2337/db11-1753.
84. Sengenès, C.; Lolmède, K.; Zakaroff-Girard, A.; Busse, R.; Bouloumié, A. Preadipocytes in the Human Subcutaneous Adipose Tissue Display Distinct Features from the Adult Mesenchymal and Hematopoietic Stem Cells. *Journal of Cellular Physiology* **2005**, *205*, 114–122, doi:10.1002/jcp.20381.
85. Gimble, J.; Guilak, F. Adipose-Derived Adult Stem Cells: Isolation, Characterization, and Differentiation Potential. *Cytotherapy* **2003**, *5*, 362–369, doi:10.1080/14653240310003026.
86. Yamamoto, N.; Akamatsu, H.; Hasegawa, S.; Yamada, T.; Nakata, S.; Ohkuma, M.; Miyachi, E.-I.; Marunouchi, T.; Matsunaga, K. Isolation of Multipotent Stem Cells from Mouse Adipose Tissue. *J Dermatol Sci* **2007**, *48*, 43–52, doi:10.1016/j.jdermsci.2007.05.015.
87. Zuk, P.A.; Zhu, M.; Mizuno, H.; Huang, J.; Futrell, J.W.; Katz, A.J.; Benhaim, P.; Lorenz, H.P.; Hedrick, M.H. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. *Tissue Eng* **2001**, *7*, 211–228, doi:10.1089/107632701300062859.
88. 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. Transplantation of a Multipotent Cell Population from Human Adipose Tissue Induces Dystrophin Expression in the Immunocompetent Mdx Mouse. *J Exp Med* **2005**, *201*, 1397–1405, doi:10.1084/jem.20042224.
89. Eelen, G.; de Zeeuw, P.; Treppe, L.; Harjes, U.; Wong, B.W.; Carmeliet, P. Endothelial Cell Metabolism. *Physiol Rev* **2018**, *98*, 3–58, doi:10.1152/physrev.00001.2017.
90. Michailidou, Z.; Gomez-Salazar, M.; Alexaki, V.I. Innate Immune Cells in the Adipose Tissue in Health and Metabolic Disease. *J Innate Immun* **2021**, *14*, 4–30, doi:10.1159/000515117.
91. Hildreth, A.D.; Ma, F.; Wong, Y.Y.; Sun, R.; Pellegrini, M.; O’Sullivan, T.E. Single-Cell Sequencing of Human White Adipose Tissue Identifies New Cell States in Health and Obesity. *Nat Immunol* **2021**, *22*, 639–653, doi:10.1038/s41590-021-00922-4.
92. Jaitin, D.A.; Adlung, L.; Thaiss, C.A.; Weiner, A.; Li, B.; Descamps, H.; Lundgren, P.; Blieriot,

- C.; Liu, Z.; Deczkowska, A.; et al. Lipid-Associated Macrophages Control Metabolic Homeostasis in a Trem2-Dependent Manner. *Cell* **2019**, *178*, 686-698.e14, doi:10.1016/j.cell.2019.05.054.
93. Vijay, J.; Gauthier, M.-F.; Biswell, R.L.; Louiselle, D.A.; Johnston, J.J.; Cheung, W.A.; Belden, B.; Pramatarova, A.; Biertho, L.; Gibson, M.; et al. Single-Cell Analysis of Human Adipose Tissue Identifies Depot and Disease Specific Cell Types. *Nat Metab* **2020**, *2*, 97–109, doi:10.1038/s42255-019-0152-6.
94. Ortega Martinez de Victoria, E.; Xu, X.; Koska, J.; Francisco, A.M.; Scalise, M.; Ferrante, A.W.; Krakoff, J. Macrophage Content in Subcutaneous Adipose Tissue: Associations with Adiposity, Age, Inflammatory Markers, and Whole-Body Insulin Action in Healthy Pima Indians. *Diabetes* **2009**, *58*, 385–393, doi:10.2337/db08-0536.
95. Weisberg, S.P.; McCann, D.; Desai, M.; Rosenbaum, M.; Leibel, R.L.; Ferrante, A.W. Obesity Is Associated with Macrophage Accumulation in Adipose Tissue. *J Clin Invest* **2003**, *112*, 1796–1808, doi:10.1172/JCI19246.
96. Distinct Macrophage Populations Direct Inflammatory versus Physiological Changes in Adipose Tissue | PNAS Available online: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1802611115> (accessed on 1 August 2023).
97. Weinstock, A.; Brown, E.J.; Garabedian, M.L.; Pena, S.; Sharma, M.; Lafaille, J.; Moore, K.J.; Fisher, E.A. Single-Cell RNA Sequencing of Visceral Adipose Tissue Leukocytes Reveals That Caloric Restriction Following Obesity Promotes the Accumulation of a Distinct Macrophage Population with Features of Phagocytic Cells. *Immunometabolism* **2019**, *1*, e190008, doi:10.20900/immunometab20190008.
98. Xu, X.; Grijalva, A.; Skowronski, A.; van Eijk, M.; Serlie, M.J.; Ferrante, A.W. Obesity Activates a Program of Lysosomal-Dependent Lipid Metabolism in Adipose Tissue Macrophages Independently of Classic Activation. *Cell Metab* **2013**, *18*, 816–830, doi:10.1016/j.cmet.2013.11.001.
99. Boutens, L.; Stienstra, R. Adipose Tissue Macrophages: Going off Track during Obesity. *Diabetologia* **2016**, *59*, 879–894, doi:10.1007/s00125-016-3904-9.
100. Fasshauer, M.; Blüher, M. Adipokines in Health and Disease. *Trends Pharmacol Sci* **2015**, *36*, 461–470, doi:10.1016/j.tips.2015.04.014.
101. Arner, P.; Langin, D. Lipolysis in Lipid Turnover, Cancer Cachexia, and Obesity-Induced Insulin Resistance. *Trends Endocrinol Metab* **2014**, *25*, 255–262, doi:10.1016/j.tem.2014.03.002.
102. Perry, R.J.; Camporez, J.-P.G.; Kursawe, R.; Titchenell, P.M.; Zhang, D.; Perry, C.J.; Jurczak, M.J.; Abudukadier, A.; Han, M.S.; Zhang, X.-M.; et al. Hepatic Acetyl CoA Links Adipose Tissue Inflammation to Hepatic Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Cell* **2015**, *160*, 745–758, doi:10.1016/j.cell.2015.01.012.
103. Congenital Leptin Deficiency Is Associated with Severe Early-Onset Obesity in Humans | Nature Available online: <https://www.nature.com/articles/43185> (accessed on 4 August 2023).
104. Clément, K.; Vaisse, C.; Lahlou, N.; Cabrol, S.; Pelloux, V.; Cassuto, D.; Gourmelen, M.; Dina, C.; Chambaz, J.; Lacorte, J.M.; et al. A Mutation in the Human Leptin Receptor Gene Causes Obesity and Pituitary Dysfunction. *Nature* **1998**, *392*, 398–401, doi:10.1038/32911.
105. H, C.; O, C.; La, T.; Ea, W.; X, W.; Sj, E.; Nd, L.; J, C.; Kj, M.; Re, B.; et al. Evidence That the Diabetes Gene Encodes the Leptin Receptor: Identification of a Mutation in the Leptin Receptor Gene in Db/Db Mice. *Cell* **1996**, *84*, doi:10.1016/s0092-8674(00)81294-5.
106. Frederich, R.C.; Hamann, A.; Anderson, S.; Löllmann, B.; Lowell, B.B.; Flier, J.S. Leptin Levels Reflect Body Lipid Content in Mice: Evidence for Diet-Induced Resistance to Leptin Action. *Nat Med* **1995**, *1*, 1311–1314, doi:10.1038/nm1295-1311.
107. Masuzaki, H.; Ogawa, Y.; Hosoda, K.; Kawada, T.; Fushiki, T.; Nakao, K. Augmented Expression of the Obese Gene in the Adipose Tissue from Rats Fed High-Fat Diet. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1995**, *216*, 355–358, doi:10.1006/bbrc.1995.2631.
108. Depot- and Sex-Specific Differences in Human Leptin mRNA Expression: Implications for the Control of Regional Fat Distribution | Diabetes | American Diabetes Association Available online: <https://diabetesjournals.org/diabetes/article/46/3/342/9778/Depot-and-Sex-Specific-Differences-in-Human-Leptin> (accessed on 4 August 2023).



109. Leptin Receptor Signaling in T Cells Is Required for Th17 Differentiation | The Journal of Immunology | American Association of Immunologists Available online: <https://journals.aai.org/jimmunol/article/194/11/5253/98440> (accessed on 4 August 2023).
110. Lord, G.M.; Matarese, G.; Howard, J.K.; Baker, R.J.; Bloom, S.R.; Lechler, R.I. Leptin Modulates the T-Cell Immune Response and Reverses Starvation-Induced Immunosuppression. *Nature* **1998**, *394*, 897–901, doi:10.1038/29795.
111. Myers, M.G.; Leibel, R.L.; Seeley, R.J.; Schwartz, M.W. Obesity and Leptin Resistance: Distinguishing Cause from Effect. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **2010**, *21*, 643–651, doi:10.1016/j.tem.2010.08.002.
112. Müller, G.; Ertl, J.; Gerl, M.; Preibisch, G. Leptin Impairs Metabolic Actions of Insulin in Isolated Rat Adipocytes *. *Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272*, 10585–10593, doi:10.1074/jbc.272.16.10585.
113. Leptin Impairs Insulin Signaling in Rat Adipocytes | Diabetes | American Diabetes Association Available online: <https://diabetesjournals.org/diabetes/article/53/2/347/11465/Leptin-Impairs-Insulin-Signaling-in-Rat-Adipocytes> (accessed on 4 August 2023).
114. Novel Form of Lipolysis Induced by Leptin* - Journal of Biological Chemistry Available online: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)72737-9/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)72737-9/fulltext) (accessed on 4 August 2023).
115. Sympathetic Neuro-Adipose Connections Mediate Leptin-Driven Lipolysis: Cell Available online: [https://www.cell.com/fulltext/S0092-8674\(15\)01107-1](https://www.cell.com/fulltext/S0092-8674(15)01107-1) (accessed on 4 August 2023).
116. Arita, Y.; Kihara, S.; Ouchi, N.; Takahashi, M.; Maeda, K.; Miyagawa, J.; Hotta, K.; Shimomura, I.; Nakamura, T.; Miyaoka, K.; et al. Paradoxical Decrease of an Adipose-Specific Protein, Adiponectin, in Obesity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1999**, *257*, 79–83, doi:10.1006/bbrc.1999.0255.
117. Matsubara, M.; Maruoka, S.; Katayose, S. Inverse Relationship between Plasma Adiponectin and Leptin Concentrations in Normal-Weight and Obese Women. *European Journal of Endocrinology* **2002**, *147*, 173–180, doi:10.1530/eje.0.1470173.
118. Hara, K.; Horikoshi, M.; Yamauchi, T.; Yago, H.; Miyazaki, O.; Ebinuma, H.; Imai, Y.; Nagai, R.; Kadowaki, T. Measurement of the High-Molecular Weight Form of Adiponectin in Plasma Is Useful for the Prediction of Insulin Resistance and Metabolic Syndrome. *Diabetes Care* **2006**, *29*, 1357–1362, doi:10.2337/dc05-1801.
119. Hirose, H.; Yamamoto, Y.; Seino-Yoshihara, Y.; Kawabe, H.; Saito, I. Serum High-Molecular-Weight Adiponectin as a Marker for the Evaluation and Care of Subjects with Metabolic Syndrome and Related Disorders. *J Atheroscler Thromb* **2010**, *17*, 1201–1211, doi:10.5551/jat.6106.
120. Betz, M.J.; Enerbäck, S. Targeting Thermogenesis in Brown Fat and Muscle to Treat Obesity and Metabolic Disease. *Nat Rev Endocrinol* **2018**, *14*, 77–87, doi:10.1038/nrendo.2017.132.
121. Nicholls, D.G. The Physiological Regulation of Uncoupling Proteins. *Biochim Biophys Acta* **2006**, *1757*, 459–466, doi:10.1016/j.bbabi.2006.02.005.
122. Sluse, F.E.; Jarmuszkiewicz, W.; Navet, R.; Douette, P.; Mathy, G.; Sluse-Goffart, C.M. Mitochondrial UCPs: New Insights into Regulation and Impact. *Biochim Biophys Acta* **2006**, *1757*, 480–485, doi:10.1016/j.bbabi.2006.02.004.
123. Fedorenko, A.; Lishko, P.V.; Kirichok, Y. Mechanism of Fatty-Acid-Dependent UCP1 Uncoupling in Brown Fat Mitochondria. *Cell* **2012**, *151*, 400–413, doi:10.1016/j.cell.2012.09.010.
124. Lehr, L.; Canola, K.; Asensio, C.; Jimenez, M.; Kuehne, F.; Giacobino, J.-P.; Muzzin, P. The Control of UCP1 Is Dissociated from That of PGC-1 α or of Mitochondriogenesis as Revealed by a Study Using β -Less Mouse Brown Adipocytes in Culture. *FEBS Letters* **2006**, *580*, 4661–4666, doi:10.1016/j.febslet.2006.07.037.
125. Hanssen, M.J.W.; Hoeks, J.; Brans, B.; van der Lans, A.A.J.J.; Schaart, G.; van den Driessche, J.J.; Jörgensen, J.A.; Boekschoten, M.V.; Hesselink, M.K.C.; Havekes, B.; et al. Short-Term Cold Acclimation Improves Insulin Sensitivity in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 863–865, doi:10.1038/nm.3891.
126. Marti, A.; Martinez-González, M.A.; Martinez, J.A. Interaction between Genes and Lifestyle Factors on Obesity. *Proc Nutr Soc* **2008**, *67*, 1–8, doi:10.1017/S002966510800596X.

127. Barsh, G.S.; Farooqi, I.S.; O’Rahilly, S. Genetics of Body-Weight Regulation. *Nature* **2000**, *404*, 644–651, doi:10.1038/35007519.
128. Almind, K.; Kahn, C.R. Genetic Determinants of Energy Expenditure and Insulin Resistance in Diet-Induced Obesity in Mice. *Diabetes* **2004**, *53*, 3274–3285, doi:10.2337/diabetes.53.12.3274.
129. Comuzzie, A.G.; Allison, D.B. The Search for Human Obesity Genes. *Science* **1998**, *280*, 1374–1377, doi:10.1126/science.280.5368.1374.
130. Faust, I.M.; Johnson, P.R.; Stern, J.S.; Hirsch, J. Diet-Induced Adipocyte Number Increase in Adult Rats: A New Model of Obesity. *Am J Physiol* **1978**, *235*, E279-286, doi:10.1152/ajpendo.1978.235.3.E279.
131. Lopes, H.F.; Corrêa-Giannella, M.L.; Consolim-Colombo, F.M.; Egan, B.M. Visceral Adiposity Syndrome. *Diabetol Metab Syndr* **2016**, *8*, 40, doi:10.1186/s13098-016-0156-2.
132. 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. Beige Adipocytes Are a Distinct Type of Thermogenic Fat Cell in Mouse and Human. *Cell* **2012**, *150*, 366–376, doi:10.1016/j.cell.2012.05.016.
133. Kajimura, S.; Spiegelman, B.M.; Seale, P. Brown and Beige Fat: Physiological Roles beyond Heat Generation. *Cell Metab.* **2015**, *22*, 546–559, doi:10.1016/j.cmet.2015.09.007.
134. Waldén, T.B.; Hansen, I.R.; Timmons, J.A.; Cannon, B.; Nedergaard, J. Recruited vs. Nonrecruited Molecular Signatures of Brown, “Brite,” and White Adipose Tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **2012**, *302*, E19-31, doi:10.1152/ajpendo.00249.2011.
135. Young, P.; Arch, J.R.; Ashwell, M. Brown Adipose Tissue in the Parametrial Fat Pad of the Mouse. *FEBS Lett* **1984**, *167*, 10–14, doi:10.1016/0014-5793(84)80822-4.
136. Orava, J.; Nuutila, P.; Lidell, M.E.; Oikonen, V.; Noponen, T.; Viljanen, T.; Scheinin, M.; Taittonen, M.; Niemi, T.; Enerbäck, S.; et al. Different Metabolic Responses of Human Brown Adipose Tissue to Activation by Cold and Insulin. *Cell Metab* **2011**, *14*, 272–279, doi:10.1016/j.cmet.2011.06.012.
137. Bartelt, A.; Heeren, J. Adipose Tissue Browning and Metabolic Health. *Nat Rev Endocrinol* **2014**, *10*, 24–36, doi:10.1038/nrendo.2013.204.
138. Roh, H.C.; Tsai, L.T.Y.; Shao, M.; Tenen, D.; Shen, Y.; Kumari, M.; Lyubetskaya, A.; Jacobs, C.; Dawes, B.; Gupta, R.K.; et al. Warming Induces Significant Reprogramming of Beige, but Not Brown, Adipocyte Cellular Identity. *Cell Metab* **2018**, *27*, 1121-1137.e5, doi:10.1016/j.cmet.2018.03.005.
139. Petrovic, N.; Walden, T.B.; Shabalina, I.G.; Timmons, J.A.; Cannon, B.; Nedergaard, J. Chronic Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPARgamma) Activation of Epididymally Derived White Adipocyte Cultures Reveals a Population of Thermogenically Competent, UCP1-Containing Adipocytes Molecularly Distinct from Classic Brown Adipocytes. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 7153–7164, doi:10.1074/jbc.M109.053942.
140. Poekes, L.; Lanthier, N.; Leclercq, I.A. Brown Adipose Tissue: A Potential Target in the Fight against Obesity and the Metabolic Syndrome. *Clinical Science* **2015**, *129*, 933–949, doi:10.1042/CS20150339.
141. Rabhi, N.; Hannou, S.A.; Gromada, X.; Salas, E.; Yao, X.; Oger, F.; Carney, C.; Lopez-Mejia, I.C.; Durand, E.; Rabearivelo, I.; et al. Cdkn2a Deficiency Promotes Adipose Tissue Browning. *Mol Metab* **2018**, *8*, 65–76, doi:10.1016/j.molmet.2017.11.012.
142. Bonet, M.L.; Oliver, P.; Palou, A. Pharmacological and Nutritional Agents Promoting Browning of White Adipose Tissue. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **2013**, *1831*, 969–985, doi:10.1016/j.bbalip.2012.12.002.
143. Bruera, E. ABC of Palliative Care. Anorexia, Cachexia, and Nutrition. *BMJ* **1997**, *315*, 1219–1222, doi:10.1136/bmj.315.7117.1219.
144. Hart, P.A.; Kamada, P.; Rabe, K.G.; Srinivasan, S.; Basu, A.; Aggarwal, G.; Chari, S.T. Weight Loss Precedes Cancer-Specific Symptoms in Pancreatic Cancer-Associated Diabetes Mellitus. *Pancreas* **2011**, *40*, 768, doi:10.1097/MPA.0b013e318220816a.
145. Sharma, A.; Kandlakunta, H.; Nagpal, S.J.S.; Feng, Z.; Hoos, W.; Petersen, G.M.; Chari, S.T. Model to Determine Risk of Pancreatic Cancer in Patients With New-Onset Diabetes.



- Gastroenterology* **2018**, *155*, 730-739.e3, doi:10.1053/j.gastro.2018.05.023.
146. Tsoli, M.; Moore, M.; Burg, D.; Painter, A.; Taylor, R.; Lockie, S.H.; Turner, N.; Warren, A.; Cooney, G.; Oldfield, B.; et al. Activation of Thermogenesis in Brown Adipose Tissue and Dysregulated Lipid Metabolism Associated with Cancer Cachexia in Mice. *Cancer Res* **2012**, *72*, 4372–4382, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3536.
147. Vaitkus, J.A.; Celi, F.S. The Role of Adipose Tissue in Cancer-Associated Cachexia. *Exp Biol Med (Maywood)* **2017**, *242*, 473–481, doi:10.1177/1535370216683282.
148. Okuda, T.; Hirai, H.; Valentine, V.A.; Shurtleff, S.A.; Kidd, V.J.; Lahti, J.M.; Sherr, C.J.; Downing, J.R. Molecular Cloning, Expression Pattern, and Chromosomal Localization of Human CDKN2D/INK4d, an Inhibitor of Cyclin D-Dependent Kinases. *Genomics* **1995**, *29*, 623–630, doi:10.1006/geno.1995.9957.
149. Buchkovich, K.; Duffy, L.A.; Harlow, E. The Retinoblastoma Protein Is Phosphorylated during Specific Phases of the Cell Cycle. *Cell* **1989**, *58*, 1097–1105, doi:10.1016/0092-8674(89)90508-4.
150. Han, X.; Kuang, Y.; Chen, H.; Liu, T.; Zhang, J.; Liu, J. P19INK4d: More than Just a Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor. *CDT* **2019**, *21*, 96–102, doi:10.2174/1389450120666190809161901.
151. Dreidax, D.; Bannert, S.; Henrich, K.-O.; Schröder, C.; Bender, S.; Oakes, C.C.; Lindner, S.; Schulte, J.H.; Duffy, D.; Schwarzl, T.; et al. P19-INK4d Inhibits Neuroblastoma Cell Growth, Induces Differentiation and Is Hypermethylated and Downregulated in MYCN-Amplified Neuroblastomas. *Hum Mol Genet* **2014**, *23*, 6826–6837, doi:10.1093/hmg/ddu406.
152. Lin, S.; Wang, M.J.; Tseng, K.-Y. Polypyrimidine Tract-Binding Protein Induces P19(Ink4d) Expression and Inhibits the Proliferation of H1299 Cells. *PLoS One* **2013**, *8*, e58227, doi:10.1371/journal.pone.0058227.
153. Zhong, L.; Liao, G.; Wang, X.; Li, L.; Zhang, J.; Chen, Y.; Liu, J.; Liu, S.; Wei, L.; Zhang, W.; et al. Mesenchymal Stem Cells-Microvesicle-MiR-451a Ameliorate Early Diabetic Kidney Injury by Negative Regulation of P15 and P19. *Exp Biol Med (Maywood)* **2018**, *243*, 1233–1242, doi:10.1177/1535370218819726.
154. Kumar, A.; Gopalswamy, M.; Wolf, A.; Brockwell, D.J.; Hatzfeld, M.; Balbach, J. Phosphorylation-Induced Unfolding Regulates P19INK4d during the Human Cell Cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2018**, *115*, 3344–3349, doi:10.1073/pnas.1719774115.
155. Bai, F.; Chan, H.L.; Smith, M.D.; Kiyokawa, H.; Pei, X.-H. P19Ink4d Is a Tumor Suppressor and Controls Pituitary Anterior Lobe Cell Proliferation. *Mol Cell Biol* **2014**, *34*, 2121–2134, doi:10.1128/MCB.01363-13.
156. Miller, C.W.; Yeon, C.; Aslo, A.; Mendoza, S.; Aytac, U.; Koeffler, H.P. The P19INK4D Cyclin Dependent Kinase Inhibitor Gene Is Altered in Osteosarcoma. *Oncogene* **1997**, *15*, 231–235, doi:10.1038/sj.onc.1201185.
157. Carcagno, A.L.; Giono, L.E.; Marazita, M.C.; Castillo, D.S.; Pregi, N.; Cánepa, E.T. E2F1 Induces P19INK4d, a Protein Involved in the DNA Damage Response, Following UV Irradiation. *Mol Cell Biochem* **2012**, *366*, 123–129, doi:10.1007/s11010-012-1289-8.
158. Sonzogni, S.V.; Ogara, M.F.; Belluscio, L.M.; Castillo, D.S.; Scassa, M.E.; Cánepa, E.T. P19INK4d Is Involved in the Cellular Senescence Mechanism Contributing to Heterochromatin Formation. *Biochim Biophys Acta* **2014**, *1840*, 2171–2183, doi:10.1016/j.bbagen.2014.03.015.
159. Guan, K.L.; Jenkins, C.W.; Li, Y.; Nichols, M.A.; Wu, X.; O’Keefe, C.L.; Matera, A.G.; Xiong, Y. Growth Suppression by P18, a P16INK4/MTS1- and P14INK4B/MTS2-Related CDK6 Inhibitor, Correlates with Wild-Type PRb Function. *Genes Dev* **1994**, *8*, 2939–2952, doi:10.1101/gad.8.24.2939.
160. Hirai, H.; Roussel, M.F.; Kato, J.Y.; Ashmun, R.A.; Sherr, C.J. Novel INK4 Proteins, P19 and P18, Are Specific Inhibitors of the Cyclin D-Dependent Kinases CDK4 and CDK6. *Mol Cell Biol* **1995**, *15*, 2672–2681, doi:10.1128/MCB.15.5.2672.
161. Solomon, D.A.; Kim, J.-S.; Jean, W.; Waldman, T. Conspirators in a Capital Crime: Co-Deletion of P18INK4c and P16INK4a/P14ARF/P15INK4b in Glioblastoma Multiforme. *Cancer Res* **2008**, *68*, 8657–8660, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2084.
162. Latres, E.; Malumbres, M.; Sotillo, R.; Martín, J.; Ortega, S.; Martín-Caballero, J.; Flores, J.M.;

- Cordón-Cardo, C.; Barbacid, M. Limited Overlapping Roles of P15INK4b and P18INK4c Cell Cycle Inhibitors in Proliferation and Tumorigenesis. *EMBO J* **2000**, *19*, 3496–3506, doi:10.1093/emboj/19.13.3496.
163. Zariwala, M.; Liu, E.; Xiong, Y. Mutational Analysis of the P16 Family Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors P15INK4b and P18INK4c in Tumor-Derived Cell Lines and Primary Tumors. *Oncogene* **1996**, *12*, 451–455.
164. Lapointe, J.; Lachance, Y.; Labrie, Y.; Labrie, C. A P18 Mutant Defective in CDK6 Binding in Human Breast Cancer Cells. *Cancer Res* **1996**, *56*, 4586–4589.
165. Kulkarni, M.S.; Daggett, J.L.; Bender, T.P.; Kuehl, W.M.; Bergsagel, P.L.; Williams, M.E. Frequent Inactivation of the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor P18 by Homozygous Deletion in Multiple Myeloma Cell Lines: Ectopic P18 Expression Inhibits Growth and Induces Apoptosis. *Leukemia* **2002**, *16*, 127–134, doi:10.1038/sj.leu.2402328.
166. Iolascon, A.; Faienza, M.F.; Coppola, B.; della Ragione, F.; Schettini, F.; Biondi, A. Homozygous Deletions of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Genes, P16(INK4A) and P18, in Childhood T Cell Lineage Acute Lymphoblastic Leukemias. *Leukemia* **1996**, *10*, 255–260.
167. He, J.; Hoang-Xuan, K.; Marie, Y.; Leuraud, P.; Mokhtari, K.; Kujas, M.; Delattre, J.Y.; Sanson, M. P18 Tumor Suppressor Gene and Progression of Oligodendrogliomas to Anaplasia. *Neurology* **2000**, *55*, 867–869, doi:10.1212/wnl.55.6.867.
168. Legrier, M.E.; Ducray, A.; Propper, A.; Chao, M.; Kastner, A. Cell Cycle Regulation during Mouse Olfactory Neurogenesis. *Cell Growth Differ* **2001**, *12*, 591–601.
169. Phelps, D.E.; Xiong, Y. Regulation of Cyclin-Dependent Kinase 4 during Adipogenesis Involves Switching of Cyclin D Subunits and Concurrent Binding of P18INK4c and P27Kip1. *Cell Growth Differ* **1998**, *9*, 595–610.
170. Rowell, E.A.; Wang, L.; Chunder, N.; Hancock, W.W.; Wells, A.D. Regulation of T Cell Differentiation and Alloimmunity by the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor P18ink4c. *PLoS One* **2014**, *9*, e91587, doi:10.1371/journal.pone.0091587.
171. Fuxe, J.; Raschperger, E.; Pettersson, R.F. Translation of P15.INK4B, an N-Terminally Extended and Fully Active Form of P15INK4B, Is Initiated from an Upstream GUG Codon. *Oncogene* **2000**, *19*, 1724–1728, doi:10.1038/sj.onc.1203496.
172. Tsubari, M.; Tiihonen, E.; Laiho, M. Cloning and Characterization of P10, an Alternatively Spliced Form of P15 Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor. *Cancer Res* **1997**, *57*, 2966–2973.
173. Pasmant, E.; Laurendeau, I.; Héron, D.; Vidaud, M.; Vidaud, D.; Bièche, I. Characterization of a Germ-Line Deletion, Including the Entire INK4/ARF Locus, in a Melanoma-Neural System Tumor Family: Identification of ANRIL, an Antisense Noncoding RNA Whose Expression Coclusters with ARF. *Cancer Res* **2007**, *67*, 3963–3969, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2004.
174. Hannon, G.J.; Beach, D. P15INK4B Is a Potential Effector of TGF-Beta-Induced Cell Cycle Arrest. *Nature* **1994**, *371*, 257–261, doi:10.1038/371257a0.
175. Narita, M.; Núñez, S.; Heard, E.; Narita, M.; Lin, A.W.; Hearn, S.A.; Spector, D.L.; Hannon, G.J.; Lowe, S.W. Rb-Mediated Heterochromatin Formation and Silencing of E2F Target Genes during Cellular Senescence. *Cell* **2003**, *113*, 703–716, doi:10.1016/s0092-8674(03)00401-x.
176. Humeniuk, R.; Rosu-Myles, M.; Fares, J.; Koller, R.; Bies, J.; Wolff, L. The Role of Tumor Suppressor P15Ink4b in the Regulation of Hematopoietic Progenitor Cell Fate. *Blood Cancer J* **2013**, *3*, e99, doi:10.1038/bcj.2012.44.
177. Wolff, L.; Humeniuk, R. Concise Review: Erythroid versus Myeloid Lineage Commitment: Regulating the Master Regulators. *Stem Cells* **2013**, *31*, 1237–1244, doi:10.1002/stem.1379.
178. Rosu-Myles, M.; Taylor, B.J.; Wolff, L. Loss of the Tumor Suppressor P15Ink4b Enhances Myeloid Progenitor Formation from Common Myeloid Progenitors. *Exp Hematol* **2007**, *35*, 394–406, doi:10.1016/j.exphem.2006.11.005.
179. Teofili, L.; Morosetti, R.; Martini, M.; Urbano, R.; Putzulu, R.; Rutella, S.; Pierelli, L.; Leone, G.; Larocca, L.M. Expression of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor P15(INK4B) during Normal and Leukemic Myeloid Differentiation. *Exp Hematol* **2000**, *28*, 519–526, doi:10.1016/s0301-472x(00)00139-9.

180. Kotake, Y.; Nakagawa, T.; Kitagawa, K.; Suzuki, S.; Liu, N.; Kitagawa, M.; Xiong, Y. Long Non-Coding RNA ANRIL Is Required for the PRC2 Recruitment to and Silencing of P15(INK4B) Tumor Suppressor Gene. *Oncogene* **2011**, *30*, 1956–1962, doi:10.1038/onc.2010.568.
181. Kim, W.Y.; Sharpless, N.E. The Regulation of INK4/ARF in Cancer and Aging. *Cell* **2006**, *127*, 265–275, doi:10.1016/j.cell.2006.10.003.
182. Helgadóttir, A.; Thorleifsson, G.; Manolescu, A.; Gretarsdóttir, S.; Blondal, T.; Jonasdóttir, A.; Jonasdóttir, A.; Sigurdsson, A.; Baker, A.; Palsson, A.; et al. A Common Variant on Chromosome 9p21 Affects the Risk of Myocardial Infarction. *Science* **2007**, *316*, 1491–1493, doi:10.1126/science.1142842.
183. Melzer, D.; Frayling, T.M.; Murray, A.; Hurst, A.J.; Harries, L.W.; Song, H.; Khaw, K.; Luben, R.; Surtees, P.G.; Bandinelli, S.S.; et al. A Common Variant of the P16(INK4a) Genetic Region Is Associated with Physical Function in Older People. *Mech Ageing Dev* **2007**, *128*, 370–377, doi:10.1016/j.mad.2007.03.005.
184. McPherson, R.; Pertsemlidis, A.; Kavaslar, N.; Stewart, A.; Roberts, R.; Cox, D.R.; Hinds, D.A.; Pennacchio, L.A.; Tybjaerg-Hansen, A.; Folsom, A.R.; et al. A Common Allele on Chromosome 9 Associated with Coronary Heart Disease. *Science* **2007**, *316*, 1488–1491, doi:10.1126/science.1142447.
185. Wellcome Trust Case Control Consortium Genome-Wide Association Study of 14,000 Cases of Seven Common Diseases and 3,000 Shared Controls. *Nature* **2007**, *447*, 661–678, doi:10.1038/nature05911.
186. A Genome-Wide Association Study of Type 2 Diabetes in Finns Detects Multiple Susceptibility Variants - PubMed Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17463248/> (accessed on 4 August 2023).
187. Diabetes Genetics Initiative of Broad Institute of Harvard and MIT, Lund University, and Novartis Institutes of Biomedical Research; Saxena, R.; Voight, B.F.; Lyssenko, V.; Burt, N.P.; de Bakker, P.I.W.; Chen, H.; Roix, J.J.; Kathiresan, S.; Hirschhorn, J.N.; et al. Genome-Wide Association Analysis Identifies Loci for Type 2 Diabetes and Triglyceride Levels. *Science* **2007**, *316*, 1331–1336, doi:10.1126/science.1142358.
188. Zeggini, E.; Weedon, M.N.; Lindgren, C.M.; Frayling, T.M.; Elliott, K.S.; Lango, H.; Timpson, N.J.; Perry, J.R.B.; Rayner, N.W.; Freathy, R.M.; et al. Replication of Genome-Wide Association Signals in UK Samples Reveals Risk Loci for Type 2 Diabetes. *Science* **2007**, *316*, 1336–1341, doi:10.1126/science.1142364.
189. Züchner, S.; Gilbert, J.R.; Martin, E.R.; Leon-Guerrero, C.R.; Xu, P.-T.; Browning, C.; Bronson, P.G.; Whitehead, P.; Schmechel, D.E.; Haines, J.L.; et al. Linkage and Association Study of Late-Onset Alzheimer Disease Families Linked to 9p21.3. *Ann Hum Genet* **2008**, *72*, 725–731, doi:10.1111/j.1469-1809.2008.00474.x.
190. Fahham, N.; Sardari, S.; Ostad, S.N.; Vaziri, B.; Ghahremani, M.H. C-Terminal Domain of P16(INK4a) Is Adequate in Inducing Cell Cycle Arrest, Growth Inhibition and CDK4/6 Interaction Similar to the Full Length Protein in HT-1080 Fibrosarcoma Cells. *J Cell Biochem* **2010**, *111*, 1598–1606, doi:10.1002/jcb.22892.
191. Wolff, B.; Naumann, M. INK4 Cell Cycle Inhibitors Direct Transcriptional Inactivation of NF-KappaB. *Oncogene* **1999**, *18*, 2663–2666, doi:10.1038/sj.onc.1202617.
192. Fu, G.-H.; Wang, Y.; Xi, Y.-H.; Shen, W.-W.; Pan, X.-Y.; Shen, W.-Z.; Jiang, X.-S.; Chen, G.-Q. Direct Interaction and Cooperative Role of Tumor Suppressor P16 with Band 3 (AE1). *FEBS Lett* **2005**, *579*, 2105–2110, doi:10.1016/j.febslet.2005.02.063.
193. Low, P.S.; Waugh, S.M.; Zinke, K.; Drenckhahn, D. The Role of Hemoglobin Denaturation and Band 3 Clustering in Red Blood Cell Aging. *Science* **1985**, *227*, 531–533, doi:10.1126/science.2578228.
194. Becker, T.M.; Haferkamp, S.; Dijkstra, M.K.; Scurr, L.L.; Frausto, M.; Diefenbach, E.; Scolyer, R.A.; Reisman, D.N.; Mann, G.J.; Kefford, R.F.; et al. The Chromatin Remodelling Factor BRG1 Is a Novel Binding Partner of the Tumor Suppressor P16INK4a. *Mol Cancer* **2009**, *8*, 4, doi:10.1186/1476-4598-8-4.

195. Nishiwaki, E.; Turner, S.L.; Harju, S.; Miyazaki, S.; Kashiwagi, M.; Koh, J.; Serizawa, H. Regulation of CDK7-Carboxyl-Terminal Domain Kinase Activity by the Tumor Suppressor P16(INK4A) Contributes to Cell Cycle Regulation. *Mol Cell Biol* **2000**, *20*, 7726–7734, doi:10.1128/MCB.20.20.7726-7734.2000.
196. Souza-Rodríguez, E.; Estanyol, J.M.; Friedrich-Heineken, E.; Olmedo, E.; Vera, J.; Canela, N.; Brun, S.; Agell, N.; Hübscher, U.; Bachs, O.; et al. Proteomic Analysis of P16ink4a-Binding Proteins. *Proteomics* **2007**, *7*, 4102–4111, doi:10.1002/pmic.200700133.
197. Al-Khalaf, H.H.; Mohideen, P.; Nallar, S.C.; Kalvakolanu, D.V.; Aboussekhra, A. The Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor P16INK4a Physically Interacts with Transcription Factor Sp1 and Cyclin-Dependent Kinase 4 to Transactivate MicroRNA-141 and MicroRNA-146b-5p Spontaneously and in Response to Ultraviolet Light-Induced DNA Damage. *J Biol Chem* **2013**, *288*, 35511–35525, doi:10.1074/jbc.M113.512640.
198. Tsellou, E.; Michailidi, C.; Pafiti, A.; Troungos, C. DNA Methylation-Independent Regulation of P16 in Epithelial Cells during Mouse Mammary Gland Development. *Epigenetics* **2008**, *3*, 143–148, doi:10.4161/epi.3.3.6371.
199. Wang, X.; Pan, L.; Feng, Y.; Wang, Y.; Han, Q.; Han, L.; Han, S.; Guo, J.; Huang, B.; Lu, J. P300 Plays a Role in P16(INK4a) Expression and Cell Cycle Arrest. *Oncogene* **2008**, *27*, 1894–1904, doi:10.1038/sj.onc.1210821.
200. Jacobs, J.J.; Kieboom, K.; Marino, S.; DePinho, R.A.; van Lohuizen, M. The Oncogene and Polycomb-Group Gene Bmi-1 Regulates Cell Proliferation and Senescence through the Ink4a Locus. *Nature* **1999**, *397*, 164–168, doi:10.1038/16476.
201. Wang, X.; Feng, Y.; Pan, L.; Wang, Y.; Xu, X.; Lu, J.; Huang, B. The Proximal GC-Rich Region of P16(INK4a) Gene Promoter Plays a Role in Its Transcriptional Regulation. *Mol Cell Biochem* **2007**, *301*, 259–266, doi:10.1007/s11010-007-9427-4.
202. Li, H.; Wang, W.; Liu, X.; Paulson, K.E.; Yee, A.S.; Zhang, X. Transcriptional Factor HBP1 Targets P16(INK4A), Upregulating Its Expression and Consequently Is Involved in Ras-Induced Premature Senescence. *Oncogene* **2010**, *29*, 5083–5094, doi:10.1038/onc.2010.252.
203. Ohtani, N.; Zebedee, Z.; Huot, T.J.; Stinson, J.A.; Sugimoto, M.; Ohashi, Y.; Sharrocks, A.D.; Peters, G.; Hara, E. Opposing Effects of Ets and Id Proteins on P16INK4a Expression during Cellular Senescence. *Nature* **2001**, *409*, 1067–1070, doi:10.1038/35059131.
204. Gizard, F.; Amant, C.; Barbier, O.; Bellosta, S.; Robillard, R.; Percevault, F.; Sevestre, H.; Krimpenfort, P.; Corsini, A.; Rochette, J.; et al. PPAR Alpha Inhibits Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation Underlying Intimal Hyperplasia by Inducing the Tumor Suppressor P16INK4a. *J Clin Invest* **2005**, *115*, 3228–3238, doi:10.1172/JCI22756.
205. Chien, W.W.; Ffrench, M. [Regulation of p16INK4a, senescence and oncogenesis]. *Med Sci (Paris)* **2006**, *22*, 865–871, doi:10.1051/medsci/20062210865.
206. Li, J.; Poi, M.J.; Tsai, M.-D. Regulatory Mechanisms of Tumor Suppressor P16(INK4A) and Their Relevance to Cancer. *Biochemistry* **2011**, *50*, 5566–5582, doi:10.1021/bi200642e.
207. Ma, W.-L.; Wang, L.; Liu, L.-X.; Wang, X.-L. Effect of Phosphorylation and Methylation on the Function of the P16INK4a Protein in Non-Small Cell Lung Cancer A549 Cells. *Oncol Lett* **2015**, *10*, 2277–2282, doi:10.3892/ol.2015.3617.
208. Sherr, C.J. Divorcing ARF and P53: An Unsettled Case. *Nat Rev Cancer* **2006**, *6*, 663–673, doi:10.1038/nrc1954.
209. Reef, S.; Zalckvar, E.; Shifman, O.; Bialik, S.; Sabanay, H.; Oren, M.; Kimchi, A. A Short Mitochondrial Form of P19ARF Induces Autophagy and Caspase-Independent Cell Death. *Mol Cell* **2006**, *22*, 463–475, doi:10.1016/j.molcel.2006.04.014.
210. Weber, J.D.; Taylor, L.J.; Roussel, M.F.; Sherr, C.J.; Bar-Sagi, D. Nucleolar Arf Sequesters Mdm2 and Activates P53. *Nat Cell Biol* **1999**, *1*, 20–26, doi:10.1038/8991.
211. Rizos, H.; Darmanian, A.P.; Mann, G.J.; Kefford, R.F. Two Arginine Rich Domains in the P14ARF Tumour Suppressor Mediate Nucleolar Localization. *Oncogene* **2000**, *19*, 2978–2985, doi:10.1038/sj.onc.1203629.
212. Xirodimas, D.P.; Chisholm, J.; Desterro, J.M.S.; Lane, D.P.; Hay, R.T. P14ARF Promotes

Accumulation of SUMO-1 Conjugated (H)Mdm2. *FEBS Lett* **2002**, *528*, 207–211, doi:10.1016/s0014-5793(02)03310-0.

213. Zindy, F.; Eischen, C.M.; Randle, D.H.; Kamijo, T.; Cleveland, J.L.; Sherr, C.J.; Roussel, M.F. Myc Signaling via the ARF Tumor Suppressor Regulates P53-Dependent Apoptosis and Immortalization. *Genes Dev* **1998**, *12*, 2424–2433, doi:10.1101/gad.12.15.2424.

214. Conacci-Sorrell, M.; McFerrin, L.; Eisenman, R.N. An Overview of MYC and Its Interactome. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2014**, *4*, a014357, doi:10.1101/cshperspect.a014357.

215. DeGregori, J.; Leone, G.; Miron, A.; Jakoi, L.; Nevins, J.R. Distinct Roles for E2F Proteins in Cell Growth Control and Apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1997**, *94*, 7245–7250, doi:10.1073/pnas.94.14.7245.

216. Aslanian, A.; Iaquinta, P.J.; Verona, R.; Lees, J.A. Repression of the Arf Tumor Suppressor by E2F3 Is Required for Normal Cell Cycle Kinetics. *Genes Dev* **2004**, *18*, 1413–1422, doi:10.1101/gad.1196704.

217. Humbert, P.O.; Verona, R.; Trimarchi, J.M.; Rogers, C.; Dandapani, S.; Lees, J.A. E2f3 Is Critical for Normal Cellular Proliferation. *Genes Dev* **2000**, *14*, 690–703.

218. Tschan, M.P.; Federzoni, E.A.; Haimovici, A.; Britschgi, C.; Moser, B.A.; Jin, J.; Reddy, V.A.; Sheeter, D.A.; Fischer, K.M.; Sun, P.; et al. Human DMTF1 β Antagonizes DMTF1 α Regulation of the P14(ARF) Tumor Suppressor and Promotes Cellular Proliferation. *Biochim Biophys Acta* **2015**, *1849*, 1198–1208, doi:10.1016/j.bbagr.2015.07.009.

219. Inoue, K.; Roussel, M.F.; Sherr, C.J. Induction of ARF Tumor Suppressor Gene Expression and Cell Cycle Arrest by Transcription Factor DMP1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, *96*, 3993–3998, doi:10.1073/pnas.96.7.3993.

220. Bouchard, C.; Lee, S.; Paulus-Hock, V.; Loddenkemper, C.; Eilers, M.; Schmitt, C.A. FoxO Transcription Factors Suppress Myc-Driven Lymphomagenesis via Direct Activation of Arf. *Genes Dev* **2007**, *21*, 2775–2787, doi:10.1101/gad.453107.

221. Freeman-Anderson, N.E.; Zheng, Y.; McCalla-Martin, A.C.; Treanor, L.M.; Zhao, Y.D.; Garfin, P.M.; He, T.-C.; Mary, M.N.; Thornton, J.D.; Anderson, C.; et al. Expression of the Arf Tumor Suppressor Gene Is Controlled by Tgfbeta2 during Development. *Development* **2009**, *136*, 2081–2089, doi:10.1242/dev.033548.

222. Chen, G.; Ghosh, P.; O'Farrell, T.; Munk, R.; Rezanka, L.J.; Sasaki, C.Y.; Longo, D.L. Transforming Growth Factor B1 (TGF-B1) Suppresses Growth of B-Cell Lymphoma Cells by P14(ARF)-Dependent Regulation of Mutant P53. *J Biol Chem* **2012**, *287*, 23184–23195, doi:10.1074/jbc.M112.351411.

223. Gil, J.; Bernard, D.; Martínez, D.; Beach, D. Polycomb CBX7 Has a Unifying Role in Cellular Lifespan. *Nat Cell Biol* **2004**, *6*, 67–72, doi:10.1038/ncb1077.

224. Cakouros, D.; Isenmann, S.; Cooper, L.; Zannettino, A.; Anderson, P.; Glackin, C.; Gronthos, S. Twist-1 Induces Ezh2 Recruitment Regulating Histone Methylation along the Ink4A/Arf Locus in Mesenchymal Stem Cells. *Mol Cell Biol* **2012**, *32*, 1433–1441, doi:10.1128/MCB.06315-11.

225. Jacobs, J.J.; Keblusek, P.; Robanus-Maandag, E.; Kristel, P.; Lingbeek, M.; Nederlof, P.M.; van Welsem, T.; van de Vijver, M.J.; Koh, E.Y.; Daley, G.Q.; et al. Senescence Bypass Screen Identifies TBX2, Which Represses Cdkn2a (P19(ARF)) and Is Amplified in a Subset of Human Breast Cancers. *Nat Genet* **2000**, *26*, 291–299, doi:10.1038/81583.

226. Ozenne, P.; Dayde, D.; Brambilla, E.; Eymin, B.; Gazzeri, S. P14(ARF) Inhibits the Growth of Lung Adenocarcinoma Cells Harboring an EGFR L858R Mutation by Activating a STAT3-Dependent pro-Apoptotic Signalling Pathway. *Oncogene* **2013**, *32*, 1050–1058, doi:10.1038/onc.2012.107.

227. Inoue, R.; Shiraishi, T. PKC α Is Involved in Phorbol Ester TPA-Mediated Stabilization of P14ARF. *Biochem Biophys Res Commun* **2005**, *330*, 1314–1318, doi:10.1016/j.bbrc.2005.03.117.

228. Vivo, M.; Ranieri, M.; Sansone, F.; Santoriello, C.; Calogero, R.A.; Calabrò, V.; Pollice, A.; La Mantia, G. Mimicking P14ARF Phosphorylation Influences Its Ability to Restrain Cell Proliferation. *PLoS One* **2013**, *8*, e53631, doi:10.1371/journal.pone.0053631.

229. Fontana, R.; Guidone, D.; Sangermano, F.; Calabrò, V.; Pollice, A.; La Mantia, G.; Vivo, M.

- PKC Dependent P14ARF Phosphorylation on Threonine 8 Drives Cell Proliferation. *Sci Rep* **2018**, *8*, 7056, doi:10.1038/s41598-018-25496-4.
230. Kuo, M.-L.; den Besten, W.; Bertwistle, D.; Roussel, M.F.; Sherr, C.J. N-Terminal Polyubiquitination and Degradation of the Arf Tumor Suppressor. *Genes Dev* **2004**, *18*, 1862–1874, doi:10.1101/gad.1213904.
231. Chio, I.I.C.; Sasaki, M.; Ghazarian, D.; Moreno, J.; Done, S.; Ueda, T.; Inoue, S.; Chang, Y.-L.; Chen, N.J.; Mak, T.W. TRADD Contributes to Tumour Suppression by Regulating ULF-Dependent P19Arf Ubiquitylation. *Nat Cell Biol* **2012**, *14*, 625–633, doi:10.1038/ncb2496.
232. Lee, S.; Cho, Y.-E.; Kim, S.-H.; Kim, Y.-J.; Park, J.-H. GLTSCR2 Promotes the Nucleoplasmic Translocation and Subsequent Degradation of Nucleolar ARF. *Oncotarget* **2017**, *8*, 16293–16302, doi:10.18632/oncotarget.9957.
233. Ko, A.; Han, S.Y.; Choi, C.H.; Cho, H.; Lee, M.-S.; Kim, S.-Y.; Song, J.S.; Hong, K.-M.; Lee, H.-W.; Hewitt, S.M.; et al. Oncogene-Induced Senescence Mediated by c-Myc Requires USP10 Dependent Deubiquitination and Stabilization of P14ARF. *Cell Death Differ* **2018**, *25*, 1050–1062, doi:10.1038/s41418-018-0072-0.
234. Colombo, E.; Bonetti, P.; Lazzarini Denchi, E.; Martinelli, P.; Zamponi, R.; Marine, J.-C.; Helin, K.; Falini, B.; Pelicci, P.G. Nucleophosmin Is Required for DNA Integrity and P19Arf Protein Stability. *Mol Cell Biol* **2005**, *25*, 8874–8886, doi:10.1128/MCB.25.20.8874-8886.2005.
235. Velimezi, G.; Lontos, M.; Vougas, K.; Roumeliotis, T.; Bartkova, J.; Sideridou, M.; Dereli-Oz, A.; Kocylowski, M.; Pateras, I.S.; Evangelou, K.; et al. Functional Interplay between the DNA-Damage-Response Kinase ATM and ARF Tumour Suppressor Protein in Human Cancer. *Nat Cell Biol* **2013**, *15*, 967–977, doi:10.1038/ncb2795.
236. Vivo, M.; Matarese, M.; Sepe, M.; Di Martino, R.; Festa, L.; Calabrò, V.; La Mantia, G.; Pollice, A. MDM2-Mediated Degradation of P14ARF: A Novel Mechanism to Control ARF Levels in Cancer Cells. *PLoS One* **2015**, *10*, e0117252, doi:10.1371/journal.pone.0117252.
237. Kaushik, S.; Cuervo, A.M. The Coming of Age of Chaperone-Mediated Autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2018**, *19*, 365–381, doi:10.1038/s41580-018-0001-6.
238. Han, S.Y.; Ko, A.; Kitano, H.; Choi, C.H.; Lee, M.-S.; Seo, J.; Fukuoka, J.; Kim, S.-Y.; Hewitt, S.M.; Chung, J.-Y.; et al. Molecular Chaperone HSP90 Is Necessary to Prevent Cellular Senescence via Lysosomal Degradation of P14ARF. *Cancer Res* **2017**, *77*, 343–354, doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-0613.
239. Seo, J.; Han, S.Y.; Seong, D.; Han, H.-J.; Song, J. Multifaceted C-Terminus of HSP70-Interacting Protein Regulates Tumorigenesis via Protein Quality Control. *Arch Pharm Res* **2019**, *42*, 63–75, doi:10.1007/s12272-018-1101-8.
240. Serrano, M.; Hannon, G.J.; Beach, D. A New Regulatory Motif in Cell-Cycle Control Causing Specific Inhibition of Cyclin D/CDK4. *Nature* **1993**, *366*, 704, doi:10.1038/366704a0.
241. Ruas, M.; Peters, G. The P16INK4a/CDKN2A Tumor Suppressor and Its Relatives. *Biochim Biophys Acta* **1998**, *1378*, F115–177, doi:10.1016/s0304-419x(98)00017-1.
242. Sherr, C.J.; Roberts, J.M. Inhibitors of Mammalian G1 Cyclin-Dependent Kinases. *Genes Dev* **1995**, *9*, 1149–1163, doi:10.1101/gad.9.10.1149.
243. Prives, C. Signaling to P53: Breaking the MDM2-P53 Circuit. *Cell* **1998**, *95*, 5–8, doi:10.1016/s0092-8674(00)81774-2.
244. Momand, J.; Jung, D.; Wilczynski, S.; Niland, J. The MDM2 Gene Amplification Database. *Nucleic Acids Res* **1998**, *26*, 3453–3459, doi:10.1093/nar/26.15.3453.
245. Zhang, Y.; Xiong, Y. Mutations in Human ARF Exon 2 Disrupt Its Nucleolar Localization and Impair Its Ability to Block Nuclear Export of MDM2 and P53. *Mol Cell* **1999**, *3*, 579–591, doi:10.1016/s1097-2765(00)80351-2.
246. Sherr, C.J.; Roberts, J.M. CDK Inhibitors: Positive and Negative Regulators of G1-Phase Progression. *Genes Dev* **1999**, *13*, 1501–1512, doi:10.1101/gad.13.12.1501.
247. Sun, P.; Dong, P.; Dai, K.; Hannon, G.J.; Beach, D. P53-Independent Role of MDM2 in TGF- β 1 Resistance. *Science* **1998**, *282*, 2270–2272, doi:10.1126/science.282.5397.2270.
248. Muñoz-Espín, D.; Serrano, M. Cellular Senescence: From Physiology to Pathology. *Nat Rev*

Mol Cell Biol **2014**, *15*, 482–496, doi:10.1038/nrm3823.

249. Birch, J.; Gil, J. Senescence and the SASP: Many Therapeutic Avenues. *Genes Dev* **2020**, *34*, 1565–1576, doi:10.1101/gad.343129.120.
250. Di Micco, R.; Krizhanovsky, V.; Baker, D.; d’Adda di Fagagna, F. Cellular Senescence in Ageing: From Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2021**, *22*, 75–95, doi:10.1038/s41580-020-00314-w.
251. Beck, J.; Horikawa, I.; Harris, C. Cellular Senescence: Mechanisms, Morphology, and Mouse Models. *Vet Pathol* **2020**, *57*, 747–757, doi:10.1177/0300985820943841.
252. Baker, D.J.; Wijshake, T.; Tchkonja, T.; LeBrasseur, N.K.; Childs, B.G.; van de Sluis, B.; Kirkland, J.L.; van Deursen, J.M. Clearance of P16Ink4a-Positive Senescent Cells Delays Ageing-Associated Disorders. *Nature* **2011**, *479*, 232–236, doi:10.1038/nature10600.
253. Baker, D.J.; Childs, B.G.; Durik, M.; Wijers, M.E.; Sieben, C.J.; Zhong, J.; Saltness, R.A.; Jeganathan, K.B.; Verzosa, G.C.; Pezeshki, A.; et al. Naturally Occurring P16(Ink4a)-Positive Cells Shorten Healthy Lifespan. *Nature* **2016**, *530*, 184–189, doi:10.1038/nature16932.
254. Baker, D.J.; Perez-Terzic, C.; Jin, F.; Pitel, K.S.; Niederländer, N.J.; Jeganathan, K.; Yamada, S.; Reyes, S.; Rowe, L.; Hiddinga, H.J.; et al. Opposing Roles for P16Ink4a and P19Arf in Senescence and Ageing Caused by BubR1 Insufficiency. *Nat Cell Biol* **2008**, *10*, 825–836, doi:10.1038/ncb1744.
255. Krishnamurthy, J.; Ramsey, M.R.; Ligon, K.L.; Torrice, C.; Koh, A.; Bonner-Weir, S.; Sharpless, N.E. P16INK4a Induces an Age-Dependent Decline in Islet Regenerative Potential. *Nature* **2006**, *443*, 453–457, doi:10.1038/nature05092.
256. Scott, A.; Bai, F.; Chan, H.L.; Liu, S.; Slingerland, J.M.; Robbins, D.J.; Capobianco, A.J.; Pei, X.-H. P16 Loss Rescues Functional Decline of Brca1-Deficient Mammary Stem Cells. *Cell Cycle* **2017**, *16*, 759–764, doi:10.1080/15384101.2017.1295185.
257. Palmero, I.; Pantoja, C.; Serrano, M. P19ARF Links the Tumour Suppressor P53 to Ras. *Nature* **1998**, *395*, 125–126, doi:10.1038/25870.
258. Ramsey, M.R.; Sharpless, N.E. ROS as a Tumour Suppressor? *Nat Cell Biol* **2006**, *8*, 1213–1215, doi:10.1038/ncb1106-1213.
259. Minamino, T.; Orimo, M.; Shimizu, I.; Kunieda, T.; Yokoyama, M.; Ito, T.; Nojima, A.; Nabetani, A.; Oike, Y.; Matsubara, H.; et al. A Crucial Role for Adipose Tissue P53 in the Regulation of Insulin Resistance. *Nat. Med.* **2009**, *15*, 1082–1087, doi:10.1038/nm.2014.
260. Vergoni, B.; Cornejo, P.-J.; Gilleron, J.; Djedaini, M.; Ceppo, F.; Jacquet, A.; Bouget, G.; Ginet, C.; Gonzalez, T.; Maillet, J.; et al. DNA Damage and the Activation of the P53 Pathway Mediate Alterations in Metabolic and Secretory Functions of Adipocytes. *Diabetes* **2016**, *65*, 3062–3074, doi:10.2337/db16-0014.
261. Chen, C.-Y.; Abell, A.M.; Moon, Y.S.; Kim, K.-H. An Advanced Glycation End Product (AGE)-Receptor for AGEs (RAGE) Axis Restores Adipogenic Potential of Senescent Preadipocytes through Modulation of P53 Protein Function *. *Journal of Biological Chemistry* **2012**, *287*, 44498–44507, doi:10.1074/jbc.M112.399790.
262. Tchkonja, T.; Morbeck, D.E.; Von Zglinicki, T.; Van Deursen, J.; Lustgarten, J.; Scrbale, H.; Khosla, S.; Jensen, M.D.; Kirkland, J.L. Fat Tissue, Aging, and Cellular Senescence. *Aging Cell* **2010**, *9*, 667–684, doi:10.1111/j.1474-9726.2010.00608.x.
263. Minami, R.; Muta, K.; Umemura, T.; Motomura, S.; Abe, Y.; Nishimura, J.; Nawata, H. P16(Ink4a) Induces Differentiation and Apoptosis in Erythroid Lineage Cells. *Exp Hematol* **2003**, *31*, 355–362, doi:10.1016/s0301-472x(03)00040-7.
264. Wang, J.; Walsh, K. Resistance to Apoptosis Conferred by Cdk Inhibitors during Myocyte Differentiation. *Science* **1996**, *273*, 359–361, doi:10.1126/science.273.5273.359.
265. D’Arcangelo, D.; Tinaburri, L.; Dellambra, E. The Role of P16INK4a Pathway in Human Epidermal Stem Cell Self-Renewal, Aging and Cancer. *Int J Mol Sci* **2017**, *18*, 1591, doi:10.3390/ijms18071591.
266. Philipot, D.; Guérit, D.; Platano, D.; Chuchana, P.; Olivotto, E.; Espinoza, F.; Dorandeu, A.; Pers, Y.-M.; Piette, J.; Borzi, R.M.; et al. P16INK4a and Its Regulator MiR-24 Link Senescence and Chondrocyte Terminal Differentiation-Associated Matrix Remodeling in Osteoarthritis. *Arthritis Res*

Ther **2014**, *16*, R58, doi:10.1186/ar4494.

267. Curtis, E.M.; Murray, R.; Titcombe, P.; Cook, E.; Clarke-Harris, R.; Costello, P.; Garratt, E.; Holbrook, J.D.; Barton, S.; Inskip, H.; et al. Perinatal DNA Methylation at CDKN2A Is Associated With Offspring Bone Mass: Findings From the Southampton Women's Survey. *J Bone Miner Res* **2017**, *32*, 2030–2040, doi:10.1002/jbmr.3153.
268. Le, O.; Palacio, L.; Bernier, G.; Batinic-Haberle, I.; Hickson, G.; Beauséjour, C. INK4a/ARF Expression Impairs Neurogenesis in the Brain of Irradiated Mice. *Stem Cell Reports* **2018**, *10*, 1721–1733, doi:10.1016/j.stemcr.2018.03.025.
269. Price, J.D.; Park, K.-Y.; Chen, J.; Salinas, R.D.; Cho, M.J.; Kriegstein, A.R.; Lim, D.A. The Ink4a/Arf Locus Is a Barrier to Direct Neuronal Transdifferentiation. *J. Neurosci.* **2014**, *34*, 12560–12567, doi:10.1523/JNEUROSCI.3159-13.2014.
270. Bruggeman, S.W.M.; Valk-Lingbeek, M.E.; van der Stoop, P.P.M.; Jacobs, J.J.L.; Kieboom, K.; Tanger, E.; Hulsman, D.; Leung, C.; Arsenijevic, Y.; Marino, S.; et al. Ink4a and Arf Differentially Affect Cell Proliferation and Neural Stem Cell Self-Renewal in Bmi1-Deficient Mice. *Genes Dev* **2005**, *19*, 1438–1443, doi:10.1101/gad.1299305.
271. Morris, A.P.; Voight, B.F.; Teslovich, T.M.; Ferreira, T.; Segre, A.V.; Steinthorsdottir, V.; Strawbridge, R.J.; Khan, H.; Grallert, H.; Mahajan, A.; et al. Large-Scale Association Analysis Provides Insights into the Genetic Architecture and Pathophysiology of Type 2 Diabetes. *Nat. Genet.* **2012**, *44*, 981–990, doi:10.1038/ng.2383.
272. Bantubungi, K.; Hannou, S.-A.; Caron-Houde, S.; Vallez, E.; Baron, M.; Lucas, A.; Bouchaert, E.; Paumelle, R.; Tailleux, A.; Staels, B. Cdkn2a/P16Ink4a Regulates Fasting-Induced Hepatic Gluconeogenesis through the PKA-CREB-PGC1 α Pathway. *Diabetes* **2014**, *63*, 3199–3209, doi:10.2337/db13-1921.
273. Kahoul, Y.; Oger, F.; Montaigne, J.; Froguel, P.; Breton, C.; Annicotte, J.-S. Emerging Roles for the INK4a/ARF (CDKN2A) Locus in Adipose Tissue: Implications for Obesity and Type 2 Diabetes. *Biomolecules* **2020**, *10*, 1350, doi:10.3390/biom10091350.
274. Bao, X.Y.; Xie, C.; Yang, M.S. Association between Type 2 Diabetes and CDKN2A/B: A Meta-Analysis Study. *Mol. Biol. Rep.* **2012**, *39*, 1609–1616, doi:10.1007/s11033-011-0900-5.
275. González-Navarro, H.; Vinué, Á.; Sanz, M.J.; Delgado, M.; Pozo, M.A.; Serrano, M.; Burks, D.J.; Andrés, V. Increased Dosage of Ink4/Arf Protects against Glucose Intolerance and Insulin Resistance Associated with Aging. *Aging Cell* **2013**, *12*, 102–111, doi:10.1111/accel.12023.
276. Pal, A.; Potjer, T.P.; Thomsen, S.K.; Ng, H.J.; Barrett, A.; Scharfmann, R.; James, T.J.; Bishop, D.T.; Karpe, F.; Godsland, I.F.; et al. Loss-of-Function Mutations in the Cell-Cycle Control Gene CDKN2A Impact on Glucose Homeostasis in Humans. *Diabetes* **2016**, *65*, 527–533, doi:10.2337/db15-0602.
277. Helman, A.; Klochendler, A.; Azazmeh, N.; Gabai, Y.; Horwitz, E.; Anzi, S.; Swisa, A.; Condiotti, R.; Granit, R.Z.; Nevo, Y.; et al. P16(Ink4a)-Induced Senescence of Pancreatic Beta Cells Enhances Insulin Secretion. *Nat. Med.* **2016**, *22*, 412–420, doi:10.1038/nm.4054.
278. Aguayo-Mazzucato, C.; van Haaren, M.; Mruk, M.; Lee, T.B.; Crawford, C.; Hollister-Lock, J.; Sullivan, B.A.; Johnson, J.W.; Ebrahimi, A.; Dreyfuss, J.M.; et al. β Cell Aging Markers Have Heterogeneous Distribution and Are Induced by Insulin Resistance. *Cell Metab.* **2017**, *25*, 898–910.e5, doi:10.1016/j.cmet.2017.03.015.
279. Kong, Y.; Sharma, R.B.; Ly, S.; Stamateris, R.E.; Jesdale, W.M.; Alonso, L.C. CDKN2A/B T2D Genome-Wide Association Study Risk SNPs Impact Locus Gene Expression and Proliferation in Human Islets. *Diabetes* **2018**, *67*, 872–884, doi:10.2337/db17-1055.
280. Liu, Y.; Sanoff, H.K.; Cho, H.; Burd, C.E.; Torrice, C.; Mohlke, K.L.; Ibrahim, J.G.; Thomas, N.E.; Sharpless, N.E. INK4/ARF Transcript Expression Is Associated with Chromosome 9p21 Variants Linked to Atherosclerosis. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e5027, doi:10.1371/journal.pone.0005027.
281. González-Navarro, H.; Abu Nabah, Y.N.; Vinué, A.; Andrés-Manzano, M.J.; Collado, M.; Serrano, M.; Andrés, V. P19(ARF) Deficiency Reduces Macrophage and Vascular Smooth Muscle Cell Apoptosis and Aggravates Atherosclerosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2010**, *55*, 2258–2268, doi:10.1016/j.jacc.2010.01.026.

282. Kuo, C.-L.; Murphy, A.J.; Sayers, S.; Li, R.; Yvan-Charvet, L.; Davis, J.Z.; Krishnamurthy, J.; Liu, Y.; Puig, O.; Sharpless, N.E.; et al. Cdkn2a Is an Atherosclerosis Modifier Locus That Regulates Monocyte/Macrophage Proliferation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2011**, *31*, 2483–2492, doi:10.1161/ATVBAHA.111.234492.
283. Congrains, A.; Kamide, K.; Oguro, R.; Yasuda, O.; Miyata, K.; Yamamoto, E.; Kawai, T.; Kusunoki, H.; Yamamoto, H.; Takeya, Y.; et al. Genetic Variants at the 9p21 Locus Contribute to Atherosclerosis through Modulation of ANRIL and CDKN2A/B. *Atherosclerosis* **2012**, *220*, 449–455, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.11.017.
284. Ogrodnik, M.; Miwa, S.; Tchkonja, T.; Tiniakos, D.; Wilson, C.L.; Lahat, A.; Day, C.P.; Burt, A.; Palmer, A.; Anstee, Q.M.; et al. Cellular Senescence Drives Age-Dependent Hepatic Steatosis. *Nat Commun* **2017**, *8*, 15691, doi:10.1038/ncomms15691.
285. El-Athman, R.; Genov, N.N.; Mazuch, J.; Zhang, K.; Yu, Y.; Fuhr, L.; Abreu, M.; Li, Y.; Wallach, T.; Kramer, A.; et al. The Ink4a/Arf Locus Operates as a Regulator of the Circadian Clock Modulating RAS Activity. *PLoS Biol.* **2017**, *15*, e2002940, doi:10.1371/journal.pbio.2002940.
286. Ma, K.H.; Duong, P.; Moran, J.J.; Junaidi, N.; Svaren, J. Polycomb Repression Regulates Schwann Cell Proliferation and Axon Regeneration after Nerve Injury. *Glia* **2018**, *66*, 2487–2502, doi:10.1002/glia.23500.
287. Gomez-Sanchez, J.A.; Gomis-Coloma, C.; Morenilla-Palao, C.; Peiro, G.; Serra, E.; Serrano, M.; Cabedo, H. Epigenetic Induction of the Ink4a/Arf Locus Prevents Schwann Cell Overproliferation during Nerve Regeneration and after Tumorigenic Challenge. *Brain* **2013**, *136*, 2262–2278, doi:10.1093/brain/awt130.
288. Vinué, Á.; Martínez-Hervás, S.; Herrero-Cervera, A.; Sánchez-García, V.; Andrés-Blasco, I.; Piqueras, L.; Sanz, M.J.; Real, J.T.; Ascaso, J.F.; Burks, D.J.; et al. Changes in CDKN2A/2B Expression Associate with T-Cell Phenotype Modulation in Atherosclerosis and Type 2 Diabetes Mellitus. *Transl Res* **2019**, *203*, 31–48, doi:10.1016/j.trsl.2018.08.003.
289. Martínez-Hervás, S.; Sánchez-García, V.; Herrero-Cervera, A.; Vinué, Á.; Real, J.T.; Ascaso, J.F.; Burks, D.J.; González-Navarro, H. Type 1 Diabetic Mellitus Patients with Increased Atherosclerosis Risk Display Decreased CDKN2A/2B/2BAS Gene Expression in Leukocytes. *J Transl Med* **2019**, *17*, 222, doi:10.1186/s12967-019-1977-1.
290. Wouters, K.; Deleye, Y.; Hannou, S.A.; Vanhoutte, J.; Maréchal, X.; Coisne, A.; Tagzirt, M.; Derudas, B.; Bouchaert, E.; Duhem, C.; et al. The Tumour Suppressor CDKN2A/P16INK4a Regulates Adipogenesis and Bone Marrow-Dependent Development of Perivascular Adipose Tissue. *Diab Vasc Dis Res* **2017**, *14*, 516–524, doi:10.1177/1479164117728012.
291. Fu, W.; Liu, Y.; Sun, C.; Yin, H. Transient P53 Inhibition Sensitizes Aged White Adipose Tissue for Beige Adipocyte Recruitment by Blocking Mitophagy. *FASEB J.* **2019**, *33*, 844–856, doi:10.1096/fj.201800577R.
292. Fuentes, L.; Wouters, K.; Hannou, S.A.; Cudejko, C.; Rigamonti, E.; Mayi, T.H.; Derudas, B.; Pattou, F.; Chinetti-Gbaguidi, G.; Staels, B.; et al. Downregulation of the Tumour Suppressor P16INK4A Contributes to the Polarisation of Human Macrophages toward an Adipose Tissue Macrophage (ATM)-like Phenotype. *Diabetologia* **2011**, *54*, 3150–3156, doi:10.1007/s00125-011-2324-0.
293. Mohsen-Kanson, T.; Hafner, A.-L.; Wdziekonski, B.; Takashima, Y.; Villageois, P.; Carrière, A.; Svensson, M.; Bagnis, C.; Chignon-Sicard, B.; Svensson, P.-A.; et al. Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells into Brown and White Adipocytes: Role of Pax3. *Stem Cells* **2014**, *32*, 1459–1467, doi:10.1002/stem.1607.
294. Heydemann, A. An Overview of Murine High Fat Diet as a Model for Type 2 Diabetes Mellitus. *J Diabetes Res* **2016**, *2016*, 2902351, doi:10.1155/2016/2902351.
295. Ferrannini, E. The Theoretical Bases of Indirect Calorimetry: A Review. *Metab. Clin. Exp.* **1988**, *37*, 287–301.
296. Zhou, Y.; Rui, L. Leptin Signaling and Leptin Resistance. *Front Med* **2013**, *7*, 207–222, doi:10.1007/s11684-013-0263-5.
297. Badimon, L.; Oñate, B.; Vilahur, G. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells and Their

- Reparative Potential in Ischemic Heart Disease. *Rev Esp Cardiol* **2015**, *68*, 599–611, doi:10.1016/j.rec.2015.02.025.
298. Muir, L.A.; Neeley, C.K.; Meyer, K.A.; Baker, N.A.; Brosius, A.M.; Washabaugh, A.R.; Varban, O.A.; Finks, J.F.; Zamarron, B.F.; Flesher, C.G.; et al. Adipose Tissue Fibrosis, Hypertrophy, and Hyperplasia: Correlations with Diabetes in Human Obesity. *Obesity (Silver Spring)* **2016**, *24*, 597–605, doi:10.1002/oby.21377.
299. Sethi, J.K.; Vidal-Puig, A.J. Thematic Review Series: Adipocyte Biology. Adipose Tissue Function and Plasticity Orchestrate Nutritional Adaptation. *J Lipid Res* **2007**, *48*, 1253–1262, doi:10.1194/jlr.R700005-JLR200.
300. Donath, M.Y.; Shoelson, S.E. Type 2 Diabetes as an Inflammatory Disease. *Nat Rev Immunol* **2011**, *11*, 98–107, doi:10.1038/nri2925.
301. Winkles, J.A. The TWEAK–Fn14 Cytokine–Receptor Axis: Discovery, Biology and Therapeutic Targeting. *Nat Rev Drug Discov* **2008**, *7*, 411–425, doi:10.1038/nrd2488.
302. Barbera, M.J.; Schluter, A.; Pedraza, N.; Iglesias, R.; Villarroya, F.; Giral, M. 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* **2001**, *276*, 1486–1493, doi:10.1074/jbc.M006246200.
303. Liu, X.; Perusse, F.; Bukowiecki, L.J. Chronic Norepinephrine Infusion Stimulates Glucose Uptake in White and Brown Adipose Tissues. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **1994**, *266*, R914–R920, doi:10.1152/ajpregu.1994.266.3.R914.
304. Macaulay, S.L.; Kelada, A.S.; Proietto, J. Isoproterenol Inhibits Cyclic AMP-Mediated but Not Insulin-Mediated Translocation of the GLUT4 Glucose Transporter Isoform. *Mol Cell Biochem* **1994**, *141*, 27–33, doi:10.1007/BF00935588.
305. Morrison, S.; McGee, S.L. 3T3-L1 Adipocytes Display Phenotypic Characteristics of Multiple Adipocyte Lineages. *Adipocyte* **2015**, *4*, 295–302, doi:10.1080/21623945.2015.1040612.
306. Cong, H.; Zhong, W.; Wang, Y.; Ikuyama, S.; Fan, B.; Gu, J. Pycnogenol® Induces Browning of White Adipose Tissue through the PKA Signaling Pathway in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *J Diabetes Res* **2018**, *2018*, 9713259, doi:10.1155/2018/9713259.
307. Khoo, N.K.H.; Mo, L.; Zharikov, S.; Kamga-Pride, C.; Quesnelle, K.; Golin-Bisello, F.; Li, L.; Wang, Y.; Shiva, S. Nitrite Augments Glucose Uptake in Adipocytes through the Protein Kinase A-Dependent Stimulation of Mitochondrial Fusion. *Free Radic Biol Med* **2014**, *70*, 45–53, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.02.009.
308. Wang, L.; Li, J.; Di, L. Glycogen Synthesis and beyond, a Comprehensive Review of GSK3 as a Key Regulator of Metabolic Pathways and a Therapeutic Target for Treating Metabolic Diseases. *Med Res Rev* **2022**, *42*, 946–982, doi:10.1002/med.21867.
309. Oreña, S.J.; Torchia, A.J.; Garofalo, R.S. Inhibition of Glycogen-Synthase Kinase 3 Stimulates Glycogen Synthase and Glucose Transport by Distinct Mechanisms in 3T3-L1 Adipocytes. *J Biol Chem* **2000**, *275*, 15765–15772, doi:10.1074/jbc.M910002199.
310. Geering, B. Death-Associated Protein Kinase 2: Regulator of Apoptosis, Autophagy and Inflammation. *Int J Biochem Cell Biol* **2015**, *65*, 151–154, doi:10.1016/j.biocel.2015.06.001.
311. Henegar, C.; Tordjman, J.; Achard, V.; Lacasa, D.; Cremer, I.; Guerre-Millo, M.; Poitou, C.; Basdevant, A.; Stich, V.; Viguerie, N.; et al. Adipose Tissue Transcriptomic Signature Highlights the Pathological Relevance of Extracellular Matrix in Human Obesity. *Genome Biology* **2008**, *9*, R14, doi:10.1186/gb-2008-9-1-r14.
312. Soussi, H.; Reggio, S.; Alili, R.; Prado, C.; Mutel, S.; Pini, M.; Rouault, C.; Clément, K.; Dugail, I. DAPK2 Downregulation Associates With Attenuated Adipocyte Autophagic Clearance in Human Obesity. *Diabetes* **2015**, *64*, 3452–3463, doi:10.2337/db14-1933.
313. Daval, M.; Fougère, F.; Ferré, P. Functions of AMP-Activated Protein Kinase in Adipose Tissue. *J Physiol* **2006**, *574*, 55–62, doi:10.1113/jphysiol.2006.111484.
314. Hafner, A.-L.; Dani, C. Human Induced Pluripotent Stem Cells: A New Source for Brown and White Adipocytes. *World J Stem Cells* **2014**, *6*, 467–472, doi:10.4252/wjsc.v6.i4.467.
315. Yao, X.; Dani, V.; Dani, C. Human Pluripotent Stem Cells: A Relevant Model to Identify

- Pathways Governing Thermogenic Adipocyte Generation. *Front Endocrinol (Lausanne)* **2020**, *10*, 932, doi:10.3389/fendo.2019.00932.
316. Acosta, J.R.; Douagi, I.; Andersson, D.P.; Bäckdahl, J.; Rydén, M.; Arner, P.; Laurencikiene, J. Increased Fat Cell Size: A Major Phenotype of Subcutaneous White Adipose Tissue in Non-Obese Individuals with Type 2 Diabetes. *Diabetologia* **2016**, *59*, 560–570, doi:10.1007/s00125-015-3810-6.
317. Wouters, K.; Deleue, Y.; Hannou, S.A.; Vanhoutte, J.; Maréchal, X.; Coisne, A.; Tagzirt, M.; Derudas, B.; Bouchaert, E.; Duhem, C.; et al. The Tumour Suppressor CDKN2A/P16INK4a Regulates Adipogenesis and Bone Marrow-Dependent Development of Perivascular Adipose Tissue. *Diabetes and Vascular Disease Research* **2017**, *14*, 516–524, doi:10.1177/1479164117728012.
318. Abella, A.; Dubus, P.; Malumbres, M.; Rane, S.G.; Kiyokawa, H.; Sicard, A.; Vignon, F.; Langin, D.; Barbacid, M.; Fajas, L. Cdk4 Promotes Adipogenesis through PPAR γ Activation. *Cell Metab.* **2005**, *2*, 239–249, doi:10.1016/j.cmet.2005.09.003.
319. Lagarrigue, S.; Lopez-Mejia, I.C.; Denechaud, P.-D.; Escoté, X.; Castillo-Armengol, J.; Jimenez, V.; Chavey, C.; Giralt, A.; Lai, Q.; Zhang, L.; et al. CDK4 Is an Essential Insulin Effector in Adipocytes. *J. Clin. Invest.* **2016**, *126*, 335–348, doi:10.1172/JCI81480.
320. Ziegler, G.C.; Almos, P.; McNeill, R.V.; Jansch, C.; Lesch, K.-P. Cellular Effects and Clinical Implications of SLC2A3 Copy Number Variation. *Journal of Cellular Physiology* **2020**, *235*, 9021–9036, doi:10.1002/jcp.29753.
321. Du, L.; Heaney, A.P. Regulation of Adipose Differentiation by Fructose and GluT5. *Mol Endocrinol* **2012**, *26*, 1773–1782, doi:10.1210/me.2012-1122.
322. Hernández-Díazcouder, A.; Romero-Nava, R.; Carbó, R.; Sánchez-Lozada, L.G.; Sánchez-Muñoz, F. High Fructose Intake and Adipogenesis. *International Journal of Molecular Sciences* **2019**, *20*, 2787, doi:10.3390/ijms20112787.
323. Gu, W.; Li, X.; Liu, C.; Yang, J.; Ye, L.; Tang, J.; Gu, Y.; Yang, Y.; Hong, J.; Zhang, Y.; et al. Globular Adiponectin Augments Insulin Secretion from Pancreatic Islet β Cells at High Glucose Concentrations. *Endocr* **2006**, *30*, 217–221, doi:10.1385/ENDO:30:2:217.
324. Dunmore, S.J.; Brown, J.E.P. The Role of Adipokines in β -Cell Failure of Type 2 Diabetes. *J Endocrinol* **2013**, *216*, T37-45, doi:10.1530/JOE-12-0278.
325. Revollo, J.R.; Körner, A.; Mills, K.F.; Satoh, A.; Wang, T.; Garten, A.; Dasgupta, B.; Sasaki, Y.; Wolberger, C.; Townsend, R.R.; et al. Nampt/PBEF/Visfatin Regulates Insulin Secretion in Beta Cells as a Systemic NAD Biosynthetic Enzyme. *Cell Metab* **2007**, *6*, 363–375, doi:10.1016/j.cmet.2007.09.003.
326. Brown, J.E.P.; Onyango, D.J.; Ramanjaneya, M.; Conner, A.C.; Patel, S.T.; Dunmore, S.J.; Randeve, H.S. Visfatin Regulates Insulin Secretion, Insulin Receptor Signalling and MRNA Expression of Diabetes-Related Genes in Mouse Pancreatic Beta-Cells. *J Mol Endocrinol* **2010**, *44*, 171–178, doi:10.1677/JME-09-0071.
327. Pukel, C.; Baquerizo, H.; Rabinovitch, A. Destruction of Rat Islet Cell Monolayers by Cytokines. Synergistic Interactions of Interferon-Gamma, Tumor Necrosis Factor, Lymphotoxin, and Interleukin 1. *Diabetes* **1988**, *37*, 133–136, doi:10.2337/diab.37.1.133.
328. Norreen-Thorsen, M.; Struck, E.C.; Öling, S.; Zwahlen, M.; Feilitzen, K.V.; Odeberg, J.; Lindskog, C.; Pontén, F.; Uhlén, M.; Dusart, P.J.; et al. A Human Adipose Tissue Cell-Type Transcriptome Atlas. *Cell Reports* **2022**, *40*, doi:10.1016/j.celrep.2022.111046.
329. Kahoul, Y.; Yao, X.; Oger, F.; Moreno, M.; Amanzougarene, S.; Derhourhi, M.; Durand, E.; Boutry, R.; Bonnefond, A.; Froguel, P.; et al. Knocking Down CDKN2A in 3D HiPSC-Derived Brown Adipose Progenitors Potentiates Differentiation, Oxidative Metabolism and Browning Process. *Cells* **2023**, *12*, 870, doi:10.3390/cells12060870.
330. Portales, A.E.; Miguel, I.; Rodriguez, M.J.; Novaro, V.; Gambaro, S.E.; Giovambattista, A. CDK4/6 Are Necessary for UCP1-Mediated Thermogenesis of White Adipose Tissue. *Life Sci* **2023**, 121652, doi:10.1016/j.lfs.2023.121652.
331. Bordicchia, M.; Liu, D.; Amri, E.-Z.; Ailhaud, G.; Dessi-Fulgheri, P.; Zhang, C.; Takahashi, N.; Sarzani, R.; Collins, S. Cardiac Natriuretic Peptides Act via P38 MAPK to Induce the Brown Fat Thermogenic Program in Mouse and Human Adipocytes. *J. Clin. Invest.* **2012**, *122*, 1022–1036,

doi:10.1172/JCI59701.

332. Berry, D.C.; Jiang, Y.; Graff, J.M. Emerging Roles of Adipose Progenitor Cells in Tissue Development, Homeostasis, Expansion and Thermogenesis. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **2016**, *27*, 574–585, doi:10.1016/j.tem.2016.05.001.
333. Drareni, K.; Ballaire, R.; Barilla, S.; Mathew, M.J.; Toubal, A.; Fan, R.; Liang, N.; Chollet, C.; Huang, Z.; Kondili, M.; et al. GPS2 Deficiency Triggers Maladaptive White Adipose Tissue Expansion in Obesity via HIF1A Activation. *Cell Rep* **2018**, *24*, 2957–2971.e6, doi:10.1016/j.celrep.2018.08.032.
334. Chusyd, D.E.; Wang, D.; Huffman, D.M.; Nagy, T.R. Relationships between Rodent White Adipose Fat Pads and Human White Adipose Fat Depots. *Front Nutr* **2016**, *3*, 10, doi:10.3389/fnut.2016.00010.
335. Bjørndal, B.; Burri, L.; Staalesen, V.; Skorve, J.; Berge, R.K. Different Adipose Depots: Their Role in the Development of Metabolic Syndrome and Mitochondrial Response to Hypolipidemic Agents. *Journal of Obesity* **2011**, *2011*, e490650, doi:10.1155/2011/490650.
336. Maniyadath, B.; Zhang, Q.; Gupta, R.K.; Mandrup, S. Adipose Tissue at Single-Cell Resolution. *Cell Metab* **2023**, *35*, 386–413, doi:10.1016/j.cmet.2023.02.002.
337. Paschos, G.K.; Tang, S.Y.; Theken, K.N.; Li, X.; Verginadis, I.; Lekkas, D.; Herman, L.; Yan, W.; Lawson, J.; FitzGerald, G.A. Cold-Induced Browning of Inguinal White Adipose Tissue Is Independent of Adipose Tissue Cyclooxygenase-2. *Cell Rep* **2018**, *24*, 809–814, doi:10.1016/j.celrep.2018.06.082.
338. Kirschner, K.M.; Foryst-Ludwig, A.; Gohlke, S.; Li, C.; Flores, R.E.; Kintscher, U.; Schupp, M.; Schulz, T.J.; Scholz, H. Wt1 Haploinsufficiency Induces Browning of Epididymal Fat and Alleviates Metabolic Dysfunction in Mice on High-Fat Diet. *Diabetologia* **2022**, *65*, 528–540, doi:10.1007/s00125-021-05621-1.
339. Sudeep, H.V.; Ramanaiah, I.; Amritha, R.; Naveen, P.; Gouthamchandra, K.; Shyamprasad, K. A Standardized Aframomum Melegueta Seed Extract Regulates Browning of White Adipose Tissue in High-Fat Diet Model Mice. *Natural Product Communications* **2021**, *16*, 1934578X211033744, doi:10.1177/1934578X211033744.
340. Shimizu, I.; Yoshida, Y.; Katsuno, T.; Tateno, K.; Okada, S.; Moriya, J.; Yokoyama, M.; Nojima, A.; Ito, T.; Zechner, R.; et al. P53-Induced Adipose Tissue Inflammation Is Critically Involved in the Development of Insulin Resistance in Heart Failure. *Cell Metab.* **2012**, *15*, 51–64, doi:10.1016/j.cmet.2011.12.006.
341. Cudejko, C.; Wouters, K.; Fuentes, L.; Hannou, S.A.; Paquet, C.; Bantubungi, K.; Bouchaert, E.; Vanhoutte, J.; Fleury, S.; Remy, P.; et al. P16INK4a Deficiency Promotes IL-4-Induced Polarization and Inhibits Proinflammatory Signaling in Macrophages. *Blood* **2011**, *118*, 2556–2566, doi:10.1182/blood-2010-10-313106.
342. Li, L.; Ng, D.S.W.; Mah, W.-C.; Almeida, F.F.; Rahmat, S.A.; Rao, V.K.; Leow, S.C.; Laudisi, F.; Peh, M.T.; Goh, A.M.; et al. A Unique Role for P53 in the Regulation of M2 Macrophage Polarization. *Cell Death Differ.* **2015**, *22*, 1081–1093, doi:10.1038/cdd.2014.212.
343. Ruffolo, S.C.; Forsell, P.K.A.; Yuan, X.; Desmarais, S.; Himms-Hagen, J.; Cromlish, W.; Wong, K.K.; Kennedy, B.P. Basal Activation of P70S6K Results in Adipose-Specific Insulin Resistance in Protein-Tyrosine Phosphatase 1B $-/-$ Mice. *J Biol Chem* **2007**, *282*, 30423–30433, doi:10.1074/jbc.M700697200.
344. Tavares, M.R.; Pavan, I.C.B.; Amaral, C.L.; Meneguello, L.; Luchessi, A.D.; Simabuco, F.M. The S6K Protein Family in Health and Disease. *Life Sci* **2015**, *131*, 1–10, doi:10.1016/j.lfs.2015.03.001.
345. Mukaida, S.; Evans, B.A.; Bengtsson, T.; Hutchinson, D.S.; Sato, M. Adrenoceptors Promote Glucose Uptake into Adipocytes and Muscle by an Insulin-Independent Signaling Pathway Involving Mechanistic Target of Rapamycin Complex 2. *Pharmacological Research* **2017**, *116*, 87–92, doi:10.1016/j.phrs.2016.12.022.
346. Cooney, G.J.; Caterson, I.D.; Newsholme, E.A. The Effect of Insulin and Noradrenaline on the Uptake of 2-[1-14C]Deoxyglucose in Vivo by Brown Adipose Tissue and Other Glucose-Utilising

- Tissues of the Mouse. *FEBS Lett* **1985**, *188*, 257–261, doi:10.1016/0014-5793(85)80383-5.
347. Valentine, J.M.; Ahmadian, M.; Keinan, O.; Abu-Odeh, M.; Zhao, P.; Zhou, X.; Keller, M.P.; Gao, H.; Yu, R.T.; Liddle, C.; et al. B3-Adrenergic Receptor Downregulation Leads to Adipocyte Catecholamine Resistance in Obesity. *J Clin Invest* **132**, e153357, doi:10.1172/JCI153357.
348. Park, H.S.; Kim, J.H.; Sun, B.K.; Song, S.U.; Suh, W.; Sung, J.-H. Hypoxia Induces Glucose Uptake and Metabolism of Adipose-derived Stem Cells. *Molecular Medicine Reports* **2016**, *14*, 4706–4714, doi:10.3892/mmr.2016.5796.
349. Dai, W.; Xu, Y.; Mo, S.; Li, Q.; Yu, J.; Wang, R.; Ma, Y.; Ni, Y.; Xiang, W.; Han, L.; et al. GLUT3 Induced by AMPK/CREB1 Axis Is Key for Withstanding Energy Stress and Augments the Efficacy of Current Colorectal Cancer Therapies. *Signal Transduct Target Ther* **2020**, *5*, 177, doi:10.1038/s41392-020-00220-9.
350. Tang, Q.-Q.; Otto, T.C.; Lane, M.D. Mitotic Clonal Expansion: A Synchronous Process Required for Adipogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**, *100*, 44–49, doi:10.1073/pnas.0137044100.
351. Lee, Y.K.; Chung, Y.S.; Lee, J.H.; Chun, J.M.; Park, J.H. The Intricate Role of P53 in Adipocyte Differentiation and Function. *Cells* **2020**, *9*, 2621, doi:10.3390/cells9122621.
352. R, W.; J, P.; Y, Q.; Z, S.; R, H.; Y, Y.; S, X.; Z, W.; G, Y.; Sg, O.; et al. Genetically Prolonged Beige Fat in Male Mice Confers Long-Lasting Metabolic Health. *Nature communications* **2023**, *14*, doi:10.1038/s41467-023-38471-z.
353. Chen, H.; Pei, Q.; Tao, L.; Xia, J.; Lu, G.; Zong, Y.; Xie, W.; Li, W.; Huang, C.; Zeng, T.; et al. ASC Regulates Subcutaneous Adipose Tissue Lipogenesis and Lipolysis via P53/AMPK α Axis. *Int J Mol Sci* **2022**, *23*, 10042, doi:10.3390/ijms231710042.
354. Aguilar, M.; Bhuket, T.; Torres, S.; Liu, B.; Wong, R.J. Prevalence of the Metabolic Syndrome in the United States, 2003-2012. *JAMA* **2015**, *313*, 1973–1974, doi:10.1001/jama.2015.4260.
355. Berry, R.; Rodeheffer, M.S. Characterization of the Adipocyte Cellular Lineage in Vivo. *Nat Cell Biol* **2013**, *15*, 302–308, doi:10.1038/ncb2696.
356. Baker, D.J.; Childs, B.G.; Durik, M.; Wijers, M.E.; Sieben, C.J.; Zhong, J.; A. Saltness, R.; Jeganathan, K.B.; Verzosa, G.C.; Pezeshki, A.; et al. Naturally Occurring P16Ink4a-Positive Cells Shorten Healthy Lifespan. *Nature* **2016**, *530*, 184–189, doi:10.1038/nature16932.
357. Berberich, S.J.; Litteral, V.; Mayo, L.D.; Tabesh, D.; Morris, D. Mdm-2 Gene Amplification in 3T3-L1 Preadipocytes. *Differentiation* **1999**, *64*, 205–212, doi:10.1046/j.1432-0436.1999.6440205.x.

Revue : Rôles émergents pour le locus *INK4a/ARF (CDKN2A)* dans le tissu adipeux : implications pour l'obésité et le diabète de type 2

(Emerging Roles for the *INK4a/ARF (CDKN2A)* Locus in Adipose Tissue: Implications for Obesity and Type 2 Diabetes)

Yasmina Kahoul, Frédérik Oger, Jessica Montaigne, Philippe Froguel, Christophe Breton, Jean-Sébastien Annicotte

Biomolécules, 22 Septembre 2020

DOI: <https://doi.org/10.3390/biom10091350>



Review

Emerging Roles for the *INK4a/ARF* (*CDKN2A*) Locus in Adipose Tissue: Implications for Obesity and Type 2 Diabetes

Yasmina Kahoul , Frédéric Oger, Jessica Montaigne, Philippe Froguel, Christophe Breton ^{*,†} and Jean-Sébastien Annicotte ^{*,†}

U1283-UMR8199-EGID, Univ. Lille, INSERM, CNRS, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, F-59000 Lille, France; yasmina.kahoul.etu@univ-lille.fr (Y.K.); frederik.oger2@univ-lille.fr (F.O.); jessica.montaigne@univ-lille.fr (J.M.); p.froguel@imperial.ac.uk (P.F.)

* Correspondence: christophe.breton@univ-lille.fr (C.B.); jean-sebastien.annicotte@inserm.fr (J.-S.A.)

† C.B. and J.-S.A. contributed equally to this paper.

Received: 10 July 2020; Accepted: 16 September 2020; Published: 22 September 2020



Abstract: Besides its role as a cell cycle and proliferation regulator, the *INK4a/ARF* (*CDKN2A*) locus and its associated pathways are thought to play additional functions in the control of energy homeostasis. Genome-wide association studies in humans and rodents have revealed that single nucleotide polymorphisms in this locus are risk factors for obesity and related metabolic diseases including cardiovascular complications and type-2 diabetes (T2D). Recent studies showed that both p16^{INK4a}-CDK4-E2F1/pRB and p19^{ARF}-P53 (p14^{ARF} in humans) related pathways regulate adipose tissue (AT) physiology and adipocyte functions such as lipid storage, inflammation, oxidative activity, and cellular plasticity (browning). Targeting these metabolic pathways in AT emerged as a new putative therapy to alleviate the effects of obesity and prevent T2D. This review aims to provide an overview of the literature linking the *INK4a/ARF* locus with AT functions, focusing on its mechanisms of action in the regulation of energy homeostasis.

Keywords: adipogenesis; insulin sensitivity; inflammation; obesity; oxidative activity; senescence; type 2 diabetes

1. Introduction

The global epidemic of obesity and associated metabolic diseases have increased substantially over the past decades. Obesity is defined as an increased body weight characterized by an excessive accumulation of fat in adipose tissue (AT) mainly because of an imbalance between energy intake and energy expenditure [1]. Indeed, although genetics may explain parts of the variation in body mass, environmental factors such as overnutrition and ultra-processed foods, sedentary lifestyle, xenobiotics, as well as chemical exposure are the major contributors to the rapidly increasing prevalence [2]. Energy balance regulation depends on extremely complex processes that integrate multiple interacting hypothalamic neural pathways and metabolic signaling mechanisms (i.e., hormones, nutrients, sensory, and nerve inputs) typically referred to as the homeostatic regulation but also engage most other parts of the brain referred to as non-homeostatic regulation. It also depends on key cellular energy sensors (such as AMP kinase) which act as an integrator of regulatory signals monitoring systemic and cellular energy balance [3]. The long-term excessive AT mass, progressively leads to the appearance of a marked inflammatory profile and to its secondary dysfunction (i.e., impaired expandability and plasticity) [4]. The inability of further AT expansion accelerates fat spillover from AT to skeletal muscle and liver, resulting in ectopic fat deposition and insulin resistance in these tissues, which play vital

roles in systemic insulin resistance and T2D [5,6]. These modifications that strongly contribute to T2D and obesity comorbidity development [7,8], makes AT a putative new therapeutic target.

Two anatomically and functionally distinct types of AT exist in mammals: the white (WAT) and brown (BAT) AT. The AT cellular content is heterogeneous and includes adipocytes, preadipocytes, fibroblasts, immune cells, and endothelial cells [9]. White adipocytes are characterized by the presence of a wide single (unilocular) lipid droplet. They store energy excess as triglycerides (TG) and release free fatty acids as energy substrate during period of negative energy balance. WAT exists in multiple locations in the body with two major subtypes: visceral and subcutaneous [10]. Adipose depots are composed of adipocytes that derive from distinct precursor populations and contain progenitors through distinct lineages [11]. In normal growth throughout life and during obesity, the renewal/expansion of AT relies on both hyperplasia (increase in number via adipogenesis) and hypertrophy (increase in size via TG storage) which contribute to maintaining AT in a healthy state [10]. Unlike visceral WAT (vWAT), the metabolic adaptability of subcutaneous WAT (sWAT) to changes in its environment, a process called plasticity, has been associated with increased insulin sensitivity and decreased rates of T2D [12].

BAT specializes in energy expenditure and production of heat, mainly via active fat oxidation. In contrast to white adipocytes, brown adipocytes contain numerous (multilocular) smaller lipid droplets and a much higher number of mitochondria. Brown adipocytes are characterized by a high expression of the thermogenic uncoupling protein 1 (UCP1), a BAT-specific marker. BAT differs from WAT by its cellular origin, sharing a common progenitor with skeletal muscles, both expressing the myogenic regulatory factor Myf5 [13]. Recent studies have revealed a new distinct type of thermogenic adipocyte—named beige cells (also known as brite cells for brown in white)—intermingled within WAT [14–16]. Beige adipocytes might arise via de novo differentiation from undifferentiated adipocyte-derived stem cells or via a transdifferentiation of existing mature white adipocytes. Beige adipocytes also express UCP1 and mainly develop under cold exposure or in response to noradrenergic stimulation through the β 3 adrenergic stimulation. This adaptive AT plasticity is called WAT beiging or browning [17]. In adult humans, the abundance of brown/beige fat is reduced with obesity and the challenge is to prevent its loss with aging or to reactivate existing depots or both. Beige fat has the largest potential as a therapeutic target in the prevention of obesity and T2D because it can be present in many white depots as clusters of pre-adipocytes that then can be recruited [11,12].

Genome-wide association studies (GWAS) have established the cyclin-dependent kinase inhibitor (*CDKN*)2*a* locus, also called *INK4a/ARF*, as a hotspot influencing genetic risk for cardiovascular and metabolic diseases including T2D. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) and loss-of-function mutations in *CDKN2A* locus affect glucose values, insulin sensitivity, and T2D risk [18–21]. Epigenetic modifications are also likely to play an important role in regulating this locus. Epigenetics is defined as heritable changes in gene expression that do not involve changes to the underlying DNA sequence. Epigenetics relate to chromatin modifications, including DNA methylation and histone modification [22]. In particular, decreased DNA methylation within the promoter of ANRIL (Antisens Noncoding RNA in the INK4 Locus), a 3.8 kb non-coding RNA transcribed from the genomic *INK4b-ARF-INK4a* locus, is associated with a higher risk for a child to develop obesity during adulthood [23]. Consistently, deletion of a region of mouse chromosome 4, orthologous to the human 9p21 metabolic disease risk interval, results in increased body weight, linking the region with obesity and metabolic syndrome [24].

The human *CDKN2A* locus spans around 35 kilobases on chromosome 9p21 (Figure 1). It encodes for two proteins, p16INK4a, the principal member of the INK4 family of cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKI) and the p53 regulatory protein p14ARF. While p14ARF is transcribed from exon 1b and exon 2, p16INK4a is transcribed from exon 1a localized 20 kb downstream of 1b and exons 2 and 3. p16INK4a binds to CDK4/6, inhibiting cyclin D-CDK4/6 complex formation and CDK4/6-mediated phosphorylation of Rb family members (pRB). Expression of p16INK4a maintains pRB in a hypophosphorylated state, which promotes binding to the transcription factor E2F1 and blocks the progression of the cell-division cycle. p14ARF (p19ARF in mice), which is an alternate

reading frame protein product of the *CDKN2A* locus, mainly exerts its anti-proliferative activity via the inhibition of the mouse double minute 2 homolog (MDM2), an ubiquitin-ligase that hampers the activity of the transcription factor p53, acting as a tumor suppressor [18,19] (Figure 1).

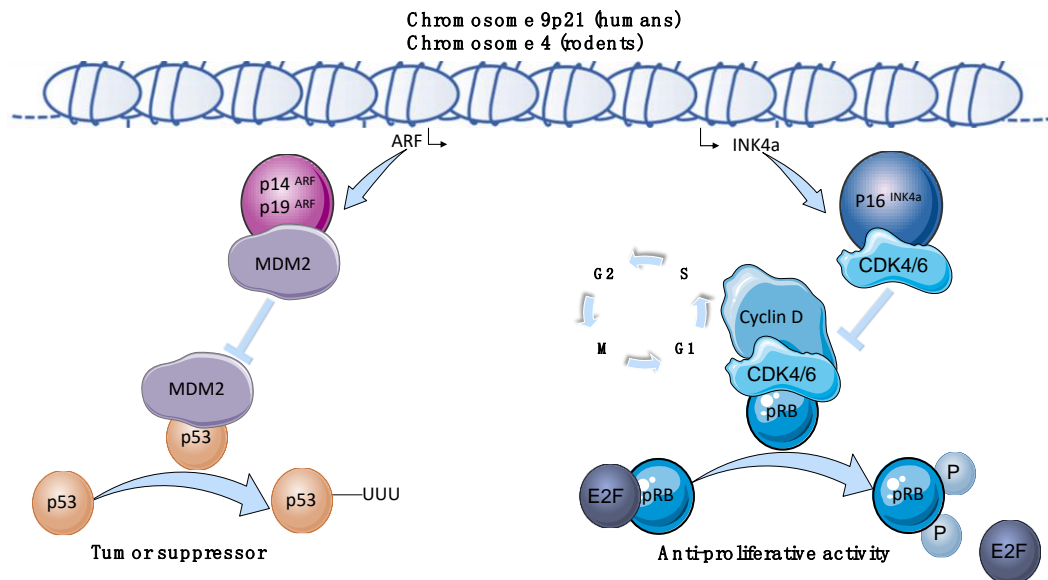


Figure 1. The *INK4a/ARF* locus. The *INK4a/ARF* locus is located on chromosome 9p21 in humans and chromosome 4 in rodents. It encodes for two proteins, p16INK4a the principal member of the INK4 family of cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKI) and the p53 regulatory protein p14ARF (p19ARF in mice). Both are key regulators of the cell cycle machinery with an anti-proliferative and tumor suppressor role. p16INK4a binds to CDK4/6, inhibiting cyclin D-CDK4/6 complex formation and CDK4/6-mediated phosphorylation of Rb family members (pRB). Expression of p16INK4a maintains pRB in a hypophosphorylated state, which promotes binding to the transcription factors E2F and blocks the passage of the G1 to S phase. p14ARF (p19ARF in mice) mainly exerts its anti-proliferative activity via the inhibition of the mouse double minute 2 homolog (MDM2), an ubiquitin-ligase that hampers the activity of the transcription factor p53, acting as a tumor suppressor, blocking cells in G1 and G2 phase.

In line with its canonical role in cell-cycle progression and differentiation, several studies showed that the *INK4a/ARF* locus promotes AT development [25–28]. Two main adipogenesis phases are described: the first phase, called commitment, results in the conversion of the progenitor proliferating cells into preadipocytes [29]. This phase is then followed by terminal differentiation, during which specified preadipocytes take on the characteristics of the mature adipocyte [30]. Adipogenesis involves a complex orchestrated gene expression program under the control of the transcription factors CCAAT-enhancer-binding proteins (CEBPs) and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ that induces mature adipocyte formation [31–33].

First, p16INK4a knock-down in 3T3-L1 increases adipogenesis [34]. p16INK4a-deficient mouse developed more epicardial AT in response to the adipogenic PPAR γ agonist rosiglitazone, providing a potential mechanistic link between the genetic association of the *INK4a/ARF* locus and cardiovascular disease risk [34,35]. CDK4 also directly phosphorylates PPAR γ , thus promoting terminal differentiation [36]. Second, E2F1 promotes preadipocyte differentiation by activating inhibitor of β -catenin and TCF4 (ICAT), therefore repressing Wnt/ β -catenin activity in 3T3-L1 cells [37]. E2F1 complex-dependent transcription repression by physical association of C/EBP α inhibits the proliferation of progenitors and induce adipocyte terminal differentiation [38,39]. It activates the PPAR γ promoter triggering PPAR γ expression during adipogenesis [38]. Accordingly, E2F1-deficient primary embryonic fibroblasts (MEF) have a reduced capacity to differentiate into adipocytes and E2F1-deficient mice are resistant to diet-induced obesity (DIO) [38]. Third, pRB deletion in MEFs results

in enhanced number of committed preadipocytes. During the early stages of adipogenesis, pRB interacts with PPAR γ to inhibit adipocyte differentiation [40]. Thereafter, pRB activates adipogenesis for terminal differentiation through association with C/EBP α [41,42]. pRB deletion in 3T3-L1 cells fails to undergo terminal differentiation [42] whereas overexpression of pRB promotes terminal adipocyte differentiation [43]. Four, p53 inhibits adipogenic differentiation [44]. p53-deficient MEFs undergo spontaneous commitment to the adipogenic program and ectopic re-expression of p53 inhibits their spontaneous differentiation [45,46]. Nutlin-3a-mediated p53 accumulation (by destabilization of the p53/MDM2 complex) in MEFs leads to decreased PPAR γ [47] whereas the knockdown of p53 in 3T3-L1 results in enhanced PPAR γ and differentiation [46–48]. The p53-deficient mice high sensibility to DIO may rely on the regulatory role of p53 as an inhibitor in the process of white versus brown fat accumulation [46].

Alternatively, *INK4a/ARF* locus is thought to regulate additional functions in adipocyte. In this review, we will present data supporting the role of the *INK4a/ARF* locus as a key regulatory hub to maintain AT in a healthy state. As indicated in Figure 2, this locus regulates the balance between adipogenesis and senescence [49–53] and plays a role in adipocyte insulin sensitivity and lipid storage [34,36,54,55], inflammation [56–58] as well as oxidative activity and browning [59–61]. Targeting these metabolic pathways have recently emerged as a new putative therapy to alleviate the effects of obesity and prevent insulin resistance and T2D [62].

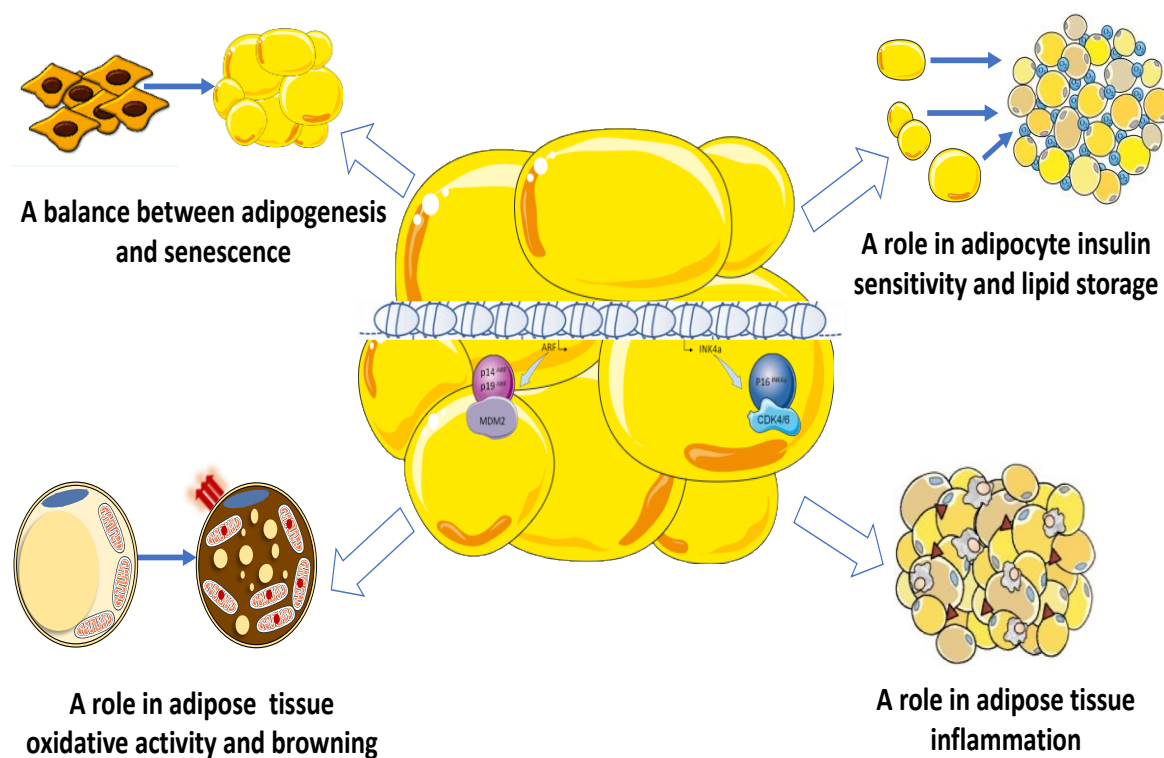


Figure 2. The *INK4a/ARF* locus as a key regulatory hub to maintain adipose tissue in a healthy state. The *INK4A/ARF* locus regulates the balance between adipogenesis and senescence and promotes lipid storage as triglycerides and adipocyte hypertrophy via the insulin-signaling pathway. It has been described as a molecular switch of white-to-beige adipocyte conversion and as a key determinant of brown adipocyte fate, being an alternative way to increase energy expenditure. It is also involved in the switch between macrophage phenotype and thus obesity-related inflammation.

2. The *INK4a/ARF* Locus: A Balance between Adipogenesis and Senescence

Emerging evidence from human and animal studies suggests that the *INK4a/ARF* locus controls the balance between adipocyte differentiation and senescence [49–53] (Figure 2). Like aging, obesity

can be seen as an accelerated form of AT senescence [63]. In both cases, cell senescence characterized by elevated p16INK4a/p53 expression appears to be a key mechanism for reduced regenerative potential of adipose progenitor cells and impaired adipocyte replacement. However, unlike aging, MDM2 expression is paradoxically increased in obese AT, indicating that the pathways leading to p53 activation in aged and obese AT may be distinct [63]. In addition to defective adipogenesis, in both obesity and aging, the immune profile dramatically alters to inflammatory status and associates with number of senescent cells, aberrant adipocytokines production, leading to local (AT) and systemic insulin resistance and T2D [49–53,64].

Indeed, the differentiation of new adipocytes is associated with marked improvement of insulin sensitivity, mostly through increased fatty acid buffering capacity, modification of adipokine repertoire, and possibly through increases in the amount of cellular membranes that act as a buffering system for cholesterol esters and other lipid signaling molecules [65]. Although metabolic insults (such as high glucose and saturated fatty acid) directly up-regulate p16INK4a/p53 expression, yet the underlying mechanisms are still unclear. In addition, it remains elusive whether the cell cycle changes are causative or resultant of AT dysfunction [63]. In short, the defective adipogenesis is mainly due to poor-differentiating ability of senescent progenitor cells and senescent microenvironment within AT in obesity and aging. The mechanistic basis for aging or obesity-associated adipose stem cell decline linked to elevated p16INK4a/p53 expression is not completely understood. However, increasing evidence suggests that epigenetic dysregulation is an important mechanistic driver of stem cell fate during these processes [66]. Thus, it is tempting to speculate that epigenetic mechanisms regulating differentiation transcriptional program may account for the adipose stem cell fate decision between senescence and differentiation in obese individuals. These findings are in line with the AT expandability theory which proposes that the inability of further AT expansion in obese individuals is a key determinant of dysfunctional AT, inflammation, and insulin resistance [65]. During obesity, the enlargement of the vascular network is not sufficient to supply enough oxygen to hypertrophic adipocytes in obese individuals resulting in local hypoxia. This hypoxia could be a key trigger of AT dysfunction (i.e., fibrosis) and inflammation by induction of gene expression in adipocytes and macrophages [67].

A recent study by Gustafson et al. shed light on the involvement of this locus in reduced adipogenesis in AT of obese patients [49]. They reported that individuals with hypertrophic obesity and insulin resistance displayed a dysfunctional AT with inappropriate expansion of the adipose cells in sWAT. Interestingly, progenitors undergoing poor differentiation have elevated p16INK4a/p53 expression which is a characteristic of senescent cells. Diminishing senescence and P53 activity in dysfunctional AT may constitute an alternative method to prevent insulin resistance and T2D. Indeed, reducing senescence either genetically or with senolytic agents in obese mouse models with T2D restores adipogenesis in sWAT and alleviates metabolic and AT dysfunction (i.e. reduction of inflammation and enhanced insulin sensitivity) [50,51]. Increased p53 has also been reported in AT from individuals with T2D and overexpression of p53 in AT in rodent models triggers insulin resistance and inflammation [52,53,64]. Like senescence, inhibition of p53 activity in AT protects obese mice from insulin resistance and reduce AT inflammation [53].

3. The *INK4a/ARF* Locus: A Role in Adipocyte Insulin Sensitivity and Lipid Storage

Several studies showed that the *INK4a/ARF* promotes TG accumulation and adipocyte hypertrophy via the insulin-signaling pathway (Figure 2). In particular, the cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) which mediates the phosphorylation of pRB resulting in the dissociation of E2F1 and activation of the cell-cycle progression from G1 to S phase (Figure 1) is a key molecule involved in adipocyte insulin sensitivity. CDK4 acts independently of E2F1 in a cell-cycle-independent manner to regulate lipid storage in mature adipocyte [34,36,54,55].

CDK4 is expressed in fully differentiated adipocytes in both human and mouse AT under physiological conditions [36]. CDK4 activity in AT is positively correlated with fat mass, lipogenesis, and insulin sensitivity. Pharmacological inhibition of CDK4 in fully differentiated 3T3-L1 adipocytes

decreased insulin sensitivity, reduced glucose transport and lipogenesis resulting in smaller lipid droplets [34,36,54,55]. In line with these observations, CDK4-deficient mice have less fat mass and smaller adipocytes [68]. They also exhibit impaired insulin signaling and lipogenesis in addition to insulin deficiency, the latter being due to reduction of the pancreatic β -cell number [69]. CDK4 re-expression in β -cells does not rescue body weight reduction and still displays hypotrophic adipocyte suggesting cell-autonomous contribution for CDK4 in AT [70]. Consistently, mice expressing a hyperactive CDK4 mutant have increased body weight, fat mass, and larger adipocytes [68]. As strong evidence of its cell-autonomous action, CDK4 was shown to activate the insulin-signaling pathway through phosphorylation of insulin receptor substrate 2 (IRS2) at Ser388 upon insulin stimulation, thus maintaining insulin action in adipocytes ([55], Figure 3). Interestingly, IRS2-Ser388 phosphorylation in human vWAT is positively correlated with BMI and negatively correlates with blood glucose levels in patients [55].

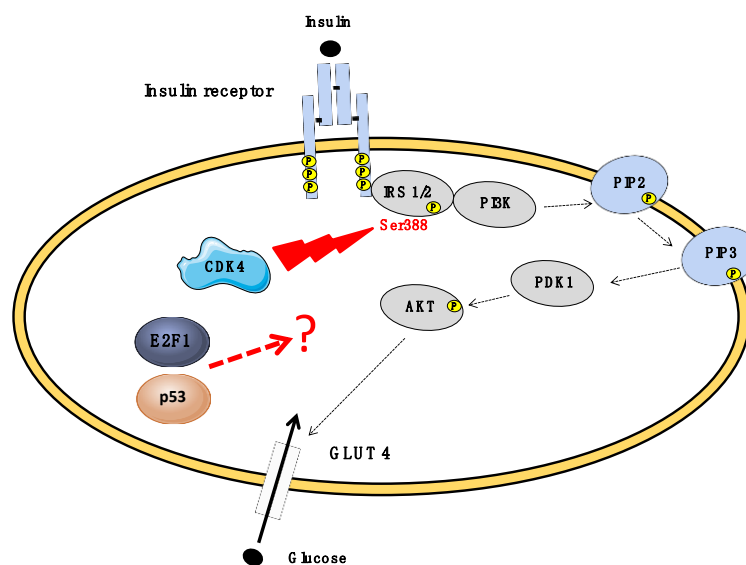


Figure 3. The *INK4a/ARF* locus modulates the insulin-signaling pathway in adipocyte. Insulin attaches to insulin receptor triggering intracellular autophosphorylation of their tyrosine residues, which constitutes an attachment for insulin receptor substrate (IRS) proteins. These molecules undergo phosphorylation and form a complex with PI3K. PI3K phosphorylates PIP2, which results in PIP3 formation and activation of PDK1. AKT gets phosphorylated and activated by PDK1. The latter is responsible for GLUT4 translocation to cellular membrane and glucose inflow. CDK4 was shown to activate the insulin-signaling pathway through phosphorylation of IRS2 at Ser388 upon insulin stimulation, thus maintaining insulin action in adipocytes. Although E2F1 and p53 are thought to interact with the insulin-signaling pathway to modulate AT insulin sensitivity, yet the underlying mechanisms are still unclear.

In addition, elevated E2F1 contents in adipocytes of vWAT from obese patients are positively correlated with insulin resistance. Besides its role in cell-cycle progression, E2F1 also activates promoter activity of several autophagy genes [71,72]. Thus, E2F1 adipocyte levels might play a role in linking obesity with AT insulin sensitivity by upregulating autophagy gene expression and by sensitizing cells to inflammation [71,72]. In agreement with this notion, MEFs-derived adipocytes from E2F1-deficient mice exhibited increased insulin sensitivity with lower inflammation and autophagy [72]. Finally, treatment of 3T3-L1 and human adipocytes with p53-inducers doxorubicin (a DNA damage-inducing drug) and nutlin-3a reduces insulin-stimulated glucose uptake by lowering GLUT4 glucose transporter translocation. This adipocyte cell-autonomous effect occurs independently of inflammation [64]. Although E2F1 and p53 are thought to interact with the insulin-signaling pathway to modulate AT insulin sensitivity, yet the underlying mechanisms are still unclear.

4. The *INK4a/ARF* Locus: A Role in Adipose Tissue Inflammation

Obesity provides a plethora of intrinsic and extrinsic signals capable of triggering an inflammatory response in AT resulting in low-grade chronic AT inflammation. These mechanisms are commonly considered the link between chronic caloric excess and AT meta-inflammation. Some of these mechanisms include dysregulation of fatty acid homeostasis, increased adipocyte size and death, local hypoxia, mitochondrial dysfunction, increased reactive oxygen species production, endoplasmic reticulum, and mechanical stress leading to extracellular matrix remodeling and fibrosis [5,6]. These triggers converge on the activation of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) and nuclear factor-kappa B (NF- κ B) pathways, commonly considered signaling hubs. The activation of these pathways increases the production of pro-inflammatory cytokines and promotes the recruitment of a variety of immune cells, including macrophages, T cells, B cells, neutrophils, and others. These immune cells produce a large number of type 1 inflammatory molecules and also interact directly with each other to induce a type 1 inflammatory environment in AT resulting in local (AT) and systemic insulin resistance and T2D [5,6]. Therefore, inflamed AT is characterized by the combination of an increase in total macrophages and an increased ratio of «classically-activated» proinflammatory M1 phenotype versus «alternatively-activated» anti-inflammatory M2 phenotype macrophages [4,73] that is typical of lean individuals [74]. Emerging evidence suggests that the *INK4a/ARF* locus is involved in macrophage phenotype and thus obesity-related inflammation [57,75] (Figure 2).

Although p16INK4a deficiency does not affect macrophage proliferation or maturation, its anti-inflammatory effects contribute to the polarization of macrophage by inducing a shift of AT-associated M1 macrophages toward the M2 state. Thus, bone-marrow-derived macrophages (BMDMs) isolated from p16INK4a-deficient mice exhibit a phenotype resembling «alternatively-activated» anti-inflammatory M2 with low expression levels and secretion of inflammatory cytokines [56,57]. In line with these observations, AT macrophages from overweight patients express higher levels of p16INK4a. The silencing of p16INK4a in macrophages from these patients mediated by siRNA increases the expression of M2 marker genes to give a phenotype resembling that of macrophages from healthy donors [57].

Several studies have also highlighted a role for p53/MDM2 complex as a physiological “brake” on M2 polarization. By using BMDMs, p53 activity increased when macrophages were polarized to the M2 state facilitating expression of M2 genes. However, forcing further activation of p53 using nutlin-3a downregulated M2 gene expression [58]. In agreement with these findings, M2-polarized macrophages from p53-deficient mice showed increased expression of M2 genes [58]. In addition, p53 induces upregulation of semaphorin, which acts as a chemoattractant for macrophages in vWAT [76]. Although upregulation of both p53 activity and inflammation is commonly observed in WAT of obese rodents and humans, the causal relationship remains unclear [44]. It is tempting to speculate that the age- and obesity-related increase in p16INK4a and P53 levels in AT [49,52,53,64], not only facilitates the recruitment of macrophages in AT, but also hampers macrophage M2 polarization and contributes to T2D risk.

5. The *INK4a/ARF* Locus: A Role in Adipose Tissue Oxidative Activity and Browning

Originally, data highlighted the importance of silencing the *INK4a/ARF* locus to allow for proliferation and reprogramming [77]. This locus is considered as a general suppressor of differentiation in embryonic stem cells and of reprogramming in induced pluripotent stem cells (iPSCs), controlling cell fate determination and plasticity [78].

Recently, the *INK4a/ARF* locus has been suggested to play a major role in the molecular switch of white-to-beige adipocyte conversion and thus is a key determinant of brown adipocyte fate (Figure 2). In support of this notion, we showed that *CDKN2A*-deficient mice were protected against DIO exhibiting sWAT browning and increased thermogenesis and insulin sensitivity [60]. Differentiated SVF cells from sWAT displayed elevated oxidative activity with upregulation of brown fat-specific gene and increase in PKA activity and adrenergic receptor signaling pathways. This suggests a cell-autonomous

requirement of *CDKN2A* to the browning process. Consistent with these findings, silencing *CDKN2A* expression during human iPSCs adipogenic differentiation promotes UCP1 expression and browning markers [60]. We also observed that *CDKN2A* expression was increased in adipocytes from obese patients. Whether p16INK4a and p19ARF pathways modulate AT plasticity through transdifferentiation of fully differentiated adipocytes remains elusive. However, inducible ablation or pharmacological inhibition of p53 in mature adipocytes of mice restore cold-induced beiging and increase energy expenditure and insulin sensitivity [79].

These data raise the hypothesis of potential effects of *CDKN2A* ablation in adipocyte progenitor cells. In line with these findings, blocking these pathways, either genetically (deletion of the *INK4a/ARF* locus) or pharmacologically, in aged mouse or human beige dysfunctional progenitor cells, reverses the senescence-like process and restores their potential to form cold-induced beige adipocytes leading to increased insulin sensitivity [80]. In this respect, *CDKN2A*-deficient mice restricted to adipocyte precursors should assess the contribution of *CDKN2A* in modulating adipose stem cells beiging.

Somatic mutations in *CDKN2A* or dysregulation of its functional activity are frequently detected in various types of human cancer. Studies in rodents and humans reported that cancer-associated cachexia triggers sWAT browning and may contribute to increased oxidative activity, energy expenditure and weight loss [81,82]. Therefore, we cannot rule out the fact that the inactivation of *CDKN2A* in cancer cells may indirectly account for AT browning (at least partly via β 3-adrenergic activation) participating in the development of cachexia.

The E2F1/pRB repressor complex was proposed to act as a molecular switch of cellular utilization from glycolytic to oxidative metabolisms, hence in the adaptation to energy demand. On the one hand, chromatin immunoprecipitation has demonstrated binding of E2F1 and pRB to gene promoters involved in oxidative metabolism. On the other hand, an E2F1 and pRB complex is required for the repression of the transcription of these genes. For instance, pRB was observed to bind the promoter of PGC-1 α , the mitochondrial biogenesis master regulator, to repress transcription [59,83]. As reported for *CDKN2A*-deficient mice [60], E2f1- and adipocyte-specific pRB-deficient animals [59,61] displayed resistance to DIO associated with a marked mitochondrial oxidative activity with enhanced fatty acid oxidation-related genes, thermogenesis and insulin sensitivity. Browning induction of sWAT and elevated energy expenditure may account for the resistance to DIO with improved insulin sensitivity in both *CDKN2A*- and pRB-deficient mice [60,61]. Consistent with these findings, pRB-deficient MEFs exhibited BAT characteristics, with activation of BAT-specific genes and an increase in mitochondria activity [61].

Discordant findings have been reported in the literature regarding the implication of P53 in BAT differentiation and activity [44]. On the one hand, Molchadsky et al. showed that, although p53 suppresses white adipogenic differentiation, it seems to be required for brown adipogenic differentiation. Indeed, BAT from adult obesity-prone p53-deficient mice displayed abnormal morphology and reduction in expression levels of key genes for brown adipocyte function suggesting that p53 might be involved, not only in brown fat differentiation and development, but also in maintaining the full integrity of a brown fat phenotype [46]. On the other hand, p53 has emerged as a negative regulator of brown adipogenic differentiation from progenitor cells. Indeed, Hallenborg et al. reported that brown differentiation efficiency of MEFs and primary adipocytes, both deriving from p53-deficient mice, was enhanced, evidenced by higher expression of UCP1 mRNA levels [45]. p53 impairs oxidative metabolism through inhibition of PGC1 α activity [45,84]. Accordingly, mice bearing a global invalidation or having a reduced activity of p53 were resistant to DIO with browning of sWAT [45] or increased oxidative activity [85], respectively, resulting in increased thermogenesis and insulin sensitivity. However, in these studies, no differences in BAT morphology or activity were observed [45,85]. Overall, although P53 seems to be required in sustaining a proper brown adipocyte phenotype, the difference of p53-deficient mice phenotype regarding DIO sensitivity and BAT phenotype [45,46] may rely on differences in mouse strains and housing temperatures.

6. The *INK4a/ARF* Locus: An Emerging Key Actor in Metabolic Functions

In addition to AT, the *INK4A/ARF* (*CDKN2A*) locus is thought to play a variety of roles in metabolic functions under normal and pathological conditions (Figure 4). Several *CDKN2A* loss- or gain-of-function studies showed that this locus is involved in glucose homeostasis [86,87], β -cell functions (insulin secretion) and mass (proliferation) [88–90], gluconeogenesis [91], atherosclerosis [92–95], and hepatic steatosis [96]. A few studies also linked the *INK4A/ARF* locus to the regulation of the circadian rhythm via the modulation of RAS activity [97], neurogenesis [98], neuronal transdifferentiation [99], and axonal regeneration [100,101]. As reported in AT [60], the PKA activity appears to be a key target of this locus in liver and pancreas. p16INK4a-deficient mice enhanced fasting-induced hepatic glucose production through the activation of PKA-CREB-PGC1 α signaling pathway by the phosphorylation of its regulatory subunits (PKAR2) independent of changes in intracellular cAMP levels [91]. *CDKN2A* knockdown in β -cell line results in an increase in insulin secretion accompanied by elevated PKA activity [87]. Premature atherosclerosis in T2D associates with altered immune cell homeostasis (i.e., T-cell subtype-associated proinflammatory state), diminished p16INK4a and ANRIL expression, and increased CDK4 levels. Treatment with drugs resulting in CDK4 inhibition via p16INK4a mimetic drugs are currently considered to delay atherosclerosis [102,103]. Ogrodnik et al. demonstrated that elimination of hepatic senescent cells via targeting the p16INK4A senescence regulator may be a novel therapeutic strategy to reduce hepatic steatosis [96].

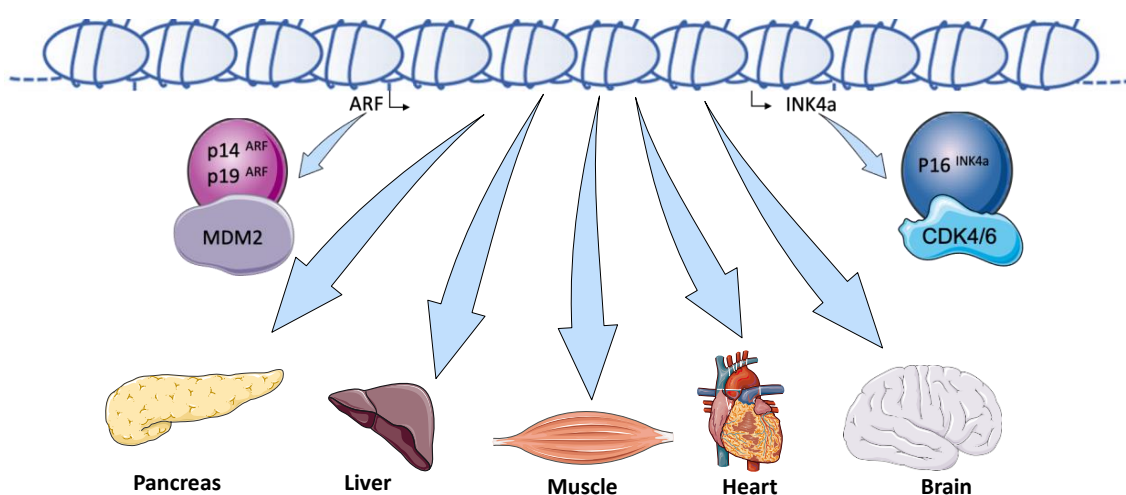


Figure 4. The *INK4a/ARF* locus: an emerging key actor in metabolic functions. In addition to AT, the *INK4A/ARF* (*CDKN2A*) locus is thought to play a variety of role in metabolic functions under normal and physiopathological conditions in other organs (pancreas, liver, muscle, heart, and brain). This locus affects glucose homeostasis, β -cell functions and mass, hepatic gluconeogenesis and lipid storage as well as cardiovascular functions. It also regulates the circadian rhythm, neurogenesis, and axonal regeneration.

ANRIL, also known as cyclin-dependent kinase inhibitor 2b-antisens RNA 1 (*CDKN2b-AS1*), also emerges as an actor in several metabolic diseases. *CDKN2b-AS1* is transcribed under the influence of different transcription factors (e.g., E2F1 [104], SOX2 [105]) depending on the cell type and pathological conditions. SNPs within *CDKN2b-AS1* locus are also associated with risks for several cancers [106]. From a functional point of view, *CDKN2b-AS1* is directly involved in the regulation of gene expression in both cis and trans through its interaction with polycomb repressive complexes 1 and 2 (PRC-1 and PRC-2) [107,108]. *CDKN2b-AS1* also possesses miRNA "sponge" functions [109]. Lillycrop et al. proposed that ER α could directly regulate the expression of *CDKN2b-AS1* [23] suggesting that the well-known effects of ER α on glucose tolerance and insulin sensitivity in AT could be partly modulated by *CDKN2b-AS1*. Furthermore, given the important role of miRNAs in adipocyte

functionality and modulation of their expression under certain pathological conditions [110], the fact that CDKN2b-AS1 plays a role with respect to its miRNA "sponge" function cannot be ruled out.

7. Discussion

The *INK4a/ARF* locus regulates adipocyte and AT functions, positioning this locus as an essential regulatory hub that participates in maintaining AT in a healthy state. As summarized in Figure 2, this locus is involved in the balance between adipogenesis and senescence and plays a role in adipocyte insulin sensitivity and lipid storage, inflammation, as well as oxidative activity and browning. Given that upregulation of the *INK4a/ARF* locus activity is commonly observed in dysregulated WAT of obese rodents and humans, downregulation and/or pharmacological inactivation of its activity may represent an alternative way to restore healthy AT. However, since p16INK4a, p14/p19ARF, and P53 are the anti-tumor pillars of the cell, their inactivation is challenging. On the other hand, the recent observations reporting that the *INK4a/ARF* locus plays a role in WAT browning raise the question of the pathways involved in the regulation of AT plasticity [17]. This alternative role is particularly interesting because increasing energy expenditure by promoting browning of WAT has recently emerged as a new putative therapy to alleviate the effects of obesity and prevent insulin resistance and T2D [11,12,111]. Indeed, the engraftment of BAT and beige/brown adipocytes, isolated from human adipocyte precursors and transplanted into mouse recipients, results in substantial weight loss, improvements in glucose tolerance, and insulin sensitivity, representing a clinically translatable model [112,113]. Therefore, it is challenging to identify the responsible cellular pathways and intermediates involved in browning independent of the cell cycle regulation. It might open up novel therapeutic options to protect against obesity consequences, insulin resistance and T2D. In particular, specific inhibitors, which have no effects on cell cycle progression but retain their ability to induce beiging, could be used to alleviate metabolic syndrome.

Author Contributions: C.B. and J.-S.A. conceptualized and supervised the work. Y.K., F.O. and C.B. wrote the manuscript. Y.K., J.M. and C.B. designed the figures. C.B., J.-S.A. and P.F. revised the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by grants from «European Genomic Institute for Diabetes» (E.G.I.D, ANR-10-LABX-46 to P.F. and J.-S.A.), Agence Nationale pour la Recherche (BETAPLASTICITY, ANR-17-CE14-0034 to P.F. and J.-S.A.; Equipex 2010 ANR-10-EQPX-07-01; 'LIGAN-PM' Genomics platform), European Foundation for the Study of Diabetes (EFSD, to J.-S.A.), INSERM, CNRS, Institut Pasteur de Lille, I-SITE ULNE, Université de Lille (to Y.K., J.M., P.F., C.B. and J.-S.A.) and Société Francophone du Diabète (to J.-S.A.).

Acknowledgments: We thank members of the INSERM U1283/CNRS UMR 8199 for the helpful discussions.

Conflicts of Interest: The authors declare no competing financial interests.

References

1. Lam, Y.Y.; Ravussin, E. Indirect calorimetry: An indispensable tool to understand and predict obesity. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2017**, *71*, 318–322. [[CrossRef](#)]
2. González-Muniesa, P.; Martínez-González, M.A.; Hu, F.B.; Després, J.P.; Matsuzawa, Y.; Loos, R.J.F.; Moreno, L.A.; Bray, G.A.; Martínez, J.A. Obesity. *Nat. Rev. Dis. Primer* **2017**, *3*, 17034. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Waterson, M.J.; Horvath, T.L. Neuronal Regulation of Energy Homeostasis: Beyond the Hypothalamus and Feeding. *Cell Metab.* **2015**, *22*, 962–970. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Reilly, S.M.; Saltiel, A.R. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2017**, *13*, 633–643. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Wu, H.; Ballantyne, C.M. Metabolic Inflammation and Insulin Resistance in Obesity. *Circ. Res.* **2020**, *126*, 1549–1564. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Zatterale, F.; Longo, M.; Naderi, J.; Raciti, G.A.; Desiderio, A.; Miele, C.; Beguinot, F. Chronic Adipose Tissue Inflammation Linking Obesity to Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Front. Physiol.* **2019**, *10*, 1607. [[CrossRef](#)]

7. Qasim, A.; Turcotte, M.; de Souza, R.J.; Samaan, M.C.; Champredon, D.; Dushoff, J.; Speakman, J.R.; Meyre, D. On the origin of obesity: Identifying the biological, environmental and cultural drivers of genetic risk among human populations. *Obes. Rev.* **2018**, *19*, 121–149. [[CrossRef](#)]
8. Longo, M.; Zatterale, F.; Naderi, J.; Parrillo, L.; Formisano, P.; Raciti, G.A.; Beguinot, F.; Miele, C. Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2358. [[CrossRef](#)]
9. Berry, D.C.; Jiang, Y.; Graff, J.M. Emerging Roles of Adipose Progenitor Cells in Tissue Development, Homeostasis, Expansion and Thermogenesis. *Trends Endocrinol. Metab.* **2016**, *27*, 574–585. [[CrossRef](#)]
10. Lecoutre, S.; Petrus, P.; Rydén, M.; Breton, C. Transgenerational Epigenetic Mechanisms in Adipose Tissue Development. *Trends Endocrinol. Metab.* **2018**, *29*, 675–685. [[CrossRef](#)]
11. Sanchez-Gurmaches, J.; Guertin, D.A. Adipocyte lineages: Tracing back the origins of fat. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1842*, 340–351. [[CrossRef](#)]
12. Goodpaster, B.H.; Sparks, L.M. Metabolic Flexibility in Health and Disease. *Cell Metab.* **2017**, *25*, 1027–1036. [[CrossRef](#)]
13. Kajimura, S.; Spiegelman, B.M.; Seale, P. Brown and Beige Fat: Physiological Roles beyond Heat Generation. *Cell Metab.* **2015**, *22*, 546–559. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Vitali, A.; Murano, I.; Zingaretti, M.C.; Frontini, A.; Ricquier, D.; Cinti, S. The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes. *J. Lipid Res.* **2012**, *53*, 619–629. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Ishibashi, J.; Seale, P. Beige Can Be Slimming. *Science* **2010**, *328*, 1113–1114. [[CrossRef](#)]
16. Petrovic, N.; Walden, T.B.; Shabalina, I.G.; Timmons, J.A.; Cannon, B.; Nedergaard, J. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 7153–7164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Herz, C.T.; Kiefer, F.W. Adipose tissue browning in mice and humans. *J. Endocrinol.* **2019**, *241*, R97–R109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Hannou, S.A.; Wouters, K.; Paumelle, R.; Staels, B. Functional genomics of the CDKN2A/B locus in cardiovascular and metabolic disease: What have we learned from GWASs? *Trends Endocrinol. Metab. TEM* **2015**, *26*, 176–184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Kong, Y.; Sharma, R.B.; Nwosu, B.U.; Alonso, L.C. Islet biology, the CDKN2A/B locus and type 2 diabetes risk. *Diabetologia* **2016**, *59*, 1579–1593. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Morris, A.P.; Voight, B.F.; Teslovich, T.M.; Ferreira, T.; Segre, A.V.; Steinthorsdottir, V.; Strawbridge, R.J.; Khan, H.; Grallert, H.; Mahajan, A.; et al. Large-scale association analysis provides insights into the genetic architecture and pathophysiology of type 2 diabetes. *Nat. Genet.* **2012**, *44*, 981–990. [[CrossRef](#)]
21. Cauchi, S.; Meyre, D.; Durand, E.; Proença, C.; Marre, M.; Hadjadj, S.; Choquet, H.; De Graeve, F.; Gaget, S.; Allegaert, F.; et al. Post genome-wide association studies of novel genes associated with type 2 diabetes show gene-gene interaction and high predictive value. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e2031. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Jones, P.A.; Takai, D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* **2001**, *293*, 1068–1070. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Lillycrop, K.; Murray, R.; Cheong, C.; Teh, A.L.; Clarke-Harris, R.; Barton, S.; Costello, P.; Garratt, E.; Cook, E.; Titcombe, P.; et al. ANRIL Promoter DNA Methylation: A Perinatal Marker for Later Adiposity. *EBioMedicine* **2017**, *19*, 60–72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Visel, A.; Zhu, Y.; May, D.; Afzal, V.; Gong, E.; Attanasio, C.; Blow, M.J.; Cohen, J.C.; Rubin, E.M.; Pennacchio, L.A. Targeted deletion of the 9p21 non-coding coronary artery disease risk interval in mice. *Nature* **2010**, *464*, 409–412. [[CrossRef](#)]
25. Marquez, M.P.; Alencastro, F.; Madrigal, A.; Jimenez, J.L.; Blanco, G.; Gureghian, A.; Keagy, L.; Lee, C.; Liu, R.; Tan, L.; et al. The Role of Cellular Proliferation in Adipogenic Differentiation of Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Dev.* **2017**, *26*, 1578–1595. [[CrossRef](#)]
26. Smas, C.M.; Sul, H.S. Control of adipocyte differentiation. *Biochem. J.* **1995**, *309*, 697–710. [[CrossRef](#)]
27. Patel, Y.M.; Lane, M.D. Mitotic clonal expansion during preadipocyte differentiation: Calpain-mediated turnover of p27. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 17653–17660. [[CrossRef](#)]
28. Reichert, M.; Eick, D. Analysis of cell cycle arrest in adipocyte differentiation. *Oncogene* **1999**, *18*, 459–466. [[CrossRef](#)]

29. Rosen, E.D.; Walkey, C.J.; Puigserver, P.; Spiegelman, B.M. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev.* **2000**, *14*, 1293–1307.
30. Cristancho, A.G.; Lazar, M.A. Forming functional fat: A growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2011**, *12*, 722–734. [[CrossRef](#)]
31. Siersbæk, R.; Nielsen, R.; John, S.; Sung, M.H.; Baek, S.; Loft, A.; Hager, G.L.; Mandrup, S. Extensive chromatin remodelling and establishment of transcription factor “hotspots” during early adipogenesis. *EMBO J.* **2011**, *30*, 1459–1472. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Siersbæk, R.; Baek, S.; Rabiee, A.; Nielsen, R.; Traynor, S.; Clark, N.; Sandelin, A.; Jensen, O.N.; Sung, M.H.; Hager, G.L.; et al. Molecular architecture of transcription factor hotspots in early adipogenesis. *Cell Rep.* **2014**, *7*, 1434–1442. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Siersbæk, R.; Nielsen, R.; Mandrup, S. Transcriptional networks and chromatin remodeling controlling adipogenesis. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* **2012**, *23*, 56–64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Wouters, K.; Deleye, Y.; Hannou, S.A.; Vanhoutte, J.; Maréchal, X.; Coisne, A.; Tagzirt, M.; Derudas, B.; Bouchaert, E.; Duhem, C.; et al. The tumour suppressor CDKN2A/p16INK4a regulates adipogenesis and bone marrow-dependent development of perivascular adipose tissue. *Diabetes Vasc. Dis. Res.* **2017**, *14*, 516–524. [[CrossRef](#)]
35. Kim, K.H.; Cho, Y.; Lee, J.; Jeong, H.; Lee, Y.; Kim, S.I.; Kim, C.H.; Lee, H.W.; Nam, K.T. Sexually dimorphic leanness and hypermobility in p16Ink4a/CDKN2A-deficient mice coincides with phenotypic changes in the cerebellum. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 11167. [[CrossRef](#)]
36. Abella, A.; Dubus, P.; Malumbres, M.; Rane, S.G.; Kiyokawa, H.; Sicard, A.; Vignon, F.; Langin, D.; Barbacid, M.; Fajas, L. Cdk4 promotes adipogenesis through PPARgamma activation. *Cell Metab.* **2005**, *2*, 239–249. [[CrossRef](#)]
37. Chen, J.; Yang, Y.; Li, S.; Yang, Y.; Dai, Z.; Wang, F.; Wu, Z.; Tso, P.; Wu, G. E2F1 Regulates Adipocyte Differentiation and Adipogenesis by Activating ICAT. *Cells* **2020**, *9*, 1024. [[CrossRef](#)]
38. Fajas, L.; Landsberg, R.L.; Huss-Garcia, Y.; Sardet, C.; Lees, J.A.; Auwerx, J. E2Fs regulate adipocyte differentiation. *Dev. Cell* **2002**, *3*, 39–49. [[CrossRef](#)]
39. Porse, B.T.; Pedersen, T.A.; Xu, X.; Lindberg, B.; Wewer, U.M.; Friis-Hansen, L.; Nerlov, C. E2F repression by C/EBPalpha is required for adipogenesis and granulopoiesis in vivo. *Cell* **2001**, *107*, 247–258. [[CrossRef](#)]
40. Fajas, L.; Egler, V.; Reiter, R.; Hansen, J.; Kristiansen, K.; Debril, M.B.; Miard, S.; Auwerx, J. The retinoblastoma-histone deacetylase 3 complex inhibits PPARgamma and adipocyte differentiation. *Dev. Cell* **2002**, *3*, 903–910. [[CrossRef](#)]
41. Richon, V.M.; Lyle, R.E.; McGehee, R.E. Regulation and expression of retinoblastoma proteins p107 and p130 during 3T3-L1 adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 10117–10124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Chen, P.L.; Riley, D.J.; Chen, Y.; Lee, W.H. Retinoblastoma protein positively regulates terminal adipocyte differentiation through direct interaction with C/EBPs. *Genes Dev.* **1996**, *10*, 2794–2804. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Classon, M.; Kennedy, B.K.; Mulloy, R.; Harlow, E. Opposing roles of pRB and p107 in adipocyte differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 10826–10831. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Krstic, J.; Reinisch, I.; Schupp, M.; Schulz, T.J.; Prokesch, A. p53 Functions in Adipose Tissue Metabolism and Homeostasis. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 2622. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Hallenborg, P.; Fjære, E.; Liaset, B.; Petersen, R.K.; Murano, I.; Sonne, S.B.; Falkerslev, M.; Winther, S.; Jensen, B.A.H.; Ma, T.; et al. p53 regulates expression of uncoupling protein 1 through binding and repression of PPARγ coactivator-1α. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2016**, *310*, E116–E128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Molchadsky, A.; Ezra, O.; Amendola, P.G.; Krantz, D.; Kogan-Sakin, I.; Buganim, Y.; Rivlin, N.; Goldfinger, N.; Folgiero, V.; Falcioni, R.; et al. p53 is required for brown adipogenic differentiation and has a protective role against diet-induced obesity. *Cell Death Differ.* **2013**, *20*, 774–783. [[CrossRef](#)]
47. Molchadsky, A.; Shats, I.; Goldfinger, N.; Pevsner-Fischer, M.; Olson, M.; Rinon, A.; Tzahor, E.; Lozano, G.; Zipori, D.; Sarig, R.; et al. p53 plays a role in mesenchymal differentiation programs, in a cell fate dependent manner. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e3707. [[CrossRef](#)]
48. Okita, N.; Ishikawa, N.; Mizunoe, Y.; Oku, M.; Nagai, W.; Suzuki, Y.; Matsushima, S.; Mikami, K.; Okado, H.; Sasaki, T.; et al. Inhibitory effect of p53 on mitochondrial content and function during adipogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *446*, 91–97. [[CrossRef](#)]
49. Gustafson, B.; Nerstedt, A.; Smith, U. Reduced subcutaneous adipogenesis in human hypertrophic obesity is linked to senescent precursor cells. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 2757. [[CrossRef](#)]

50. Palmer, A.K.; Xu, M.; Zhu, Y.; Pirtskhalava, T.; Weivoda, M.M.; Hachfeld, C.M.; Prata, L.G.; van Dijk, T.H.; Verkade, E.; Casaclang-Verzosa, G.; et al. Targeting senescent cells alleviates obesity-induced metabolic dysfunction. *Aging Cell* **2019**, *18*, e12950. [[CrossRef](#)]
51. Baker, D.J.; Wijshake, T.; Tchkonja, T.; LeBrasseur, N.K.; Childs, B.G.; van de Sluis, B.; Kirkland, J.L.; van Deursen, J.M. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* **2011**, *479*, 232–236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Shimizu, I.; Yoshida, Y.; Katsuno, T.; Tateno, K.; Okada, S.; Moriya, J.; Yokoyama, M.; Nojima, A.; Ito, T.; Zechner, R.; et al. p53-induced adipose tissue inflammation is critically involved in the development of insulin resistance in heart failure. *Cell Metab.* **2012**, *15*, 51–64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Minamino, T.; Orimo, M.; Shimizu, I.; Kunieda, T.; Yokoyama, M.; Ito, T.; Nojima, A.; Nabetani, A.; Oike, Y.; Matsubara, H.; et al. A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nat. Med.* **2009**, *15*, 1082–1087. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Phelps, D.E.; Xiong, Y. Regulation of cyclin-dependent kinase 4 during adipogenesis involves switching of cyclin D subunits and concurrent binding of p18INK4c and p27Kip1. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **1998**, *9*, 595–610.
55. Lagarrigue, S.; Lopez-Mejia, I.C.; Denechaud, P.D.; Escoté, X.; Castillo-Armengol, J.; Jimenez, V.; Chavey, C.; Giral, A.; Lai, Q.; Zhang, L.; et al. CDK4 is an essential insulin effector in adipocytes. *J. Clin. Investig.* **2016**, *126*, 335–348. [[CrossRef](#)]
56. Cudejko, C.; Wouters, K.; Fuentes, L.; Hannou, S.A.; Paquet, C.; Bantubungi, K.; Bouchaert, E.; Vanhoutte, J.; Fleury, S.; Remy, P.; et al. p16INK4a deficiency promotes IL-4-induced polarization and inhibits proinflammatory signaling in macrophages. *Blood* **2011**, *118*, 2556–2566. [[CrossRef](#)]
57. Fuentes, L.; Wouters, K.; Hannou, S.A.; Cudejko, C.; Rigamonti, E.; Mayi, T.H.; Derudas, B.; Pattou, F.; Chinetti-Gbaguidi, G.; Staels, B.; et al. Downregulation of the tumour suppressor p16INK4A contributes to the polarisation of human macrophages toward an adipose tissue macrophage (ATM)-like phenotype. *Diabetologia* **2011**, *54*, 3150–3156. [[CrossRef](#)]
58. Li, L.; Ng, D.S.W.; Mah, W.C.; Almeida, F.F.; Rahmat, S.A.; Rao, V.K.; Leow, S.C.; Laudisi, F.; Peh, M.T.; Goh, A.M.; et al. A unique role for p53 in the regulation of M2 macrophage polarization. *Cell Death Differ.* **2015**, *22*, 1081–1093. [[CrossRef](#)]
59. Blanchet, E.; Annicotte, J.S.; Lagarrigue, S.; Aguilar, V.; Clapé, C.; Chavey, C.; Fritz, V.; Casas, F.; Apparailly, F.; Auwerx, J.; et al. E2F transcription factor-1 regulates oxidative metabolism. *Nat. Cell Biol.* **2011**, *13*, 1146–1152. [[CrossRef](#)]
60. Rabhi, N.; Hannou, S.A.; Gromada, X.; Salas, E.; Yao, X.; Oger, F.; Carney, C.; Lopez-Mejia, I.C.; Durand, E.; Rabearivelo, I.; et al. Cdkn2a deficiency promotes adipose tissue browning. *Mol. Metab.* **2018**, *8*, 65–76. [[CrossRef](#)]
61. Dali-Youcef, N.; Matak, C.; Coste, A.; Messaddeq, N.; Giroud, S.; Blanc, S.; Koehl, C.; Champy, M.F.; Chambon, P.; Fajas, L.; et al. Adipose tissue-specific inactivation of the retinoblastoma protein protects against diabetes because of increased energy expenditure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 10703–10708. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Hanssen, M.J.W.; Hoeks, J.; Brans, B.; van der Lans, A.A.J.J.; Schaart, G.; van den Driessche, J.J.; Jörgensen, J.A.; Boekschoten, M.V.; Hesselink, M.K.C.; Havekes, B.; et al. Short-term cold acclimation improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes mellitus. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 863–865. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Liu, Z.; Wu, K.K.L.; Jiang, X.; Xu, A.; Cheng, K.K.Y. The role of adipose tissue senescence in obesity- and ageing-related metabolic disorders. *Clin. Sci. Lond. Engl.* **2020**, *134*, 315–330. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Vergoni, B.; Cornejo, P.J.; Gilleron, J.; Djedaini, M.; Ceppo, F.; Jacquél, A.; Bouget, G.; Ginet, C.; Gonzalez, T.; Maillet, J.; et al. DNA Damage and the Activation of the p53 Pathway Mediate Alterations in Metabolic and Secretory Functions of Adipocytes. *Diabetes* **2016**, *65*, 3062–3074. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Slawik, M.; Vidal-Puig, A.J. Adipose tissue expandability and the metabolic syndrome. *Genes Nutr.* **2007**, *2*, 41–45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Beerman, I.; Rossi, D.J. Epigenetic Control of Stem Cell Potential during Homeostasis, Aging, and Disease. *Cell Stem Cell* **2015**, *16*, 613. [[CrossRef](#)]
67. Hosogai, N.; Fukuhara, A.; Oshima, K.; Miyata, Y.; Tanaka, S.; Segawa, K.; Furukawa, S.; Tochino, Y.; Komuro, R.; Matsuda, M.; et al. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes* **2007**, *56*, 901–911. [[CrossRef](#)]

68. Rane, S.G.; Dubus, P.; Mettus, R.V.; Galbreath, E.J.; Boden, G.; Reddy, E.P.; Barbacid, M. Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in beta-islet cell hyperplasia. *Nat. Genet.* **1999**, *22*, 44–52. [[CrossRef](#)]
69. Mettus, R.V.; Rane, S.G. Characterization of the abnormal pancreatic development, reduced growth and infertility in Cdk4 mutant mice. *Oncogene* **2003**, *22*, 8413–8421. [[CrossRef](#)]
70. Martín, J.; Hunt, S.L.; Dubus, P.; Sotillo, R.; Néhmé-Pélluard, F.; Magnuson, M.A.; Parlow, A.F.; Malumbres, M.; Ortega, S.; Barbacid, M. Genetic rescue of Cdk4 null mice restores pancreatic beta-cell proliferation but not homeostatic cell number. *Oncogene* **2003**, *22*, 5261–5269. [[CrossRef](#)]
71. Jansen, H.J.; van Essen, P.; Koenen, T.; Joosten, L.A.B.; Netea, M.G.; Tack, C.J.; Stienstra, R. Autophagy activity is up-regulated in adipose tissue of obese individuals and modulates proinflammatory cytokine expression. *Endocrinology* **2012**, *153*, 5866–5874. [[CrossRef](#)]
72. Haim, Y.; Blüher, M.; Slutsky, N.; Goldstein, N.; Klötting, N.; Harman-Boehm, I.; Kirshtein, B.; Ginsberg, D.; Gericke, M.; Guiu Jurado, E.; et al. Elevated autophagy gene expression in adipose tissue of obese humans: A potential non-cell-cycle-dependent function of E2F1. *Autophagy* **2015**, *11*, 2074–2088. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Lumeng, C.N.; Bodzin, J.L.; Saltiel, A.R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J. Clin. Investig.* **2007**, *117*, 175–184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Burhans, M.S.; Hagman, D.K.; Kuzma, J.N.; Schmidt, K.A.; Kratz, M. Contribution of Adipose Tissue Inflammation to the Development of Type 2 Diabetes Mellitus. *Compr. Physiol.* **2018**, *9*, 1–58. [[CrossRef](#)]
75. Kim, J.A.; Hong, S.; Lee, B.; Hong, J.W.; Kwak, J.Y.; Cho, S.; Kim, C.C. The inhibition of T-cells proliferation by mouse mesenchymal stem cells through the induction of p16INK4A-cyclin D1/cdk4 and p21waf1, p27kip1-cyclin E/cdk2 pathways. *Cell. Immunol.* **2007**, *245*, 16–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Shimizu, I.; Yoshida, Y.; Moriya, J.; Nojima, A.; Uemura, A.; Kobayashi, Y.; Minamino, T. Semaphorin3E-induced inflammation contributes to insulin resistance in dietary obesity. *Cell Metab.* **2013**, *18*, 491–504. [[CrossRef](#)]
77. Li, H.; Collado, M.; Villasante, A.; Strati, K.; Ortega, S.; Cañamero, M.; Blasco, M.A.; Serrano, M. The Ink4/Arf locus is a barrier for iPSC cell reprogramming. *Nature* **2009**, *460*, 1136–1139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Takahashi, K.; Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **2006**, *126*, 663–676. [[CrossRef](#)]
79. Fu, W.; Liu, Y.; Sun, C.; Yin, H. Transient p53 inhibition sensitizes aged white adipose tissue for beige adipocyte recruitment by blocking mitophagy. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **2019**, *33*, 844–856. [[CrossRef](#)]
80. Berry, D.C.; Jiang, Y.; Arpke, R.W.; Close, E.L.; Uchida, A.; Reading, D.; Berglund, E.D.; Kyba, M.; Graff, J.M. Cellular Aging Contributes to Failure of Cold-Induced Beige Adipocyte Formation in Old Mice and Humans. *Cell Metab.* **2017**, *25*, 166–181. [[CrossRef](#)]
81. Petruzzelli, M.; Schweiger, M.; Schreiber, R.; Campos-Olivas, R.; Tsoli, M.; Allen, J.; Swarbrick, M.; Rose-John, S.; Rincon, M.; Robertson, G.; et al. A switch from white to brown fat increases energy expenditure in cancer-associated cachexia. *Cell Metab.* **2014**, *20*, 433–447. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Daas, S.I.; Rizeq, B.R.; Nasrallah, G.K. Adipose tissue dysfunction in cancer cachexia. *J. Cell. Physiol.* **2018**, *234*, 13–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Scimè, A.; Grenier, G.; Huh, M.S.; Gillespie, M.A.; Bevilacqua, L.; Harper, M.E.; Rudnicki, M.A. Rb and p107 regulate preadipocyte differentiation into white versus brown fat through repression of PGC-1alpha. *Cell Metab.* **2005**, *2*, 283–295. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Irie, Y.; Asano, A.; Cañas, X.; Nikami, H.; Aizawa, S.; Saito, M. Immortal brown adipocytes from p53-knockout mice: Differentiation and expression of uncoupling proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *255*, 221–225. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Liu, S.; Kim, T.H.; Franklin, D.A.; Zhang, Y. Protection against High-Fat-Diet-Induced Obesity in MDM2C305F Mice Due to Reduced p53 Activity and Enhanced Energy Expenditure. *Cell Rep.* **2017**, *18*, 1005–1018. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. González-Navarro, H.; Vinué, Á.; Sanz, M.J.; Delgado, M.; Pozo, M.A.; Serrano, M.; Burks, D.J.; Andrés, V. Increased dosage of Ink4/Arf protects against glucose intolerance and insulin resistance associated with aging. *Aging Cell* **2013**, *12*, 102–111. [[CrossRef](#)]

87. Pal, A.; Potjer, T.P.; Thomsen, S.K.; Ng, H.J.; Barrett, A.; Scharfmann, R.; James, T.J.; Bishop, D.T.; Karpe, F.; Godsland, I.F.; et al. Loss-of-Function Mutations in the Cell-Cycle Control Gene CDKN2A Impact on Glucose Homeostasis in Humans. *Diabetes* **2016**, *65*, 527–533. [[CrossRef](#)]
88. Helman, A.; Klochendler, A.; Azazmeh, N.; Gabai, Y.; Horwitz, E.; Anzi, S.; Swisa, A.; Condiotti, R.; Granit, R.Z.; Nevo, Y.; et al. p16(Ink4a)-induced senescence of pancreatic beta cells enhances insulin secretion. *Nat. Med.* **2016**, *22*, 412–420. [[CrossRef](#)]
89. Aguayo-Mazzucato, C.; van Haaren, M.; Mruk, M.; Lee, T.B.; Crawford, C.; Hollister-Lock, J.; Sullivan, B.A.; Johnson, J.W.; Ebrahimi, A.; Dreyfuss, J.M.; et al. β Cell Aging Markers Have Heterogeneous Distribution and Are Induced by Insulin Resistance. *Cell Metab.* **2017**, *25*, 898–910. [[CrossRef](#)]
90. Kong, Y.; Sharma, R.B.; Ly, S.; Stamateris, R.E.; Jesdale, W.M.; Alonso, L.C. CDKN2A/B T2D Genome-Wide Association Study Risk SNPs Impact Locus Gene Expression and Proliferation in Human Islets. *Diabetes* **2018**, *67*, 872–884. [[CrossRef](#)]
91. Bantubungi, K.; Hannou, S.A.; Caron-Houde, S.; Vallez, E.; Baron, M.; Lucas, A.; Bouchaert, E.; Paumelle, R.; Tailleux, A.; Staels, B. Cdkn2a/p16Ink4a regulates fasting-induced hepatic gluconeogenesis through the PKA-CREB-PGC1 α pathway. *Diabetes* **2014**, *63*, 3199–3209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Liu, Y.; Sanoff, H.K.; Cho, H.; Burd, C.E.; Torrice, C.; Mohlke, K.L.; Ibrahim, J.G.; Thomas, N.E.; Sharpless, N.E. INK4/ARF transcript expression is associated with chromosome 9p21 variants linked to atherosclerosis. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e5027. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. González-Navarro, H.; Abu Nabah, Y.N.; Vinué, A.; Andrés-Manzano, M.J.; Collado, M.; Serrano, M.; Andrés, V. p19(ARF) deficiency reduces macrophage and vascular smooth muscle cell apoptosis and aggravates atherosclerosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2010**, *55*, 2258–2268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Kuo, C.L.; Murphy, A.J.; Sayers, S.; Li, R.; Yvan-Charvet, L.; Davis, J.Z.; Krishnamurthy, J.; Liu, Y.; Puig, O.; Sharpless, N.E.; et al. Cdkn2a is an atherosclerosis modifier locus that regulates monocyte/macrophage proliferation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2011**, *31*, 2483–2492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Congrains, A.; Kamide, K.; Oguro, R.; Yasuda, O.; Miyata, K.; Yamamoto, E.; Kawai, T.; Kusunoki, H.; Yamamoto, H.; Takeya, Y.; et al. Genetic variants at the 9p21 locus contribute to atherosclerosis through modulation of ANRIL and CDKN2A/B. *Atherosclerosis* **2012**, *220*, 449–455. [[CrossRef](#)]
96. Ogrodnik, M.; Miwa, S.; Tchkonina, T.; Tiniakos, D.; Wilson, C.L.; Lahat, A.; Day, C.P.; Burt, A.; Palmer, A.; Anstee, Q.M.; et al. Cellular senescence drives age-dependent hepatic steatosis. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 15691. [[CrossRef](#)]
97. El-Athman, R.; Genov, N.N.; Mazuch, J.; Zhang, K.; Yu, Y.; Fuhr, L.; Abreu, M.; Li, Y.; Wallach, T.; Kramer, A.; et al. The Ink4a/Arf locus operates as a regulator of the circadian clock modulating RAS activity. *PLoS Biol.* **2017**, *15*, e2002940. [[CrossRef](#)]
98. Le, O.; Palacio, L.; Bernier, G.; Batinic-Haberle, I.; Hickson, G.; Beauséjour, C. INK4a/ARF Expression Impairs Neurogenesis in the Brain of Irradiated Mice. *Stem Cell Rep.* **2018**, *10*, 1721–1733. [[CrossRef](#)]
99. Price, J.D.; Park, K.Y.; Chen, J.; Salinas, R.D.; Cho, M.J.; Kriegstein, A.R.; Lim, D.A. The Ink4a/Arf locus is a barrier to direct neuronal transdifferentiation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **2014**, *34*, 12560–12567. [[CrossRef](#)]
100. Ma, K.H.; Duong, P.; Moran, J.J.; Junaidi, N.; Svaren, J. Polycomb repression regulates Schwann cell proliferation and axon regeneration after nerve injury. *Glia* **2018**, *66*, 2487–2502. [[CrossRef](#)]
101. Gomez-Sanchez, J.A.; Gomis-Coloma, C.; Morenilla-Palao, C.; Peiro, G.; Serra, E.; Serrano, M.; Cabedo, H. Epigenetic induction of the Ink4a/Arf locus prevents Schwann cell overproliferation during nerve regeneration and after tumorigenic challenge. *Brain J. Neurol.* **2013**, *136*, 2262–2278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Vinué, Á.; Martínez-Hervás, S.; Herrero-Cervera, A.; Sánchez-García, V.; Andrés-Blasco, I.; Piqueras, L.; Sanz, M.J.; Real, J.T.; Ascaso, J.F.; Burks, D.J.; et al. Changes in CDKN2A/2B expression associate with T-cell phenotype modulation in atherosclerosis and type 2 diabetes mellitus. *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.* **2019**, *203*, 31–48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Martínez-Hervás, S.; Sánchez-García, V.; Herrero-Cervera, A.; Vinué, Á.; Real, J.T.; Ascaso, J.F.; Burks, D.J.; González-Navarro, H. Type 1 diabetic mellitus patients with increased atherosclerosis risk display decreased CDKN2A/2B/2BAS gene expression in leukocytes. *J. Transl. Med.* **2019**, *17*, 222. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Sato, K.; Nakagawa, H.; Tajima, A.; Yoshida, K.; Inoue, I. ANRIL is implicated in the regulation of nucleus and potential transcriptional target of E2F1. *Oncol. Rep.* **2010**, *24*, 701–707. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

105. Wu, J.H.; Tang, J.M.; Li, J.; Li, X.W. Upregulation of SOX2-activated lncRNA ANRIL promotes nasopharyngeal carcinoma cell growth. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 3333. [[CrossRef](#)]
106. Kong, Y.; Hsieh, C.H.; Alonso, L.C. ANRIL: A lncRNA at the CDKN2A/B Locus With Roles in Cancer and Metabolic Disease. *Front. Endocrinol.* **2018**, *9*, 405. [[CrossRef](#)]
107. Yap, K.L.; Li, S.; Muñoz-Cabello, A.M.; Raguz, S.; Zeng, L.; Mujtaba, S.; Gil, J.; Walsh, M.J.; Zhou, M.M. Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a. *Mol. Cell* **2010**, *38*, 662–674. [[CrossRef](#)]
108. Kotake, Y.; Nakagawa, T.; Kitagawa, K.; Suzuki, S.; Liu, N.; Kitagawa, M.; Xiong, Y. Long non-coding RNA ANRIL is required for the PRC2 recruitment to and silencing of p15(INK4B) tumor suppressor gene. *Oncogene* **2011**, *30*, 1956–1962. [[CrossRef](#)]
109. Xu, S.T.; Xu, J.H.; Zheng, Z.R.; Zhao, Q.Q.; Zeng, X.S.; Cheng, S.X.; Liang, Y.H.; Hu, Q.F. Long non-coding RNA ANRIL promotes carcinogenesis via sponging miR-199a in triple-negative breast cancer. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *96*, 14–21. [[CrossRef](#)]
110. Shi, C.; Huang, F.; Gu, X.; Zhang, M.; Wen, J.; Wang, X.; You, L.; Cui, X.; Ji, C.; Guo, X. Adipogenic miRNA and meta-signature miRNAs involved in human adipocyte differentiation and obesity. *Oncotarget* **2016**, *7*, 40830–40845. [[CrossRef](#)]
111. 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. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* **2012**, *150*, 366–376. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. White, J.D.; Dewal, R.S.; Stanford, K.I. The beneficial effects of brown adipose tissue transplantation. *Mol. Asp. Med.* **2019**, *68*, 74–81. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Lee, Y.H.; Petkova, A.P.; Mottillo, E.P.; Granneman, J.G. In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by β 3-adrenoceptor activation and high-fat feeding. *Cell Metab.* **2012**, *15*, 480–491. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).