



HAL
open science

Fonction métabolique de la microvasculature des tissus adipeux : une cible de l'obésité et du vieillissement

Alex Aupetit

► To cite this version:

Alex Aupetit. Fonction métabolique de la microvasculature des tissus adipeux : une cible de l'obésité et du vieillissement. Cardiologie et système cardiovasculaire. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2023. Français. <NNT : 2023TOU30157>. <tel-04390309>

HAL Id: tel-04390309

<https://theses.hal.science/tel-04390309v1>

Submitted on 12 Jan 2024

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.



HAL Authorization



THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE
Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par
Alex AUPETIT

Le 26 septembre 2023

**Fonction métabolique de la microvasculature des tissus adipeux:
une cible de l'obésité et du vieillissement**

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

Spécialité : **MALADIES METABOLIQUES ET CARDIOVASCULAIRES**

Unité de recherche :

I2MC - Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires

Thèse dirigée par
Anne BOULOUMIE et Anais BRIOT

Jury

M. Xavier PRIEUR, Rapporteur
Mme Marie-Ange RENAULT, Rapporteur
M. Frédéric CAPEL, Examineur
Mme Françoise LENFANT, Examinatrice
Mme Anne BOULOUMIE, Directrice de thèse
Mme Anais BRIOT, Co-directrice de thèse



THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE
Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par
Alex AUPETIT

Le 26 septembre 2023

**Fonction métabolique de la microvasculature des tissus adipeux:
une cible de l'obésité et du vieillissement**

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

Spécialité : **MALADIES METABOLIQUES ET CARDIOVASCULAIRES**

Unité de recherche :

I2MC - Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires

Thèse dirigée par
Anne BOULOUMIE et Anais BRIOT

Jury

M. Xavier PRIEUR, Rapporteur
Mme Marie-Ange RENAULT, Rapporteuse
M. Frédéric CAPEL, Examineur
Mme Françoise LENFANT, Examinatrice
Mme Anne BOULOUMIE, Directrice de thèse
Mme Anais BRIOT, Co-directrice de thèse

Voilà, c'est fini !

Je profite de ces premiers mots pour exprimer toute ma reconnaissance à vous qui allez lire ce manuscrit et remercie celles et ceux qui, quelle qu'en soit l'ampleur, ont participé à ce travail.

Je tiens à remercier les membres de mon jury qui ont accepté de lire et évaluer mes travaux.

Anaïs, sans toi tout ce travail n'aurait pas pu voir le jour, je te suis profondément reconnaissant de m'avoir donné l'opportunité de faire ce travail de thèse. Nous étions toujours confinés et nous ne nous étions jamais rencontrés mais tu m'as fait confiance, j'espère en avoir été digne. Pour ma part, j'ai rencontré une chercheuse passionnée, déterminée et disponible avec qui j'ai pu évoluer à la fois techniquement et scientifiquement. **Merci** de m'avoir accompagné sur cette étape du chemin !

Anne, je vous suis reconnaissant de m'avoir accueilli dans votre équipe et d'avoir codirigé ma thèse. Je vous remercie pour les précieux conseils et pour le temps que vous avez pu me donner.

Pauline, malgré tes goûts musicaux parfois discutables, je dois dire que j'ai eu une chance inouïe de te rencontrer et de travailler à tes côtés. Tu as été là à toutes les étapes, les joyeuses et les plus difficiles. Tu m'as aussi supporté (team râleur) pendant les après-midis « tubes et filtres », les semaines FlexMet, les DLA, et les extractions à s'en faire tourner la tête. Pour tout ça un merci ne suffit pas alors en voilà milles, je te souhaite le meilleur et te laisse la macro de qPCR en souvenir.

Emmanuelle et Léopold aka Manu et Léo aka Manuel y pepito, malgré la promiscuité, le froid en hiver et le chaud en été, les craquages en culture et le rush de la fin on a survécu. Je me sens très chanceux d'avoir partagé ce bureau avec vous pendant cette dernière année. Manu, je te souhaite une carrière à ton image : joyeuse et créative. Léo, tout repose sur toi maintenant (pas de pression), je te souhaite une bonne fin de thèse et de trouver « la bonne idée » pour la suite.

Nathalie, ce fut un plaisir de travailler à tes côtés pendant ces trois années, merci pour tes conseils et ta positivité même quand rien ne semblait aller. Je te souhaite le meilleur pour tes nouvelles aventures niçoises remplis de de physiologie cardiaque, de mer et pissaladière au coin d'un barbecue.

Jean, j'ai longuement hésité à demander à chat GPT à m'aider à écrire ces quelques mots. Malheureusement, (ou heureusement) il n'aurait pas pu te remercier pour tous tes conseils, tes protocoles donnés à la volée, tes gadgets et bricolages toujours très utiles. Je te souhaite par avance une retraite ensoleillée auprès des tiens.

Pénélope, entre A.R.M.Y et cytométrie tu es devenu une amie. Merci d'avoir été présente, au labo, à la salle et dans toutes nos péripéties.

Jiuwen, 我感谢你的幽默和热情。我希望我是一名中文的好学生（即使谷歌在这里帮了我很多）。Tu es la personne la plus travailleuse que je connaisse, je te souhaite une fin de thèse pleine de réussite et d'article. 我也祝你找到你的男人

Christian, le Raymond Poulidor du laboratoire, je te remercie pour tes conseils et de m'avoir permis de rencontrer des collègues Français et Espagnols lors des éditions consécutives du CTPIOD. Je te souhaite une bonne retraite.

Matthieu, Charlotte, Pascale, Vincent x 2, Sylvie, Christophe, Maxime, Kévin, Jessica, Lucie, Valentin, Rémy nos chemins se sont croisés ce fut bref et intense mais j'ai passé de très bons moments à vos côtés. Promis je me tiendrais loins des méchantes porphyromonas gingivalis. Je vous souhaite à tous le meilleur.

Je veux aussi remercier Emma, Emma, Melanie et Bastien les stagiaires de la Team Endo. Vous avez tous les 4 des parcours et des personnalités différentes mais j'ai beaucoup aimé travailler à vos côtés. Je vous souhaite de réussir dans vos voies respectives.

Mélanie, Julie, Marlène, Karina, Elena, aka le PPD. On est parti de pas grand-chose après le COVID et on a réussi à fédérer les PhD et Postdoc de l'institut. Merci pour tout les filles, ce fut un plaisir d'organiser ces moments tellement nécessaires avec vous. Je souhaite au PPD de perdurer et de se renforcer. A tous mes co-doctorants et à mes futures collègues postdoc je vous souhaite le meilleur !

Je ne pouvais décidément pas oublier les inspiriens TRF dans ces remerciements, 1 an au rythme des cycles inversés avec TRF 5 jours sur 7. Merci à tous ceux que j'ai rencontré ce fut une sacrée expérience. Merci à l'équipe du L5 et en particulier Laetitia, Morgane, Deborah qui ont comme d'habitude d'une aide précieuse On se retrouve sur le papier !

Pendant ces 3 années à l'I2MC j'ai eu la chance de rencontrer un grand nombre d'entre vous, dans les équipes, sur les plateaux ou à la retraite. Je remercie chacun d'entre vous pour votre aide, vos conseils, vos sourires. Je tiens aussi à m'excuser auprès de chacun d'entre vous pour avoir à supporter ma tête en 16/9^{ème} à chaque fois que vous passez devant un TV.

Maman, papa, bon on ne peut pas dire que c'était gagné d'avance, merci d'y avoir cru et de m'avoir soutenu sans garantie. Merci à toute ma famille, Tom, les papys, les mamies, les oncles et tantes, les cousins, et tous les autres (oui la famille est grande) d'avoir été présente pendant toutes ces étapes. Comme un grand homme disait souvent « cha'ptit va loin ... ». Je vais m'éloigner un peu, mais je vous attends pour randonner dans les grands parcs.

Je ne peux bien sûr pas oublier ceux sans qui mes soirées et mes nuits auraient été bien ternes, merci à vous les copains de m'avoir fait sortir de mon labo, je n'oublierai pas nos escapades ensoleillées et nos desserts au Florida. A bientôt sans fautes.

Enfin je ne pouvais pas clore ce chapitre sans remercier chacun.e des patient.es qui ont accepté de donner leurs tissus adipeux, ainsi que les mus musculus pour leurs dévotions aveugles, sans eux ce travail ne pourrait pas exister.

Table des matières

INTRODUCTION	10
I. Tissus adipeux et flexibilité métabolique	10
A. Les tissus adipeux : structure et distribution	10
1. Généralités	10
2. Le Tissu adipeux brun	11
3. Les Tissu adipeux blancs	13
4. Fonctions	14
a) L'entrée et devenir des substrats énergétiques dans l'adipocyte	14
b) La formation des triglycérides	16
c) La lipogenese de novo	16
d) La lipolyse	16
e) La re-esterification	18
f) La beta-Oxydation	19
g) La thermogenèse	19
h) La fonction endocrine du tissu adipeux	21
(1) La leptine	22
(2) L'Adiponectine	22
(3) Les autres adipokines	23
5. La répartition des tissus adipeux blancs :	24
6. Les différences inter- espèces : les rongeurs	24
B. L'Obésité et les pathologies cardio-métaboliques	25
a) L' Epidémiologie de l'obésité	26
b) L'Obésité saine versus obésité pathologique	26
c) La répartition des dépôts adipeux comme déterminante de la santé	27
(1) L'expandabilité et l'hypothèse portale	28
(a) L'Expandabilité des dépôts adipeux	28
(b) L'Hypothèse portale	29

(2) Les Différences sexuelles.....	29
d) Les traitements de l'obésité	31
II. La Flexibilité métabolique	33
A. De l'homéostasie vers l'homéodynamie	33
B. L'adaptation aux changements d'états métaboliques	34
a) La phase absorptive.....	35
b) Le Jeûne court (moins de 24 heures)	36
c) Adaptation au jeûne prolongé	37
(1) L'hibernation	38
(2) Le jeûne prolongé, la famine et l'évolution.....	38
C. Les mécanismes de régulation	39
1. Le Cycle circadien comme intégrateur central et périphérique.....	39
2. Les stimuli neuro-humoraux dans les communications inter-organes	41
a) Les hormones de la phase absorptive	41
(1) Le GLP-1 & le GLP-2	41
(2) Le GIP.....	43
(3) L'insuline.....	43
b) Les hormones du jeûne	43
(1) Le glucagon.....	43
(2) Les catécholamines	44
(3) Le FGF21	45
3. Les Régulations Intracellulaires.....	45
a) La voie de l'AMPK	45
b) La voie mTOR.....	47
c) Le facteur de transcription FOXO	48
d) Le facteur de transcription PPAR.....	49
e) L'autophagie.....	50
4. Les régulations épigénétiques.....	52

III. L'endothélium du tissu adipeux et la flexibilité métabolique	52
A. La Structure et la diversité du système vasculaire	53
B. Les Fonctions de l'endothélium	57
1. Le tonus et la modulation du flux sanguin	57
2. La régulation de l'hémostase et du recrutement des cellules immunes	58
3. La régulation des échanges entre le sang et le parenchyme	59
C. L'angiogenèse et remodelage du tissu adipeux	63
D. La flexibilité du métabolisme des cellules endothéliales	64
E. Le vieillissement de l'endothélium vasculaire du tissu adipeux	65
IV. La voie de signalisation NOTCH	68
A. Définition et fonctionnalité	68
1. Les récepteurs et ligands de la voie NOTCH.....	68
2. La voie canonique de NOTCH	70
3. La voie non canonique de NOTCH	72
B. La voie Notch dans le système vasculaire	72
1. L'angiogénèse.....	73
2. La mécano-transduction.....	73
3. L'inflammation vasculaire	73
4. Les échanges trans-endothéliaux.....	74
5. Les dérivés nutritionnels	75
OBJECTIFS.....	76
RESULTATS.....	78
PUBLICATION.....	79
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	80
REFERENCES	91

Liste des figures

Figure 1 : Composition cellulaire du tissu adipeux	11
Figure 2 : Les adipocytes bruns : rôles et fonctions	12
Figure 3 : Adipocyte Blanc	13
Figure 4 : Métabolisme adipocytaire	15
Figure 5 : Contrôle du métabolisme adipocytaire	18
Figure 6 : Thermogenèse dans les adipocytes bruns : dépendante ou indépendante de UCP-1	21
Figure 7 : Répartition des dépôts adipeux blancs chez l'homme	24
Figure 8 : Répartition des dépôts adipeux chez la souris	25
Figure 9 : Répartition de la masse grasse et facteur de risques cardio-métaboliques	28
Figure 10 : Modèle homéodynamique	34
Figure 11 : Dynamique des substrats énergétiques et des hormones au cours du jeûne	37
Figure 12 : Boucle de rétrocontrôle traduction/transcription circadienne	40
Figure 13 : Effets de GLP1 et GLP2	42
Figure 14 : Effets du glucagon	44
Figure 15 : AMPK de l'activation à la signalisation	47
Figure 16 : Voie de signalisation mTOR	48
Figure 17 : Les mécanismes de l'autophagie	51
Figure 18 : Les différents types d'endothéliums	54
Figure 19 : Diagrammes de Venn et voies de signalisation des sous-populations de cellules endothéliales des tissus adipeux	56
Figure 20 Voies de l'endocytose	61
Figure 21 : Echanges entre le compartiment sanguin et le parenchyme adipeux	63
Figure 22 : La cellule sénescente et effet sur le métabolisme	67
Figure 23 : Récepteur et Ligands de la voie NOTCH	70
Figure 24 : Voie de signalisation NOTCH	71
Figure 25 : Caractérisation de l'hétérogénéité des cellules endothéliales des dépôts adipeux humains et murins	83
Figure 26 : Adaptation des cellules endothéliales des tissus adipeux aux transitions énergétiques	85
Figure 27 : Mécanismes mis en jeu dans la gestion des flux de lipides.	87
Figure 28 : Impact de l'obésité sur les mécanismes	89

Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : Définition de l'obésité métaboliquement saine.....</i>	<i>27</i>
<i>Tableau 2 : Classement des patients atteints d'obésité en fonction de leurs degrés de gravité</i>	<i>32</i>

Liste des abréviations

1,3BGP : 1,3-Bisphosphoglyceric acid
2PG : 2-Phosphoglyceric acid
3PG : 3-Phosphoglyceric acid
4E-BP : Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1
ACC1 : Acetyl-coA carboxylase 1
ACE : Angiotensin converting enzyme
ADAM : A disintegrin and metalloprotease
ADIPOQ : Adiponectin
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADP : Adénosine triphosphate
AG : Acides gras
AKT : Protein kinase B, PKB
ALDO : Fructose-bisphosphate aldolase
AMP : Adénosine monophosphate
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
AMPK : AMP-activated protein kinase
ANGPLTL4 : Angiopoietin-like 4
ANK : Ankyrin
ANP : Atrial natriuretic peptide
ARN : Acides ribonucléiques
ATF-4 : Cyclic AMP-dependent transcription factor
ATGL : Adipose triglycéride lipase
ATP : Adénosine triphosphate
BAT : Brown adipose tissue
BNP : Brain natriuretic peptide
CAMKK2 : Calcium-calmoduline kinase kinase
CBS : Cystathionine- β -synthase
CCL20 : C-C motif chemokine 20
CD36/FAT : Fatty acid transporter
CDR : Circular dorsal ruffle
COX : Cyclooxygénase
CPT-1 : Carnitine palmitoyltransferase 1
CREB : Cyclic AMP-responsive element-binding protein
CSF-1R : Colony stimulating factor-1 receptor
DAG : Diacylglycerol
DHAP : Dihydroxyacetone phosphate
DLL : Delta-like ligand
DPP-4 : Dipeptidyl peptidase 4
DT2 : Diabète de types 2
EGF : Epidermal growth factor
EGFR : Epidermal growth factor receptor
ENO : Enolase
eNOS : Endothelial Nitric Oxide Synthase
ET_A : Endothéline de type A

ET_B : Endothéline de type B
F1,6BP : Fructose 1,6-bisphosphate
F-6-P : Fructose-6-phosphate
FABPpm : Fatty Acid Binding Protein
FAD : Flavine adénine dinucléotide
FADH² : Flavine adénine dinucléotide
FATP : Fatty acid transport protein
FGF21 : Fibroblast growth factor 21
FOXO : Forkhead box O
G-3-P : Glucose-3-phosphate
G-6-P : Glucose-6-phosphate
GADP : Glyceraldehyde 3-phosphate
GAPDH : Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GIP : Gastric inhibitory polypeptide
GLP-1 : Glucagon-like peptide-1
GLP-2 : Glucagon-like peptide-2
GLUT : Glucose transporter type
GMPc : Guanosine monophosphate cyclique
GPIHBP1 : Glycosylphosphatidylinositol anchored high density lipoprotein binding protein 1
GWAS : Genome-wide association studies
HAS : Haute autorité de santé
HDAC : Histones dé-acetylase
HES : Hairy/Enhancer of Split
HEY : Hairy/ Enhancer of Split related to YRPW
HIF1 α : Hypoxia-inducible factor 1-alpha
HK : Hexokinase
HUVEC : *Human umbilical vein endothelial cells*
ICAM-1 : Immunoglobuline superfamily intercellular adhesion-1
IL- : Interleukines
IMC : Indice de Masse Corporelle
INSR: Récepteur à l'insuline
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
IRS : Insulin receptor substrate
JAG : Jagged
Ic NICD : Notch IntraCellular Domain
LHS : Lipase hormono-sensible
LKB1 : Liver kinase B1
LNR : Lin-Notch Repeats
LPL : lipoprotéine lipase
MAG : Monoacylglycerol
MAML : Mastermindlike-1
MAPK : MAP kinase-activated protein kinase
MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein-1
MGL : Monoacylglycérol lipase
MIP : Macrophages inflammatory protein
MLL5 : Mixed lineage leukemia

mTOR : Target-of-rapamycin
NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide
NGF : Nerve growth factor
NO : Nitric oxide
OXPHOS : Phosphorylation oxydative
PEP : Phosphoenolpyruvate
PEST : *Peptide sequence rich in proline, glutamic acid, serine, threonine*
PFK : Phosphofructokinase
PGI : Glucose-6-phosphate isomerase
PGI2 : prostacycline
PGM : Phosphoglycerate mutase
PI3-K : Phosphoinositide 3-kinase
PK : Pyruvate kinase
PKA : Protéine kinase A
PKC : Protéine kinase C
PKG : Phosphoglycerate kinase
PLVAP : Plasmalemma vesicle-associated protein
PPAR : Peroxisome proliferator-activated receptor
QR : Qutient respiratoire
Ras : Ras-like protein
ROS : Reactive oxygen species
S1P : Sphingosine-1-phosphate
S1PR3 : *Sphingosine-1-phosphate receptor 3*
S6K : Ribosomal protein S6 kinase
SASP : Senescence-associated secretory phenotype
SFRP5 : Secreted frizzled-related protein 5
SHBG : Sex hormone-binding globulin
SREBP1 : Sterol regulatory element-binding protein 1
SREBP1c : Sterol regulatory element-binding protein 1c
SVF : Stromal vascular fraction
TA : Tissu adipeux
TAD : *Transcriptional Activation Domain*
TAK1 : Transforming growth factor- β -activated kinase 1
TEP : Tomographie par Emission de Positron
TG : Triglycérides
TPI : Triose-phosphate isomerase
TRBF2 : Telomeric repeat-binding factor 2
TSH : Thyroid-stimulating hormone
UCP-1 : Uncoupling protein 1
VCAM-1 : Vascular cell adhesion molecule-1
VEG : Fascular endothelial growth factor
VLDL : Very-low-density lipoprotein
vWf : Von Willebrand
WAT : White adipose tissue
WHR : Waist to hip ratio

Introduction

I. Tissus adipeux et flexibilité métabolique

Alors qu'il est indispensable à la vie, présent en excès ou en défaut le tissu adipeux devient un facteur de risque de développement de pathologies létales ¹. Pendant de nombreuses années les tissus adipeux ne méritaient que peu, voir aucune mention dans les manuels médicaux et de physiologies. Cependant, depuis les trente dernières années, la recherche a permis de comprendre la part décisive de cet organe pour le maintien des processus physiologiques et notamment métaboliques. Il est aujourd'hui clair que la répartition des masses grasses est un déterminant majeur de la santé cardio-métabolique ^{2,3}.

A. Les tissus adipeux : structure et distribution

Contrairement à la plupart des organes, les tissus adipeux sont multiples avec des anatomies et des fonctions communes mais des traits propres à chaque dépôt ⁴. De plus, ils ont une remarquable capacité de moduler leur taille et leur composition cellulaire dans les conditions physiologiques comme pathologiques ⁵.

1. Généralités

Il existe plusieurs types de tissus adipeux qui peuvent être définis par leurs couleurs, certains parlent même d'une « polychromie adipeuse » puisque l'on retrouve des tissus blancs, des tissus bruns, des tissus dit beiges (émergence de brun dans le blanc) mais aussi des tissus « roses » retrouvés dans les tissus mammaires ⁶. Bien que les types cellulaires majoritaires composant ces tissus soient communs, leurs répartitions et leurs fonctions sont différentes. La plus grande partie du volume cellulaire du tissu adipeux est occupé par les adipocytes matures. Le reste est constitué par les cellules de la fraction stroma-vasculaire (SVF). Les travaux pionniers de l'équipe ont montré à l'aide d'approches réalisées en cytométrie en flux grâce à des anticorps reconnaissant des marqueurs membranaires que la SVF des dépôts blancs. Elle est composée essentiellement de cellules immunes (CD45+) (macrophages, lymphocytes, polynucléaires), de cellules progénitrices (CD45-,CD34+,CD31-) et de cellules endothéliales vasculaires (CD45-, CD34+,CD31+) chez l'homme ⁷ (Figure 1). Chez la souris, les mêmes populations sont retrouvées mais avec le marqueur Sca-1 (Stem cell antigen-1) qui remplace CD34 ⁸. D'autres types cellulaires plus minoritaires sont aussi retrouvés au sein de la SVF tels que des cellules de soutien comme des myofibroblastes et des péricytes/cellules musculaires lisses. Actuellement, les approches utilisant les techniques d'études du transcriptome sans à priori (séquençage d'ARN sur cellule ou noyaux unique) ont permis de mettre en lumière une subdivision bien plus complexe des phénotypes cellulaires et ce pour chaque population cellulaire y compris les adipocytes matures. Ces

nouvelles informations jusqu'à présent uniquement basées sur des analyses moléculaires devront être complétées d'études fonctionnelles afin de préciser le rôle de ces sous-types cellulaires dans la fonctionnalité des dépôts adipeux ⁹⁻¹¹. Cependant, la répartition des populations cellulaires est distincte selon le territoire adipeux considéré, l'état d'adiposité, l'âge et le sexe ^{12,13}, suggérant un lien fonctionnel avec l'homéostasie des dépôts adipeux.

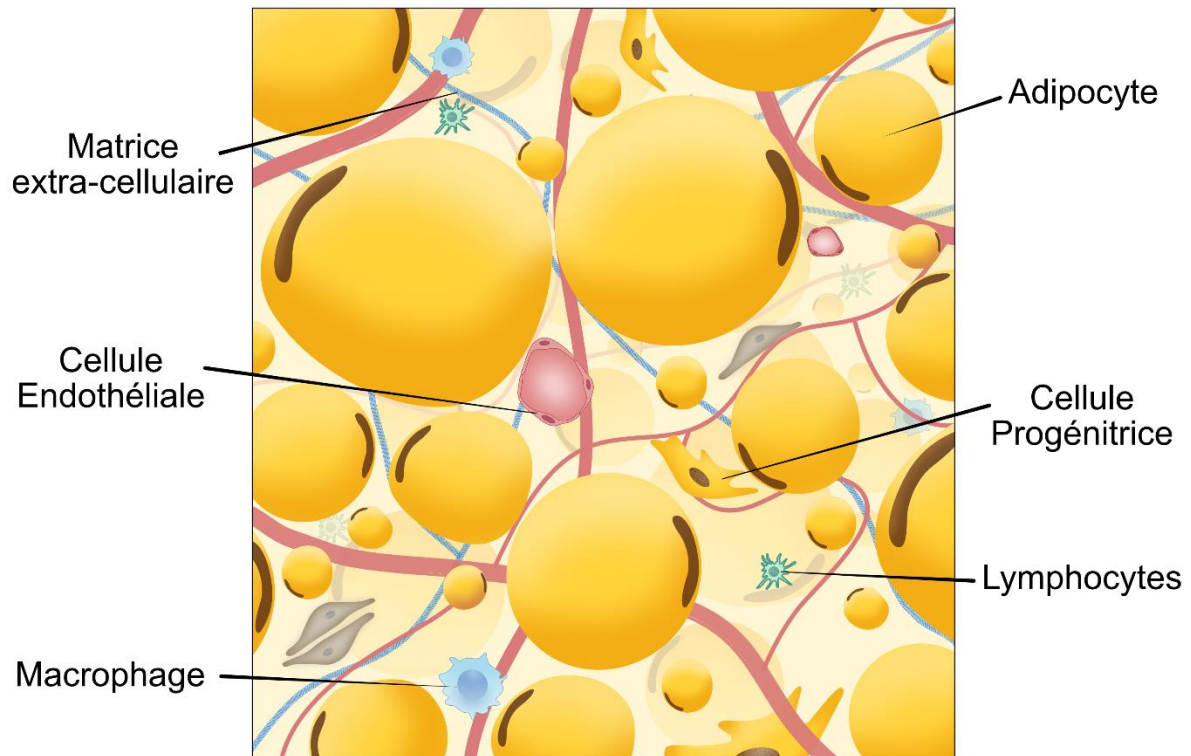


Figure 1 : Composition cellulaire du tissu adipeux

Le tissu adipeux humain est composé d'adipocytes mature et de la fraction stroma-vasculaire. Elle est elle-même composée de cellules progénitrices, de cellules endothéliales et de cellules immunes.

2. Le Tissu adipeux brun

Chez les petits mammifères comme les souris où il joue un rôle thermogénique important ¹⁴, le tissu adipeux brun (BAT) représente entre 2 et 5% de la masse totale d'un individu à l'âge adulte. Dans l'espèce humaine, la présence de tissu adipeux brun avait été décrite depuis de nombreuses années chez l'enfant et détectée par des anatomistes du début du siècle dans les régions sous claviculaires et dorsales ¹⁵. Cependant, c'est l'utilisation de l'imagerie TEP (Tomographie par Emission de Positons) couplée avec des injections de glucose marqué (18F-FDG-PET/CT) dans le diagnostic oncologique qui a permis de mettre en évidence la présence de BAT chez l'adulte. Bien que la présence du BAT chez l'adulte ne soit aujourd'hui plus remise en question, la proportion de graisse brune par rapport au poids total est dans la majorité des cas bien inférieure à celle retrouvée chez les rongeurs. Ces dépôts, chez l'humains peuvent être observés dans les régions sous-claviculaires, de la nuque ainsi que dans les régions dorsales du thorax et de l'abdomen. Chez l'adulte sain d'âge moyen (moins de 50 ans), le

BAT représente environ 1 Kg soit moins de 1% de la masse corporelle ¹⁶. Cependant , plusieurs études ont montré que la quantité de BAT est très variable selon l'exposition au froid, l'activité physique, le sexe ou encore l'IMC (Indice de Masse Corporelle qui est inversement corrélée avec la masse du BAT)¹⁷. Au niveau structurel, le BAT est un tissu fortement vascularisé et avec une innervation sympathique importante. Comme tous les tissus adipeux, les adipocytes forment la population cellulaire majoritaire. Ils sont de forme polygonale avec des diamètres compris entre 15 µm et 60 µm et contiennent plusieurs gouttelettes lipidiques et de nombreuses mitochondries (Figure 2). Leur expression spécifique de la protéine UCP1 (Uncoupling protein 1) au niveau mitochondrial permet aux adipocytes bruns d'exercer une activité thermogénique via le découplage de la respiration mitochondriale. Bien que le rôle du BAT dans la thermogénèse ne soit pas totalement compris chez l'Homme adulte, plusieurs hypothèses convergent vers la capacité d'un réchauffement systémique rapide via sa proximité directe avec le système sanguin. Le tissu adipeux brun a également une fonction de sécrétion de molécules actives regroupées sous le terme « batokines » dont le FGF21, l'IL6, les 12-13diHOME ¹⁸ (Figure 2).

Enfin, il est considéré comme un « puit » à glucose (d'où sa visualisation par 18F-FDG-PET/CT) ¹⁹ mais également à acides gras, cholestérol et acides aminés branchés. Ces différentes fonctions contribuent probablement aux effets bénéfiques protecteurs pour la santé car la présence de BAT chez l'adulte est associée à une diminution de l'apparition de pathologies cardio-métaboliques ²⁰. Déterminer la capacité du BAT à se développer ou à s'activer chez l'adulte dans une proportion qui pourrait affecter la balance énergétique et/ou ses productions spécifiques et in fine la santé reste une question majeure de recherche pour les années à venir.

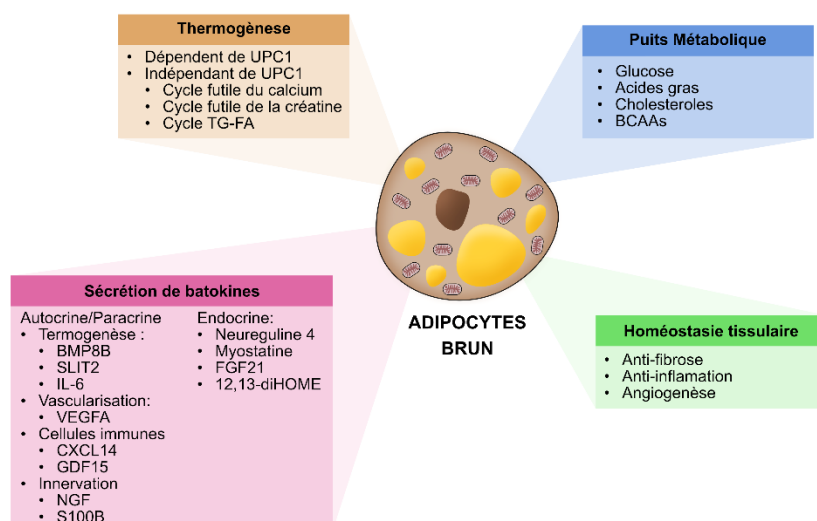


Figure 2 : Les adipocytes bruns : rôles et fonctions

Le rôle primordial du tissu adipeux brun est la thermogénèse, qu'elle soit dépendante de UCP-1 ou non. De plus ce tissu est considéré comme un puit métabolique pour le glucose, les acides gras, le cholestérol et les acides aminés branchés (BCAA), contrôlant ainsi la clairance des métabolites dans la circulation. En outre, les graisses brune et beige sécrètent

diverses molécules (batokines) qui assurent des communications inter organes (endocrine), ainsi que des communications entre les cellules au sein des tissus adipeux (autocrine/paracrine). Ils sont notamment associés à une réduction de la fibrose, de l'inflammation et de l'angiogenèse dans les tissus adipeux. UPC1 : uncoupling protein ; FGF21 : fibroblast growth factor 21 D'après ²¹

3. Les tissu adipeux blancs

Les tissus adipeux blancs sont des tissus conjonctifs, à 80% composés d'adipocytes qui dérivent pour une grande majorité d'entre eux du mésoderme ²². La fonction principale adipocytaire est la libération des substrats énergétiques, les acides gras, en condition de besoin énergétique principalement au cours du jeûne et de l'exercice physique lors de la lipolyse. Il a pendant longtemps été admis que nous naissons avec un stock d'adipocytes défini qui était maintenu jusqu'à la mort et dont la taille variait en fonction des besoins. Des études plus récentes de traçage cellulaire ont permis de montrer qu'il existait un renouvellement adipocytaire d'environ 8 à 10% par an soit un renouvellement complet en 15 ans ²³⁻²⁵.

Dans les tissus adipeux blancs, les adipocytes sont de forme sphérique avec un diamètre pouvant varier de 25 μm à 250 μm chez l'homme. Ils sont caractérisés par une gouttelette lipidique unique qui occupe la quasi-totalité du volume cytoplasmique et qui contient les triglycérides (Figure 3). La vacuole lipidique unique est un marqueur phénotypique de différenciation terminale de l'adipocyte. Il est à noter qu'à ce jour ce phénotype uniloculaire n'est pas retrouvé dans les modèles d'adipocytes *in vitro* et donc les modèles précliniques restent donc nécessaires pour étudier le métabolisme adipocytaire. Cette gouttelette lipidique est un organelle très dynamique, constitué en grande partie de triglycérides et d'esters de cholestérols. Elle est délimitée par une monocouche de phospholipides elle-même entourée par des protéines qui participent à sa formation, son maintien et à la mobilisation des triglycérides. Parmi les protéines les plus présentes, on retrouve les périlipines (5 formes chez les eucaryotes) qui stabilisent les gouttelettes et sont des points d'ancrages pour les autres protéines et enzymes de la gouttelette ^{26,27}.

Adipocyte blanc

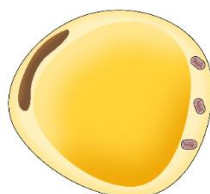


Figure 3 : Adipocyte Blanc

Les adipocytes blancs sont des cellules de 25 μm à 250 μm chez l'homme, leur volume est en grande partie occupé par une vacuole lipidique unique qui contraint le reste des organelles en périphérie.

Dans l'espèce humaine, les tissus adipeux blancs se développent à partir du second trimestre de grossesse, après la naissance et jusqu'à la diversification alimentaire chez le jeune enfant. Une phase d'amaigrissement accompagne la croissance de l'enfant jusqu'à la puberté, caractérisée par un rebond d'adiposité. A l'âge adulte, la part de l'adiposité dans la composition corporelle représente de 30 à 40% du poids total chez les femmes contre entre 15 et 25% chez les hommes ²⁸. D'un point de vue macrostructurel, dans l'espèce humaine, le tissu adipeux blanc est organisé en lobules, délimités par un septum fibreux notamment composé de collagènes de type 1 et 3 ainsi que de fibres d'élastine ²⁹. Chez les rongeurs, cette organisation en lobule n'est pas clairement présente.

4. Fonctions

Les tissus adipeux jouent des rôles multiples dans les processus physiologiques. De par leur hétérogénéité cellulaire, ils exercent des fonctions métaboliques, thermogéniques, endocrines ou même immunes. De plus, les tissus adipeux permettent aussi l'isolation thermique et la protection des organes internes en cas de choc ⁴.

a) L'entrée et devenir des substrats énergétiques dans l'adipocyte

Le signal insuline est le principal médiateur de la voie d'absorption et de stockage du glucose et des acides gras pendant les phases postprandiales. Chez l'adulte sain, le tissu adipeux blanc est responsable de la prise en charge de moins de 5% du glucose ingéré, la plus grande partie (85%) étant stocké par les muscle squelettique ^{30,31}.

Pendant les phases post-prandiales quand les apports en glucose et en lipides sont importants, le processus de lipogenèse dans les dépôts adipeux blancs permet le stockage de l'énergie sous forme de triglycérides (et plus marginalement au niveau du foie et des muscles). Il est à noter que la forme de stockage du glucose, ie. **La glycogénèse**, a été décrite dans les dépôts blancs ³² alors que ce sont le foie et les muscles squelettiques qui sont les principaux réservoirs de glycogène de l'organisme avec respectivement 8% et 1% de leurs poids total ³³. Toutefois, il reste à caractériser le rôle et les mécanismes impliqués dans la synthèse et la mobilisation du glycogène adipeux.

Le glucose entre dans les adipocytes par l'intermédiaire du transporteur constitutif GLUT1 (ubiquitaire) et du transporteur régulé par l'insuline GLUT4. Les acides gras proviennent quant à eux majoritairement chez l'homme de l'hydrolyse au niveau plasmatique des triglycérides des lipoprotéines (les VLDL et les chylomicrons) qui sont par la suite transportés pas les cellules endothéliales selon des mécanismes que nous détaillerons dans ladite partie. Le transport des acides gras dans l'adipocyte est facilité par des FATPs (fatty acid transport proteins) qui permettent l'entrée dans la cellule et les FABPs (fatty acid binding proteins) qui permettent l'adressage des lipides dans les différents compartiments cellulaires ³⁴ (Figure 4).

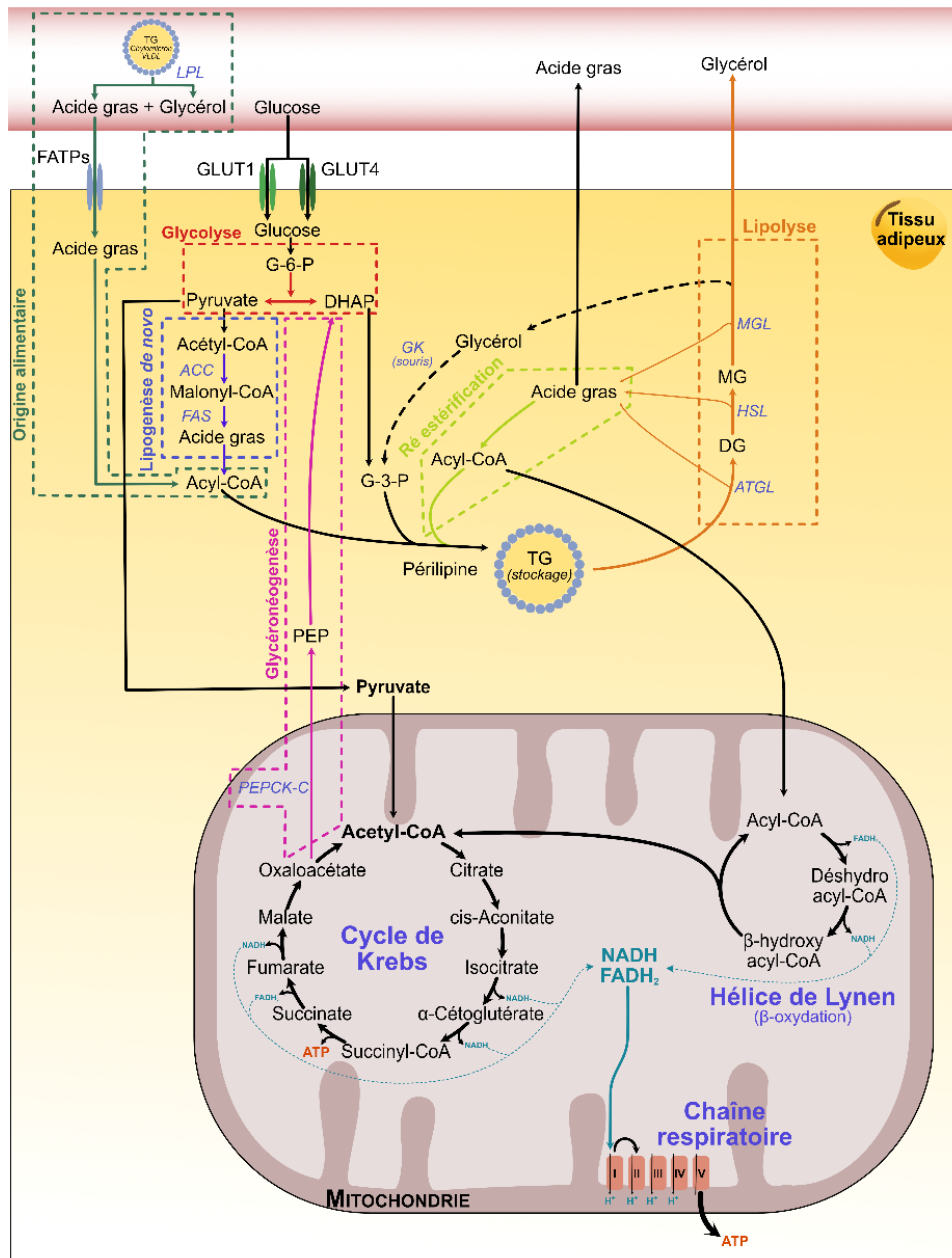


Figure 4 : Métabolisme adipocytaire

La lipogénèse conduit à la transformation des sucres et des acides gras issus de l'alimentation en triglycérides. Au niveau de la lumière endothéliale la lipoprotéine lipase permet l'hydrolyse des Chylomicron et des VLDL issus de l'alimentation pour former des acides gras et du glycérol. Les acides gras entrent ensuite dans l'adipocyte via les transporteurs FATPs alors que le glucose est quant à lui transporté par les transporteurs GLUTs. Les acides gras sont par la suite convertis en Acyl-CoA. En parallèle la glycolyse permet la synthèse à partir du glucose de G-3-P et dans le cas de la lipogénèse de novo de d'acyl-CoA. Il est aussi à noter que le G-3-P peut aussi être produit via le DHAP (un produit de la glycolyse) ou chez la souris par la glycéro kinase qui convertit le glycérol en G-3-P. Les acyl-CoA et le G-3-P permettent la formation de triglycérides via une suite de transformation enzymatiques. Les triglycérides produits sont stockés dans la vacuole lipidique. Pendant la lipolyse les triglycérides sont mobilisés à partir de la gouttelette lipidique pour être transformés en acides gras et glycérol via 3 étapes enzymatiques hautement contrôlées. Une partie des acides gras est ré-estérifiée. Pour son métabolisme propre l'adipocyte est capable d'utiliser les produits de la glycolyse comme le pyruvate pour alimenter son cycle de Krebs et in fine la chaîne respiratoire. Il peut en outre utiliser une partie des acyl-CoA qui peuvent être β-oxydés dans l'hélice de Lynen et ainsi produire des acétyl-CoA qui peuvent à leur tour alimenter le cycle de Krebs. LPL : Lipoprotéine lipase ; FATP : Fatty acid transport protein ; GLUT : Glucose transporter ; G-6-P : Glucose-6-phosphate ; DHAP : Dihydroxyacétone phosphate ; GK : Glycerol kinase ; G-3-P : Glycérol-3-phosphate ; ATGL : Adipose triglyceride lipase ; HSL : Hormone-sensitive lipase ; MGL : Monoacylglycérol lipase ; TG : Triglycéride ; DG : Diacylglycérol ; MG : Monoacylglycérol ; PEP : Acide phosphoenolpyruvique

b) La formation des triglycérides

Les triglycérides sont des macromolécules constituées d'un squelette carboné, sur lequel viennent se greffer 3 acides gras sans spécificité³⁵. Le glycérol-3-phosphate est dérivé du dihydroxyacétophosphate (DHAP), un intermédiaire de la glycolyse. Les acides gras sont estérifiés par des acyls-transférases (Figure 4). A noter que les gouttelettes lipidiques sont formées à partir du réticulum endoplasmique qui abrite les enzymes nécessaires à la dernière étape de conversion des diacylglycérols en triglycérides (les DGAT : Diacylglycérol O-acyltransférase)³⁶. D'autres protéines participent à la formation de la gouttelette lipidique. C'est le cas notamment de la seipine qui interagit avec les triglycérides et favorise leurs flux du réticulum endoplasmique vers la gouttelette lipidique en maintenant des contacts fonctionnels entre les deux organites^{37,38}. Une mutation invalidante de cette protéine est responsable d'une forme grave de lipodystrophie³⁹.

c) La lipogenèse de novo

La lipogenèse *de novo* correspond à la synthèse d'acides gras à partir de glucose. Après une dégradation en pyruvate via les processus de glycolyse, l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) et la synthase des acides gras (FAS, Fatty acid synthase) sont mises en jeu successivement pour catalyser la formation d'acides gras à longue chaîne (Figure 4). Au même titre que ceux provenant de la circulation, ces acides gras peuvent être estérifiés pour former des triglycérides. Il est important de noter que ce processus est présent dans le foie et dans le tissu adipeux chez le rongeur. Chez l'homme, il existe une lipogenèse de novo au niveau hépatique dans les tissus adipeux, plusieurs études ont montré que ce mécanisme jouerait un rôle quantitativement mineur dans la formation d'acides gras destinées au stockage. Cependant, les acides gras issus de cette voie semblent jouer un rôle majeur dans les mécanismes de communication inter-cellulaire via les lipides notamment la sensibilisation à l'insuline.⁴⁰

d) La lipolyse

Lors de la lipolyse, les triglycérides (TG) sont hydrolysés successivement en diacylglycérols (DAG) et monoacylglycérols (MAG), libérant 3 molécules d'AG et d'une molécule de glycérol par molécule de triglycéride. Trois enzymes sont mises en jeu : l'*adipose triglycéride lipase* (ATGL), la lipase hormono-sensible (LHS) et enfin la *monoacylglycérol lipase* (MGL) (Figure 4). La lipolyse est un mécanisme hautement régulé, la LHS étant la cible majeure de ces régulations principalement par des phosphorylations. Les catécholamines, via les récepteurs à 7 domaines transmembranaires bêta-adrénergiques couplés aux protéines Gα s, de type β1- et β2-AR chez l'homme et β1-, β2-AR et β3- chez la souris, augmentent les taux intracellulaires d'AMPc via l'activité de l'adénylate cyclase et l'activité de la PKA responsable de l'activation via phosphorylation activatrice de la LHS. Chez l'homme, le peptide natriurétique ANP via sa liaison sur les récepteurs NP-RA active la guanylate cyclase et

l'augmentation des taux de GMPc active la PKG et la LHS. Chez la souris, cette voie est minoritaire en situation de thermoneutralité mais est active lors de la mise au froid des animaux⁴¹ (Figure 5). La souris présente également d'autres activateurs lipolytiques qui lui sont spécifiques tels que l'ACTH, voie activée en situation de jeûne via le récepteur MC2. La TSH et le glucagon ont été impliqués comme stimulateur de l'activité lipolytique chez les rongeurs, cependant les données chez l'homme sont controversées et pourraient être mises en jeu dans certains contextes pathologiques^{42,43}. Enfin, certaines hormones telles que les glucocorticoïdes et les œstrogènes sont considérés comme des potentiateurs via des effets sensibilisants ceux des catécholamines principalement^{43,44}.

L'insuline est un puissant inhibiteur de la lipolyse via son action sur la PI3-K puis la PKB. Elle inhibe la production d'AMPc via l'activation de la phosphodiesterase (majoritaire 3B). Les catécholamines, via les récepteurs α 2-adrénergiques couplés aux protéines G α i (présents uniquement chez l'homme et exprimés de façon dépendante de la taille adipocytaire), peuvent être anti-lipolytiques⁴³ (Figure 5). Enfin les dérivés intermédiaires métaboliques tels que l'adénosine via les récepteurs A1R, les corps cétoniques via les récepteurs HCAR2 (GPR109A) et HCAR3 (GPR109B), le lactate via le récepteur HCAR1 (GPR81), le succinate via le récepteur GPR91 et les acides gras eux-mêmes via les récepteurs FFAR4/GPR20 couplés à G α i, sont anti-lipolytiques⁴³. Ces intermédiaires participent probablement à des boucles de rétrocontrôle permettant la régulation fine de la libération des acides gras.

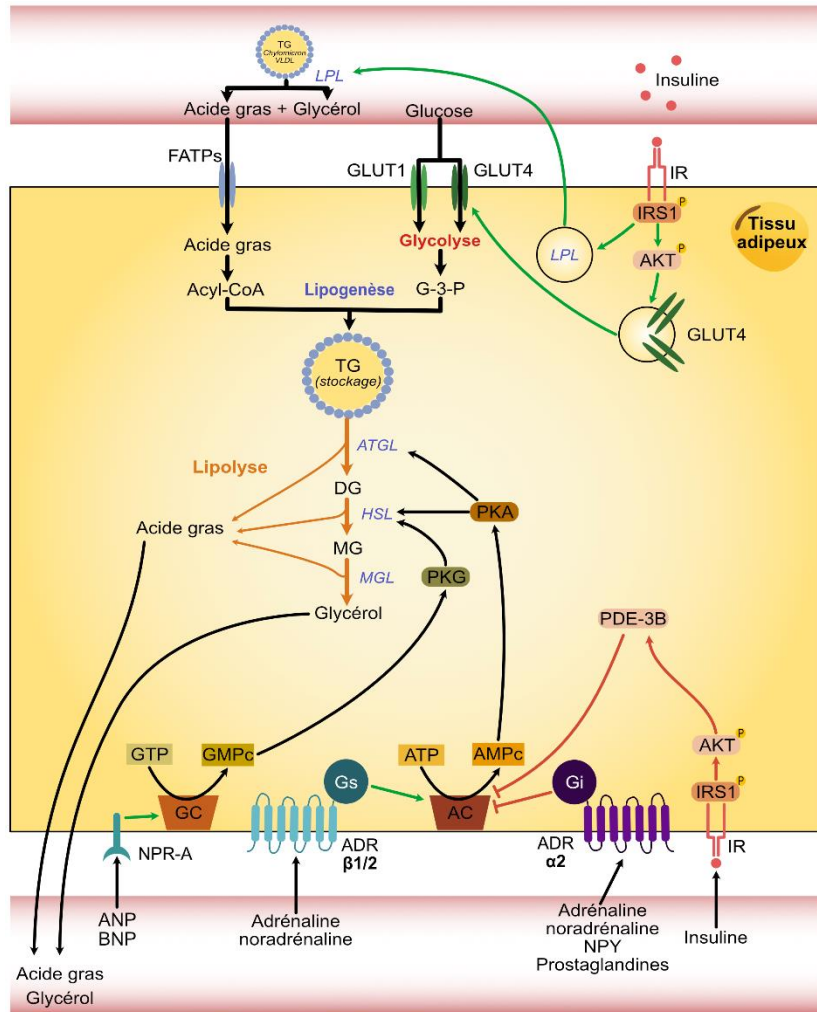


Figure 5 : Contrôle du métabolisme adipocytaire

LPL : Lipoprotéine lipase ; FATP : Fatty acid transport protein ; GLUT : Glucose transporter ; G-6-P : Glucose-6-phosphate ; IR : Insuline receptor ; GK : Glycerol kinase ; G-3-P : Glycéraldéhyde-3-phosphate ; ATGL : Adipose triglyceride lipase ; HSL : Hormone-sensitive lipase ; MGL : Monoacylglycérol ; TG : Triglycéride ; DG : Diacylglycérol ; MG : Monoacylglycérol ; PKA : Protéine kinase A ; PKG : Protéine kinase G ; NPR-A : Natriuretic peptide receptor ; GC : Guanylate cyclase ; ADR : Récepteur adrénergique ; AC : Adénylate cyclase ; PDE-3B : Phosphodiesterase 3B

e) La re-esterification

Le processus de ré-estérification permet le recyclage des acides gras issus de la lipolyse pour reformer des triglycérides. Ce mécanisme représente environ 30% des acides gras libérés pendant la lipolyse dans des conditions physiologiques⁴⁵. Pour être réutilisé comme squelette carboné pour former des triglycérides, le glycérol issu de la lipolyse doit être transformé en glycérol-3-phosphate par la glycérol kinase⁴⁶. Cette enzyme présente dans le tissu adipeux chez la souris est absente chez l'Homme, cependant on la retrouve dans le foie chez les deux espèces. Ainsi, dans l'espèce humaine la glycéronéogenèse est nécessaire pour la ré-estérification⁴⁵. Ce mécanisme consiste principalement en la conversion de l'oxaloacétate issu du cycle de Krebs en PEP par la PEPCk-C (cytoplasmic

phosphoenolpyruvate carboxykinase) puis en DHAP qui peut à son tour être transformé en glycérol-3-phosphate (Figure 4). La PEPC-C peut être régulé de façon positive par les agonistes betas adrénergiques, la Thiazolidinedione (ligand PPAR γ) ainsi que les acides gras et négativement par le glucose et les glucocorticoïdes ⁴⁷. D'autres ont par ailleurs proposé que le glycérol-3-phosphate puisse être produit à partir des stocks de glycogène présent dans l'adipocyte ³².

f) La beta-Oxydation

Bien que les mécanismes de consommation énergétique propre à son fonctionnement restent encore peu définis, les adipocytes, en réponse à une stimulation lipolytique β -adrénergique, sont capable d'utiliser une partie des acides gras pour produire l'énergie nécessaire à leur propre fonctionnement via la β -oxydation (Figure 4). Le signal catécholaminergique entraine une phosphorylation du facteur STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) qui a pour effet de rediriger une partie des acides gras vers la production énergétique au détriment de la ré-estérification. Ainsi la délétion spécifique aux adipocytes de STAT3 entraine une dysfonction adipocytaire en faveur de l'augmentation de la taille de la gouttelette lipidique et d'une augmentation de la masse grasse chez les animaux mis sous régime gras ⁴⁸.

g) La thermogénèse

Dans les tissus adipeux brun le mécanisme thermogénique est sans frisson (i.e. indépendant de l'activité musculaire) et centré sur le métabolisme mitochondrial. Contrairement au rôle bien établi des mitochondries dans la phosphorylation oxydative pour générer de l'ATP via la chaîne de transfert des électrons et l'ATP synthase, les mitochondries des tissus adipeux bruns produisent de la chaleur en découplant le transport d'électrons de la synthèse de l'ATP. La protéine découplante UCP-1 dissipe le gradient de protons à travers la membrane mitochondriale interne, produisant ainsi de la chaleur ⁴⁹. Pour alimenter la chaîne respiratoire les adipocytes brun utilisent notamment des acides gras comme substrat énergétique, cependant la littérature ne fait pas consensus quant à la provenance de ces lipides ⁵⁰. Alors qu'il a été longtemps pensé que les acides gras utilisés pour la thermogénèse des adipocytes brun provenait de la lipolyse des gouttelettes lipidiques des adipocytes brun induite par des signaux catécholaminergiques, des études plus récentes montrent que le blocage de la lipolyse dans des modèles murin délétés pour une lipase (ATGL) n'est pas un frein à la thermogénèse ⁵¹. De plus des études ont montrés CD36/FAT, un transporteur d'acides gras présent à la membrane plasmique des adipocytes bruns, est nécessaire à la thermogénèse ⁵². Ces résultats sont à considérer avec prudence puisque l'ATGL n'est pas la seule lipase adipocytaire, les acides gras ne sont probablement pas la principale source énergétique pour la thermogénèse et d'autres systèmes thermogéniques indépendant de UCP-1 existe dans le tissu adipeux brun et pourraient expliquer l'absence de dégradation des thermogénèses avec l'inhibition de la lipolyse. La thermogénèse est activée par des

signaux catécholaminergiques, via le récepteur adrénergique β_3 , induit par le froid et la prise alimentaire au niveau central^{53,54}. (Figure 6)

L'activité d'UCP-1 est sans aucun doute un moteur essentiel de la thermogénèse. Néanmoins, des études menées ces dernières années ont permis d'identifier plusieurs voies thermogéniques indépendantes d'UCP-1 dont il a été démontré qu'elles participaient à la régulation de l'homéostasie énergétique du corps entier. Jusqu'à aujourd'hui 3 mécanismes ont pu être identifiés :

Le cycle futile du calcium : Les niveaux de calcium intracellulaire sont étroitement régulés entre l'absorption dans le réticulum endoplasmique par la calcium ATPase du réticulum (SERCA) et la libération par les récepteurs de la ryanodine (RyR) ou les récepteurs de l'inositol trisphosphate (IP3R)⁵⁵. Dans des conditions où l'ADP est limitant (rapport ATP/ADP élevé) et lorsque la concentration cytosolique de Ca^{2+} est élevée, l'hydrolyse de l'ATP par la SERCA est découplée du pompage du Ca^{2+} dans le lumen du réticulum endoplasmique, ce qui entraîne une consommation constante d'ATP et une augmentation de la dissipation d'énergie par la SERCA qui devient exothermique. Cette voie est stimulée par une exposition au froid qui entraîne l'activation des récepteurs adrénergiques α_1 , qui déclenche un influx de Ca^{2+} intracellulaire, ainsi que par une activation de la signalisation via les récepteurs adrénergiques β_3 , qui déclenche la libération de Ca^{2+} du réticulum endoplasmique en favorisant l'activité de RyR⁵⁵. Il est à noter que chez l'homme la mutation de RyR est impliquée dans l'apparition de l'hyperthermie maligne per opératoire causé par les composés anesthésiques fluorés. (Figure 6)

Cycle futile de la créatine : Dans des conditions limitant l'ADP, la phosphorylation de la créatine par la créatine kinase mitochondriale se produit simultanément avec l'hydrolyse de la phosphocréatine, créant ainsi un cycle induit par la créatine avec un bilan exothermique⁵⁶. Dans le même sens une délétion du transporteur de créatine SLC6A8 à la membrane plasmique réduit la dépense énergétique chez la souris⁵⁷. Cependant, la façon dont ce cycle est induit et régulé en réponse à des stimuli externes reste inexplorée. (Figure 6)

Cycle de conversion des triglycérides et des acides gras : L'hydrolyse des triglycérides est catalysée par une série de lipases : l'ATGL, HSL et la MGL, pour générer du glycérol et des acides gras libres. Les acides gras peuvent également être réestérifiés en triglycérides. C'est la production du glycérol 3 phosphate impliquant une utilisation de l'ATP qui va permettre la production de chaleur. Ces mécanismes sont activés via les voies que nous avons décrites dans les parties précédentes. Il est aussi à noter que l'exposition au froid chez la souris favorise la production d'acides gras par lipolyse et leur ré estérification dans les tissus adipeux⁵⁸. (Figure 6)

Des fibres somatosensorielles afférentes provenant des ganglions de la racine dorsale (GDR) ont été récemment mises en évidence dans le tissu adipeux chez le rat, le hamster et la souris. La destruction des neurones GDR innervant le tissu adipeux inguinal chez la souris a entraîné une augmentation de l'expression dans les cellules adipeuses des programmes activés par les neurones sympathiques, y compris ceux dans l'apparition des adipocytes bruns, suggérant que cette innervation pourrait contrer les signaux induits par l'activation du système nerveux sympathique⁵⁹. Il reste à caractériser les stimuli physique et chimique impliqués et de déterminer leur présence chez l'homme.

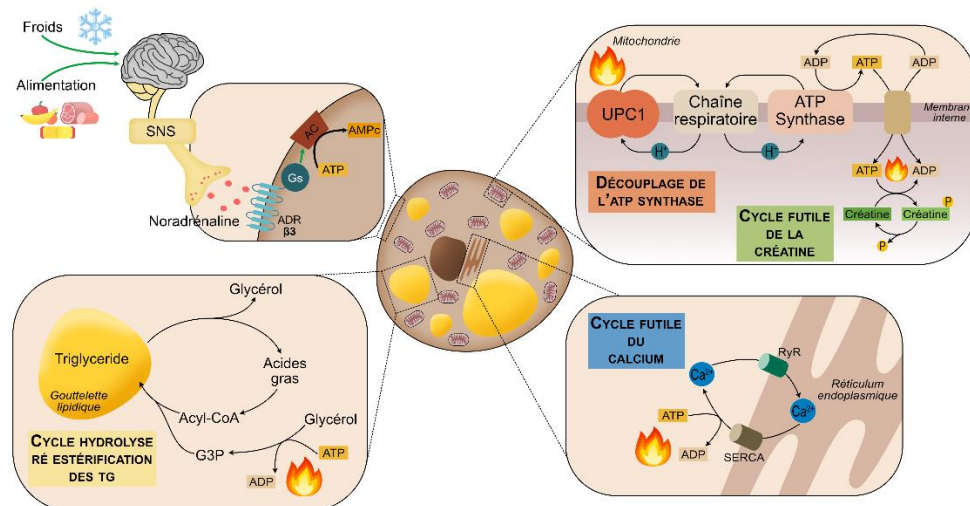


Figure 6 : Thermogénèse dans les adipocytes bruns : dépendante ou indépendante de UCP-1

Le découplage de la respiration mitochondriale par UCP1 : L'UCP1 est située dans la membrane interne de la mitochondrie et découple le gradient de protons de la synthèse de l'ATP et produit ainsi de la chaleur. Le cycle du substrat de la créatine, qui implique la phosphorylation dépendante de l'ATP de la créatine par la créatine kinase localisée dans les mitochondries en phosphocréatine et la déphosphorylation de celle-ci par des diphosphatases. Le cycle futile du Ca^{2+} dans le réticulum endoplasmique implique l'absorption de Ca^{2+} dans le réticulum endoplasmique par la calcium ATPase 2B (SERCA2B), couplé à l'hydrolyse de l'ATP et à la production de chaleur, et sa libération par le récepteur de la ryanodine 2 (RYR2) et le récepteur de l'inositol trisphosphate (IP3R). La lipolyse des triglycérides génère du glycérol et des acides gras, qui peuvent être réestérifiés en triglycérides. C'est la production du glycérol 3 phosphate impliquant une utilisation de l'ATP qui va permettre la production de chaleur. SNS : Système nerveux sympathique ; ADR : récepteurs adrénergiques ; AC adénylate cyclase ; UCP-1 : uncoupling protein ; G3P : Glycérol 3 phosphate ; RyR : Récepteur de la ryanodine ; SERCA : réticulum endoplasmique Ca^{2+} -ATPase. D'après^{21,60}

h) La fonction endocrine du tissu adipeux

La fonction sécrétoire des tissus adipeux a été mise en évidence il y a 30 ans avec la découverte des premières adipokines (hormones produites par le tissu adipeux) : la leptine⁶¹ et l'adiponectine⁶². Plus récemment, l'asprosinine a été mise en évidence. En plus des adipocytes, les autres types cellulaires résidents des tissus adipeux sont capables de produire un grand nombre de molécules bioactives qui ont des effets autocrines, paracrines ou systémiques⁶³. Le tissu adipeux est ainsi impliqué dans une grande variété de régulations physiologiques telles que la régulation de l'appétit, le métabolisme énergétique, les fonctions neuro-endocrines et les fonctions immunes. Cette communication inter-organe est finement régulée par le statut énergétique et le cycle circadien.

(1) La leptine

La leptine est une hormone produite par les adipocytes. Décrite en 1994 ⁶¹, elle a permis d'ouvrir la recherche sur le tissu adipeux et l'obésité à la régulation hormonale et centrale. La leptine agit au niveau central en réduisant l'appétit et stimulant la dépense énergétique. Lorsque la leptine active son récepteur (Ob-R) à la surface des neurones à pro-opiomelanocortine (POMC), de ceux de l'agouti-related protein (AgRP) et du neuropeptide Y ⁶⁴, elle inhibe les récepteurs MC4R du noyau paraventriculaire, le siège de la régulation de la prise alimentaire. Son expression est sous le contrôle du cycle circadien. Sa concentration plasmatique est fonction de l'adiposité et augmente en situation post-prandiale alors que pendant le jeûne, les niveaux de leptine déclinent, entraînant une augmentation de la sensation de faim et une diminution concomitante de la dépense énergétique. Comment la leptine est régulée dans l'adipocyte reste à être complètement élucidée. Cependant l'insuline, les glucocorticoïdes et les catécholamines ont été impliqués et plus récemment un intermédiaire métabolique, le succinate via sa liaison au récepteur au succinate de type 1 (SUCNR1) a été montré comme contrôlant l'expression de la leptine adipocytaire via l'horloge circadienne d'une façon dépendante des voies AMPK/JNK-C/EBP α ⁶⁵. La situation d'obésité chez l'homme est associée à une augmentation des niveaux plasmatiques de leptine provoquant à une résistance centrale ⁶⁶. La mutation, voir la suppression des récepteurs à la leptine ou d'un des acteurs de la voie de signalisation au niveau central entraîne l'apparition d'un phénotype hyperphagique associé à une obésité (syndrome de Bardet-Biedl) ⁶⁷. Le modèle de souris ob/ob présentant une délétion du gène de la leptine est utilisé comme modèle d'obésité génétique et les souris db/db du récepteur de la leptine comme modèle de diabète. Chez les patients Bardet-Biedl, un traitement par setmelanotide (agoniste de MC4R qui régule l'appétit en shuntant le récepteur à l'insuline ou les acteurs défaillant de la voie) ⁶⁸ peut être proposé alors que la métréleptine, analogue recombinant de la leptine humaine, est proposée dans la lipodystrophie généralisée congénitale ou acquise, avec un déficit en leptine.

(2) L'adiponectine

L'adiponectine est une adipokine produite spécifiquement par les adipocytes matures sous forme monomérique et qui est sécrétée dans la circulation sanguine selon plusieurs formes multimériques. L'adiponectine représente une part importante des protéines plasmatiques (0.01-0.05%) ⁶⁹. Il existe 2 récepteurs à l'adiponectine avec AdipoR1 plus exprimé dans le muscle squelettique et AdipoR2 dans le foie. Ces récepteurs sont à 7 domaines transmembranaires et la fixation du ligand sur son récepteur entraîne l'augmentation de la phosphorylation de l'AMPK et de PPAR α . Les effets métaboliques de l'adiponectine sont une augmentation de l'oxydation des acides gras et de l'utilisation du glucose ^{70,71}. Ainsi l'adiponectine participe au maintien de la flexibilité métabolique et est considérée comme sensibilisatrice à l'insuline. L'adiponectine a aussi des effets anti-inflammatoires. Cette perte de l'effet

anti inflammatoire est associé à une augmentation des niveau de TNF- α , de CRP et de l'IL6 en faveur de l'instauration de désordre métabolique ^{72,73}. Dans les pathologies métaboliques dont l'obésité, une diminution des niveaux plasmatiques d'adiponectine a pu être décrite.

(3) L'asprosinine

L'asprosinine qui est induite par le jeûne dans l'adipocyte mature, est un polypeptide glucogénique issu du clivage de la partie c-terminal de la profibrilline (FBN1). Elle est décrite pour la première fois en 2016 et des mutations dans le gène FBN1 sont associées à une forme de lipodystrophie partielle. Les patients, bien que euglycémiques, présentent une diminution des niveaux d'insuline plasmatique ⁷⁴. La libération adipocytaire d'asprosinine dans la circulation permet l'activation de récepteurs couplés aux protéines G et à l'activation AMPc-dépendante au niveau hépatique. L'activation de ces voies conduit à une libération rapide de glucose. D'autres études ont par ailleurs montré que ce polypeptide pouvait avoir des effets directs sur la régulation de l'appétit (orexigène)⁷⁵, l'insulinorésistance musculaire et la production d'insuline pancréatique ⁷⁶. Chez l'adulte en situation d'obésité, l'asprosinine est augmentée ⁷⁷. Ainsi des traitements anti-asprosinine de l'obésité sont à l'étude ⁷⁸. Malgré tout il s'agit de rester prudent quant au développement possible au vu de la découverte récente du peptide qui limite encore fortement les connaissances, notamment des classes de récepteurs activées par cette molécule.

(4) Les autres adipokines

D'autres facteurs sont produits par les dépôts adipeux dont des interleukines (IL6, CXCL8 (IL8)) ainsi que des chimiokines et des facteurs inflammatoires dont le TNF α ⁷⁹. Ces productions sont augmentées avec l'état d'obésité et contribuent à l'établissement d'un état inflammatoire chronique de bas niveau qui serait un contributeur important de la résistance à l'insuline via la phosphorylation inhibitrice sur les résidus thréonine du substrat du récepteur de l'insuline IRS1 ⁸⁰. Il est à noter que ces sécrétions inflammatoires ne sont pas modulées par l'état à jeun/nourri.

D'autres facteurs sont produits et libérés en fonction de l'état métabolique, dont ANGPTL4, qui est un inhibiteur de la lipoprotéine lipase ^{81,82} et qui est augmentée par le jeûne ⁸³; les niveaux plasmatiques de VEGFA sont également augmentés avec le jeûne prolongé ainsi que le FGF21 ⁸⁴ (augmenté lors d'un jeûne court dans le foie et prolongé dans le tissu adipeux), alors que les niveaux plasmatiques de chémérine (RARRES2) sont diminués ⁸⁵.

5. La répartition des tissus adipeux blancs :

Le tissu adipeux blanc est retrouvé dans 3 régions anatomiques principales chez l'homme ⁸⁶ et sont présentés en figure 7 :

- **Les tissus adipeux intra-abdominaux ou viscéraux** situés dans les cavités péritonéales ou médiastinales. Parmi eux, on retrouve le tissu adipeux omental, mésentérique, rétropéritonéal, gonadique et péricardique.
- **Les tissus adipeux sous-cutanés abdominaux** situés entre la peau et les feuillets musculaires et péritonéaux au niveau de l'abdomen. Ces tissus peuvent eux même être dichotomisés suivant leur position par rapport au *fascia superficialis* en sous cutané abdominal profond et superficiel ⁸⁷.
- **Les tissus adipeux sous-cutanés inguinaux ou glutéo-fémoraux** sont situés au niveau du bassin, des hanches et des membres inférieurs avec une localisation interne entre la peau et les muscles sous-jacents.

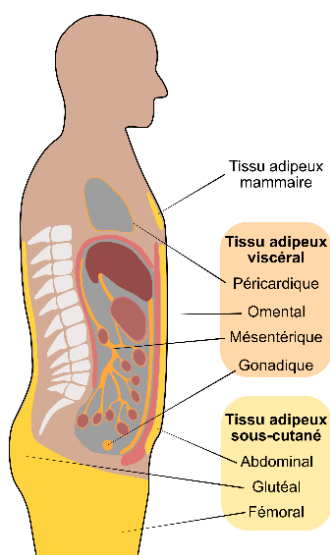


Figure 7 : Répartition des dépôts adipeux blancs chez l'homme

Les dépôts adipeux blanc sont répartis selon leur localisation anatomique.

6. Les différences inter- espèces : les rongeurs

Chez le rongeur, la répartition des dépôts est différente de celle retrouvée dans l'espèce humaine comme présenté dans la figure 8. Le tissu adipeux sous-cutané murin est majoritairement situé pour la région antérieure au niveau dorsal entre les scapulas et jusqu'aux zones axillaires. Dans la région postérieure, on retrouve un dépôt inguinal qui s'étend de la région dorsolombaire à l'espace fémoral. Ces tissus sous-cutanés inguinaux sont comparables en termes de localisation aux tissus adipeux glutéofémoraux humains.

Contrairement à l'espèce humaine, les rongeurs présentent un réticulum interstitium et un panniculus carnosus qui séparent les tissus adipeux du derme et sous-cutané profond^{86,88}. Les tissus adipeux viscéraux chez le rongeur sont principalement localisés autour et reliés aux gonades (périgonadiques), à proximité des reins (rétropéritonéal et péri rénal) et constitue le mésentère. Le tissu adipeux mésentérique du rongeur est le plus proche anatomiquement des tissus viscéraux chez l'Homme cependant sa difficulté d'accès et les faibles quantités retrouvées font, dans la grande majorité des études choisir le tissu adipeux périgonadique qui peut être considéré comme un tissu péri viscéral⁸⁶. Le tissu adipeux omental qui est fortement hypertrophié en condition obésogène chez l'humain n'est présent qu'en quantité infime chez les rongeurs, limitant fortement la capacité d'étude. Une étude a cependant réussi à montrer leur forte ressemblance anatomique et structurelle avec une connexion directe avec l'estomac⁸⁹ (Figure 8). Ainsi, bien que répartie suivant les mêmes plans d'organisation, les dépôts adipeux des humains et des rongeurs ne sont pas totalement identiques, ces informations doivent être prises en considération lors de l'utilisation de modèles animaux.

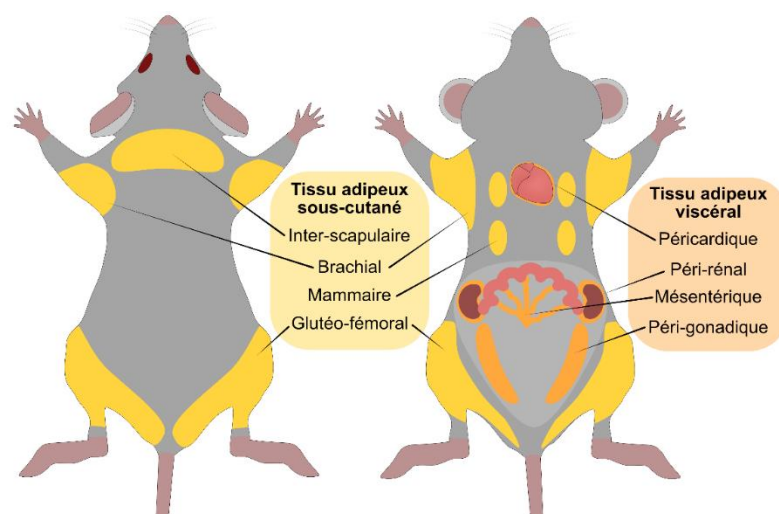


Figure 8 : Répartition des dépôts adipeux chez la souris

Chez la souris les dépôts adipeux peuvent être répartis en 2 grandes régions : Les tissus adipeux sous-cutanés et viscéraux. Ils sont eux même subdivisés en localisations adipeuses.

B. L'obésité et les pathologies cardio-métaboliques

L'obésité est définie par l'organisation mondiale de la santé (OMS) comme un excès de masse grasse et est reconnue par l'organisation mondiale de la santé comme une « épidémie » mondiale. L'adiposité d'un individu est évaluée via l'indice de masse corporelle (IMC) calculé selon la formule suivante (Kg/m^2) = $\frac{poids(Kg)}{taille(m)^2}$. Un individu entre 18.5 et inférieur ou égal à 25 kg/m^2 est considéré en état normopondéré, avec un IMC supérieur à 25 est considéré en état de surpoids, tandis qu'un IMC supérieur à 30 est indicateur d'une situation d'obésité. Cet indice, créé par Adolphe Quetelet au XIX^{ème} siècle, est plutôt simple à mettre en place en clinique, cependant il est nécessaire d'en

connaître les limites. En effet, ne prenant en compte aucun facteur tel que le sexe, l'âge, l'origine ethnique ou la masse musculaire, qui pourrait mener à une estimation fautive de l'état adipeux, plusieurs proposent une évolution de cet indice pour intégrer ces facteurs. L'exemple le plus parlant étant le cas des sportifs de haut niveau avec une musculature importante, qui malgré des masses grasses bien inférieures à la moyenne, pourraient être considérés en surpoids voir en état d'obésité avec la simple mesure de l'IMC. Des formules de l'IMC corrigées par le sexe ou l'âge existent, mais peinent à être convaincantes en fonction de l'ethnicité ou de l'activité physique⁹⁰. Des estimations plus précises de l'adiposité peuvent être réalisées par tomographie par émission de positron ou par résonance magnétique, qui permettent de déterminer de façon quantitative la masse de tissus adipeux et leur localisation^{91,92}. Ces techniques néanmoins coûteuses et parfois difficiles à mettre en place restent des outils intéressants de validation des méthodes moins invasives.

a) *L'épidémiologie de l'obésité*

Les études épidémiologiques suggèrent que la prévalence de l'obésité affectant environ 14% de la population mondiale adulte en 2020 pourrait atteindre 24% d'ici 2035⁹³. En France, les rapports de La direction de la Recherche, des Études, de l'Évaluation et des Statistiques (DREES) en 2022 indiquent que près d'un français sur deux est en surpoids (45%) et 14% en situation d'obésité. Bien que l'obésité affecte principalement les populations des pays à haut revenu, une hausse dans les pays à revenu faible et intermédiaire a pu être observée⁹³. Il existe également des disparités importantes dans la prévalence de l'obésité selon le sexe, l'âge, l'origine ethnique et le niveau socio-économique. Bien que l'augmentation de l'adiposité corporelle ne soit pas une pathologie *per se*, l'obésité est un facteur de risque favorisant le développement de nombreuses pathologies, notamment le diabète de type 2 (DT2), les maladies cardiovasculaires et certains types de cancer entraînant près de 3 millions de décès chaque année. Les causes de l'obésité sont multifactorielles impliquant : des facteurs génétiques, environnementaux, sociaux et comportementaux.

b) *L'obésité saine versus obésité pathologique*

Des travaux de la littérature basés sur l'observation clinique de l'état de santé des patients en situation d'obésité ont permis de distinguer des patients avec une obésité dite « pathologique », associée à des maladies cardio-métaboliques, et des patients avec une obésité dite « saine » présentant un profil cardio-métabolique relativement favorable^{94,95}. Cependant, cette condition ne peut pas être totalement associée à la bonne santé du fait du risque important que présentent ces patients d'évoluer vers une obésité pathologique⁹⁶. Il est également important de préciser que l'obésité impacte d'autres systèmes biologiques avec notamment des troubles musculo-squelettiques et des altérations de la sphère reproductive qui ne sont pas prises en compte dans cette notion d'obésité dite « saine » qui considère principalement l'absence de pathologies cardio-métaboliques tels que l'hypertension

artérielle, le diabète de type 2, les dyslipidémies et l'athérosclérose ⁹⁵ et parfois étendue à l'inflammation de bas grade et à la stéatose hépatique ⁹⁷. D'un point de vue épidémiologique, ce type d'obésité saine est plus fréquente chez les femmes (entre 11,4 et 43,3% selon l'étude) que chez les hommes (entre 3.3 et 32.1% selon l'étude) et chez les jeunes adultes que chez les personnes âgées (Tableau 1) ⁹⁸.

Tableau 1 : Définition de l'obésité métaboliquement saine

Paramètres métaboliques	Critères modérément stricts	Critères stricts
Obésité avec IMC \geq 30 kg/m ²		
Pression artérielle		
Systolique	\leq 140 mmHg	\leq 130 mmHg
Diastolique	\leq 90 mmHg	\leq 85 mmHg
Traitement antihypertenseur	aucun	aucun
Glycémie à jeun	\leq 7,0 mmol/l	\leq 6,1 mmol/l
	En l'absence de traitement antidiabétique	En l'absence de traitement antidiabétique
Triglycéridémie à jeun	\leq 1,7 mmol/l	\leq 1,7 mmol/l
Triglycéridémie post-prandiale	\leq 2,1 mmol/l	\leq 2,1 mmol/l
	En l'absence de traitement hypolipémiant	En l'absence de traitement hypolipémiant
HDL-cholestérol	> 1,03 mmol/l (homme) > 1,3 mmol/l (femme)	> 1,03 mmol/l (homme) > 1,3 mmol/l (femme)
	En l'absence de traitement hypolipémiant	En l'absence de traitement hypolipémiant
Diagnostic de maladie cardio-vasculaire	Non	Non

D'après ⁹⁹

c) La répartition des dépôts adipeux comme déterminante de la santé

Les données anthropométriques des obèses dits « en bonne santé » ont permis d'identifier le ratio tour de taille sur le tour de hanche (ou *waist to hip ratio*, WHR) comme élément déterminant de la santé cardio-métabolique ^{100,101}. Le WHR est un bon indicateur de la balance de répartition des masses grasses entre le haut et le bas du corps ¹⁰². Des études épidémiologiques utilisant le WHR ajusté à l'indice de masse corporelle (BMI Adj WHR), montrent qu'un WHR élevé, indépendamment de l'IMC, est délétère même chez les individus non obèses (IMC). La quantification par IRM du volume des différents dépôts adipeux viscéraux, abdominaux et glutéofémoraux ajustés au BMI sur une population générale (UK biobank, 40032 participants) par intelligence artificielle, montre une augmentation claire des risques de diabète de type 2 et de pathologies cardiovasculaires avec le volume de tissu adipeux

viscéral et une protection avec le volume de glutéofémoral chez les femmes et les hommes ¹⁰³ (figure 9). La compréhension des mécanismes mis en jeu dans les processus de répartition des dépôts adipeux et leur lien avec la santé cardiométabolique est donc un enjeu majeur sociétal.

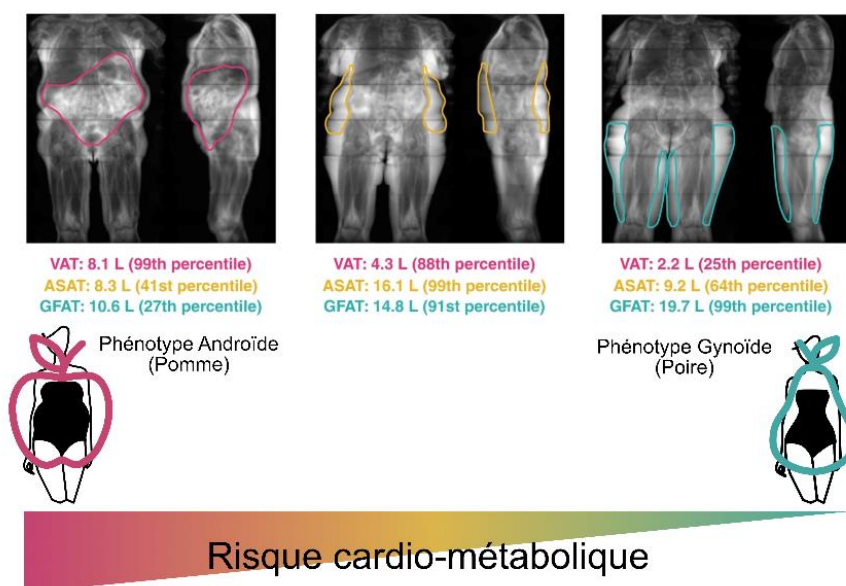


Figure 9 : Répartition de la masse grasse et facteur de risques cardio-métaboliques

Images d'IRM avec une analyse de la répartition des masses grasses selon 3 territoires adipeux par intelligence artificielle. Les trois femmes présentent un IMC similaire (de 29,1 à 29,6 kg/m²) mais des volumes de dépôts adipeux très différents. Les percentiles du volume du dépôt adipeux sont calculés par rapport à un sous-groupe de participantes présentant un IMC entre 25 ≤ IMC < 30 (surpoids). Les auteurs notent que les contours de chaque dépôt sont dessinés comme une aide visuelle et ne reflètent pas la segmentation. Ces répartitions adipeuses peuvent être liées à des phénotypes : Androïdes et gynoïdes qui ont eu même été lié avec un risque ou une protection par rapport aux maladies cardio-métaboliques. VAT, tissu adipeux viscéral ; ASAT, tissu adipeux sous-cutané abdominal ; GFAT, tissu adipeux glutéo-fémoral. D'après ¹⁰³

(1) L'expandabilité et l'hypothèse portale

Bien qu'incomplètes, plusieurs hypothèses ont été émises pour comprendre les liens entre le phénotype de répartition des masses grasses et la santé.

(a) L'expandabilité des dépôts adipeux

La première hypothèse ou « expandabilité des dépôts adipeux » est basée sur le concept du pouvoir tampon protecteur des tissus adipeux vis-à-vis des effets toxiques des lipides en stockant les excès de lipides sous forme de triglycérides neutres. Lorsque l'expandabilité c'est-à-dire la capacité des adipocytes à augmenter leur taille et/ou leur nombre est maintenue, la lipotoxicité est limitée. Si cette capacité est dépassée ou perdue, les lipides se déposent dans des dépôts ectopiques comme au niveau des vaisseaux sanguins, le foie, le muscle et le pancréas dans lesquels ils génèrent des effets toxiques dont une résistance à l'insuline ^{104,105}. Lors d'une prise de poids, il a été montré que les tissus adipeux centraux répondent principalement par une hypertrophie adipocytaire ¹⁰⁶. Un protocole de 8 semaines de suralimentation montre en effet une prise de 2Kg supplémentaires au niveau du tissu adipeux

viscéral sans augmentation du nombre d'adipocyte. Les tissus adipeux glutéofémoraux ont quant à eux tendance à augmenter leur volume par une hyperplasie adipocytaire, c'est-à-dire une augmentation du nombre d'adipocytes dû à une adipogenèse (différenciation adipogénique des progéniteurs) ¹⁰⁶. Le même protocole de suralimentation montre une augmentation de 2.6 millions d'adipocytes dans le tissu adipeux glutéofémoral ¹⁰⁷. Ainsi, le pouvoir tampon du dépôt adipeux glutéofémoral est dépendant de l'adipogenèse et serait donc pratiquement illimité et donc protecteur alors que celui des dépôts centraux est dépendant de l'hypertrophie, qui elle est limitée à un certain diamètre et donc délétère. En accord avec cette hypothèse, chez les patientes atteintes d'obésité, un traitement à la pioglitazone, un agoniste sélectif de PPAR γ , promeut l'adipogenèse au niveau du tissu adipeux fémoral en parallèle d'une diminution de la graisse abdominale et rétablit la sensibilité à l'insuline ¹⁰⁸.

(b) L'hypothèse portale

La seconde hypothèse repose sur la proximité immédiate des dépôts adipeux centraux avec les tissus viscéraux via la veine porte (hypothèse portale). Ainsi, les productions issues de ces tissus impactent rapidement les organes en avant dont le foie. Il a été montré que les flux d'acides gras libres émanant des adipocytes après un jeûne nocturne étaient supérieurs de 50% dans les tissus adipeux centraux comparés à ceux des régions basses du corps. ¹⁰⁹. Pendant les phases postprandiales, il a été montré qu'environ 30% des triglycérides étaient pris en charge dès leur premier passage dans les tissus adipeux avec une capacité d'environ 50% supérieure des tissus adipeux abdominaux par rapport aux tissus glutéofémoraux ¹¹⁰. Ainsi, les tissus adipeux centraux ont un turn-over plus élevé des acides gras et serait mobilisé en réponse à des stress aigus alors que le tissu adipeux glutéo-fémoral serait spécialisé dans le stockage à plus long terme ^{2,111}. Les tissus adipeux viscéraux (omental et mésentérique) sont drainés via la circulation portal. Ainsi, si il existe un turn-over des acides gras augmenté et une masse adipeuse centrale plus importante (comme chez l'homme ou la femme ménopausée), les niveaux d'acides gras libres sont augmentés au niveau de la circulation hépatique favorisant l'apparition de dysfonctions hépatiques et cardiométaboliques ¹¹². De plus, l'hypertrophie adipocytaire des tissus adipeux centraux est associée à une production accrue de cytokines pro-inflammatoires et à l'établissement d'une inflammation systémique chronique de bas grade. Il a été montré que des facteurs de transcription et les cytokines pro inflammatoires telles que NF κ B ou TNF- α favorisent l'instauration d'une insulino-résistance adipocytaire via la sécrétion d'adipokines proinflammatoires hépatique et musculaire ¹¹³. A noter, l'inflammation de bas grade pourrait également participer à limiter l'expandabilité via les effets anti-adipogéniques ¹¹⁴.

(2) Les différences sexuelles

À partir de la puberté, la composition corporelle entre les hommes et les femmes commence à différer, avec chez la femme un développement adipeux environ 10% supérieur à celui des hommes ^{115,116}. En

plus d'une différence d'adiposité totale, les hommes et les femmes présentent généralement une répartition différente des masses grasses comme décrit plus haut ¹¹⁷. Cette distribution différente des masses adipeuses s'accompagne d'un risque de survenue de pathologies cardio-métaboliques plus précoce chez les hommes comparés aux femmes qui sont généralement protégées, en l'absence d'autres facteurs de risques et ce jusqu'à la ménopause ¹¹⁸. Après la ménopause, le risque d'événements cardiovasculaires chez la femme devient équivalent voir supérieur, en fonction du groupe ethnique, à celui des hommes ¹¹⁹. Ce dimorphisme sexuel des risques cardiométaboliques est associé à celui de la répartition des masses grasses ¹²⁰ sans que les mécanismes exacts aient encore pu être élucidés. Plusieurs hypothèses tentent aujourd'hui de répondre à cette question, mais il est probable que la réponse repose sur une combinaison de facteurs.

Les déterminants génétiques et épigénétiques en font partie. Les combinaisons caryotypiques XX et XY définissent le sexe biologique de l'individu à la naissance et donc la production d'hormones sexuelles en fonction des gonades. Cependant, jusqu'à peu, il était difficile d'imputer les différences de répartition des masses grasses à l'expression chromosomique et/ou à celle des stéroïdes sexuels. Des modèles animaux ont été développés pour répondre à cette question avec un caryotype indépendant des gonades, par exemple des animaux XX avec des testicules et des animaux XY avec des ovaires. Les souris XX quelle que soient leurs gonades et donc leurs imprégnations en androgènes ou estrogènes présentent la plus forte proportion de masse grasse mettant en exergue l'implication importante du chromosome X dans l'adiposité ¹²¹. En parallèle, l'analyse des bases de données de GWAS (genome-wide association studies) ont permis de montrer qu'il existe des polymorphismes génétiques associés aux phénotypes de répartition des dépôts adipeux (463 signaux dans 346 loci). Pris indépendamment, ces modifications ponctuelles du génome n'ont montré que des effets faibles sur les paramètres anthropométriques ¹²² mais leur combinatoire permet la détermination du rapport taille sur hanche et ce en fonction du sexe avec un effet plus marqué et une plus grande héritabilité chez les femmes que chez les hommes ^{102,123}. À ces variations génétiques, viennent s'ajouter des variations épigénétiques qui participent à la répartition dimorphique des masses grasses. L'épigénétique étant les modifications par des facteurs externes de la capacité d'exprimer certains gènes sans affecter l'information génétique. Il a notamment été montré que les femmes nées de mères enceintes pendant la famine au Pays-Bas entre 1944 et 1945 avaient une prédisposition à la prise de poids plus importante ¹²⁴. À l'inverse, il a été montré que si la mère d'un homme est obèse pendant la grossesse, celui-ci à plus de prédisposition à devenir obèse à l'âge adulte ¹²⁵.

La composition cellulaire des tissus peut aussi jouer un rôle dans le dimorphisme sexuel de la répartition des masses grasses. Au niveau des cellules progénitrices adipocytaires, chez la souris, des études rapportent des différences sexuelles concernant l'origine mésodermique des adipocytes des

tissus adipeux peri-gonadiques ¹²⁶. Aussi, il a pu être montré que les réservoirs de pré-adipocytes étaient différents entre les hommes et les femmes avec un potentiel adipogénique plus important dans les dépôts glutéofémoraux chez la femme ¹²⁷.

Le déterminant hormonal est sans doute celui avec le plus de poids dans cette balance de dimorphisme sexuel. Des études ont montré que la répartition des masses grasses chez les femmes change entre les périodes pré et post-ménopause. Avant la ménopause, le ratio taille sur hanches est plutôt en faveur d'une adiposité glutéofémoral, ce ratio s'inverse après l'arrêt du cycle menstruel ¹²⁸. Pour la grande majorité les gènes autosomaux dont l'expression est différentielle en fonction du sexe comporte une région de fixation des récepteurs aux stéroïdes sexuels (récepteur aux œstrogènes et aux androgènes). TBX15 est un facteur de transcription pouvant être activé par le récepteur aux androgènes et régulant un grand nombre de gène comme PPAR α et ADIPOQ, deux gènes importants dans la répartition des masses adipeuses. Les effets des stéroïdes sexuels sur la répartition des masses adipeuses et notamment chez les femmes avant et après la ménopause restent débattu et nécessite plus d'investigations ¹²⁹.

d) Les traitements de l'obésité

Bien que la situation d'obésité ne soit pas en soi une pathologie, il s'agit d'un facteur de risque impliquant la nécessité d'une prise en charge de cet excès de poids. En France, un rapport de la Haute Autorité de Santé (HAS) encadre la prise en charge, depuis l'évaluation de l'état d'obésité et des pathologies associées, aux traitements s'ils sont nécessaires ⁹⁹. Le rapport propose une gradation des patients après un phénotypage qui regroupe des données anthropométriques (IMC, ratio taille/hanche), médicales (présence de pathologies associées comme le diabète de type 2), psychologiques (trouble du comportement alimentaire) et la trajectoire pondérale afin d'orienter leur prise en charge. Ce phénotypage permet la gradation du patient selon 5 groupes (Tableau 2). De manière générale, en première intention l'application de mesures hygiéno-diététiques avec un accompagnement nutritionnel et sportif adapté est prescrite. Puis en cas d'échec ou en parallèle pour les grades les plus élevés, des mesures médicamenteuses ou chirurgicales peuvent être envisagées.

Tableau 2 : Classement des patients atteints d'obésité en fonction de leurs degrés de gravité

D'après ⁹⁹

Stade de sévérité de l'obésité	Paramètres de phénotypage						
	1 IMC	2 Retentissement médical	3 Retentissement (qualité de vie ou fonctionnel)	4 Troubles psychologiques, psychopathologiques et/ou cognitifs, troubles du comportement	5 Étiologie de l'obésité	6 Comportement alimentaire	7 Trajectoire pondérale
1a	30 ≤ IMC < 35	- Pas d'anomalie cardio-métabolique - Pas de symptôme physique (pas de dyspnée, pas de douleurs)	- Pas d'impact significatif sur la QDV - Pas de limitation fonctionnelle	- Aucun trouble ou - Troubles ayant peu d'incidence sur le comportement alimentaire	- Commune	- Pas d'impulsivité alimentaire	- Initiation de prise en charge - Obésité apparue à l'âge adulte
1b	30 ≤ IMC < 35	- Anomalie cardio-métabolique débutante (HTA limite, hyperglycémie à jeun,	- Impact modéré sur QDV et sur l'état de santé	- Retentissement psychologique	- Commune	- Impulsivité alimentaire	- Obésité apparue dans
2		élévation modérée des enzymes hépatiques) ou - Présence d'altérations cardio-métaboliques, hépatiques et respiratoires (HTA, DT2, SAHOS, NAFLD) ou autres complications/comorbidités gérées de façon satisfaisante (malgré l'absence de perte de poids)	ou - Atteinte fonctionnelle modérée (dyspnée stade 2, douleurs occasionnelles)	léger (estime de soi, humeur) ou - Troubles psychologiques associés bien gérés (ex. : dépression traitée et suivie)		sans accès de boulimie	l'enfance ou à l'adolescence ou - Un épisode de rebond pondéral
	35 ≤ IMC < 50	- Altérations cardio-métaboliques (HTA résistante, DT2 difficile à contrôler, NASH/fibrose, SAHOS sévère, SOH) ou - Aggravation par l'obésité d'une maladie chronique n'exposant pas à un risque majeur ou - Infertilité ou - SOPK	- Impact marqué sur QDV et sur l'état de santé	- Pathologie psychiatrique et psychopathologique sous-jacente avec net impact pondéral et/ou comportemental (troubles de l'humeur, troubles anxieux, stress post-traumatique, addictions associées, etc.)	- Obésité commune avec facteur aggravant : traumatisme psychique ou - Prise de poids sur douleurs chroniques (ex. : fibromyalgie) - Médicaments obésogènes*	- Accès de boulimie épisodiques	- Obésité apparue dans l'enfance persistante à l'âge adulte ou - Au moins 2 épisodes de rebond pondéral ou - Échec de prise en charge de niveau 1 ou - Grossesse après chirurgie bariatrique
3a	35 ≤ IMC < 50 <i>si associé à la présence d'un des problèmes listés dans cette ligne</i>	- Aggravation par l'obésité d'une maladie chronique exposant à un risque majeur ou un handicap fonctionnel (ex. : BPCO, maladies neuromusculaires, maladies inflammatoires chroniques, maladies auto-immunes, etc.)	- Impact du poids sur la mobilité avec périmètre de marche entre 100 et 500 m	- Pathologie psychiatrique sévère (ex. : dépression sévère, troubles de la personnalité borderline, paranoïaque, schizophrénie, etc.)	- Obésité secondaire à une dérégulation hormonale (hypercorticisme, acromégalie) ou - Tumeur cérébrale (dont craniopharyngiome ou autre...)	- Hyperphagie boulimique	- Évolution pondérale non contrôlée malgré un accompagnement spécialisé ou - Échec de prise en charge de niveau 2
3b	≥ 50	- Retentissement terminal des pathologies chroniques (insuffisance cardiaque, insuffisance respiratoire, insuffisance hépatique, insuffisance rénale dialysée, transplantés ou en attente de transplantation)	- Impact du poids sur la mobilité avec périmètre de marche < 100 m voire grabatisation/perde d'autonomie due à l'obésité ou - Qualité de vie fortement dégradée	- Troubles du spectre de l'autisme ; troubles cognitifs (retard mental, difficultés de compréhension, troubles mnésiques)	- Monogénique ou - Syndromique		- Échec de chirurgie bariatrique ou - Indication de chirurgie bariatrique avec risque opératoire élevé, âge > 65 ans et < 18 ans

BPCO : bronchopneumopathie chronique obstructive ; DT2 : diabète de type 2 ; HTA : hypertension artérielle ; NAFLD (Non Alcoholic Fatty Liver Disease) : stéatose hépatique non alcoolique ; NASH (Non Alcoholic Steato Hepatitis) : stéatohépatite non alcoolique ; monogénique ou syndromique : obésités de causes rares (cf.

A ce jour en France, deux types d'agents pharmacologiques présentent une autorisation de mise sur le marché avec une indication d'anti-obésité et une molécule possède une autorisation d'accès précoce. Le premier est l'Orlistat, cette molécule avec un effet inhibiteur direct sur la lipase pancréatique limite l'absorption des graisses issues du bol alimentaire¹³⁰. Cependant, de nombreuses réserves sont émises sur l'intérêt clinique de cette molécule. Depuis 2011, la HAS recommande de ne plus prescrire l'Orlistat au regard des effets modestes sur la perte de poids, du grand nombre d'effets secondaires et d'interactions médicamenteuses^{131,132}. Le second groupe de médicaments avec une indication obésité sont les agonistes du récepteur au GLP-1 dont le Sémaglutide et le Liraglutide 3mg⁹⁹. Ils ont un effet direct sur la perte de poids et est associée à une diminution du tour de taille, de la glycémie à jeun, de l'HbA1c, de la pression artérielle systolique et une amélioration du bilan lipidique¹³³. Enfin, une autorisation anticipée de mise sur le marché de la Setmélanotide avec une indication pour le traitement de l'obésité est proposée. Cette molécule agit directement sur le système de contrôle de la faim et est pour le moment destiné aux patients avec une obésité génétique associée au système de la pro-opiomélanocortine ou du récepteur à la leptine. Cette molécule montre des effets intéressants dans la réduction du poids de 5.5% après 3 mois, -11.3% après 6 mois et -16.3 après 12 mois chez ces groupes de patients⁶⁸.

Les patients en échec de perte de poids peuvent aussi bénéficier d'une chirurgie bariatrique sous certaines conditions. Ces chirurgies lourdes ont pour but de limiter l'absorption intestinale des nutriments et/ou réduire la taille de l'estomac. Parmi elles, on retrouve l'anneau gastrique (qui n'est plus pratiqué en France), la gastrectomie longitudinale (sleeve gastrectomie) et le court-circuit gastrojéjunal de Roux-en-Y (bypass gastrique). La chirurgie peut être prescrite après l'échec de perte de poids suite à la mise en place de mesures hygiéno-diététiques chez des patients avec un IMC supérieur à 40 ou supérieur à 35 avec des comorbidités (HAS, 2009). La chirurgie bariatrique conduit à une perte de poids qui peut être variable¹³⁴ voir avec une reprise de poids chez 43,6% des patient qui reprennent 5 points d'IMC à 5 ans. Il y a parfois la nécessité d'une ré-intervention, ce qui représente environ 5 à 8% des chirurgie et qui est valable lorsque la perte de poids est inférieure à 25% de la surcharge ou qu'il y a eu une reprise de poids d'au moins 10kg^{135,136}.

II. La Flexibilité métabolique

A. De l'homéostasie vers l'homéodynamie

La notion de flexibilité métabolique, qui inclut une composante dynamique est liée à l'évolution du paradigme entre homéostasie et homéodynamie. Le concept d'homéostasie est un élément fondateur de la physiologie apparu en France à la fin du 19^{ème} siècle. Décrite par Claude Bernard (1849), avec la

découverte des mécanismes de régulation et de sécrétion pancréatique, de la fonction respiratoire du sang, de la fonction des nerfs vasculomoteurs et du rôle glyco-génique du foie. L'homéostasie est plus formellement définie par Cannon (1926) comme le maintien d'un paramètre biologique autour d'une valeur de référence grâce à des processus de régulations ¹³⁷. Aujourd'hui, cette définition tend à évoluer en passant du caractère fixe apporté par la valeur de référence vers des systèmes plus complexes et dynamiques qui oscillent autour d'un point de stabilité. Bien que l'observation des rythmes naturels (alternance jour/nuit, saison) ait été faite par les premières civilisations antiques, la découverte des cycles biologiques (circadiens, ultradiens) est relativement récente puisque l'apparition du terme circadien est attribué à Franz Halberg au milieu du 20^{ème} siècle et pose les premières fondations de ce changement de paradigme ¹³⁸. L'homéodynamie est donc la capacité d'un système à s'organiser de façon dynamique afin de garantir le maintien des paramètres biologiques dans des domaines compatibles à la vie. La perte de stabilité du système, quelle que soit son origine, autorise son changement d'état, qu'il soit quantitatif ou qualitatif ¹³⁹ (modification du profil ou de l'amplitude d'oscillation) soit de façon qualitative (même profil d'oscillation mais à des intensités différentes) (Figure 10).

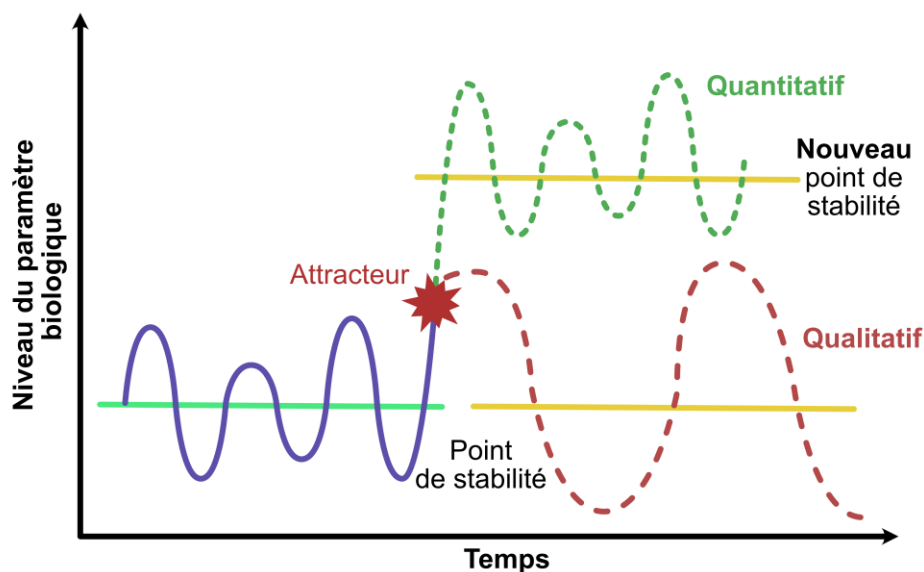


Figure 10 : Modèle homéodynamique

L'homéodynamie est la capacité du métabolisme à maintenir oscillations périodiques physiologiques d'un paramètre biologique autour d'un point de stabilité. La perte de stabilité causée par un attracteur (stimuli extérieurs) va pousser l'organisme à trouver un nouveau point de stabilité soit quantitativement soit qualitativement.

B. L'adaptation aux changements d'états métaboliques

La flexibilité métabolique peut être définie comme le maintien de l'homéodynamie énergétique nécessitant la détection, l'adressage et le transport, le stockage et l'utilisation des substrats

énergétiques en fonction de leur disponibilité et des besoins de l'organisme. Ce modèle a d'abord été introduit pour décrire la capacité des helminthes, des vers parasites de l'homme et de certains mammifères, à produire de l'énergie en utilisant de façon alternative mécanismes aérobie et anaérobie. En 1983 Saltin et Gollnick parlent « d'adaptabilité métabolique » dans un manuel traitant de l'adaptation du métabolisme du muscle squelettique à l'exercice ¹⁴⁰. Le terme flexibilité métabolique est finalement adopté à la fin des années 90 où il est notamment défini par Kelley et al. ¹⁴¹. Dans un premier temps fortement associé au muscle squelettique, le terme s'est ouvert à d'autres contextes métaboliques et tissulaires et s'est imposé comme une donnée physiologique de fondamentale.

Chez tous les animaux, le recours à la nourriture est nécessaire à la survie. Les phases de prises alimentaires sont associées de façon corollaire à des phases de jeûne qui peuvent être plus ou moins étendus. L'adaptation à ces états de transition énergétique est un élément clé de la flexibilité métabolique.

a) *La phase absorptive*

Dans le règne animal, la prise alimentaire n'est que très rarement continue à l'exception de certaines espèces comme le colibri qui maintient une alimentation quasi-constante dans le temps pour compenser ses besoins métaboliques très importants ¹⁴². Dans l'espèce humaine, la glycémie est augmentée dès 15 minutes après le début du repas pour atteindre un pic entre 30 et 60 minutes ¹⁴³. Elle déclenche la sécrétion d'insuline par les cellules bêtas du pancréas qui passe de quelques dizaines de pmoles.L⁻¹ à 400-500 pmoles.L⁻¹ environ 30 minutes après ingestion de glucose (Figure 11). Cette augmentation des niveaux circulants d'insuline va avoir des effets :

- Au niveau hépatique : les voies de biosynthèse des corps cétoniques et de la dégradation du glycogène (**glycogénolyse**) vont être interrompues. En même temps, le foie va synthétiser du glycogène à partir de glucose (**glycogénèse**). La diminution des concentrations plasmatiques en acides gras libres issus de la **lipolyse** va également participer à limiter la production de corps cétoniques.
- Au niveau musculaire : les mécanismes d'oxydation des acides gras vont être stoppés au profit du stockage glycogénique (**glycogénèse**).
- Au niveau des tissus adipeux, la mobilisation des stocks de triglycérides (**lipolyse**) va être fortement réduite au profit du stockage des acides gras et des sucres en excès (**lipogénèse**). Les lipides vont être couplés à des protéines pour former les chylomicrons au niveau intestinal et Very low density lipoproteines (VLDL) au niveau hépatique, qui seront mis en réserve dans les adipocytes.

b) *Le jeûne court (moins de 24 heures)*

Quand les processus de prise alimentaire et de digestion cessent, quel qu'en soit la raison et la durée, la capacité à produire de l'énergie et de la biomasse est circonscrite aux stocks de nutriments constitués par l'organisme pendant la période prandiale. Dans les 5 à 6 heures après le repas, les niveaux de glucose plasmatique ainsi que les niveaux d'insuline diminuent pour atteindre leurs niveaux de base ($4.0 - 5.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; $60 \text{ pmoles}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivement) (Figure 11). Le maintien de la glycémie repose alors sur les hormones hyperglycémiantes telle que le glucagon, le cortisol et les catécholamines dont les niveaux plasmatiques augmentent pendant cette période. La part lipidique sous forme d'acides gras non estérifiés est apportée par la concomitance de la diminution de l'insuline et de l'augmentation des catécholamines qui vont permettre la mobilisation des stocks adipeux (lipolyse). Au-delà de 12h de jeûne malgré l'épuisement des stocks hépatiques et musculaires de glycogène, les concentrations plasmatiques en glucose restent constantes. La mobilisation des stocks adipeux associés à la forte augmentation des niveaux de glycérol, d'acides gras et de corps cétoniques va permettre le maintien de la glycémie et garantir un apport énergétique à tous les organes (Figure 11). L'acétoacétate et le beta-hydroxybutyrate sont des substrats énergétiques produits au niveau hépatique à partir des acides gras. Lorsque le glucose est moins disponible le cerveau et plus particulièrement les cellules gliales sont capable d'utiliser des corps cétoniques¹⁴⁴ (Figure 11). D'autres organes dont le cœur peuvent aussi utiliser les corps cétoniques comme substrats énergétiques même si cela représente environ 5% de la dépense énergétique totale. Pendant les phases de jeûne chez l'homme comme chez la souris, les niveaux plasmatiques de corps cétoniques sont proches de 1mM, alors qu'ils sont proches de zéro pendant les phases postprandiales. Chez les patients diabétiques non traité, l'absence de production d'insuline ou l'insulino-résistance peut entraîner une forte mobilisation des stocks adipocytaires prompt à un emballement de la production de corps cétonique dont les taux plasmatiques peuvent atteindre 20mM et conduire à la mort par acidocétose¹⁴⁵ (Figure 11).

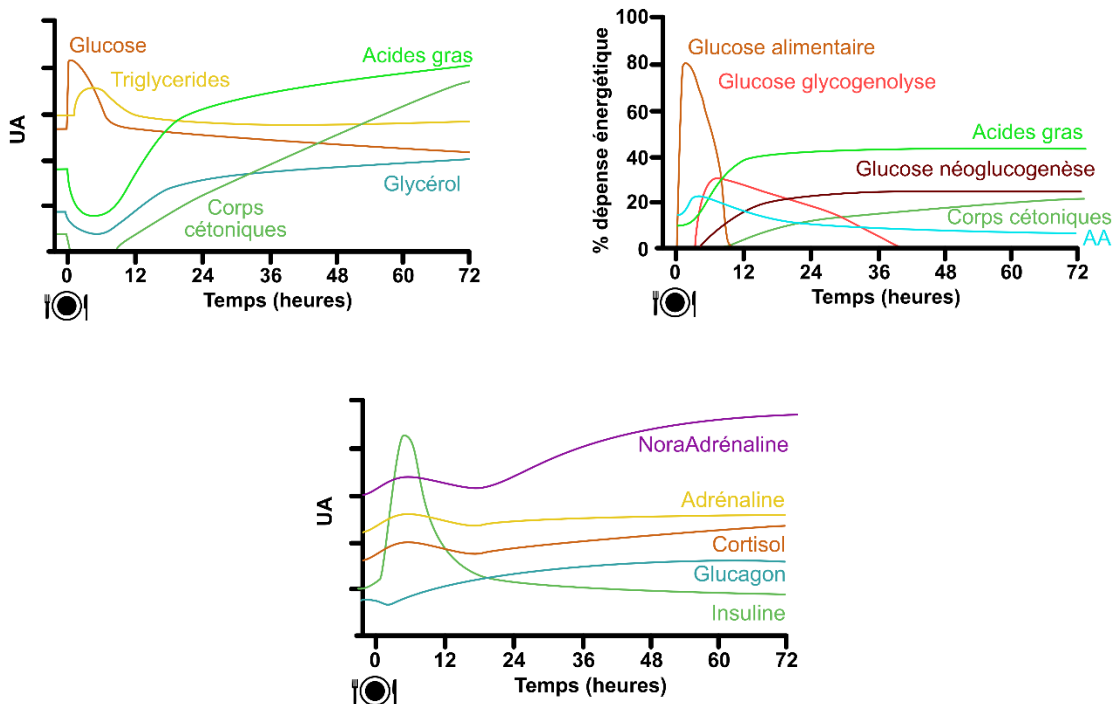


Figure 11 : Dynamique des substrats énergétiques et des hormones au cours du jeûne

Evolution dynamique des concentrations plasmatiques des principaux substrats énergétiques (panel de gauche), des hormones associées au jeûne (panel inférieur) et provenance des substrats énergétiques (panel de droite) pendant 72h de jeûne après un repas. AA : acides aminés. D'après Manuel Dote-Montero, 2022

Depuis quelques années, faisant le constat d'une diminution du temps de jeûne associé à l'apparition de pathologies métaboliques et cardiovasculaires, il a été proposé de ré-augmenter les périodes de jeûne (comme l'alimentation restreinte dans le temps ou le jeûne intermittent) afin de favoriser les alternances de changements de substrats métaboliques et donc d'améliorer la flexibilité métabolique^{143,146,147}. Il est à noter que les approches chez la souris montrent des effets pléiotropes anti-obésité et pro-sensibilisateur à l'insuline¹⁴⁷. Récemment, la restriction alimentaire dans le temps chez la souris a été montré comme diminuant la prise de poids via des effets sur le cycle circadien impliquant le cycle futile de la créatine et la thermogenèse¹⁴⁸. Chez l'homme, quelques approches cliniques sont également en faveur d'effets bénéfiques sur la santé cardiométabolique¹⁴⁹. Il faut cependant prendre en compte des effets potentiels délétères particulièrement sur la fatigue, l'humeur mais également sur la masse osseuse et la fonction immunitaire¹⁵⁰.

c) Adaptation au jeûne prolongé

Alors que l'expérience du jeûne est commune à toutes les espèces animales, certaines espèces, souvent par contrainte, étendent le jeûne à plusieurs jours voire plusieurs mois. Dans l'espèce humaine, selon l'organisation mondiale de la santé, 828 millions de personnes ont souffert de la faim faute de ressources dans le monde en 2021¹⁵¹.

(1) L'hibernation

Les contraintes de disponibilité alimentaire et environnementale ont conduit à l'émergence d'adaptation particulière à certaines espèces. Chez les poïkilothermes comme les amphibiens ou les reptiles, la diminution de la température corporelle pendant les périodes hivernales leur permet de diminuer leur besoin énergétique. Chez les endothermes comme les mammifères, la température corporelle peut être abaissée ou fluctuer avec la température extérieure. La diminution de la dépense énergétique est la clé de la survie. Chez certains petits mammifères, cette réduction peut aller jusqu'à une diminution de 98% de leur métabolisme basal ^{152,153}. Pour les plus gros mammifères, comme l'ours brun qui hiberne entre 3 à 7 mois, le métabolisme basal est réduit de 75% malgré une diminution de la température corporelle plus modérée de l'ordre de 3 à 5°C ¹⁵⁴. Pendant l'hibernation, ces animaux vont utiliser leurs stocks adipeux comme principale source de substrat énergétique pour alimenter la β -oxydation ¹⁵². Dans certains cas, notamment chez des écureuils vivant dans des régions où la température descend en dessous de -20°C, il a pu être montré que ces animaux perdent 30 à 40% de leur masse maigre ^{155,156}.

(2) Le jeûne prolongé, la famine et l'évolution

Quel soit causé par les crues du Nil dans le monde antique, par des guerres médiévales ou par des sécheresses dans le Sahel à l'époque moderne, les périodes de famine sont associées avec l'histoire humaine. Physiologiquement l'état de famine correspond au dernier stade d'un jeûne long, une fois les stocks de glycogène épuisés, l'organisme mobilise les stocks provenant des tissus adipeux, cette seconde phase peut être d'une durée variable et fonction de la quantité de substrat en stock et de la dépense énergétique. La dernière étape du jeûne intervient lorsque le substrat lipidique n'est plus présent en quantité suffisante, l'organisme va alors basculer sur l'utilisation des acides aminés issus de la protéolyse des protéines de structure pour produire de l'énergie. Cet état précaire ne peut être maintenu que sur une courte durée. *In fine*, il est considéré que l'utilisation de 30 à 50% de la masse protéique est létale ¹⁵⁷. Chez le sujet normo-pondérée, bien que les données soient relativement restreintes en dehors des études rétrospectives sur les famines, des jeûnes supérieurs à 40 jours sont associés à des risques potentiellement mortels. Cependant, des périodes de jeûne extrême, supérieures à un an, ont pu être enregistrées chez des obèses. En 1973, Stewart rapport le cas clinique d'un homme âgé de 27 ans et pesant 207Kg qui a jeuné 382 jours consécutif au terme duquel il pesait 82kg ¹⁵⁸. Dans les années suivantes, ce type de régime par « famine » a été proposé à des milliers d'obèse conduisant à la mort de 58 d'entre eux ¹⁵⁹.

La génétique évolutive a impliqué comme pression de sélection génique les périodes de famine fréquentes au cours de l'histoire de l'espèce humaine. C'est l'hypothèse des gènes économes ou « thrifty genes » qui permettent aux individus de mettre en réserve du substrat énergétique en

prévision des périodes de famines ¹⁶⁰. La sélection de ce patrimoine génétique favoriserait le développement de l'obésité dans nos sociétés occidentales dans lesquelles l'apport alimentaire est constant.

C. Les mécanismes de régulation

La flexibilité métabolique est sous le contrôle du cycle circadien central et périphérique au niveau du corps entier, de stimuli neuro-humoraux dans les communications inter-organes et au niveau cellulaire par des détecteurs et transducteurs de signaux liés aux substrats métaboliques.

1. Le cycle circadien comme intégrateur central et périphérique

Le mot circadien nous provient du latin *circa* qui signifie « à propos » et *dies* « jour », un rythme circadien désigne donc un processus biologique oscillatoire sur une période d'environ 24 heures de façon répétitive ¹⁶¹. Un grand nombre de processus biologiques suit cette rythmicité et parmi eux le métabolisme ¹⁶².

L'horloge principale, située au niveau du système nerveux central, est dépendante de l'exposition à la lumière. Le photo-signal est transmis via le ganglion rétinien au noyau supra chiasmatique de l'hypothalamus. En ce sens, ce noyau est considéré comme le donneur de temps principal de l'organisme ¹⁶³. Les signaux centraux agissent sur la glande pinéale et sur les surrénales pour réguler la production rythmée et inverse de mélatonine (sécrétion en phase inactive) et de cortisol (ou corticostérone chez les rongeurs) avec un pic de sécrétion en début de phase active, respectivement ¹⁶⁴. Ces signaux neuro-endocrines vont moduler les horloges périphériques et notamment les niveaux de leptine et d'adiponectine, ainsi que ceux des glucocorticoïdes et des minéralocorticoïdes, de l'insuline et du GLP1 ainsi que de la ghréline ¹⁶⁵⁻¹⁶⁷. Ces horloges secondaires sont fortement associées à l'alternance entre les états nourris et à jeun ¹⁶⁸. Une étude récente réalisée sur 46 tissus issus de 914 donneurs montre que le tissu adipeux présente les amplitudes de régulation génique les plus étendues sur 24 heures et le nombre le plus élevé de gènes rythmés avec des vagues d'expression centrées sur le matin (7 heures) et le soir (19 heures) ¹⁶⁹. Cette étude conclue que les fonctions génétiques pan-rythmiques chez l'espèce humaine consistent en grande partie en des processus métaboliques qui reflètent un passage entre des états de basse et de haute énergie au cours du cycle repos-activité. Il est à noter que les tissus adipeux ne présentent pas de dimorphisme sexuel, ni de différences liées à l'âge dans le nombre et le rythme des transcrits rythmiques (à la différence des glandes surrénales et du foie ou des artères coronaires, respectivement) ¹⁶⁹.

Au niveau moléculaire, les informations provenant du système nerveux central ou des horloges périphériques, permettent l'initialisation de cycle de transcription et de traduction de gènes donneurs de temps, qui s'autorégulent par des boucles de rétrocontrôle positif et négatif qui sont présentés dans la figure 12.

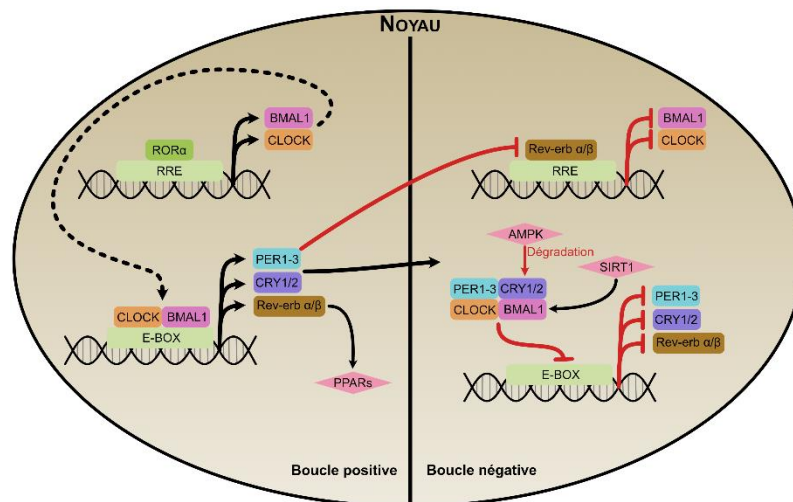


Figure 12: Boucle de rétrocontrôle traduction/transcription circadienne

Les gènes de l'horloge sont des facteurs de transcription constitutif CLOCK et inductible BMAL1 qui se lient sur des séquences E-box de nombreux gènes pour activer leur transcription (boucle positive). Les gènes PER1/PER2 et CRY1/2 constituent la boucle négative. Leur transcription est sous le contrôle de BMAL1/CLOCK. Après leur traduction et leur phosphorylation par la caséine kinase 1 epsilon/delta (CK1), ils s'hétérodimérisent, entrent dans le noyau et inhibent leur propre transcription et celle de BMAL1/CLOCK. La boucle accessoire est constituée par REV-ERBa et RORa. Leur transcription est aussi sous le contrôle de BMAL1/CLOCK. Ils entrent dans le noyau après traduction et agissent sur les retinoic response element (RRE) dans la séquence promotrice de BMAL1 comme inhibiteur ou activateur, respectivement de sa transcription. REV-ERBa et RORa sont également inhibés par Per/Cry. L'expression des gènes de la boucle positive est en antiphasse avec celle de la boucle négative. De nombreuses modifications post-traductionnelles sont également impliquées dont des phosphorylations médiées par AMPK et CK1 sur CRY et PER, respectivement, qui conduit à leur adressage au protéasome pour leur dégradation, ce qui leur limite le temps de ½ vie et permet leur oscillation journalière. D'après ¹⁷⁰

Le lien moléculaire entre les gènes de l'horloge et le statut métabolique fait intervenir la dé-acétylase dépendante du NAD⁺, la sirtuine1. En dé-acétylant BMAL1, Sirt1, dont l'expression est augmentée pendant les phases de restriction énergétique, affecte directement l'horloge ¹⁷¹. L'AMPK qui est activée par les faibles niveaux énergétiques, est également un acteur comme précisé précédemment de la dégradation par le protéasome de CRY ¹⁷².

En aval, au niveau du tissu adipeux, les activités lipolytiques, lipogéniques et thermogéniques ainsi que l'adipogenèse sont soumises au cycle circadien, avec au niveau des adipocytes blancs, une stimulation lipolytique pendant la phase inactive et lipogénique pendant la phase active principalement via des contrôle transcriptionnel impliquant BMAL1/CLOCK et au niveau des adipocytes bruns, une stimulation de la thermogenèse pendant la phase active impliquant REV-ERBa ¹⁷³. Les effets sur l'adipogenèse sont principalement médiés via les modulations de l'expression de PPARg ¹⁷⁴.

2. Les stimuli neuro-humoraux dans les communications inter-organes

Les régulations inter-organes mettent notamment en jeu des acteurs neuro-humoraux. Au niveau de la régulation des activités métaboliques des dépôts adipeux, les voies nerveuses catécholaminergiques efférentes sont les voies principales impliquées dans la stimulation de la lipolyse en condition de jeûne. La découverte récente de voies nerveuses afférentes somatosensorielles dans le tissu adipeux qui constitueraient un système de contrôle négatif des voies catécholaminergiques ouvre un nouvel axe de recherche sur la contribution de ce système à la flexibilité métabolique⁵⁹. Il est intéressant de noter que l'activité thermogénique également sous le contrôle des catécholamines lors de l'adaptation au froid n'est pas activée par le jeûne mais peut l'être en situation absorptive (thermogénèse post-prandiale)¹⁷⁵. Cette thermogénèse pourrait faire intervenir le cycle futile de la créatine¹⁷⁶. On peut également émettre l'hypothèse d'une implication de voies nerveuses afférentes somatosensorielles dans le rétro-contrôle des voies catécholaminergiques.

a) Les hormones de la phase absorptive

Les hormones de la phase absorptive sont les incrétines et l'insuline.

Les incrétines sont des hormones issues du clivage du proglucagon par la pro-hormone convertase 1/3 dans les cellules L neuro-endocrine situées dans la paroi de l'intestin, principalement au niveau illéal et colonique, en réponse à une prise alimentaire.

(1) Le GLP-1 & le GLP-2

Le GLP-1 (glucagon-like peptide-1) est une hormone de 30 à 31 acides aminés, produite pendant les phases prandiales et son expression est particulièrement importante en réponse à un repas riche en glucides et en graisses¹⁷⁷. Sa sécrétion est biphasique avec un premier pic à 10 -15 min et un second pic à 30 -60 min. Le premier pic de sécrétion du GLP1 est induit par une stimulation para-sympathique du nerf vague. Une section de celui-ci chez le rat entraîne un arrêt de la sécrétion de GLP-1 en réponse à la prise alimentaire alors que la stimulation de la branche cœliaque entraîne sa libération¹⁷⁸. En regard, la seconde phase de libération est quant à elle très probablement induite par l'activation directe des cellules L par les nutriments¹⁷⁹. Une fois sécrété, la demi-vie du GLP-1 est très courte (2 min)¹⁸⁰ car il est la cible de la dipeptidylpeptidase DPP-4 présente à la surface de nombreuses cellules et notamment les cellules endothéliales. Ainsi, plus de la moitié du pool de GLP-1 est inactivé dans la veine porte par DPP-4 et n'atteint pas la circulation générale¹⁸¹. Il est à noter que les inhibiteurs de DPP4, également appelés « gliptines », utilisés en complément d'autres antidiabétiques oraux, permettent d'augmenter la demie-vie du GLP1. Le récepteur du GLP1 est un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé aux protéines G et à une activation de l'adénylate cyclase et une augmentation des taux intracellulaires d'AMPc¹⁸². Il est retrouvé de manière majoritaire au niveau du

pancréas, puis dans le muscle cardiaque et la glande salivaire ainsi que l'estomac et le cortex cérébral. Au niveau des cellules β -pancréatiques, la fixation de GLP-1 sur son récepteur entraîne la libération de vésicules d'insuline dans la circulation ¹⁸³. En outre, le GLP-1 est aussi capable d'inhiber la sécrétion de glucagon par les cellules α -pancréatique ¹⁸⁴ et d'activer la sécrétion de somatostatine par les cellules δ ¹⁸⁵. Au niveau du système nerveux central, GLP-1 semble jouer un rôle majeur dans l'axe intestin cerveau et la régulation de la prise alimentaire ¹⁸⁶ (Figure 13). Au niveau gastro-intestinal, le GLP-1 a un rôle inhibiteur sur la sécrétion d'acide gastrique et la vidange gastrique. Au niveau cardiaque, il a été rapporté un effet direct du GLP-1 sur la pression sanguine et le rythme cardiaque que certains associent à une meilleure sensibilité à l'insuline et un meilleur apport en glucose ¹⁸⁷. Des agonistes du récepteurs au GLP1 ont été développés (exenatide, liraglutide, dulaglutide, semaglutide) et sont utilisés en association avec d'autres antidiabétiques oraux ou l'insuline, en injection sous-cutanée. Ils diminuent la glycémie et l'HbA1c (environ -1%) et peuvent induire une perte de poids. Le semaglutide (3mg) a actuellement l'indication « obésité » en cas d'échec des prises en charges hygiéno-diététiques chez des individus d'indice de masse corporelle supérieur à 35 kg/m². De plus, les agonistes du récepteur au GLP1 auraient des effets cardio-protecteurs et amélioreraient le pronostic dans les infarctus du myocarde et l'ischémie/reperfusion ^{188,189}. Comme le GLP1, le GLP2 est produit à partir du pro-glucagon par les cellules intestinales L en réponse aux substrats énergétiques. Le récepteur spécifique au GLP2 est présent dans différents types cellulaires au niveau intestinal, de la vésicule biliaire, de la vessie et des dépôts adipeux. Les principaux effets du GLP2 sont observés au niveau gastro-intestinal et sont présentés dans la figure 13. D'ailleurs, des analogues de GLP2, comme le teduglutide, plus résistant à la dégradation par DPP4, ont été développés dans le traitement de pathologies intestinales (Figure 13).

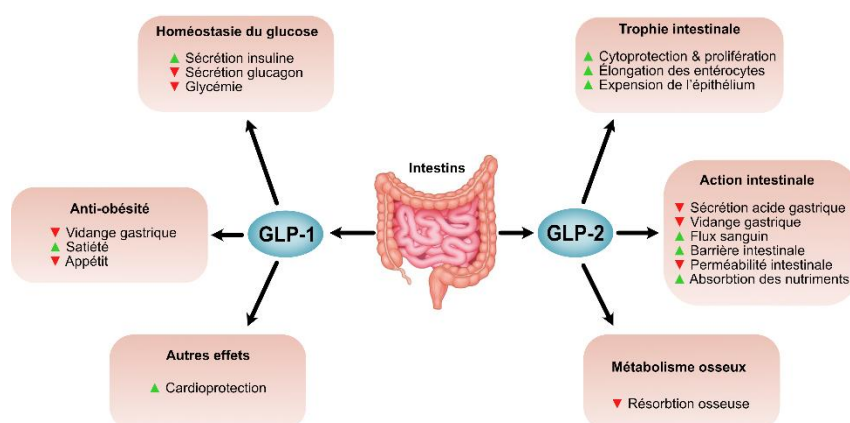


Figure 13 : Effets de GLP1 et GLP2

Principaux effets de GLP1 et GLP2 au niveau de leurs tissus cibles. D'après ¹⁹⁰

(2) Le GIP

Le GIP (Gastric inhibitory polypeptide) est une incrétine produite au niveau des cellules K de l'intestin et particulièrement suite à un repas riche en lipides.¹⁹¹ L'interaction de GIP avec son récepteur entraîne l'augmentation de l'AMPc et/ou du calcium intracellulaire. En plus de réduire la formation d'acide par l'estomac, GIP a des actions au niveau pancréatique, osseux et adipeux. Au niveau pancréatique, il augmente la synthèse et la sécrétion d'insuline via l'augmentation des niveaux d'AMPc et la stimulation de l'exocytose¹⁹². Dans le tissu adipeux, GIP augmente la lipogénèse en augmentant la synthèse de la lipoprotéine lipase. Les animaux avec une délétion pour GIP sont résistants à la prise de poids malgré plusieurs mois sous régimes hyper lipidiques¹⁹³.

(3) L'insuline

L'insuline est l'hormone hypoglycémisante dont la sécrétion est induite par l'entrée de glucose dans les cellules β via le transporteur GLUT2 qui va provoquer une élévation des niveaux d'ATP intracellulaire. Cet événement va entraîner la fermeture de canaux potassiques modifiant ainsi le potentiel de membrane. La dépolarisation induite va avoir pour effet d'ouvrir des canaux calciques voltage dépendants qui vont faire entrer du calcium dans le cytoplasme. L'apport en calcium va provoquer la libération des granules d'insuline. A ce mécanisme s'ajoute la contribution de l'AMPc, pour libérer les vésicules d'insuline. Le récepteur à l'insuline est un hétérodimère à activité tyrosine kinase. Une fois activé, le récepteur a de nombreuses cibles dont le principal est l'IRS (insulin receptor substrate). L'activation d'IRS va activer la PI3K qui va elle-même activer AKT. Au niveau des adipocytes, la fixation de l'insuline sur son récepteur promeut le captage du glucose et des acides gras et la lipogénèse tout en réprimant la lipolyse^{194,195}. La présence de la résistance à l'insuline, promue par l'hypertrophie adipocytaire et l'état inflammatoire chronique de bas niveau dans le contexte de l'obésité, est associée à une inflexibilité métabolique systémique¹⁹⁶.

b) Les hormones du jeûne

Les taux bas de glucose vont mettre en place le système contrerégulateur au niveau du pancréas avec la sécrétion du glucagon et au niveau hypothalamique les glucorécepteurs sont stimulés d'un part la sécrétion des catécholamines via le système nerveux autonome et la libération de l'hormone adréno-corticotrope (ACTH) et de l'hormone de croissance (GH) par l'hypophyse.

(1) Le glucagon

Alors que l'insuline a été découverte quelque année auparavant, Charles Kimball et John Murlin découvrent en 1923 alors qu'ils perfectionnaient une technique d'extraction de l'insuline à partir d'extrait pancréatique, une fraction induisant une hyperglycémie¹⁹⁷. Ils la nomment glucagon pour la contraction de « glucose agonist ». Ce n'est cependant qu'en 1953 que le glucagon est purifié et

cristallisé. Le glucagon est issu du clivage du proglucagon dans les cellules α -pancréatiques. La sécrétion du glucagon est stimulée par l'hypoglycémie, les signaux catécholaminergiques ¹⁹⁸. A l'inverse, elle est diminuée par l'insuline ¹⁹⁹. Le glucagon a un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé aux protéines G ²⁰⁰. Il est principalement retrouvé au niveau hépatocytaire mais il a également été décrit au niveau rénal, adipocytaire, cérébral, intestinal et pancréatique. L'activation du récepteur par le glucagon entraîne l'activation des protéines Gs et Gq qui vont respectivement mettre en place la formation d'AMPc ²⁰¹ et la libération de calcium dans le cytoplasme ²⁰². Le rôle physiologique du glucagon continue d'être étudié et fortement débattu dont son rôle dans le contrôle de la glycémie. Le glucagon est un puissant régulateur de la glycémie à jeun chez l'homme. Cependant, le rôle du glucagon dans le contrôle de la glycémie postprandiale est moins clair. Les effets du glucagon principalement au niveau hépatique sont résumés dans la figure 14. De façon intéressante, se développe également le concept d'une résistance au glucagon dans le contexte du diabète de type 2 et des pathologies hépatiques de type stéatose non alcoolique. Enfin, plusieurs essais cliniques ont montré que associé avec un agoniste de GLP-1 le glucagon pouvait être utilisé dans le traitement de l'obésité avec moins de risque de développer une hyperglycémie ²⁰³.

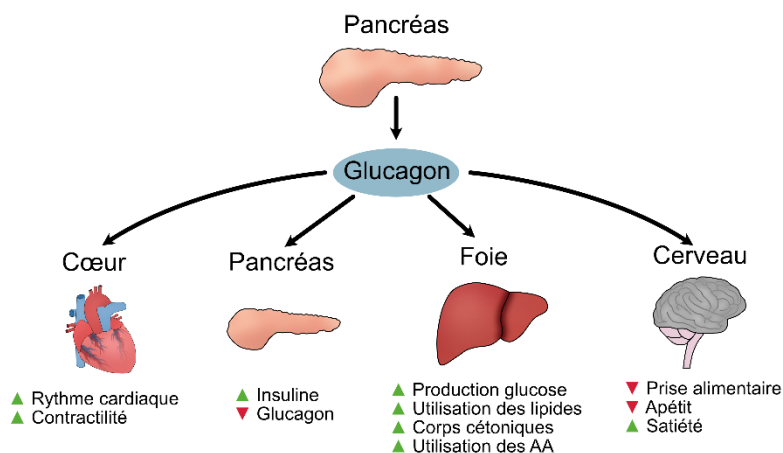


Figure 14 : Effets du glucagon

Effets du glucagon sur les différents organes cibles. D'après ²⁰⁴

(2) Les catécholamines

Pendant le jeûne, la baisse du glucose sanguin induit au niveau des centres hypothalamiques régulateurs, la stimulation du système nerveux autonome les actions autonomes sont médiées par l'adrénaline, qui pénètre dans la circulation systémique après avoir été libérée par les cellules neuroendocrines surrénaliennes, et par la noradrénaline, sécrétée directement par les neurones sympathiques postganglionnaires. Le maintien de l'activation synaptique par le jeune est médié par le

neuropeptide Y, un co-transmetteur surrénalien et par l'activation des récepteurs surrénaliens NPYR5²⁰⁵.

(3) Le FGF21

Le FGF21 est une hormone produite majoritairement par le foie mais également par les dépôts adipeux en situation de jeûne. Le FGF21 serait également produit au niveau central par les tanocytes en réponse aux acides gras libres et participerait à la régulation centrale de l'homéostasie lipidique via des actions sur les neurones GHH, TRH et AVP²⁰⁶.

3. Les régulations Intracellulaires

Les cellules sont dotées d'une capacité propre de détection des niveaux des substrats énergétiques, qui leur permet d'adapter leur métabolisme à l'environnement de façon autonome. Les voies principales mises en jeu sont celles de la signalisation AMPK (AMP-activated protein kinase) et de mTOR (target-of-rapamycin) permettant la détection des états de faible (diminution des niveaux d'ATP) et de forte énergie (augmentation des acides aminés/glucose) respectivement. De plus, des facteurs de transcription comme les PPARs (Peroxisome proliferator-activated receptor) sont des récepteurs activés par les lipides permettant de mettre en place une réponse transcriptionnelle adaptée au niveau énergétique.

a) La voie de l'AMPK

Les niveaux d'énergie disponible pour la cellule sont représentés par les ratios ADP/ATP et AMP/ATP. La protéine kinase activé par l'AMP (AMPK) est considérée comme un régulateur central des niveaux d'énergie cellulaire. L'AMPK est constituée d'une sous unité catalytique (alpha) et de 2 sous unités régulatrices (beta et gamma) qui compte chacune plusieurs isoformes, ce qui porte à 12 le nombre de combinaisons possibles. Certaines isoformes sont enrichies dans certains territoires comme pour AMPK α 2 β 2 γ 3 retrouvée en grande partie dans le muscle squelettique²⁰⁷. L'utilisation d'ATP par la cellule va provoquer une diminution des ratios ADP/ATP et AMP/ATP et donc l'activation de l'AMPK. Cette activation nécessite la présence de la sous unité gamma²⁰⁸ qui présente un domaine CBS (cystathionine- β -synthase)²⁰⁹ qui a une affinité différente pour l'ATP, ADP et AMP. La compétition de la fixation allostérique des nucléotides sur le domaine CBS (l'ATP présente une affinité 10 fois supérieure pour le domaine CBS que l'ADP ou l'AMP) va démasquer le site de phosphorylation ou empêcher la déphosphorylation du résidu thréonine 172 de la sous-unité catalytique alpha²¹⁰. A ce jour, 3 kinases sont connues pour avoir la capacité de phosphoryler la thréonine 172 : LKB1 (Liver kinase B1)²¹¹, CAMKK2 (calcium-calmoduline kinase kinase) et TAK1 (transforming growth factor- β -

activated kinase 1). Cette phosphorylation initiatrice active l'AMPK. L'AMPK est inhibée par l'insuline via AKT ²¹² et activée par la leptine, la ghreline et l'adiponectine ^{213,214}.

Les cibles de l'AMPK sont très nombreuses, cependant toutes convergent vers la mise en place de processus cataboliques pour restaurer les niveaux d'ATP intracellulaire.

Au niveau lipidique, l'AMPK réduit la synthèse de novo des acides gras au niveau hépatique, du cholestérol et des triglycérides via la phosphorylation inhibitrice de l'acetyl-coA carboxylase 1 (ACC1) et de *sterol regulatory element-binding protein 1c* (SREBP1c) ^{215,216}. En contrepartie, l'AMPK favorise l'entrée des acides gras dans les cellules par CD36²¹⁷ et leur utilisation par le processus de beta-oxydation via la levée d'inhibition de CPT-1 (carnitine palmitoyltransferase 1) ²¹⁸. De façon intéressante, l'AMPK inhibe la lipase hormonosensible (LHS) ²¹⁹ mais augmente de 4 fois la concentration de ATGL dans les adipocytes ²²⁰ suggérant un rôle de régulateur complexe des concentrations circulantes d'acides gras libres ²²¹. Par ailleurs, l'AMPK inhibe PPAR γ dans les adipocytes ²²² (Figure 15).

En ce qui concerne la sphère glucidique, AMPK a été montré comme un inducteur de la captation du glucose où elle induit la translocation à la membrane de GLUT-4 ²²³. Au niveau hépatique, L'AMPK active des acteurs enzymatiques de la glycolyse tels que PFKFB3 (6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3) et désactive ceux de la synthèse du glycogène par la glycogène synthase ²²⁴. Il faut aussi noter qu'il existe une voie non canonique indépendante des ratios ADP/ATP et AMP/ATP de détection des niveaux de glucose par AMPK mettant en jeu un complexe protéique (Regulator-AXIN/LKB1-AMPK) à la surface des lysosomes ²²⁵. AMPK a aussi un effet inhibiteur direct sur mTOR via l'activation de TSC1/2 ²²⁶. La metformine est un activateur d'AMPK et est utilisée en clinique pour traiter le diabète de type 2 (92 millions de prescription aux USA en 2020), principalement grâce à ces effets sur la gestion du glucose hépatique menant à une amélioration de la sensibilité à l'insuline.

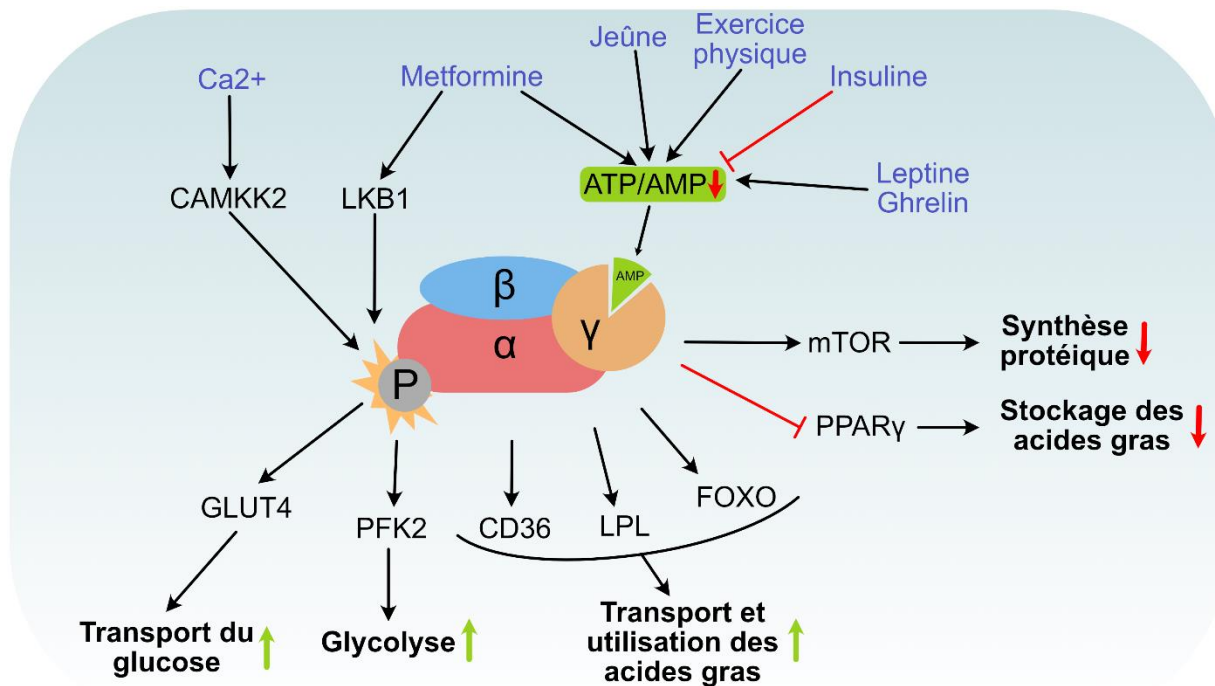


Figure 15 : AMPK de l'activation à la signalisation

D'après ²²⁷

b) La voie mTOR

mTOR fait partie de la famille des sérine/thréonine kinases, avec une forte conservation dans la phylogénie. Il existe 2 complexes mTOR qui présentent une distribution d'acteurs et des cibles différentes : mTOR complexe 1 (mTORC1) et 2 (mTORC2). Les deux complexes partagent des protéines communes telles que mTOR, mais sont aussi équipés de protéines spécifiques qui leur confère leur action propre ²²⁸.

L'activation du complexe mTORC1 est induit par des stimuli externes reçu par la cellule tel que des facteurs de croissance, les acides aminés ou le glucose et qui activent des processus anaboliques. La voie mTOR est activée par la cascade de signalisation *insuline-phosphoinositide 3-kinase* (PI3K)-AKT-RHEB. Les acides aminés vont, via une cascade de signalisation complexe mettant en jeu de nombreux acteurs en fonction de la nature des acides aminés, activer les Ras-related GTP Binding proteines (Rag) A/B et C/D, qui en s'associant au niveau du lysosome à d'autres protéines telles que REGULATOR et la V-ATPase, activent mTORC1 ^{225,226}. L'activation de mTORC1 va permettre la phosphorylation de deux effecteurs majeurs : la kinase ribosomale S6 (S6K) et 4E-BP (eIF4E-binding protéine inhibitrice) qui jouent un rôle majeur dans la synthèse de protéines par la promotion de la traduction et de l'élongation. De plus, mTORC1 est capable de favoriser la synthèse de nucléotides via le facteur de transcription ATF-4 ²²⁹, de promouvoir la lipogenèse de novo dépendante de SREBP1 ²³⁰ ainsi que la

captation de glucose et la glycolyse via l'activation du facteur de transcription sensible à l'hypoxie HIF1 α ²³¹. mTORC1 serait également un activateur de PPAR γ dans les adipocytes^{232,233}. Enfin, mTORC1 inhibe directement l'AMPK²³⁴. Contrairement à mTORC1, les voies en amont et en aval de mTORC2 sont moins bien connues. Néanmoins, son activation par les facteurs de croissance, l'insuline et les voies dépendantes de Wnts est documentée. L'activation de mTORC2 entraîne l'activation d'AKT qui va inhiber le facteur de transcription FOXO. mTORC2 peut activer la voie Rho/PKC/Ras avec une action sur le cytosquelette d'actine²³⁵.

Il existe plusieurs inhibiteurs pharmacologiques de mTOR, le plus évident étant la rapamycine. D'autres agents pharmacologiques tels que la Torin 1 et le PP242 sont utilisés comme inhibiteur de la voie de signalisation. En clinique, ces agents ont été mis sur le marché en première intention pour leurs effets anti-rejet aigu de l'allogreffe du à leur inhibition forte de l'activation des lymphocytes T²³⁶. Aussi, les inhibiteurs de mTOR sont retrouvés sur les stents utilisés pour éviter la resténose coronarienne liée à l'hyperplasie intimale des cellules musculaires lisses suite à l'angioplastie²³⁷. Enfin, des essais cliniques récents ont mis en évidence une indication en oncologie notamment ceux liés à des anomalies des voies PI3k/Akt/mTOR et PTEN/TSC/Rheb²³⁸ (Figure 16).

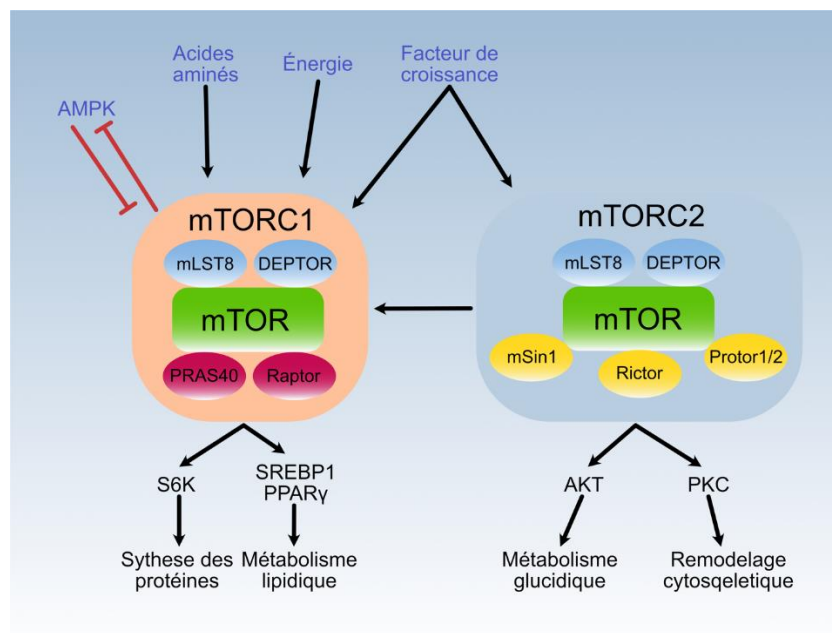


Figure 16 : Voie de signalisation mTOR

D'après Zhuo Mao, 2018

c) Le facteur de transcription FOXO

Les facteurs de transcription Forkhead box O (FoxO) sont une famille de 4 protéines (FoxO1, FoxO3, FoxO4 et FoxO6) qui joue un rôle crucial dans la régulation des voies de l'insuline et des facteurs de

croissance. Ces effets sont très variables en fonction du contexte cellulaire. Dans les contextes où l'insulinémie est élevée FOXO va être phosphorylé par AKT puis dégradé, au contraire la diminution des niveaux d'insuline et donc de l'activation d'AKT va permettre à FOXO de se fixer au niveau de son promoteur cible²³⁹. Au niveau hépatique, FOXO va pendant les périodes de jeûne induire des enzymes impliquées dans la voie néoglucogénique tel que la glucose-6-phosphatase et la phosphoenolpyruvate carboxykinase, ayant pour effet de provoquer l'élévation de la glycémie²⁴⁰. Toujours au niveau du foie, FOXO1 joue un rôle important dans la régulation dépendante de l'insuline de la production VLDL et de leur persistance dans la circulation grâce à l'augmentation de la transcription de apolipoprotéine C-III et de la microsomal triglyceride transfer protein. La *microsomal triglyceride transfer protein* est l'enzyme limitante dans la production des VLDL par le foie, son augmentation permet ainsi l'augmentation de ceux-ci. L'apolipoprotéine C-III est quant à elle sécrétée dans la circulation, elle est capable d'inhiber la fonction d'hydrolyse de la lipoprotéine lipase et donc de limiter la dégradation des VLDL²⁴¹. En cas d'insulino-résistance la régulation de FOXO par AKT n'est pas effective donnant lieu à la mise en place de l'hyperglycémie et de l'hypertriglycéridémie. Dans les adipocytes FOXO permet la suppression de l'adipogénèse et inhibe la différenciation des progéniteurs adipocytaires. Ces effets sont notamment induits par la suppression de l'expression de PPAR γ en se liant directement à son promoteur et l'activité de PPAR γ en inhibant de manière compétitive la formation du complexe fonctionnel PPAR γ /RXR²⁴². Ainsi une inhibition de FOXO1 spécifique dans les adipocytes, protège ce modèle de souris de l'insulino-résistance induite par un régime hyperlipidique²⁴³. Aussi, il a été montré que les FOXO pouvaient avoir une action au niveau des cellules endothéliales. Des modèles animaux avec délétion de FOXO 1/3/4 spécifique à l'endothélium, ont permis de montrer des effets protecteurs de FOXO contre les pathologies cardiovasculaires et notamment l'athérosclérose sous *western diet*²³⁹. De façon intéressante, la même délétion dans des conditions normales de nutrition entraîne une résistance à l'insuline²⁴⁴.

Ainsi, du fait de leurs effets multiples sur les organes du métabolisme, les FOXO sont des modulateurs centraux de la réponse insulinémique et sont indispensables à la flexibilité métabolique. L'apparition de désordre métabolique et notamment la résistance à l'insuline entraîne la déstabilisation de cette homéodynamie liée à FOXO menant à une dégradation encore plus forte de la flexibilité métabolique.

d) *Le facteur de transcription PPAR*

Les PPAR (*Peroxisome proliferator-activated receptor*) sont une famille de récepteurs nucléaires impliqués dans la régulation de la transcription de gènes du métabolisme, de l'inflammation et de la fibrose. Il existe trois formes de PPAR : α , β/δ et γ qui ont chacune des spécificités tissulaires et d'action. Les ligands endogènes des PPAR sont à ce jour encore mal connus, cependant des lipides avec entre autres des acides gras insaturés, des prostaglandines et des leucotriènes, ont été décrits comme

ligands potentiels. Une fois le ligand fixé à son récepteur, les PPARs s'hétérodimérisent avec des récepteurs à l'acide rétinoïque (RXR). C'est ce complexe qui va être capable de se fixer spécifiquement aux éléments de réponse PPRE (PPAR responsive element) situés dans les régions promotrices des gènes cibles. Les ligands exogènes spécifiques de ces récepteurs ont été développés et pour certains utilisés en thérapie comme le Fenofibrate, le clofibrate et le Gemfibrozil pour PPAR α , le GW501516 pour PPAR β/δ et les thiazolidinediones (rosiglitazone, pioglitazone,...) pour PPAR γ ²⁴⁵.

PPAR α est principalement exprimé au niveau hépatique où il est un acteur majeur de la régulation du métabolisme lipidique. Il est activé par le jeûne et permet notamment la mise en place de la cétogenèse ²⁴⁶ et l'utilisation des acides gras comme substrat énergétique via la β -oxydation ²⁴⁷. PPAR α est aussi retrouvé dans d'autres tissus tels que le rein, le cœur ou encore dans les tissus adipeux. Il est impliqué dans la thermogénèse et dans l'augmentation de l'expression FGF21 ^{248,249}.

PPAR β/δ est exprimé de façon ubiquitaire et de façon plus marqué au niveau des organes du tractus digestif, des reins et des muscles squelettiques. Dans le muscle, il est notamment induit lors de l'exercice physique et permet l'expression des gènes des voies d'oxydations des lipides ²⁵⁰.

PPAR γ présente 2 variants d'épissages retrouvés de manière différentielle en fonction des tissus. PPAR γ 1 a été décrit dans un grand nombre de types cellulaires. PPAR γ 2 est quant à lui principalement exprimé dans le tissu adipeux ²⁵¹. Dans le tissu adipeux, PPAR γ a été décrit à l'origine comme un facteur induit pendant la différenciation adipocytaire et est surtout connu pour son rôle dans la régulation des voies adipogéniques et lipogéniques ²⁵². La génération de la souris déplétée spécifiquement pour PPAR γ dans le tissu adipeux montre une lipoatrophie prouvant ainsi que PPAR γ est un acteur indispensable de la différenciation adipocytaire ²⁵³. D'autres études ont par ailleurs montré que PPAR γ est aussi nécessaire pour la survie adipocytaire ²⁵⁴. De nombreux gènes impliqués dans le transport et le métabolisme des lipides ainsi que du glucose sont des cibles de PPAR γ comme la lipoprotéine lipase et CD36 ainsi que le transporteur GLUT4.

e) *L'autophagie*

L'autophagie est un processus cellulaire permettant le recyclage des organites dysfonctionnels ou sur numéraire via des mécanismes régulés et dépendant du lysosome. Le concept original est proposé par Christian de Duve lors d'un congrès sur le lysosome et permet de distinguer la dégradation de composant intracellulaire par le lysosome de la dégradation de composant extracellulaire (hétérophagie). Il lui vaudra le prix Nobel de Physiologie et Médecine en 1974. Jusque dans les années 1990, les études qui portaient sur ces processus étaient des observations et des descriptions morphologiques. En 1993, Yoshinori Oshumi montre sur des levures dans un milieu privé en azote la présence de mutants avec une autophagie défectueuse. Dans les années qui suivent, il découvre une

quinzaine de gènes impliqués dans la régulation de l'autophagie chez les levures. Aujourd'hui, 41 gènes de l'autophagie ont été décrits chez la levure et beaucoup ont un orthologue humain. Ces découvertes lui vaudront le prix Nobel de Physiologie et Médecine en 2016. Les processus autophagiques sont maintenant bien connus et sont exposés dans la figure 17. Bien que le processus est d'abord été décrit comme non sélectif les données de la littérature montrent que l'autophagie peut être sélective de certains organites comme les mitochondries (mitophagie), le peroxysome (pexophagie), le ribosome (ribophagie) ou encore la gouttelette lipidique (lipophagie) ²⁵⁵. Les signaux de mise en place de ces processus sont principalement liés à une diminution importante des niveaux d'énergie médié par mTOR ²⁵⁶ et AMPK ²⁵⁷.

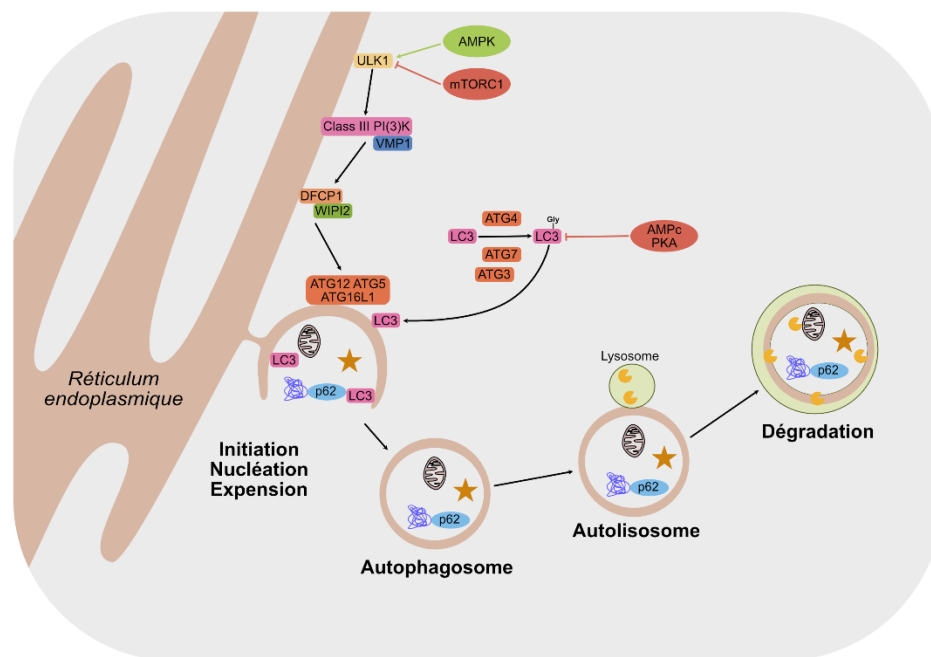


Figure 17 : Les mécanismes de l'autophagie

La membrane plasmique nécessaire à la formation de l'autophagosome provient dans la plupart des cas du réticulum endoplasmique avec une connexion directe entre les 2 compartiments confirmée en microscopie électronique ²⁵⁸. L'induction de l'autophagie entraîne une translocation du complexe protéique **ULK1** (**ULK1-ATG13-FIP200-ATG101**) au niveau du réticulum endoplasmique. Ce complexe va transitoirement s'associer avec la protéine **VMP1** (vacuole membrane protein 1) pour activer la **Class III PI3K** et **Vps34**. Leur recrutement induit l'activation du complexe **ATG12-ATG5-ATG16L1** placé au niveau de la membrane de l'autophagosome en formation. L'élongation et l'isolation de la membrane nécessite la levée de la séquestration de **LC3** par le complexe **ATG12-ATG5-ATG16L1**. **LC3** peut s'associer au niveau de la membrane de l'autophagosome et s'associer à des partenaires tels que **p62** qui sont capables de s'aggréger aux protéines poli-ubiquitinilées. L'autophagosome est par la suite clos, associé à un lysosome pour former un autolysosome et finalement dégrader le cargo. D'après ²⁵⁹

Dans les tissus adipeux blanc et brun, l'autophagie est un régulateur clé de l'adipogénèse. Une dérégulation de ce processus a un effet délétère sur l'accumulation de graisse à la fois in vitro et in vivo ²⁶⁰. Des études animales ont également suggéré un rôle important de l'autophagie et de la mitophagie dans le maintien des tissus adipeux bruns ²⁶¹. Des études humaines ont mis en évidence

une altération de l'autophagie dans le tissu adipeux blanc, et ces altérations avec la situation d'obésité et l'insulino résistance ²⁶². Malgré cela le rôle physiologique de l'autophagie dans les adipocytes reste encore à déterminer.

4. Les régulations épigénétiques

L'épigénétique peut être définie comme les mécanismes impliqués dans les impacts de l'environnement sur le patrimoine génétique sans modifier la séquence d'ADN mais transmissible ²⁶³. L'unité de base de la compaction de la chromatine est un octamère de l'histone autour duquel s'enroule 146 paires de bases soit 1 $\frac{3}{4}$ de tours de double hélice. Cette structure, le nucléosome, permet de faire tenir les 2 mètres d'ADN dans un noyau de 10 μ m de diamètre ²⁶⁴. Cet arrangement de la chromatine influence de façon invariable la capacité des facteurs de transcription à s'associer avec leur site de fixation et régule donc l'expression des gènes ²⁶⁵. Les histones peuvent être soumises à de très nombreuses modifications post-traductionnelles (acétylations de lysines, méthylation de lysines et d'arginines, phosphorylations de sérines et de thréonines ou encore ubiquitination) ²⁶⁶. Une diminution des niveaux d'acétyl-CoA ou d'ATP au niveau nucléaire diminue l'acétylation des histones ²⁶⁷. Des niveaux de glucose élevés peuvent quant à eux stimuler l'activité de la méthyl transférase MLL5 via des GlcNAcylation et ainsi modifier l'expression des gènes ²⁶⁸. De façon intéressante, des modifications transitoires des conditions nutritionnelles peuvent avoir des répercussions durables sur l'expression génique transmissible à la descendance. Il a par exemple été montré que les enfants et plus particulièrement les filles nées de mères ayant subi la famine de 1944 au Pays Bas dans les derniers mois de leurs grossesses avaient des plus petits poids à la naissance mais des plus forts risques de développer une obésité à l'âge adulte que la population générale ²⁶⁹. De plus, d'autres études suggèrent que ces transmissions ne sont pas circonscrites à la F1 et pourraient perdurer sur plusieurs générations ²⁷⁰.

III. L'endothélium du tissu adipeux et la flexibilité métabolique

Le système vasculaire sanguin assure le transport régulé des nutriments énergétiques mais également des régulateurs hormonaux et représente l'interface des échanges entre le compartiment sanguin et le parenchyme tissulaire. Il a donc un rôle clé dans la flexibilité métabolique comme surface régulable et régulant les flux des nutriments et plus particulièrement dans les dépôts adipeux des flux bidirectionnels des acides gras du sang vers les adipocytes en phase absorptive et des adipocytes vers le sang en phase de jeûne. De façon intéressante, les données récentes obtenues par transcriptomique sur cellules endothéliales uniques montrent que c'est dans le tissu adipeux et plus particulièrement dans les capillaires que le nombre de gènes différentiellement exprimés entre état normopondéré et obèse est le plus élevé, suivi par le foie ⁹.

Le système vasculaire lymphatique est un réseau unidirectionnel important dans le drainage tissulaire mais également dans le transport des lipides en condition post-prandiale sous forme de chylomicrons. Ce système ne sera pas détaillé dans ce manuscrit.

A. La structure et la diversité du système vasculaire

Le système vasculaire sanguin peut être segmenté en trois grands domaines : le système artériel, les capillaires et le système veineux. D'un point de vue structurel, les artères et les veines sont constituées de trois tuniques superposées de l'extérieur vers la lumière du vaisseau : l'adventice principalement constituée de tissu conjonctif, la média formée par les couches de cellules musculaires lisses et de matrice extracellulaire (collagène) et l'intima constituée d'une monocouche de cellules endothéliales reposant sur une lame basale composée de collagène, de fibronectine, de laminine et d'élastine. Les microvaisseaux sont caractérisés par une monocouche endothéliale supportée par des cellules murales, péricytes ou cellules musculaires lisses en fonction du diamètre du vaisseau.

Les endothéliums forment une barrière physique plus ou moins perméable entre le compartiment sanguin et les cellules adjacentes. La microscopie électronique a permis d'établir une classification morphologique et structurelle des endothéliums en trois grandes catégories^{271,272} (Figure 18).

L'endothélium continu tapisse les chambres cardiaques, les vaisseaux de gros calibres comme l'aorte ou la veine cave ainsi que des vaisseaux de plus petit calibres résidant dans les organes tel que la peau, le muscle squelettique, la vasa recta du rein et la barrière hémato-encéphalique. Les cellules endothéliales de ces lits vasculaires présentent un grand nombre de cavéoles et de vésicules plasmalemmales qui permettent d'assurer et de réguler les échanges entre le compartiment sanguin et les cellules des tissus adjacents²⁷³.

L'endothélium fenestré est présent en majorité dans les vaisseaux sanguins des glandes endocrines, du tractus digestif ainsi que dans les capillaires péri-tubulaires du rein. Il est caractérisé par des fenestrations qui sont des canaux trans-endothéliaux avec diaphragme permettant le passage des fluides et molécules de petites tailles. Ces canaux limitent néanmoins les échanges entre le compartiment sanguin et les tissus des molécules de grandes tailles qui nécessitent d'être prises en charge par des mécanismes d'endocytose pour le passage trans-endothélial.

L'endothélium sinusoidal tapisse les vaisseaux du foie et de la moelle osseuse par exemple. Les endothéliums sinusoides sont discontinus, présentent des fenestrations de diamètres importants, de tailles hétérogènes et ne présentent pas de diaphragmes. Il repose sur une membrane basale discontinue et permet des échanges libres entre le sang et le tissu dans lequel elles résident.

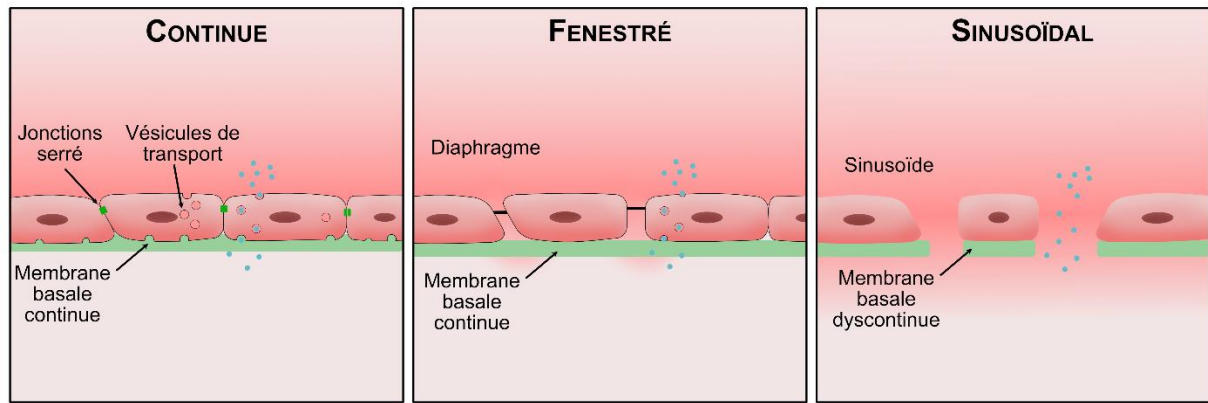


Figure 18 : Les différents types d'endothéliums

Dans les dépôts adipeux, même si la présence d'un endothélium fenestré a été suggéré de par la fonction endocrine des dépôts adipeux ²⁷⁴, les analyses en microscopie électronique des capillaires des dépôts adipeux sous-cutanés humains montrent une architecture de type endothélium continu ²⁷⁵. Dans les tissus adipeux humains, les travaux de l'équipe ont montré que les cellules endothéliales sanguines sont caractérisées par leur expression de deux marqueurs de surface : CD34 qui est une molécule d'adhésion exprimée sur les cellules progénitrices et les cellules endothéliales ainsi que CD31 ou PECAM1 (platelet-Endothelial cell Adhesion Molecule 1) exprimée de manière spécifique sur les cellules endothéliales et par l'absence du marqueur CD45 ou PTPRC, marqueur des cellules immunes ⁷. Chez la souris, les cellules endothéliales des dépôts adipeux expriment le même profil en remplaçant CD34 par SCA1 (Stem cell Antigen 1). L'étendue de la vascularisation montre des différences territoriales évaluée par cytométrie en flux en évaluant le nombre de cellules endothéliales par gramme de tissu adipeux chez l'homme ou par dépôt entier chez la souris. Des approches d'imagerie en 3D qui maintiennent l'architecture tissulaire permettent également d'évaluer le réseau vasculaire malgré la taille très supérieure des adipocytes. Ainsi les dépôts adipeux viscéraux humains (omental) ont un réseau capillaire plus étendu que les dépôts sous-cutanés ²⁷⁶. De plus, ces réseaux suivent le développement de la masse du dépôt ⁷. Grâce aux nouvelles techniques de transparence, il serait intéressant de mieux définir l'architecture des arbres vasculaires des différents dépôts adipeux afin de mettre en lumière chacun des trois domaines artériels, veineux et microvasculaires et leur organisation en fonction de la localisation des dépôts et de l'indice de masse corporelle et/ou des pathologies associées. Les approches actuelles de séquençage sur cellule unique ont permis de mettre en évidence l'existence de 6 sous-populations de cellules endothéliales dans les dépôts adipeux humains ²⁷⁷. De façon intéressante, cette hétérogénéité est retrouvée également chez la souris avec des marqueurs géniques communs humains et murins: DKK2 pour endoA1, SIPA1L2 pour endoA2, LHX6 pour endoS1, MAN1C1 pour endoS2, KYNU pour endoS3, PRAG1 pour endoV. L'analyse de la répartition de ces sous-populations montre des différences en fonction du dépôt adipeux (endoS1, S2, S3) et de l'état d'obésité (endoS1). Nos analyses basées sur les gènes spécifiques marqueurs de ces populations chez

l'homme montrent des enrichissements dans des voies distinctes avec les sous-types présentant des enrichissements dans les voies liées à l'angiogenèse pour S2, à la différenciation et migration pour S3 et à l'inflammation pour S1. Les voies de l'adhésion cellulaire sont enrichies dans la population A1, celles liées au transport et à l'homéostasie des ions dans la population A2 et les voies relatives au métabolisme (PPAR, lipolyse, PiK-Akt) ainsi qu'à la sénescence sont enrichies pour la population V. Ces résultats particulièrement intéressants suggèrent des spécialisations dans la fonction des sous-populations de cellules endothéliales des dépôts adipeux ²⁷⁷ (Figure 19).

B. Les fonctions de l'endothélium

Les fonctions « classiques » de l'endothélium sont la modulation du tonus vasculaire, la voie de l'hémostase et du complément ainsi que les interactions avec les leucocytes.

1. Le tonus et la modulation du flux sanguin

Le débit sanguin au sein du tissu adipeux sous-cutané (environ 3mL par minute pour 100g de tissu après un jeûne sur la nuit) est très faible (30 à 50 fois inférieur à celui du cœur ou du cerveau^{278,279}). L'état absorptif s'accompagne d'une augmentation du flux sanguin vers les tissus adipeux chez les individus normopondérés²⁸⁰. En parallèle, le volume microvasculaire occupé augmente²⁸¹. Chez le rat, l'analyse du flux sanguin par injection de DDT marqué au tritium montre des variations du flux sanguins en fonction de l'état actif ou inactif (matin versus soir) dans les dépôts adipeux avec le flux sanguin le plus élevé quelque soit l'état retrouvé dans le tissu adipeux brun²⁸². Chez les patients en situation d'obésité et résistant à l'insuline, les variations du flux sanguin en fonction des états absorptifs ou à jeûne sont diminués²⁸³ signant une altération de la fonction endothéliale en réponse aux changements métaboliques. Chez l'homme, des approches plus récentes par des mesures d'imagerie en TEP SCAN après perfusion de ([¹⁵O]-H₂O) montrent que le flux sanguin est inversement proportionnel quelque soit le dépôt adipeux (sous cutané et viscéral) à la sensibilité à l'insuline de chaque dépôt évaluée par l'entrée tissulaire du I[¹⁸F]-fluoro-2-deoxyglucose²⁸⁴. L'activité métabolique du tissu adipeux est impactée par les niveaux des hormones et des substrats qu'il reçoit et par la vitesse à laquelle les produits terminaux du métabolisme sont éliminés, fonction de la vitesse du flux sanguin. Il est à noter qu'en situation de jeûne lors de la mobilisation des acides gras par la lipolyse, leur accumulation excessive dans le tissu exerce un rétrocontrôle négatif sur la lipolyse. Ainsi la production d'acides gras in vivo des dépôts adipeux est en partie dictée par le flux sanguin. En ce sens, les catécholamines qui sont de puissants stimulateurs de la lipolyse adipocytaire régulent également le flux sanguin des dépôts humains abdominaux et fémoraux²⁸⁵.

L'endothélium est capable de produire et de répondre à un grand nombre de médiateurs ayant des effets vasodilatateurs ou vasoconstricteurs dont le principal est le monoxyde d'azote ou NO. Le NO est produit à partir de l'arginine par la eNOS (endothelial Nitric Oxide Synthase). Située au niveau de la membrane plasmique et associée à la cavéoline, elle est maintenue inactive. La formation de cavéole, activée par une signalisation calcique, déplace la cavéoline, libère et lève l'inhibition de la eNOS^{286,287}. Les signaux calciques peuvent provenir de différents stimuli médiés par des récepteurs (acétylcholine, catécholamines) ou par des contraintes mécaniques comme les tensions d'écoulement. Le NO diffuse vers les cellules musculaires lisses dans lesquelles il induit l'augmentation de GMP cyclique, la réduction de la concentration intracellulaire en calcium et in fine provoque un relâchement musculaire²⁸⁸. L'oxyde nitrique est un régulateur majeur du flux sanguin préprandial et postprandial du tissu

adipeux sous-cutané chez l'homme ²⁸⁹. L'augmentation du stress oxydant avec l'obésité pourrait contribuer à la diminution de la biodisponibilité du NO ²⁹⁰ et donc à l'altération des réponses endothéliales dilatatrices aux changements d'états métaboliques. De façon intéressante, au niveau du tissu adipeux humain sous-cutané, le GIP exerce un effet vasodilatateur qui implique le recrutement de capillaire ²⁹¹.

2. La régulation de l'hémostase et du recrutement des cellules immunes

L'endothélium vasculaire joue un rôle essentiel dans la régulation de l'hémostase. Dans des conditions non-pathologiques, l'endothélium produit des facteurs favorisant les propriétés anticoagulantes et s'opposant à l'activation et à l'agrégation des plaquettes tels que la thrombomoduline et le TFPI (*Tissue Factor Pathway Inhibitor*). L'héparan sulfate chargé négativement (glycocalyx) et le NO permettent respectivement la répulsion et l'inactivation plaquettaire ²⁹². En cas de détérioration de l'endothélium, les cellules endothéliales vont libérer des vésicules aussi appelés corps de Weibel–Palade contenant le facteur de Von Willebrand (vWf), de l'angiopoietine-2, et des P-selectines. Elles vont aussi produire de la fibronectine et de la thrombospondine qui sont des régulateurs de l'agrégation plaquettaire. Le vWf permet de lier les plaquettes entre elles et à la matrice dans la lumière de l'endothélium. Aussi le cross linking des monomères de fibronectine et la thrombospondine forme des structures qui limite la fibrinolyse locale et participe ainsi à l'agrégation plaquettaire. Cet enchaînement d'événement orchestré par les cellules endothéliales constitue la réponse hémostatique primaire et initialise l'activation plaquettaire et la cascade des mécanismes de coagulation ²⁹³.

En parallèle, en condition physiologique, l'endothélium vasculaire est considéré comme anti-inflammatoire et régule le trafic des cellules immunes ²⁹⁴. L'activation de l'endothélium en réponse à différents stimuli comme une infection (bactérienne ou virale) ou des interleukines (IL-6, TNF- α), conduit à la présentation luminale de molécules d'adhésions telles que les sélectines (P-sélectine, L-sélectine et E-sélectine), des intégrines (Alphav beta3 notamment) et des membres de la superfamille des immunoglobulines tel que l'immunoglobuline superfamily intercellular adhesion-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) qui facilitent l'ancrage des leucocytes circulants et leur extravasion vers le tissu ²⁹⁵. Les travaux de l'équipe ont notamment montré que les cellules endothéliales des tissus adipeux humains sous-cutanés traitées par des milieux conditionnés des adipocytes matures sont activées entraînant une adhésion et une transmigration plus élevée des monocytes sanguins. Ces effets étaient en partie mimés par des fortes concentrations de leptine ⁸. De plus, une activation de l'endothélium du tissu adipeux sous-cutané abdominal a été mise en évidence avec l'obésité ²⁹⁰ et les cellules endothéliales issues du TA viscéral de patients obèses montrent un phénotype pro-inflammatoire plus marqué que celles isolées de TA sous cutané ²⁷⁶. Enfin, la délétion du facteur de transcription de la voie de l'inflammation, NF- κ B, dans les cellules endothéliales (Tie2-cre) chez la

souris s'accompagne d'une prévention de l'accumulation des macrophages dans le tissu adipeux sous régime enrichi en lipides ²⁹⁶, démontrant l'importance de l'activation des cellules endothéliales des dépôts adipeux dans la mise en place et/ou le maintien de l'état inflammatoire de bas grade associé à l'obésité. Il a d'ailleurs été montré que les niveaux solubles d'ICAM1 et de VCAM1 étaient augmentés chez l'adulte obèse ²⁹⁷ et qu'une normalisation était possible après une perte de poids ²⁹⁸. De plus, ces données suggèrent que l'activation des cellules endothéliales avec l'état d'obésité peut être généralisée à d'autres lits vasculaires et reversée par une perte de poids.

3. La régulation des échanges entre le sang et le parenchyme

La présence d'un endothélium non fenestré, continu, implique la présence de mécanismes de transcytose facilitant les échanges entre les deux compartiments. Pendant de nombreuses années, l'étude de ces phénomènes a été rendue difficile par la rapide dérive des cellules endothéliales primaires en culture qui perdent leur capacité à la transcytose ²⁹⁹. In vivo chez la souris une des premières preuves de ces phénomènes de transcytose a été apportée suite à l'injection intracardiaque d'albumine couplée à des particules d'or et l'observation par microscopie électronique à transmission des molécules marquées dans des vésicules intracellulaires, mais aucune fuite n'a pu être observée au niveau des jonctions intercellulaires ³⁰⁰. Pour la plupart des molécules comme c'est le cas pour l'albumine une grande partie du transport se fait par des phénomènes d'endocytose qui correspondent à l'internalisation par la cellule d'une vésicule contenant du liquide extracellulaire et des molécules entourées d'une bicouche lipidique issue de la membrane plasmique.

On distingue plusieurs mécanismes d'endocytose dans l'endothélium (Figure 20) :

La macropinocytose qui correspond à une invagination de la membrane plasmique par l'intermédiaire du cytosquelette d'actine. Cet événement primaire va avoir pour effet de former une poche qui va finir par se pincer et former une vésicule intracellulaire de diamètre compris entre 0,5 et 5 μm ³⁰¹. La macropinocytose peut être secondaire à la formation de collerettes membranaires (circular dorsal ruffle ; CDR), qui se forment à la surface de la cellule ^{302,303}. Les protrusions des CDR sont enrichies en actine F et en cortactine qui contribue également à la fermeture des structures et à la formation de vésicules de macropinocytose ³⁰⁴ selon une cinétique rapide (entre 5 -30 min) ³⁰⁵. Bien que l'ensemble des mécanismes reste à préciser et que les acteurs moléculaires peuvent varier en fonction des stimuli, la formation et la fermeture des CDR ainsi que leur devenir est hautement régulé notamment par l'activité de la PI3K ³⁰⁶. Par ailleurs, des événements de macropinocytose ont pu être mis en évidence dans le cadre d'interaction ligand/récepteur, par exemple l'activation de CSF-1R (colony stimulating factor-1 receptor) ou de l'EGFR ^{307,308}.

L'endocytose dépendante des clathrines est un mécanisme mettant en jeu lui aussi des interactions ligand/récepteur. Une fois le complexe établi des adaptateurs de la clathrine tel que AP-2 vont venir se coupler au complexe. La clathrine va par la suite former un réseau en couronne et provoquer l'invagination de la membrane plasmique puis la formation d'une vésicule recouverte de clathrine. Ces vésicules d'un diamètre moyen de 100 nm, ont une structure en couronne d'épine, particulièrement reconnaissable en microscopie électronique à transmission.

L'endocytose dépendante de la cavéoline consiste en la formation de vésicules dans des microdomaines de la membrane plasmique riche en cholestérol et en cavéoline, une protéine qui recouvre l'entièreté de la vésicule une fois formée ³⁰⁹. Dans les cellules endothéliales jejunal de rat par exemple, 8,5% du volume cytoplasmique total est occupé par des vésicules entourées de cavéolines ³¹⁰. Ces vésicules d'environ 80nm de diamètre sont reconnaissables en microscopie électronique grâce à leurs couronnes très dense aux électrons. Il a été décrit la présence du récepteur scavenger et transporteur d'acides gras CD36 (FAT, CD36) dans les microdomaines cavéolaires des adipocytes. Les auteurs montrent que l'activation de CD36 par l'acide palmitique pourrait induire la formation et l'intégration des vésicules contenant les lipides et ainsi participer à la formation de la gouttelette lipidique ³¹¹.

Il est à noter que pour un même type de molécule, plusieurs types d'endocytose peuvent exister ³¹². Par exemple, l'albumine peut être transportée par macropinocytose, mais également endocytose dépendante de la cavéoline ³¹³. Les vésicules, une fois dans la cellule, sont prises en charge par la dynamine qui permet leur progression dans le cytoplasme par l'intermédiaire du réseau de microtubules ^{312,314}.

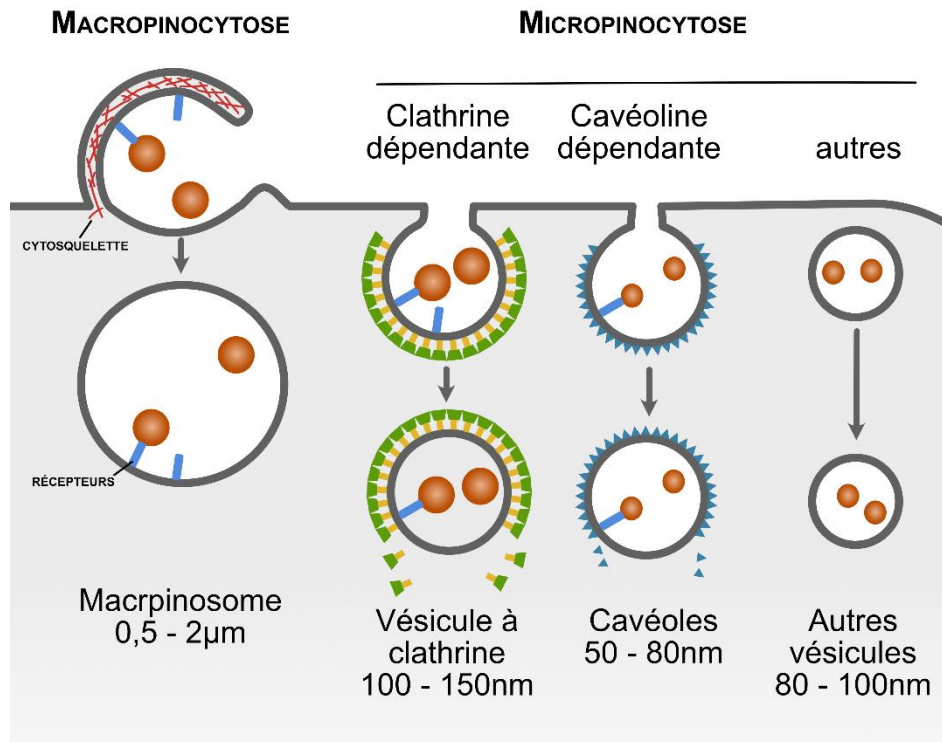


Figure 20 Voies de l'endocytose

On distingue plusieurs mécanismes d'endocytose dans l'endothélium : la macropinocytose qui peut être dépendante ou non de récepteurs et qui met en jeu le cytosquelette de cortactine pour former des vésicules entre 0.5 μm et 2 μm, la micropinocytose comprend quand à elle 3 grands types de prise en charge. Une dépendante de la clathrine qui recouvre la vésicule et permet la formation de corps entre 100 et 150 nm, une voie cavéoline dépendante avec des vésicules entre 50 et 80 nm et des micropinocytoses d'autres types.

Les cellules endothéliales jouent un rôle clé dans la régulation des flux et le transport des acides gras. Cependant, les mécanismes restent à être précisés et diffèrent en fonction des organes et des lits vasculaires ³¹⁵. Au niveau des endothéliums non fenestrés dont ceux du tissu adipeux, les cellules endothéliales expriment une machinerie permettant le transport actif des acides gras. La GPIHBP1 (glycosylphosphatidylinositol-anchored HDL-binding protein 1) est une protéine produite exclusivement par les cellules endothéliales qui permet la présentation luminaire de la LPL (lipoprotéine lipase) produite par les cellules du parenchyme, et notamment les adipocytes. La LPL est prise en charge au niveau de la membrane basolatérale de la cellule endothéliale et transportée vers la face apicale par GPIHBP1 pour être présentée dans la lumière des capillaires. Sa dimérisation s'accompagne d'une fixation des lipoprotéines circulantes ^{316,317} permettant l'hydrolyse des triglycérides qu'elles contiennent par la LPL. Les acides gras libérés sont pris en charge par des protéines chaperonnes (albumine et féтуine), des récepteurs et transporteurs membranaires. Les cellules endothéliales sont équipées de transporteurs membranaires FATP (Fatty acid transport protein) 1, 3 et 4, FABPpm (Fatty Acid Binding Protein), CD36/FAT (Fatty acid transporter) et de transporteurs cytoplasmiques FABP 3 à 5 qui ont été détectés au niveau du cœur et des gros vaisseaux ^{275,318,319} mais aussi au niveau des tissus adipeux ²⁷⁵. CD36 a d'abord été décrit comme un facilitateur de l'entrée des acides gras dans les

adipocytes³²⁰ puis a été montré dans les cellules endothéliales. Chez la souris, l'inactivation totale de CD36 provoque une diminution drastique des flux d'acides gras au niveau du cœur, du muscle squelettique et du tissu adipeux³²¹. Aussi, l'inactivation ciblée de CD36 dans les cellules endothéliales (promoteur : Tie2-Cre), est associée à une amélioration de la tolérance au glucose, de la sensibilité à l'insuline et à l'augmentation de l'absorption du glucose pendant le jeûne dans le cœur, le muscle squelettique et le tissu adipeux blanc. Les données révèlent aussi que le transport des acides gras médié par CD36 à travers les cellules endothéliales est de forte affinité mais de faible capacité laissant à penser qu'il existe d'autres transporteurs. Les transporteurs cytoplasmiques FABP 4 et 5 sont exprimés dans les capillaires et les veinules cardiaques, mais sont aussi retrouvés au niveau du tissu adipeux. En revanche, ils ne sont pas présents dans les organes avec un endothélium non fenestré³²² (Figure 21).

L'expression de ces transporteurs peut être modulée, notamment par PPAR γ connu pour être un des principaux régulateurs de la transcription des acteurs du métabolisme des lipides³²³. Une délétion spécifique de PPAR γ dans les cellules endothéliales mène à une diminution de l'expression des transporteurs des acides gras tels que Cd36 et Fabp4 ainsi que de Ghihbp1. De plus, les animaux présentent des taux anormalement élevés de VLDL et d'acides gras libres plasmatiques. Ces anomalies s'accompagnent d'une incapacité des tissus de stockage à accumuler des lipides à l'exception du foie, ce qui suggère une action spécifique de PPAR γ sur les acteurs du transport des acides gras dans les lits vasculaire des organes présentant un endothélium non fenestré³²⁴.

Enfin le VEGFB via son interaction avec le récepteur VEGFR1 a été décrit chez la souris comme étant un activateur du passage trans-endothélial des acides gras au niveau musculaire, cardiaque et dans le tissu adipeux brun mais pas dans le tissu adipeux blanc épидидymaire³²⁵. A noter, le VEGFB a également été impliqué dans la transcytose endothéliale du glucose³²⁶, cependant les cellules endothéliales du tissu adipeux n'ont pas été étudié.

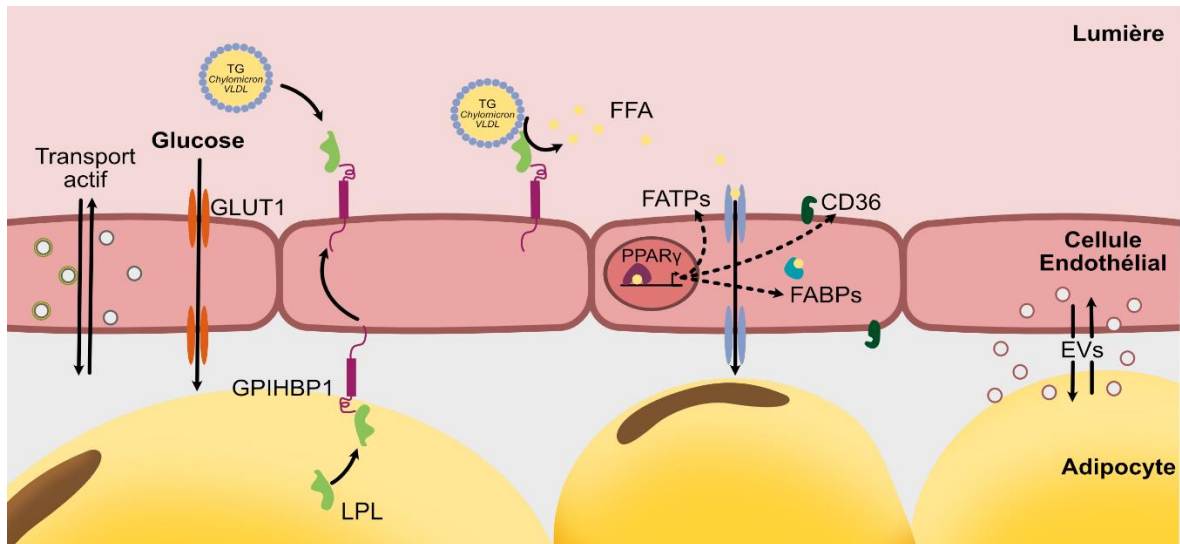


Figure 21 : Echanges entre le compartiment sanguin et le parenchyme adipeux

Les cellules endothéliales sont un point de convergence des transports puisqu'elles mettent en place et régulent les transports bidirectionnels entre les compartiments sanguins et les autres cellules du tissu adipeux. Dans le tissu adipeux les cellules endothéliales peuvent mettre en place des transports actifs de molécules et de solutés via des vésicules d'endocytose, des transporteurs comme pour le glucose et les acides gras ou par des émissions et des réceptions de vésicules extracellulaire qui permettent des échanges à grande distance. En ce qui concerne les acides gras, ils sont issus de l'hydrolyse des lipoprotéines par la lipoprotéine lipase au niveau de la lumière vésicale. La LPL est produite par les adipocytes, acheminé aux cellules endothéliales et associé à GPIHBP1 qui permet sa présentation luminal. Les acides gras libres sont par la suite pris en charges par des transporteurs (FATP, FABP, CD36). Une partie de cette machinerie de prise en charge des acides gras est sous le contrôle du facteur de transcription PPAR γ qui est activé par les niveaux d'acides gras.

C. L'angiogenèse et remodelage du tissu adipeux

L'angiogenèse est le processus par lequel le réseau vasculaire s'étend à partir de vaisseaux sanguins déjà existants. L'angiogenèse est notamment associée au développement, à la croissance et au remodelage des tissus. Il est connu depuis longtemps que le tissu adipeux a des propriétés angiogéniques marquées. En effet, des lambeaux de tissu adipeux sont utilisés pour promouvoir la vascularisation et la cicatrisation de plaies³²⁷. De même, des explants de tissu adipeux humain placés sur la membrane chorioallantoïque de poulet stimule l'angiogenèse³²⁸. Les adipocytes expriment et sécrètent un grand nombre de facteurs angiogéniques dont la leptine³²⁹. De plus, les cellules progénitrices CD45+/CD34+/CD31- ont un potentiel angiogénique marqué car leur injection à des souris avec une ischémie du membre inférieur favorise la re-vascularisation⁷. L'angiogenèse serait nécessaire au développement de la masse grasse car chez des animaux rendus obèses par un régime hyperlipidique l'injection d'un peptide ciblant spécifiquement l'angiogenèse (CKGGRKDC-GG_D (KLAKLAK)₂) induit une perte de poids et de masse grasse significative³³⁰. Compte tenu du lien étroit entre les vaisseaux sanguins et les cellules du parenchyme du tissu adipeux un remodelage concomitant de la vasculature et des tissus adipeux semble nécessaire à l'expansion des dépôts adipeux. Il a par exemple été montré dans un modèle de tissus adipeux ex-vivo de souris

génétiqnement obèses (déplété pour le gène de la leptine Ob/Ob), que les processus d'adipogénèse et d'angiogénèse étaient opérés conjointement et à proximité³³¹. Dans la même étude, le traitement des animaux génétiquement obèse avec un inhibiteur de l'angiogénèse (anti-VEGF) provoque la diminution du poids des dépôts adipeux, sans modifier la taille moyenne des adipocytes. Cependant, les auteurs n'ont pas observé des adipocytes de petit diamètre, suggérant la nécessité d'une angiogénèse conjointe à l'adipogénèse, mais surtout l'importance d'une vasculature abondante et compétente pour assurer les mécanismes de stockage. De ces études, il a pu être proposé la mise en place de traitement utilisant des inhibiteurs de l'angiogénèse pour diminuer l'adiposité³²⁵. Cependant Sun et al. ont montré grâce à des modèles murins que pendant les premières semaines après la mise sous régime gras, la surexpression du facteur pro-angiogénique VEGF-A est bénéfique sans signe de dysfonction du tissu adipeux (inflammation, fibrose, taille adipocytaire). Au contraire, l'inhibition de VEGF-A chez ces animaux pendant la mise en place de l'obésité entraîne des altérations métaboliques et une résistance à l'insuline³³². Au vue de ces résultats et du lien entre la vascularisation et la capacité d'expansion du tissu adipeux, il semble prématuré d'envisager le traitement de l'obésité par l'inhibition de l'angiogénèse, mais la compréhension des mécanismes impliqués pourrait être décisive. Renforçant les liens entre angiogénèse et accumulation excessive du tissu adipeux lors de l'obésité, les approches récentes en études transcriptomiques sur cellules endothéliales uniques montrent que l'obésité s'accompagne d'une augmentation de plus de 3 fois des sous-types de cellules endothéliales angiogéniques et prolifératives avec 11% des cellules endothéliales du tissu adipeux sous-cutané exprimant un phénotype angiogénique ou prolifératif⁹. De façon intéressante, cette même étude montre que la proportion de cellules endothéliales angiogéniques est fonction de la durée de l'obésité avec une baisse de leur nombre dans le tissu adipeux sous-cutané⁹.

D. La flexibilité du métabolisme des cellules endothéliales

L'endothélium vasculaire adapte son métabolisme à ses besoins en énergie et en biomasse tout en garantissant les apports aux tissus qu'il dessert. Les données de la littérature indiquent que le métabolisme des cellules endothéliales peut varier en fonction du lit vasculaire, du statut nutritionnel et de leur phénotype³³³. Les études transcriptomiques en cellule unique des cellules endothéliales de la souris isolées de différents organes montrent une grande diversité de phénotypes métaboliques des endothéliums selon le lit vasculaire¹⁰. Ainsi Paik et al décrit un enrichissement des voies métaboliques et de celles liées à mTOR dans les cellules endothéliales du tissu adipeux²⁷⁷. De plus ces voies sont modulées avec l'état et la durée de l'obésité⁹.

En condition physiologique chez l'adulte, les cellules endothéliales (EC) sont généralement perçues comme des cellules quiescentes et stables. Elles préfèrent une glycolyse anaérobie. Celle-ci est moins rentable pour produire de l'ATP mais permet de limiter le stress oxydant et d'assurer un transfert

maximal d'oxygène vers les tissus vascularisés. Cependant, les cellules endothéliales sont également capables d'adapter leur métabolisme pour faire face à des changements d'état et d'environnement comme par exemple pendant les phases d'angiogenèse³³⁴. Les cellules endothéliales qui guident les bourgeons vasculaires vers les régions hypoxiques, appelées des « Tip-cells » n'utilisent pas les mêmes substrats énergétiques que les cellules endothéliales qui soutiennent la croissance et formation des vaisseaux appelées Stalk Cellules³³⁴. Dans le tissu adipeux, la suppression ciblée de la PTEN dans les CE augmente la vascularisation. En conséquence, la fonction du tissu adipeux est restaurée avec une réduction de la masse grasse. La suppression de PTEN favorise la signalisation PI3K dans les CE et stimule la synthèse de polyamines (notamment la spermine), La spermine renforce la signalisation des récepteurs β AR dans les adipocytes et favorise la lipolyse³³⁵. Par conséquent, les adipocytes libèrent des AGL que les CE adjacentes utilisent comme carburant pour l'oxydation des acides gras, ce qui fournit l'énergie nécessaire à la prolifération.³³⁵. Ce dialogue cellule endothéliale /adipocytes pourrait faire intervenir des vésicules extracellulaires comme décrit par Crewe et al. d'une manière dépendante des états énergétiques et de l'obésité³³⁶.

E. Le vieillissement de l'endothélium vasculaire du tissu adipeux

La sénescence cellulaire est un processus biologique au cours duquel les cellules changent d'état et stoppent leur progression dans le cycle cellulaire. Physiologiquement, ce processus est primordial pendant les phases développementales, la réparation tissulaire³³⁷. De plus l'entrée en sénescence permet de limiter la prolifération de cellules endommagées et contribue à limiter le développement de tumeurs. Les cellules sénescents peuvent être reconnues et éliminées par les cellules immunes comme les macrophages³³⁷. En contrepartie, l'accumulation de cellules sénescents dans un tissu, liée à l'augmentation importante de leur nombre et/ou un défaut d'élimination par le système immunitaire est un phénomène délétère associé au développement de nombreuses pathologies multi-systémiques impactant par exemple le système vasculaire ou rénal, mais aussi l'obésité, le diabète de type 2 et la sarcopénie^{338,339}.

La sénescence est induite par des stress cellulaires tels que les dommages à l'ADN, les mutations associées à la surexpression d'oncogènes, un raccourcissement des télomères, une dysfonction métabolique ou même une inflammation. Ces altérations favorisent l'arrêt du cycle cellulaire par activation des voies P53/P21 et Rb/P16. Les cellules sénescents sont caractérisées par une modification de l'architecture de la chromatine, une élévation de l'activité β -galactosidase extra-lysosomal et l'expression d'un sécrétome particulier (SASP : Senescence-Associated Secretory Phenotype). Les éléments du SASP sont divers et inclus des interleukines (Il6, Il7, Il13, Il15), des chimiokines (MCP1, Eotaxin), des facteurs de croissance (EGF, VEGF, NGF) des facteurs circulant (NO), des espèces réactives de l'oxygène et des facteurs de remodelage de la matrice extracellulaire³⁴⁰.

(Figure 22). Cependant, les données de la littérature indiquent que la sénescence est un phénomène hétérogène spécifique au type cellulaire et au type même de sénescence ³⁴¹, ce qui a mené à un consensus définissant la sénescence par au moins deux marqueurs ³⁴². La contribution majeure de la sénescence dans le développement de pathologies telles que l'obésité, le diabète de type 2 et les maladies cardiovasculaires a été montré chez le rongeur par des approches permettant d'élimination spécifique des cellules sénescence (génétiques ou pharmacologiques par des sénolytiques) ³⁴³⁻³⁴⁶.

L'obésité, qui peut être un facteur de vieillissement accéléré, et le vieillissement naturel sont associés à une accumulation de cellules sénescences dans des tissus susceptibles de participer aux désordres métaboliques et au développement du diabète de type 2 ^{344,347}. En particulier, il a été montré une accumulation de cellules sénescences dans le tissu adipeux. Les données de la littérature mettent en évidence que les cellules progénitrices sénescences perdent leurs capacité à se différencier en adipocytes mature et présentent une résistance à l'insuline ³⁴⁸. De plus, les travaux de l'équipe ont montré que les progéniteurs sénescents sont plus prônes à entrer dans la voie myofibroblastique au détriment de la voie adipogénique ³⁴⁹. Chez le rongeur, la transplantation de progéniteurs sénescents suffit à induire une insulino-résistance alors que le traitement de souris rendues obèses et âgées avec des sénolytiques, a pour effet de réduire l'hypertrophie adipocytaire, d'améliorer l'inflammation et la tolérance à l'insuline ³⁵⁰. Les cellules endothéliales vasculaires sont également des cibles du vieillissement chronologique et accéléré par l'obésité ²⁷⁶.

L'accumulation de cellules endothéliales sénescences a été montrée dans différentes pathologies tel que l'athérosclérose ³⁵¹, l'hypertension pulmonaire ³⁵², des pathologies vasculaire et notamment aortiques ³⁵³, et les dysfonctions métaboliques ²⁷⁵. Les cellules endothéliales sénescences ont un phénotype propre avec un élargissement et un aplatissement des cellules qui s'accompagne souvent d'un plurinucléisme et d'une incapacité à s'aligner au flux ³⁵⁴. À l'instar des autres cellules, les cellules endothéliales sénescences présentent une augmentation l'expression des voies de suppression des tumeurs p53/p21 et Rb/P16 ³⁵⁴. Les cellules endothéliales semblent être parmi les premiers types cellulaires à devenir sénescents au cours du vieillissement et ce dans plusieurs lits vasculaires ^{355,356}. Ceci pourrait être due à leurs proximités avec le compartiment sanguin qui contient des substances impliquées dans les mécanismes de sénescence telle que l'oxygène, le glucose ^{357,358}, les lipides ³⁵⁹, les acides aminés les ROS et les cytokines inflammatoire ³⁶⁰.

Les travaux de l'équipe ont mis en évidence l'accumulation de cellules endothéliales sénescences dans les tissus adipeux avec l'obésité et avec l'âge ^{275,276}. Dans le tissu adipeux viscéral humain, les cellules endothéliales sénescences présentent une surexpression de molécules pro-inflammatoires (CCL20, CXCL8 et ICAM1) et une diminution d'acteurs de la gestion des flux d'acides gras (PPAR γ et GPIHBP1)

par rapport aux cellules endothéliales du tissu adipeux sous-cutané²⁷⁶. De plus, l'équipe a mis en évidence que les cellules endothéliales sénescents issues de tissu adipeux sous-cutané abdominal ont une altération de la réponse à l'activation de PPAR γ . Ce défaut limite la capacité d'incorporation des acides gras par les cellules endothéliales et favorise l'expression de molécules pro-inflammatoires (ICAM-1, MCP-1, IL-6 et IL-8)²⁷⁵. Ainsi, la sénescence endothéliale a également un rôle à jouer dans la dysfonction du tissu adipeux et pourrait contribuer à l'altération de l'homéostasie lipidique et du métabolisme. Cette hypothèse est soutenue par l'étude d'un modèle murin portant une mutation non-fonctionnelle de TRBF2 (telomeric repeat-binding factor 2) invalidant la télomérase spécifiquement dans l'endothélium. Cette mutation est associée à une accumulation de cellules endothéliales sénescents et favorise l'insulino-résistance du tissu adipeux et la progression d'une intolérance au glucose au niveau systémique³⁶¹. Par ailleurs, une étude suggère que le maintien de l'homéostasie vasculaire via VEGF permet de réduire les effets des dysfonctions lié au vieillissement³⁶².

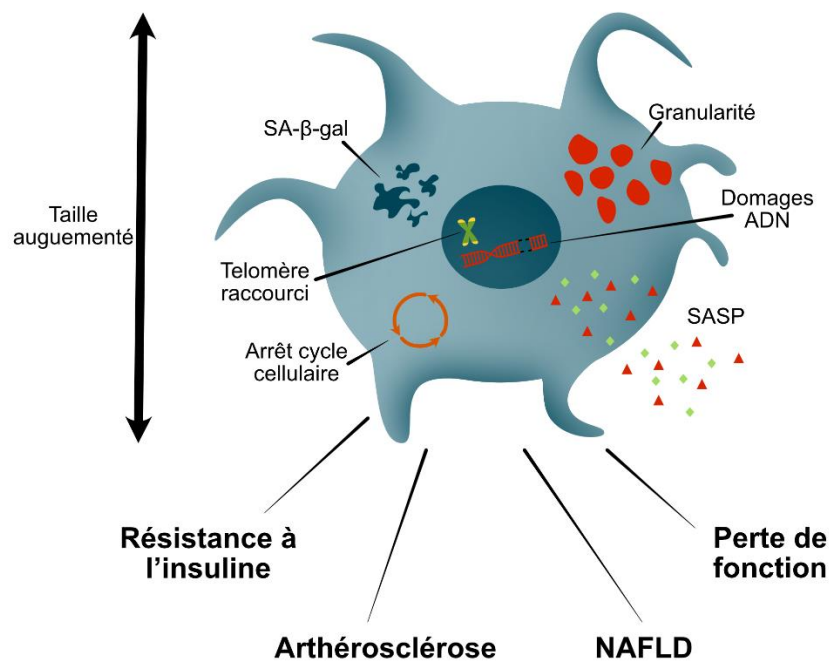


Figure 22 : La cellule sénescente et effet sur le métabolisme

Les cellules sénescents présentent un phénotype caractéristique qui permet de les identifier : une activité SA- β -gal, une taille et une granularité augmentée, une accumulation des dommages à l'ADN, un raccourcissement des télomères, un arrêt du cycle cellulaire et un phénotype transcriptionnel et sécrétoire (SASP) altéré. L'accumulation de ces cellules sénescents à été montré pour induire l'apparition de pathologies cardio-métaboliques tel que des pertes de fonctions cellulaires, la résistance à l'insuline, l'arthérosclérose et la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD).

IV. La voie de signalisation NOTCH

A. Définition et fonctionnalité

Le gène NOTCH a été initialement décrit chez des drosophiles qui présentaient des ailes dentelées (*notched* en anglais) ³⁶³. Il fut par la suite décrit, isolé et séquencé chez l'ensemble des métazoaires, faisant de la voie NOTCH une des plus anciennes et les mieux conservées ^{364,365}. La voie NOTCH est une voie de communication cellule-cellule qui met en jeu une cellule émettrice portant un ligand et une cellule réceptrice portant un récepteur. Cette voie de signalisation est impliquée dans le développement embryonnaire et post-natal, mais également l'homéostasie et la réparation tissulaire. En particulier, des mutations des acteurs de la voies Notch sont associées au développement de maladies sévères telles que le syndrome Alagille (défaut des voies biliaires entraînant des cholestases, sténoses des artères pulmonaires, anomalie vertébrale, rétinopathie pigmentaire,...) lié à une mutation du gène codant le ligand *JAG1* ou le récepteur *NOTCH2* ³⁶⁶. Des mutations des acteurs de la voie NOTCH sont également responsables du développement de leucémies lymphoblastiques aiguës (mutation activatrice de *NOTCH1*) ³⁶⁷, du syndrome CADASIL (atteinte de la microcirculation cérébrale avec troubles cognitifs et difficultés locomotrices) principalement secondaire à des mutations de *NOTCH3* ³⁶⁸. Enfin des mutations de *NOTCH1* conduisant à une haplo-insuffisance favorisent le développement de désordres cardiaques tels que la calcification de la valve aortique et augmente le risque d'incidents cardiovasculaires ³⁶⁹.

1. Les récepteurs et ligands de la voie NOTCH

Les récepteurs : Les récepteurs NOTCH sont des protéines transmembranaires. Alors que la drosophile n'exprime qu'un type de récepteur NOTCH (chromosome X), les mammifères sont quant à eux pourvus de 4 paralogues: *NOTCH1*, 2, 3 et 4 ³⁷⁰. Chez l'Homme, les gènes codant *NOTCH1* à 4 sont respectivement localisés sur les chromosomes 9, 1, 19 et 6.

Les récepteurs NOTCH sont exprimés sous forme d'un précurseur, qui est mûri au niveau du réticulum endoplasmique et de l'appareil de golgi. ³⁷¹.

En particulier les précurseurs NOTCH sont transférés au réticulum endoplasmique où ils sont O-Fructosylés puis au golgi où ils peuvent être glycosylés par des glycosyltransférases telles que Fringe. Ces modifications et d'autres modifications post-traductionnelles des récepteurs et des ligands ajustent l'amplitude et l'activité de Notch pour générer des signaux spécifiques au contexte ³⁷². De plus, la glycosylation de NOTCH est essentielle à son adressage et à sa maturation qui inclue notamment un premier clivage (S1) par une furine convertase ³⁷³. Ce clivage permet la formation d'un hétérodimère maintenu par des liaisons non covalentes, qui constitue la forme mature du récepteur.. Les récepteurs sont par la suite acheminés à la membrane plasmique. L'adressage du récepteur est primordial pour

sa régulation, après le premier clivage, les récepteurs NOTCH peuvent être endocytés et recyclés, soit pour un retour à la membrane soit en restant piégé au niveau cytoplasmique³⁷⁴. Ce recyclage influence directement les niveaux de récepteurs au niveau de la membrane plasmique et ainsi contribue à déterminer une régionalisation de l'intensité de la réponse NOTCH³⁷⁵.

Les ligands : Chez les mammifères, 5 ligands canoniques de la voie NOTCH ont été décrits : delta-like ligand 1 (DLL1), delta-like ligand 3 (DLL3), delta-like ligand 4 (DLL4), Jagged-1 (JAG1) Jagged-2 (JAG2). Comme pour les récepteurs NOTCH, les niveaux et les fonctions des ligands peuvent être contrôlés par les processus post-traductionnels tels que des glycosylations ou des ubiquitinilations³⁷⁶. L'ubiquitylation des ligands est, contrairement à celle des récepteurs, essentielle pour l'activation de la voie. L'ubiquitylation est opérée par Neuralized (Neur) et Mindbomb (Mib) est nécessaire à l'activation de la voie NOTCH³⁷⁷. L'hypothèse la plus pertinente est liée à la nécessité de la mise en place de forces de traction entre la cellule émettrice (porteuse du ligand) et la cellule receveuse (porteuse du récepteur) pour libérer le site de clivage S2. L'endocytose du ligand semble indispensable pour exercer cette force³⁷⁸.

Structure protéique : Chez l'homme 4 récepteurs (NOTCH 1-4) et 5 ligands (Jagged-1 and -2 et Delta-like (DLL) 1, 3 et 4) NOTCH sont retrouvés. En N-terminal, exposé au niveau extracellulaire, les récepteurs NOTCH présentent 29 et 36 répétitions du motif EGF-like ainsi qu'une région régulatrice (LNR : Lin-Notch Repeats) qui jouent un rôle dans la stabilisation de l'hétérodimère de NOTCH. Les motifs EGF en position 11 et 12 sont considérés comme indispensables à la fixation des ligands³⁷¹, bien que d'autres motifs semblent être impliqués dans la spécificité et la robustesse des combinaisons ligand/récepteur. Par exemple la formation du complexe Notch1/Jagged1 impliquerait les domaines EGF8-EGF11³⁷⁹. La partie intracellulaire des récepteurs NOTCH appelés le NICD (Notch IntraCellular Domain) comprend les domaines RAM, ANK (ankyrin) , TAD (Transcriptional Activation Domain; spécifique des récepteurs Notch1 et 2) impliqués dans l'activité de NOTCH notamment via l'interaction avec le complexe de transcription avec les cofacteurs, des domaines de localisation nucléaire et le PEST (Peptide sequence rich in proline, glutamic acid, serine, threonine) important pour les processus de recyclage et de dégradations du récepteur³⁷⁵. Les ligands canoniques de NOTCH sont des protéines transmembranaires caractérisées par un domaine N-terminal extracellulaire de type DSL (Delta, Serrate and LAG2) et la présence de motifs EGF (de 6 à 16) qui permettent l'interaction directe avec un récepteur NOTCH (Figure 23).

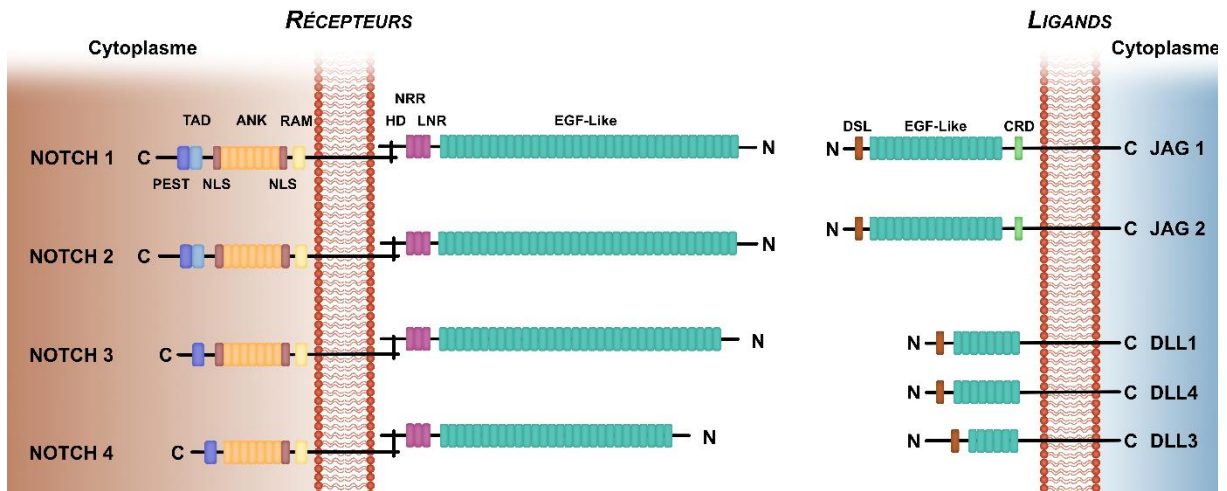


Figure 23 : Récepteur et Ligands de la voie NOTCH

La cis-inhibition et cis-activation. L'activation classique de la voie Notch dépend de la formation d'un couple récepteur/ligand présentés par des cellules adjacentes et nécessite la mise en place d'une force de traction permettant le dépliement et activation du récepteur (trans-activation). Ainsi, la formation d'un complexe ligand/récepteur présentés sur une même cellule est généralement inhibitrice. Cependant, des spécificités semblent exister en fonction des systèmes étudiés et conduire à des interactions inhibitrices ou activatrices³⁷⁵. Par exemple, dans les lymphocytes T le couple Dll3-Jag1 semble être préférentiellement inhibiteur³⁸⁰. Au contraire dans un modèle cellulaire de CHO-K1 le couple DLL1-NOTCH1 à quant à lui été montré avec des effets de cis-inhibition et de cis-activation³⁸¹. La balance entre cis et trans activation ajoute un niveau de complexité aux régulations de NOTCH.

2. La voie canonique de NOTCH

Contrairement aux voies de signalisation induites par des récepteurs couplés aux protéines G ou à activité tyrosine kinase qui nécessitent de nombreux intermédiaires entre le récepteur membranaire et la régulation transcriptionnelle, la voie NOTCH « canonique » (définie comme majoritaire ou classique) ne présente aucun intermédiaire puisque que le récepteur lui-même est transloqué dans le noyau et participe aux régulations transcriptionnelles³⁷⁰.

L'activation classique de NOTCH est dépendante de la fixation d'un ligand présenté par une cellule adjacente (cellule émettrice). L'activation de NOTCH dépend alors de l'endocytose du ligand, un phénomène qui va appliquer des forces sur le récepteur NOTCH et favoriser son dépliement³⁸² et ainsi le démasquage et clivage du site S2 par les protéases de type ADAM (A disintegrine and metalloprotease ; ADAM10 , ADAM17 et ADAMTS1)³⁸³. Le fragment NEXT composé du domaine transmembraire et du domaine intracellulaire est à son tour clivé (S3) par le complexe γ -sécrétase qui

libère le NICD. Le clivage S3 peut avoir lieu quand le fragment NEXT est à la surface ou dans les endosomes ³⁷⁴ (Figure 24).

L'expression des principaux gènes cible de NOTCH, tels que ceux de la famille des Hairy/Enhancer of Split (HES) et de Hairy/ Enhancer of Split related to YRPW (HEY), ³⁷⁰, est sous le contrôle d'un promoteur activé par le complexe de facteur de transcription RBP-jκ, CSL (CBF1, Su(H), LAG-1). En condition non activée CSL est associé à des corépresseurs transcriptionnels ainsi que des histones désacetylase (HDAC) et ainsi inhibe l'expression des gènes cibles. Suite à sa libération, le NICD est transloqué dans le noyau où il interagit avec le CSL. Cette interaction entraîne un changement de conformation du complexe dissociant les répresseurs en recrutant des co-activateurs transcriptionnels tel que MAML (Mastermindlike-1).

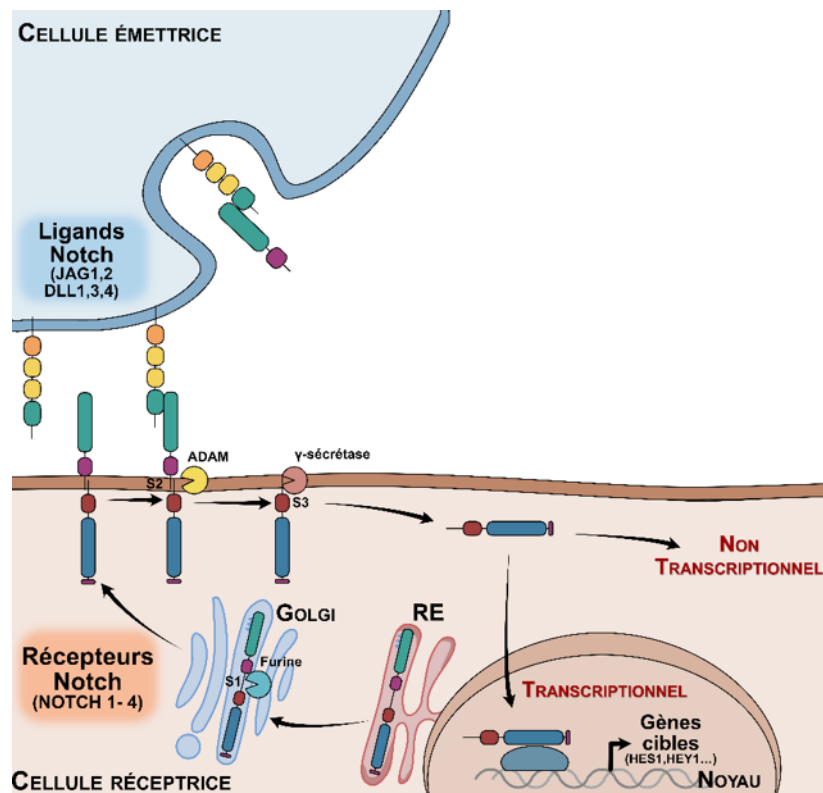


Figure 24 : Voie de signalisation NOTCH

Dans les cellules réceptrices du signal, les récepteurs NOTCH mûrissent dans l'appareil de Golgi par la furine (clivage S1) forment un hétérodimère présenté à la membrane plasmique. Dans les cellules émettrices du signal, les ligands de la voie NOTCH sont répartis sur la membrane plasmique. L'interaction entre un ligand et un récepteur s'accompagne de la mise en place de forces de tractions permettant de démasquer le site S2 et son clivage par les ADAM et la génération du NEXT. Le NEXT peut être clivé (S3) au niveau de la membrane cellulaire par le complexe des γ-sécrétases ou endocytosé dans les endosomes (non canonique). Le NICD est libéré lors du clivage en S3 et peut être transloqué dans le noyau ou rester dans le cytoplasme pour interagir avec d'autres voies de signalisation (non canonique).

3. La voie non canonique de NOTCH

En plus de la voie canonique, il existe des voies dites non-canonique qui mettent en jeu les protagonistes de la voie NOTCH mais suivent des schémas d'activation et incluent des interactions avec des partenaires protéiques non-classiques.

Bien que les récepteurs à la membrane soient capables d'interagir avec leur ligand, certains sont renouvelés par endocytose indépendamment de cette interaction ³⁷⁴. Lors de cette endocytose, les récepteurs peuvent être recyclés à la membrane et y être activé par leurs ligands (voie canonique), être dégradés par le lysosome ou être activés dans l'endosome indépendamment de la présence d'un ligand. Cette activation indépendante du ligand a notamment été décrite dans certain type de lymphocytes T dans lesquels l'activation des complexes TCR/CD3 et de CD28 induisent l'activation de la PKC qui va activer les protéases responsables des clivage S2 et S3 (ADAM et γ -sécrétase) et ainsi libérer le NICD ³⁸⁴. Il est important de noter par ailleurs que cette voie d'activation de NOTCH endosomale est elle-même capable de réguler le trafic des endosomes ³⁸⁵.

Le NICD peut également interagir avec d'autres partenaires que CSL. Le NICD a notamment été décrit pour interagir avec NF- κ B ³⁸⁶, mTORC notamment dans le foie où l'interaction a été montré comme ayant un effet pro-lipogénique en faveur de l'apparition d'une stéatose hépatique ⁶⁹, PTEN ³⁸⁷, AKT ³⁸⁸, Wnt ³⁸⁹ ou encore TGF- β ³⁹⁰ au niveau cytoplasmique ou nucléaire.

La signalisation NOTCH joue aussi un rôle important dans la mechano-transduction, indépendamment de son activité transcriptionnelle. Dans le cas de l'activation de la voie NOTCH par le flux sanguin, la partie transmembranaire de NOTCH, résiduelle du clivage S3, peut constituer une plateforme pour la mise en place d'un complexe mechano-senseur, impliquant les petites GTPase qui va permettre la stabilisation des jonctions endothéliales et le maintien de la fonction de barrière ³⁹¹.

Les ligands de la voie NOTCH peuvent eux aussi exercer une activité indépendamment de l'activation d'un récepteur NOTCH.

En somme de par son activité canonique et non-canonique, l'existence de combinaisons multiples de récepteur/ligand, la voie NOTCH permet une grande variété de fonction dont l'étendue reste à être plus amplement considéré.

B. La voie Notch dans le système vasculaire

La voie NOTCH est fortement conservée dans la phylogénie et une délétion d'un des acteurs de la voie est généralement létale au stade embryonnaire. A l'âge adulte la voie Notch est également essentiellement dans le maintien de l'homéostasie du système vasculaire.

1. L'angiogénèse

La voie de signalisation Notch occupe une place centrale dans le processus d'angiogénèse. Comme introduit précédemment, l'expansion du réseau vasculaire est induit par des signaux d'hypoxie principalement médié par le VEGF. La fixation du VEGF sur son récepteur VEGFR2 à la surface des cellules endothéliales va provoquer un changement phénotypique des cellules endothéliales et un bourgeonnement vasculaire ³⁹². La cellule la plus exposé aux stimulations VEGF va prendre un phénotype tip, migratoire et non proliférative ^{393,394}. Au niveau transcriptionnel, l'activation de VEGFR2 conduit au désassemblage du répresseur Tel-CtBP du promoteur de DLL4. Les cellules tip présentent ainsi des niveaux élevés de DLL4 à la surface pouvant activer Notch1 dans les cellules adjacentes. Cette activation inhibe le phénotype tip au profit du maintien des cellules dans un phénotype stalk en favorisant l'expression du récepteur VEGFR1 au détriment de VEGFR2 ³⁹⁵. La balance VEGFR1/VEGFR2 permet la mise en place de la compétition entre les cellules endothéliales tip et stalk. Au contraire dans ce système, il a été montré que le ligand Jagged1 contrôle négativement l'activité de Notch1 pour promouvoir la prolifération endothéliale et l'expansion du réseau vasculaire ³⁹⁵. L'impact de la voie Notch sur le processus d'angiogénèse serait néanmoins dépendant du contexte et du lit vasculaire ³⁹⁶.

2. La mécano-transduction

De façon intrinsèque, les cellules endothéliales sont capables de répondre au flux, lié à l'écoulement du sang dans les vaisseaux. NOTCH1 contribue à cette adaptation ^{397,398} de la même manière que pour les récepteurs de mécano-transduction classiques tels que : les signaux liés à l'intégrine ($\alpha(v)\beta(3)$ par exemple), les canaux ioniques ou les récepteurs couplés aux protéines G ³⁹⁹. Les forces de cisaillement induisent le clivage de NOTCH1, la libération du NICD et l'expression des gènes cibles tels que *HES1* et *NRARP*. Cette réponse peut être inhibées par l'inhibition du complexe des g-sécrétases suggérant l'implication de la voie canonique de Notch ³⁹⁷. De plus, il a été montré que l'activation de NOTCH1 par le shear stress exerce également des effets non canoniques impliqués dans le renforcement de jonctions intercellulaires ³⁹¹. Ces résultats concordent avec la contribution d'une force physique lors de la fixation ligand/récepteur pour induire le clivage S2. Une étude récente montre que les mécanismes d'activation par le shear stress peuvent être induits via Piezo 1, un canal cationique non sélectif présent à la surface des cellules endothéliales. L'entrée de calcium associée à l'activation de Piezo1 peut stimuler l'activité enzymatique de ADAM10 e clivage en S2 de Notch ⁴⁰⁰. Il est aussi important de noter que le monoxyde d'azote à un effet régulateur de l'activité de ADAM17 et peut donc ainsi activer la voie NOTCH via des signaux lié à la dynamique vasculaire ⁴⁰¹.

3. L'inflammation vasculaire

La voie Notch est un acteur important dans les processus immuno-inflammatoire qui participe à l'activation et au développement des cellules immunes ⁴⁰² et à la régulation du phénotype

inflammatoire des cellules endothéliales. L'activation des cellules endothéliales est considérée comme un événement précoce qui conduit à leur dysfonctionnement et finalement à des lésions vasculaires ⁴⁰³. Pendant les phases inflammatoires l'activation de l'endothélium renforce l'expression des molécules d'adhésion cellulaire, l'activation des lymphocytes T cytotoxiques et la production d'anticorps. En réponse, les cellules endothéliales libèrent localement des cytokines inflammatoires, dont le TNF α et l'IL-1 β , des chimiokines, et des espèces réactives de l'oxygène qui amplifient l'inflammation initiale..

Dans les cellules endothéliales aortiques humaines il a été montré que les stimuli pro-inflammatoires tels que TNF α et IL1 β régule négativement l'expression et l'activité de NOTCH1 ⁴⁰⁴. En parallèle la diminution d'expression de NOTCH1 favorise l'expression de cytokines et molécules d'adhésion ⁴⁰⁴, déstabilise les jonctions endothéliales ³⁹⁸ et favorise le recrutement de leucocytes au niveau de l'endothélium aortique ^{398,404}. Chez le rongeur mutant portant une susceptibilité au développement de plaque d'athérome, la diminution de l'expression de Notch1 dans l'endothélium favorise le développement de l'athérosclérose ^{403,404}.

Le lien entre inflammation et voie NOTCH est lui aussi dépendant du contexte cellulaire et du récepteur ou ligand considérés. Par exemple il a été montré que le TNF- α est un activateur de la transcription de ADAM-10 qui permet le clivage S2 de NOTCH ⁴⁰⁵. Les études complémentaires de cette équipe montrent l'activation par TNF- α s'accompagne d'une augmentation des niveaux de NOTCH2 et d'une diminution concomitante de NOTCH4. Cette régulation médiée par le Pi3Kinase et NF- κ B favorise l'apoptose et *le développement de dommages vasculaires* ⁴⁰⁶.

4. Les échanges trans-endothéliaux

Des travaux récents de Yang et al. ont mis en évidence un rôle de la voie DLL4/NOTCH1 dans la régulation des échanges trans-endothéliaux. Au niveau du système nerveux central, DLL4 est indispensable au maintien de la barrière hématoencéphalique. Une inactivation transitoire de la voie grâce à l'injection d'anticorps dirigés contre DLL4 dans la région rétinienne provoque des fuites de liquide du compartiment sanguin. L'arrêt de ces fuites est graduel en fonction du type de vaisseau (artère/veine) indiquant une expression basale différentielle de DLL4 entre les types de vaisseaux. En présence d'anticorps anti-DLL4 l'intégrité des jonctions endothéliales est conservée excluant le passage de fluide entre les cellules. Cependant, les auteurs ont observé la présence d'invagination de la membrane plasmique au niveau apical et des pores de fusion au niveau des membranes baso-latéral de ces cellules. Ces structures associées à la présence des protéines PLVAP (plasmalemma vesicle-associated protein) et caveolin-1 suggèrent que la voie DLL4/Notch contribue au maintien de l'imperméabilité rétinienne en limitant la transcytose endothéliale. Par ailleurs les auteurs montrent

que cette régulation est au moins en partie transcriptionnelle puisque en présence de l'anticorps anti-DLL4 ils observent une régulation négative de SREBP1 (sterol regulatory element-binding protein 1) qui est impliqué dans la formation des cavéoles ⁴⁰⁷. De plus dans le muscle, la voie de signalisation NOTCH a été mise en évidence dans le contrôle par des métabolites plasmatique du transport de l'insuline via des vésicules cavéolaires ⁴⁰⁸. Dans ces deux systèmes la voie Notch semble exercer un effet antagoniste vis-à-vis du passage trans-endothéliale.

5. Les dérivés nutritionnels

La régulation des acteurs de la voie Notch par des dérivés nutritionnels a pu être mise en évidence dans différents systèmes.

L'exposition de souris à un régime riche en gras de courte durée est associée à une diminution réversible de l'expression de *Notch1* et de son gène cible *Hey1* dans les cellules endothéliales aortiques. De plus, il a été montré dans des cellules endothéliales aortiques primaires humaines que les lipides oxydés pro-athérogéniques entraînent une diminution des niveaux protéiques et transcriptionnelles de NOTCH1 qui s'accompagne d'une baisse des transcrits de *JAG1* et des gènes cibles *HES1* et *HEYL* ⁴⁰⁴. La régulation de la voie NOTCH1 par les lipides pourrait être secondaire à une modification de la composition lipidique membranaire impactant l'activité du complexe des γ -sécrétases. De plus, certains lipides ont la capacité de se fixer sur ADAM10 et ainsi de diminuer sa capacité de clivage du fragment S2 ⁴⁰⁹. Les lipides pourraient également interagir directement avec les acteurs de la voie NOTCH. Il a notamment été montré que les phospholipides C2 pouvaient interagir avec une partie N-terminal des ligands JAG1 et DLL1. Cette fixation ne semble pas affecter la capacité de liaison au récepteur, mais interagit avec les unités d'activation de NOTCH ⁴¹⁰. De plus, d'autres ont montré dans un modèle de cellules cancéreuses une activation directe du récepteur NOTCH1 indépendante du ligand via la sphingosine-1-phosphate (S1P) et son récepteur 3 (*S1PR3*, *sphingosine-1-phosphate receptor 3*) ⁴¹¹. D'autres types de dérivés nutritionnels comme les corps cétoniques et le glucose peuvent moduler l'activité de la voie NOTCH dans différents organes. Le β -hydroxybutyrate a été montré comme un modulateur de la voie NOTCH important dans le maintien des villosités intestinales via l'activation de la transcription par celle-ci de *Olfm4* qui est un facteur permettant le renouvellement des cellules intestinales ⁴¹². Concernant la sphère glucidique, il a par ailleurs été montré dans des études de développement du système cardio-vasculaire qu'une forte concentration en glucose plasmatique pendant la morphogénèse asymétrique du cœur avait un impact inhibiteur sur la signalisation NOTCH dans les tissus nodaux et avait in fine des effets délétères sur la formation de l'axe droite/gauche ⁴¹³.

Objectifs

La répartition des tissus adipeux est un élément majeur de la santé cardio-vasculaire. Cet impact différentiel des dépôts adipeux sur la santé pourrait être dû en partie à des différences de gestion des flux lipidiques lors des transitions énergétiques garantissant la flexibilité métabolique.

De par leur position centrale, les cellules endothéliales des tissus adipeux sont soumises à des flux bidirectionnels d'acides gras entre le sang et le parenchyme adipeux. Cependant, les mécanismes qui permettent à ces cellules de détecter et d'adapter leur machinerie de transport pendant les phases de transition énergétique restent à être déterminées. On peut également émettre l'hypothèse que l'état d'obésité altère ces réponses endothéliales et donc une meilleure compréhension de la dégradation de la flexibilité métabolique liée à une altération des flux de lipides pendant l'obésité pourrait mettre en lumière de nouveaux acteurs, cibles potentielles pour ralentir, voir limiter la progression des pathologies cardio-métaboliques associées à l'obésité.

Les objectifs de ma thèse ont été :

- De caractériser l'hétérogénéité des cellules endothéliales des dépôts adipeux humains et murins
- D'identifier les mécanismes d'adaptation mis en jeu par les cellules endothéliales des dépôts adipeux lors des transitions énergétiques
- De préciser les mécanismes cellulaires mis en jeu par les cellules endothéliales des dépôts adipeux dans la gestion des flux lipidiques.
- D'évaluer l'impact de l'obésité sur les mécanismes identifiés.

Les modèles d'études ont été :

- Modèles cellulaires :
 - Les cellules endothéliales humaines immuno-sélectionnées (CD45⁻/CD34⁺/CD31⁺) par billes magnétiques ou cytométrie en flux à partir des cellules de la fraction stroma-vasculaire obtenue après digestion enzymatique des tissus adipeux :
 - ◇ Sous-cutané abdominal et glutéofémoral appariés de la cohorte ADIPENDO (femmes de 39.46±1.64 ans ; IMC : 25.13±0.71)
 - ◇ Sous-cutané abdominal issus de dermolipectomie abdominale

- Les cellules endothéliales murines triées par cytométrie en flux (CD45⁻/SCA1⁺/CD31⁺) après digestion à la collagénase des dépôts périgonadiques et inguinaux de souris sauvages C57Bl6/J
- Modèles animaux :
 - Les souris sauvages C57Bl6/J de 8 à 12 semaines ont été soumises à un régime standard ou enrichi en lipide (60% kcal) pendant 4 semaines puis sacrifiées en état nourri, placées pendant 24 heures à jeun (challenge nutritionnel).
 - Les souris Dll4^{ecKO} (Dll4^{flox/flox} : Cdh5-CRE^{ERT2}) traitées par le tamoxifène à 8 semaines pendant 1 semaine puis maintenues en régime normal pendant 2 semaine et soumises à un challenge nutritionnel.

Les stratégies et les approches ont été :

- Descriptives :
 - Transcriptome différentiel des cellules endothéliales natives appariées de la cohorte ADIPENDO,
 - Phénotype des animaux par des dosages plasmatiques, analyse de la cellularité adipocytaire (taille adipocytaire), de la fraction stroma-vasculaire et des cellules endothéliales et évaluation de la morphologie de la microvasculature
 - Transcriptome des cellules endothéliales natives isolées des dépôts périgonadique et inguinaux de souris à l'état basal et en réponse à un challenge nutritionnel
- Mécanistique : études *in vitro* de la prise en charge et dynamique d'accumulation des acides gras fluorescents par cytométrie en flux et imagerie sur cellules vivantes (Incucyte), caractérisation des acteurs moléculaires, culture primaire *in vitro* sur ligand immobilisé.

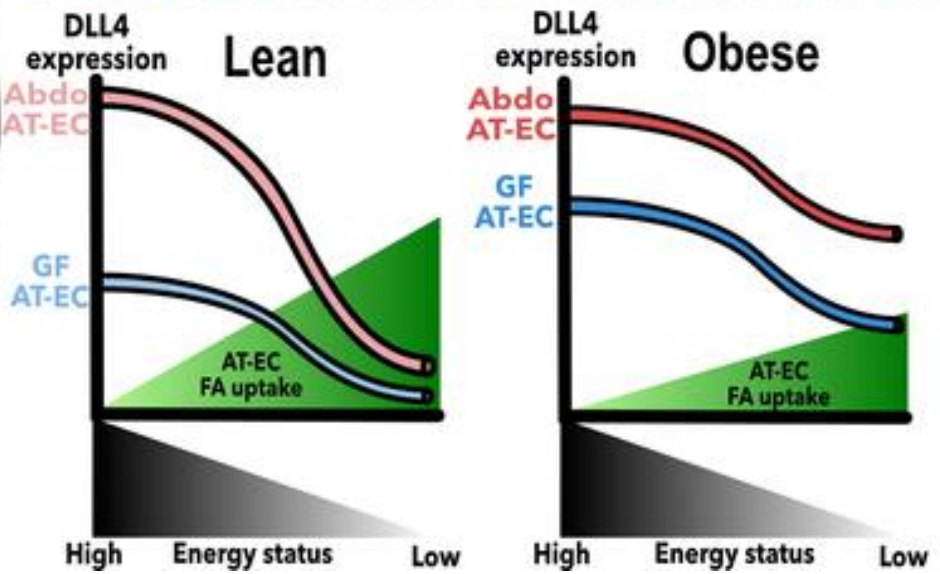
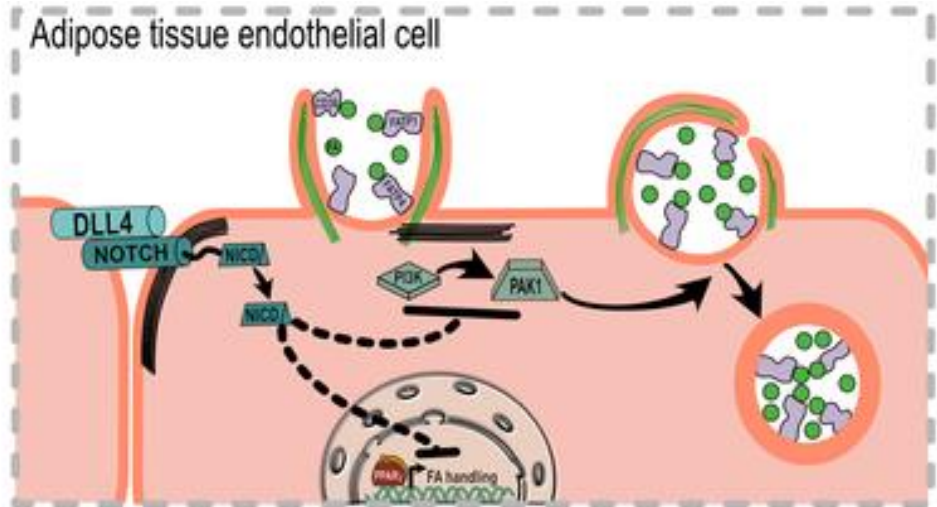
Résultats

Publication

Endothelial DLL4 Is an Adipose Depot-Specific Fasting Sensor Regulating Fatty Acid Fluxes

Alex Aupetit , Pauline Decaunes, Chloé Belles, Elodie Riant, Jean Galitzky, Candice Chapouly ,
Margaux Laisné , Rémy Flores-Flores, Benoit Chaput, Katell Vié, Jean-François Arnal , Anne
Bouloumié, Anaïs Briot

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology ; 2023 American Heart Association, Inc.





Endothelial DLL4 Is an Adipose Depot–Specific Fasting Sensor Regulating Fatty Acid Fluxes

Alex Aupetit¹, Pauline Decaunes, Chloé Belles, Elodie Riant, Jean Galitzky, Candice Chapouly¹, Margaux Laisné¹, Rémy Flores-Flores, Benoit Chaput, Katell Vié, Jean-François Arnal¹, Anne Bouloumié, Anaïs Briot¹

BACKGROUND: Adaptation of fat depots to change in fuel availability is critical for metabolic flexibility and cardiometabolic health. The mechanisms responsible for fat depot-specific lipid sensing and shuttling remain elusive. Adipose tissue microvascular endothelial cells (AT-EC) regulates bidirectional fatty acid fluxes depending on fed or fasted state. How AT-EC sense and adapt to metabolic changes according to AT location remains to be established.

METHODS: We combined transcriptional analysis of native human AT-EC together with in vitro approaches in primary human AT-EC and in vivo and ex vivo studies of mice under fed and fasted conditions.

RESULTS: Transcriptional large-scale analysis of human AT-EC isolated from gluteofemoral and abdominal subcutaneous AT revealed that the endothelium exhibits a fat depot–specific signature associated with lipid handling and Notch signaling enrichment. We uncovered a functional link between metabolic status and endothelial DLL4 (delta-like canonical notch ligand 4), which decreases with fasting. DLL4 regulates fatty acid uptake through nontranscriptional modulation of macropinocytosis-dependent long chain fatty acid uptake. Importantly, the changes in DLL4 expression, in response to energy transition state, is impaired under obesogenic conditions, an early alteration coinciding with a defect in systemic fatty acid fluxes adaptation and a resistance to weight loss.

CONCLUSIONS: DLL4 is a major actor in the adaptive mechanisms of AT-EC to regulate lipid fluxes. It likely contributes to fat depot-dependent metabolism in response to energy transition states. AT-EC alteration with obesity may favor metabolic inflexibility and the development of cardiometabolic disorders.

GRAPHIC ABSTRACT: A [graphic abstract](#) is available for this article.

Key Words: adipocytes ■ cardiovascular diseases ■ diet ■ endocytosis ■ lipids ■ obesity

Body fat distribution is a major determinant of health.¹ Accumulation of adipose tissue (AT) in the central part of the body is a strong risk factor for the development of type 2 diabetes and cardiovascular diseases, while fat mass in the lower body is protective.^{2,3} The opposite impact of fat depots on cardiometabolic health underlines functional differences in lipid handling capacity according to energy transition state. Subcutaneous abdominal adipose tissue (Abdo-AT) is considered as a short-term lipid supplier that rapidly buffers daily lipid influx and efflux.^{3–5} In contrast, gluteofemoral AT (GF-AT) is viewed as a long-term reserve mobilized in time of sustained energy demands. Suitable adaptation of

fat depots to changes in fuel availability during energy transition states is critical for whole body metabolic flexibility. While depot-specific adipocyte responsiveness to lipogenic and lipolytic stimuli are well established, less is known about the cellular and molecular actors involved in fat depot–specific abilities to sense and shuttle lipids.

Increasing evidence from the study of mouse models highlighted the role of the microvasculature in the regulation of lipid fluxes.⁶ However, the underlying mechanisms are distinct when considering vascular beds from fat consuming organs, including the heart and skeletal muscle, from the ones supplying fat, such as adipose depots.^{7–12} Microvascular endothelial cells from adipose

Correspondence to: Anne Bouloumié, PhD I2MC, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, Université de Toulouse, UMR1297 Inserm, Team 1, Toulouse, France, Email anne.bouloumie@inserm.fr; or Anaïs Briot, PhD, I2MC, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, Université de Toulouse, UMR1297 Inserm, Team 1, Toulouse, France, Email anais.briot@inserm.fr

Supplemental Material is available at <https://www.ahajournals.org/doi/suppl/10.1161/ATVBAHA.122.318876>.

For Sources of Funding and Disclosures, see page 695.

© 2023 American Heart Association, Inc.

Arterioscler Thromb Vasc Biol is available at www.ahajournals.org/journal/atvb

Nonstandard Abbreviations and Acronyms

AMPK	AMP-activated protein kinase
AT	adipose tissue
AT-EC	adipose tissue endothelial cell
CDR	circular dorsal ruffle
EC	endothelial cell
FA	fatty acid
GF-AT	gluteofemoral AT
HFD	high fat diet
LCFA	long chain fatty acid
MTORC1	mammalian target of rapamycin complex 1
PAK1	P21 (RAC1) activated kinase 1
Pi3K	phosphoinositide 3-kinase
PPARG	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
VLDL	very low density lipoprotein

tissue (AT-EC) are peculiar in that they are in contact with bidirectional fatty acid (FA) fluxes. In the post-prandial state, AT-EC constitute a platform for the hydrolysis of circulating chylomicrons and VLDL (very low density lipoprotein)^{13,14} and handle the transport of released non-esterified FA toward adipocytes. During fasting, FA generated from adipocyte lipolysis are mobilized through the endothelium toward the blood compartment. Our previous studies demonstrated that human AT-EC form a non-fenestrated endothelium that actively uptakes long chain FA under the transcriptional control of PPARG (peroxisome proliferator-activated receptor gamma).¹⁵ However, how AT-EC sense and adapt to metabolic changes according to body energy state and fat depot location remains to be established.

In the present study using large-scale transcriptional analyses of human native AT-EC immuno-selected (CD45⁻/CD34⁺/CD31⁺) from paired subcutaneous abdominal and gluteofemoral AT, we uncovered that the AT-EC transcriptome is sufficient to discriminate fat depot location and is associated with a specific lipid handling and Notch-related signature. As we and others demonstrated that Notch signaling activity and level are sensitive to metabolic and nutritional clues,^{16–21} we speculated that the pathway may be part of the molecular machinery involved in fat depot-specific adaptation to metabolic changes. Combining the study of human primary subcutaneous AT-EC and analysis of native AT-EC response in vivo in mice, our data provided mechanistic evidences that the Notch ligand DLL4 (delta-like canonical notch ligand 4) governs AT-EC adaptation to fasting in a fat depot-specific manner. The endothelial adaptation associated with DLL4 modulation in response to changes in energy levels is impaired under obesogenic conditions, a phenomenon that may favor deleterious

Highlights

- Endothelial cells transcriptome is specific of the adipose depot in which they reside.
- Adipose tissue endothelial cells actively adapt to energy transition state to regulate fatty acid fluxes.
- DLL4 (delta-like canonical notch ligand 4) level is modulated by energy transition signal in a cell type and fat depot specific manner.
- DLL4 regulates long chain fatty acid handling by adipose tissue endothelial cells through nontranscriptional mechanisms.
- Adipose tissue endothelial adaptation to change in energy transition state is altered with obesogenic condition.

lipid distribution, metabolic inflexibility, and the development of cardiometabolic disorders.

METHODS

Data Availability

The authors declare that all supporting data are available within the article and its [Supplemental Material](#). The corresponding authors may provide additional data supporting the findings of this study upon reasonable request.

Adipose Tissue Samples

Subcutaneous abdominal adipose tissue (AT) was obtained from healthy adult women undergoing dermolipectomy for esthetic purpose. Paired gluteofemoral (GF) and abdominal (Abdo) AT biopsies (GF and Abdo taken from the same individual) were obtained through the cohort study ADIPENDO including individuals who undergone adipose tissue surgery. Donors were aged 39.46±1.64 years old and presented a body mass index range of 25.13±0.71 (Table S1). These studies were approved by Institutional Review Boards. Protocol is registered at ClinicalTrials.gov (ADIPENDO; REGISTRATION: URL: <https://www.clinicaltrials.gov>; Unique identifier: NCT02672826). All subjects provided a written informed consent.

Microarray Gene Expression Studies

Native immuno-selected hAT-EC from GF-AT and Abdo-AT of 4 nonobese individuals (Table S2) were studied. Gene expression profiles were performed at the GeT-TRiX facility (GénoToul, Génopole Toulouse Midi-Pyrénées) using Agilent Sureprint G3 Human GE v3 microarrays (8x60K, design 072363) following the manufacturer's instructions. For each sample, Cyanine-3 (Cy3) labeled cRNA was prepared from 100 ng of total RNA using the OneColor Quick Amp Labeling kit (Agilent Technologies) according to the manufacturer's instructions, followed by Agencourt RNAClean XP (Agencourt Bioscience Corporation, Beverly, MA). Dye incorporation and cRNA yield were checked using Dropsense 96 UV/VIS droplet reader (Trinean, Belgium). Six hundred nanograms of Cy3-labeled cRNA were hybridized on the microarray slides following the manufacturer's instructions.

Immediately after washing, the slides were scanned on Agilent G2505C Microarray Scanner using Agilent Scan Control A.8.5.1 software, and fluorescence signal extracted using Agilent Feature Extraction software v10.10.1.1 with default parameters. Microarray data and experimental details are available in NCBI's Gene Expression Omnibus²² and are accessible through GEO Series accession number GSE226405.

Microarray data were analyzed using R (R Core Team, 2018) and Bioconductor packages.²³ Raw data (median signal intensity) were filtered, log₂ transformed, and normalized using quantile method.²⁴ A model was fitted using the limma lmf function²⁵ considering individual numbers as blocking factor. Pair-wise comparison between biological conditions was applied using specific contrast.

To highlight general profile differences between endothelial cells from subcutaneous fat depots, we classify and study transcripts differentially expressed between the Abdo-AT and GF-AT (paired, corrected for individual effects; *P* value <0.05) using EnrichR.²⁶ Heatmap clustering was performed on normalized counts using Clustvis.²⁷

Mouse Study

All animal experimental procedures were performed in accordance with the principle guidelines established by the National Institute of Medical Research (INSERM) and approved by the local ethical committee. Investigations were conducted on adult male C57BL/6J mice (Charles River, France; Specific pathogen free) or males and females Dll4^{cko} and control littermates (Conventional facility), housed in a temperature-controlled room (20–22°C) on a 12-hour light/12-hour dark cycle with ad libitum access to control or high fat diet (HFD 60% kcal from Fat, Ssniff) and water. During the fasting challenge, the animal had free access to water. Mice were sacrificed by cervical dislocation.

For the study of fat depots intrinsic differences and response to fasting, wild-type males (aged between 8 and 12 weeks) from several littermates were pooled at weaning and then randomly distributed 4 by cage by the animal facility personnel. When plasma profiling was assessed, all animals were studied. For tissue collection, animals were randomly taken in each cage to be studied under fed or fasted conditions.

Dll4^{cko} mice were generated by crossing Dll4^{flox/flox} mice²⁸ (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME; <http://www.informatics.jax.org/allele/MGI:3828266>) and Cdh5-CRE^{ERT229,30} (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME). At the age of 8 weeks, mice were treated by intraperitoneal injection of 1 mg tamoxifen diluted in corn oil (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) for 5 consecutive days. Experiments were conducted 2 weeks later. Dll4^{flox/flox} littermates were used as controls.

To minimize potential confounder effects, all experiments were performed at the same time of the day cycle (between ZT1-2). For tissue collection and cell isolation, a sampling of 2 to 6 animals from each group/cage of interest was studied each day of experimentation, and animals were sacrificed alternating between each group. For all experiments, the number of animals and details on group comparisons are reported in the legends.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using Prism (Prism 9.4.1, GraphPad Software, San Diego, CA). Comparisons between 2 independent groups were performed using parametric 2-tailed

t-test if *F*-test showed no significant differences in the variance; otherwise nonparametric Mann-Whitney *U* test was used. For paired GF-AT and Abdo-AT sampled ratio paired 2-tailed *t*-test were performed. When samples were normalized to their own control donor (theoretical mean at 1), 1-sample *t*-test was used. Time effect of the presence of BODIPY FL C16 was assessed using 1-way ANOVA test or nonparametric Kruskal-Wallis test (according to Brown-Forsythe and Bartlett test to measure differences between groups) and multiple comparisons post-test (Dunnett and Dunns tests, respectively as recommended by the software manufacturer) was used to assess differences between a given time point compared with untreated cells. When studying the impact of various treatments (Incucyte Live Imaging) or conditions (genotype, diet) on the parameters of interest over time, 2-way ANOVA was used. When studying the impact of various treatments on long chain fatty acid (LCFA) uptake overtime, using Incucyte Live Imaging, Šídák's multiple comparisons test was then applied to evaluate treatment effect at each time point compared with control-treated cells. When studying phenotypical/plasma parameters response to fasting, Tukey multiple comparisons test was used to define differences between time point and across condition (genotype or diet). Differences were considered statistically significant when *P* value <0.05; exact *P* values <0.05 are shown on figure panels. Data representation (mean, max, median±SEM) detailed are reported in the legends.

Major Resources Table and Detailed information on the methods for the Isolation of the human AT cell subtypes, Human primary AT-EC Culture and Treatments, Flow cytometry, Incucyte Live Imaging, Transcriptional Analysis, Western Blot Analysis, Immunostaining and Confocal Imaging, Mouse AT-EC isolation and sorting, Plasma profiling, Transmission Electron microscopy, Adipocyte measurement are available in the supplemental Materials.

RESULTS

The Fat Depot-Specific Transcriptome of Microvascular Endothelial Cells Is Enriched in Lipid- and Notch-Associated Pathways

Human microvascular endothelial cells characterized as CD45-/CD34+/CD31+ (hAT-EC) were isolated from paired biopsies of subcutaneous gluteofemoral (GF) and abdominal (Abdo) adipose tissues from the ADIPENDO cohort (Figure 1A; Tables S1 and S2). Although flow cytometry analyses showed that hAT-EC density (number/gr of AT) was not different according to fat depot location (Figure 1B), large-scale analyses of hAT-EC transcriptomes clearly discriminate the fat depot origin by principal component analysis (Figure 1C; 66.8% variance explained by components 1 and 2). One thousand nine hundred forty-seven and 1571 transcripts were found to be differentially enriched in Abdo-AT and GF-AT, respectively (differentially expressed genes *P*<0.05; Figure 1D). Noticeably, differentially expressed genes in endothelial cells from Abdo-AT were enriched in both lipid- and Notch-dependent pathways (Figure 1E; Table S3). The lipid-associated pathways including

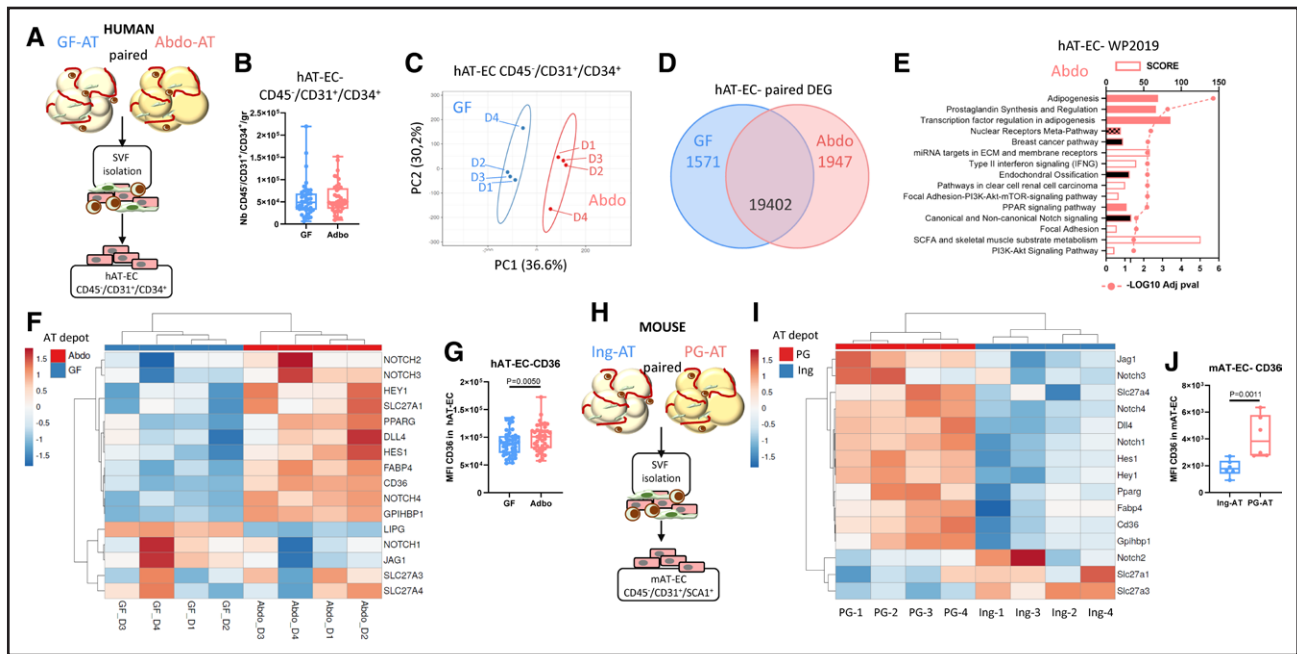


Figure 1. Microvascular endothelial cells exhibit a fat depot specific transcriptome.
A–G, Human native stroma-vascular fraction (SVF) and microvascular endothelial cells (hAT-EC) isolated from paired biopsies of subcutaneous gluteofemoral (GF) and abdominal (Abdo) adipose tissue (AT) were studied by flow cytometry and gene microarray. **B,** Number of hAT-EC (in the SVF) per gram of tissue (n=42 donors). **C** through **F,** Gene microarray analysis of hAT-EC from paired GF and Abdo-AT of nonobese individuals (n=4 donors; D1–D4). **C,** Territorial discrimination based of principal component (PC) analyses of all detected transcripts. **D,** Venn diagram indicating the number of transcripts preferentially enriched in GF and Abdo hAT-EC (DEG paired; $P < 0.05$). **E,** Transcripts differentially expressed ($P < 0.05$) in Abdo-AT were studied using EnrichR (WikiPathway2019). Plain pink bars include PPARG/RXR, plain black bars include NOTCH signaling actors, pink/dark mixed includes both PPARG/NOTCH pathway components. **F,** Clustering of the transcripts of interest from microarray dataset. **G,** Surface detection of CD36 by flow cytometry, in the hAT-EC population in native SVF from GF and Abdo-AT (n=41 donors). **H** through **J,** Mouse native endothelial cells (mAT-ECs) were isolated from perigonadal (PG-AT) and inguinal (Ing-AT) fat depots. **I,** Clustering of the transcripts of interest measured by qRT-PCR (n=4). **J,** Surface detection of CD36 by flow cytometry, in the mAT-EC population in native SVF from PG and Ing-AT (n=6). $P < 0.05$ for paired ratio across AT are shown. MFI indicates mean fluorescence intensity.

“Adipogenesis” (WP236), “Prostaglandin synthesis and regulation” (WP98), “Transcription factor regulation in adipogenesis” (WP3599) and “PPAR signaling pathway” (WP3942) highlighted the master transcription factor involved in lipid metabolism, PPARG, activated by dietary fatty acids and eicosanoids as well as involved in AT-EC dependent fatty acid transport regulation.^{7,15,31} In addition, Notch signaling components were part of the enriched pathways “Breast cancer pathway” (WP4262), “Endochondral ossification” (WP474), and “Canonical and non-canonical Notch signaling” (WP3845). Notch signaling has been shown by us and other to be regulated by nutrient-derived products and signals^{16–21} and here contributes with PPARG to the core “Nuclear Receptors Meta-Pathway” (WP2882). The differentially expressed genes more expressed in endothelial cells from GF-AT did not show any statistically significant pathway enrichment (Figure S1C).

Noticeably, the endothelial transcript levels of genes encoding FA handling machinery and Notch signaling actors were sufficient to discriminate Abdo and gluteofemoral depots (Figure 1F). Quantitative RT-PCR analysis further confirmed an enrichment in EC from Abdo-AT of the PPARG-target genes *CD36*, *GPIHBP1*, and *FABP4*,^{15,32,33} Notch receptors *NOTCH2*, *NOTCH3*, *NOTCH4*, as well

as the canonical ligand *DLL4* and its transcriptional targets *HES1* and *HEY1*. No specific fat depot pattern was detected for the FA transporters *SLC27A1*, *SCL27A3*, and *SLC27A4* (encoding FATP1 [fatty acid transport protein] 3 and 4, respectively) or *NOTCH1*, while *LIPG* and *JAG1* were enriched in EC from GF-AT (Figure S1E). Comparison between native immuno-selected Abdo-AT endothelial cells, progenitors, and immune cells demonstrated that the Notch ligand *DLL4*, as well as the receptors *NOTCH1* and *NOTCH4*, discriminated hAT-EC from the other stroma-vascular cells (Figure S1F). To note, our previous study also showed an endothelial cell enrichment in CD36 transcript and protein compared with progenitors.¹⁵ Finally, flow cytometry analyses further demonstrated a higher level of cell surface CD36 on EC from in Abdo-AT compared with GF-AT (Figure 1G) while no differences were detected for FATP1 (Figure S1D).

In parallel, we found in mice, that the expression level of the differentially expressed genes involved in lipid handling and Notch signaling was also sufficient to discriminate the fat depot of origin of the microvascular endothelial cells (Figure 1H and 1I; mAT-EC, CD45/CD31+/SCA1+; Figure S2A and S2B). We studied perigonadal AT (PG-AT) as a model for abdominal

AT versus subcutaneous inguinal fat pads (Ing-AT), which are comparable in terms of anatomical location to human gluteofemoral subcutaneous AT.³⁴ In agreement, EC from PG-AT and Ing-AT exhibited transcript profiles closer to human Abdo-AT and GF-AT, respectively (Figure 1I). In addition, comparison with native immuno-selected progenitors (Prog) and immune cells showed that the expression of the Notch ligand *Dll4*, and the receptors *Notch1*, *Notch4*, and *Cd36* were discriminant of the endothelial cell population in both adipose depots (Figure S2C and S2D). Finally, flow cytometry analysis confirmed a higher level of surface CD36 in native mAT-EC from PG-AT compared with Ing-AT (Figure 1J).

DLL4 Inhibits the Uptake and Accumulation of Long Chain Fatty Acids in Human AT Endothelial Cells

To investigate the potential link between Abdo-AT endothelial Notch signaling and lipid handling, immuno-selected primary EC from human Abdo-AT were cultured for 24 hours in the presence of immobilized Notch ligand DLL4 (FcDLL4) or an inhibitor of the γ -secretase complex

(DAPT), to activate or inhibit Notch signaling, respectively. hAT-EC were then incubated with fluorescent LCFA (FLC16). Fluorescent live imaging showed that pretreatment with DLL4 markedly inhibited the long-term accumulation of LCFA in hAT-EC while the presence of DAPT increased the ability of endothelial cells to accumulate LCFA (Figure 2A and 2B; Figure S3). This DLL4/Notch-dependent impact on long-term LCFA accumulation was associated with transcriptional modulation of *CD36* and *GPIHBP1*, downregulated in the presence of immobilized DLL4 and upregulated with DAPT treatment, which is the opposite regulatory pattern found with the canonical Notch target *HES1* (Figure 2C and 2D). We did not detect any modulation in *PPARG* levels, whose activity regulates the expression of *CD36* in EC from human Abdo-AT.¹⁵

To determine whether the inhibitory effect of DLL4/Notch on long-term accumulation of LCFA was relative to the increase of primary hAT-EC's ability to uptake LCFA, we measured FLC16 fluorescence incorporation from 2 to 20 minutes by flow cytometry (Figure 2E through 2I). We found that a time period of 24-hour pretreatment with FcDLL4 led to the inhibition of FLC16 uptake at all time points while the presence of DAPT led to the opposite effect and stimulated LCFA uptake (Figure 2F and 2G). Similar

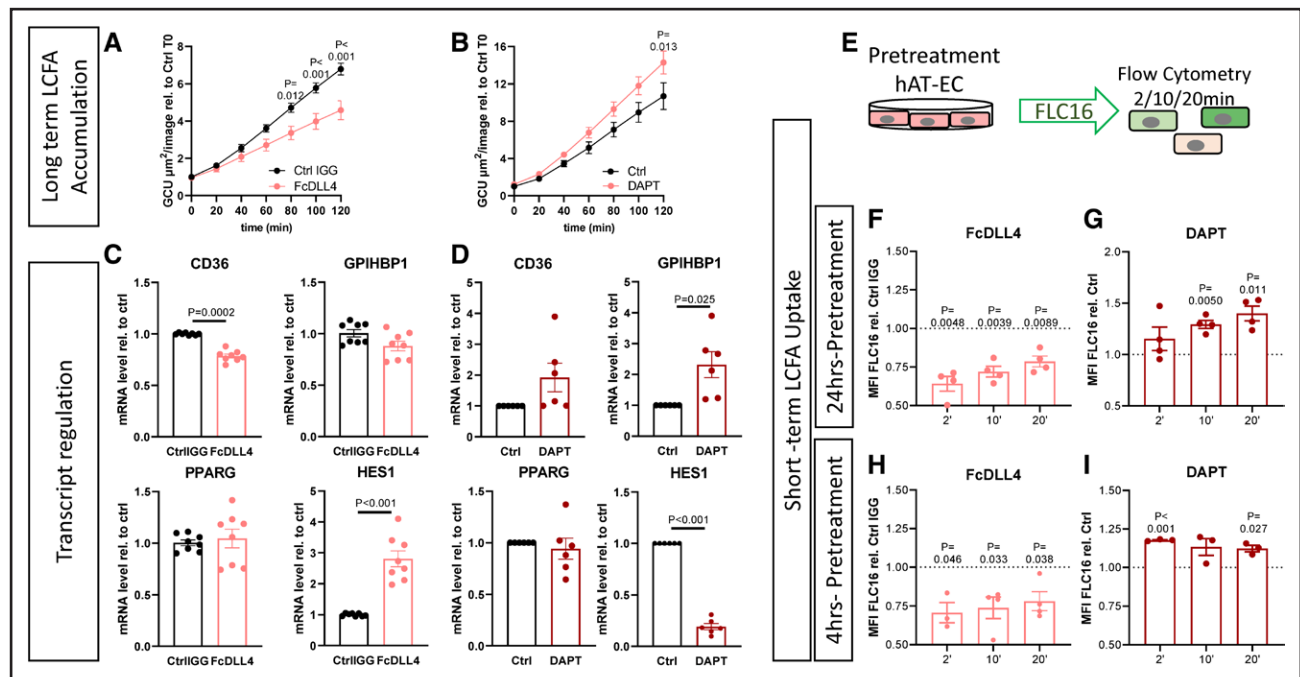


Figure 2. DLL4 (delta-like canonical notch ligand 4) inhibits the uptake and accumulation of long chain fatty acids in human adipose tissue (AT) endothelial cells.

Primary hAT-ECs were cultured in the presence of control IGG or immobilized DLL4 (Ctrl IGG, FcDLL4) or γ -secretase inhibitor (DAPT, 25 μM) or vehicle control. **A** and **B**, hAT-EC pretreated for 24 hours were then incubated with BODIPYTM FL C16 (FLC16, 750 nM) and overtime accumulation of fluorescence was assessed by Incucyte live imaging. Fold integrated green fluorescence per image (GCU $\mu\text{m}^2/\text{image}$) relative to T0 of control-treated cells for each donor are shown overtime as mean \pm SEM ($n=3$ donors, 2 wells/donor, 4 images/well). $P < 0.05$ between Ctrl IGG and FcDLL4 are shown. **C** and **D**, Primary hAT-ECs were cultured in the presence of FcDLL4 (**C**) or DAPT (25 μM ; **D**) for 8 to 12 hours. Transcripts of interest were measured by qRT-PCR and presented relative to control-treated cells for each donor ($n=6-8$, 4 donors; mean \pm SEM). **E** through **I**, hAT-ECs were incubated with FLC16 (750 nM) for 2, 10, or 20 minutes. FLC16 uptake was measured by flow cytometry. Data are presented as relative to control-treated cells. $n=3-4$ donors; mean \pm SEM are shown. $P < 0.05$ relative to control-treated cells are shown. MFI indicates mean fluorescence intensity.

impacts on LCFA uptake was achieved with pretreatments with FcDLL4 or DAPT for only 4 hours (Figure 2H and 2I), strongly suggesting that, in addition to transcriptional effects, DLL4-mediated inhibition of endothelial LCFA uptake also involved nontranscriptional mechanisms.

DLL4 Decreases LCFA Uptake Through the Modulation of Macropinocytosis

To further characterize the nontranscriptional impact of DLL4 on hAT-EC's ability to uptake LCFA, the mechanisms involved in the modulation of cell surface expression of the FA transporters CD36, FATP1 and FATP4 were investigated. Confocal microscopy revealed that the transporters were not evenly distributed at the cell surface of primary hAT-EC but were found enriched in asymmetric areas (Figure 3A through 3C). By flow cytometry, we then observed that exposure of hAT-EC to LCFA (FLC16) triggered a time-dependent decline in the cell surface level of FATP1 and FATP4 within 10 minutes and of CD36 after 20 minutes (Figure 3D through 3F). Therefore, it is suggested that LCFA uptake was associated with the modulation of cell surface transporter endocytosis in hAT-EC.

In agreement with this hypothesis, pretreatment of hAT-EC with pharmacological inhibitors of signaling pathways described to be involved in the regulation of endocytosis,³⁵ including the class III Pi3-Kinases (IN1; Vsp34-IN1) and PAK1 (P21 [RAC1] activated kinase 1; IPA3), markedly inhibited the rapid uptake of LCFA (Figure 3G). This effect was specific of class III Pi3-Kinases and PAK1 since Wortmanin (inhibition of Class I Pi3K [phosphoinositide 3-kinase] at 25nM; Wort) and PP2 (SRC kinases inhibitor) treatments had no impact on uptake (Figure 3G). The inhibitory effect of IN1 and IPA3 was also maintained over a long time period as revealed by the marked decrease of LCFA accumulation in hAT-EC measured by live imaging (Figure 3H and 3I; Figure S5A through S5D). Finally, we studied the cellular pattern of CORTACTIN as a readout of class III Pi3K and PAK1 dependent macropinocytosis,^{36–39} also likely related to the presence of membrane circular dorsal ruffles^{40,41} at the surface of hAT-EC treated with LCFA (Figure S5E). CD36 was found enriched at the edge of CORTACTIN-positive areas (Figure S5F and S5G).⁴² In the presence of LCFA, we observed a rapid constriction of CORTACTIN-positive structures (Figure 3J through 3L), associated with an increased level of phosphorylated CORTACTIN (Figure S5H and S5I). When primary hAT-ECs were cultured in the presence of immobilized DLL4 and treated with LCFA, the CORTACTIN-positive structures appeared disorganized and less constricted (Figure 3M). It coincided with a higher mean area of CORTACTIN-positive structures compared with IGG control-treated cells (Figure 3N and 3O; Figure S5J) and a reduced level of phosphorylated CORTACTIN in response to LCFA (Figure S5K through S5P). In addition, flow cytometry analysis showed an inhibition of the LCFA-induced decrease of cell surface

transporters FATP1, FATP4, and CD36 (Figure 3P through 3R). Finally, the DAPT-mediated increase in LCFA accumulation was abolished in the presence of PAK1 inhibitor (Figure 3S and 3T; Figure S5Q through S5R).

Therefore, our data suggest that the DLL4/Notch axis is part of the regulatory machinery involved in macropinocytosis-dependent uptake of LCFA by human AT-EC.

DLL4 Level Is Selectively Modulated by Signals Involved in Energy Transition State in AT-EC

Uptake of LCFA by AT-EC takes place with changes in nutrient availability such as the transition between fed and fasted conditions. To explore the molecular link between DLL4 and nutrient-sensitive signaling pathways, hAT-ECs were treated with A-769662 an activator of AMPK (AMP-activated protein kinase),⁴³ whose activity is enhanced under low nutrient condition. Transcript levels of *DLL4*, as well as the Notch target genes *HES1* and *HEY1*, were significantly decreased following AMPK activation while no changes were observed in the expression of Notch receptors and the ligand *JAG1* (Figure 4A). The drop in *DLL4* transcript was associated with a significant decrease in *DLL4* protein levels (52±0.06%) while *JAG1* levels remained unchanged (Figure 4B through 4D). In addition, treatment with the inhibitor of MTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1; rapamycin), whose activity is promoted under high nutrient condition, also decreased phosphorylation of S6-Kinase (Figure 4E through 4G) and led to a significant decrease in *DLL4* protein levels (Figure 4B and 4C). Thus, in hAT-EC, the levels of *DLL4* are modulated by signaling pathways sensitive to energy level and is decreased under low nutrient conditions.

To explore the physiological relevance of *DLL4* modulation by nutrient-sensitive signaling pathways, the molecular and phenotypic adaptation of AT-EC and systemic impacts in response to fasting were investigated. Wild-type mice under a standard diet were either fed ad libitum or fasted for 24 hours (Figure 5A). In accordance with what we observed in human primary AT-EC in vitro, a 24-hour fast led to a marked downregulation of *Dll4* transcript levels in native mAT-EC immuno-selected from PG-AT (Figure 5B) and concomitantly induced a significant increase in *Cd36* and *Gpihbp1* transcript levels. No changes in *Jag1*, *Pparg*, *Slc27a3*, and *Slc27a4* transcripts were observed (Figure 5B). These fasting-induced regulations were specific to EC from PG-AT since Ing-AT exhibited no changes in *Dll4*, *Cd36*, and *Gpihbp1*. Ing-AT did respond to fasting through a significant decrease in *Slc27a4* (Figure 5C). In addition, the response to fasting was cell type specific since the transcripts of *Dll4* and *Cd36* were not modulated in mature adipocytes neither from PG-AT nor Ing-AT (mature adipocytes; Figure 5D and 5E). *Slc27a1* levels were modulated by fasting regardless of the cell type and the fat depot (Figure 5B and 5C; Figure S6C and S6D). A marked downregulation

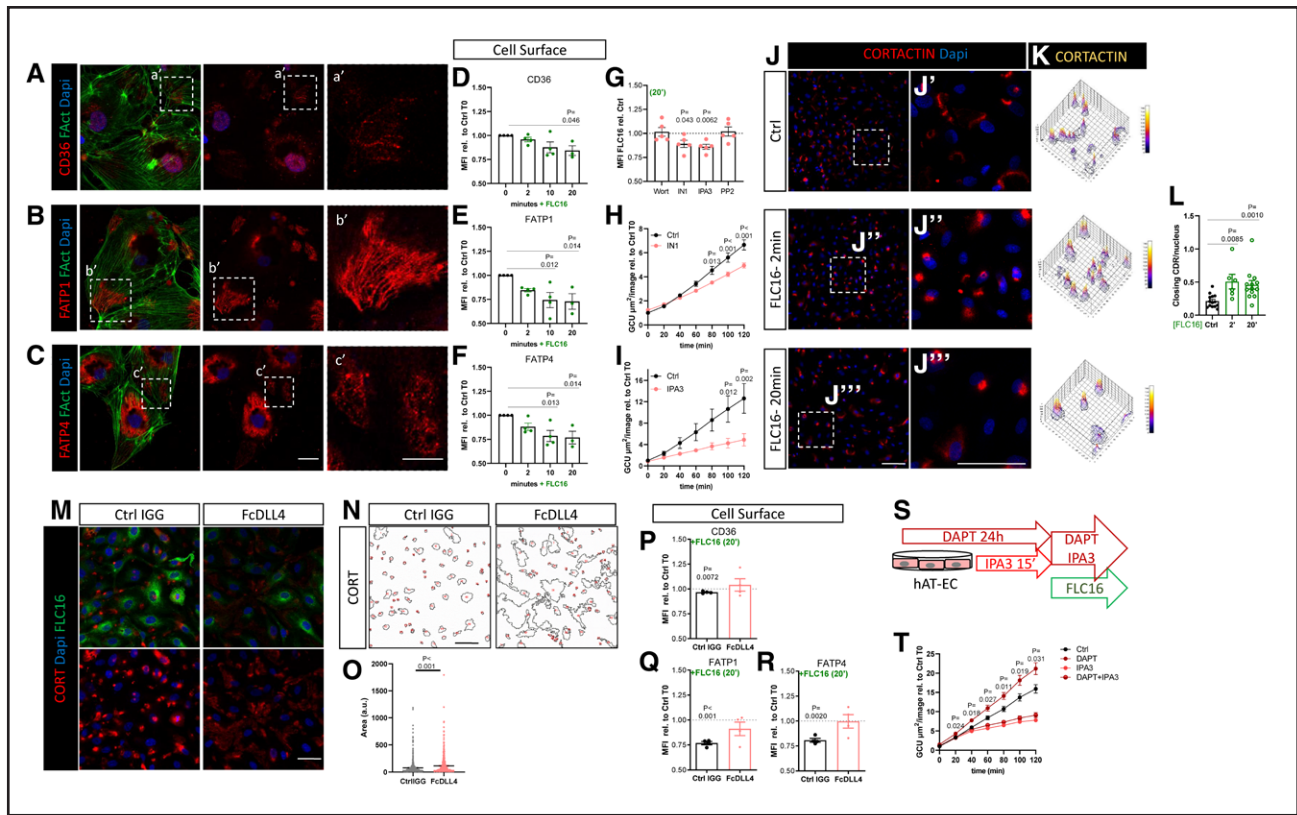


Figure 3. DLL4 (delta-like canonical notch ligand 4) antagonizes the uptake of long chain fatty acids by human adipose tissue (AT) endothelial cells through nontranscriptional mechanisms.

A through **C**, Immunodetection and confocal imaging of CD36 (**A**, a', red), FATP1 (**B**, b', red) and FATP4 (**C**, c', red) in combination with F-Actin (**A–C**, green) in primary hAT-EC. (a'-c') higher magnification of areas selected in **A** through **C**. **D** through **F**, Primary hAT-ECs were incubated with FLC16 (750 nM) for 2, 10, or 20 minutes. The presence of CD36, FATP1, and FATP4 at the cell surface was measured by flow cytometry and presented relative to T0 (n=3–4 donors; $P < 0.05$ relative to Ctrl T0 are shown). **G** through **I**, Primary hAT-ECs were pretreated with Wortmannin (25 M; Wort), IN1 (1 μ M), IPA3 (10 μ M), or PP2 (10 μ M) and then incubated with FLC16 (750 nM) for 20 minutes (**G**) or 2 hours (**H** and **I**). **G**, Uptake of FLC16 was measured by flow cytometry. Data are presented as relative to control-treated cells (n=5 donors; $P < 0.05$ relative to control-treated cells are shown). **H** and **I**, Accumulation of fluorescence was followed overtime using Incucyte. Fold integrated green fluorescence per image (GCU μ m²/image) relative to T0 of control-treated cells for each donor are shown overtime (n=3 donors, 2 wells/donor, 4 images/well; $P < 0.05$ relative to control-treated cells are shown). **J** through **L**, Primary hAT-ECs were treated or not with FLC16 (750 nM) prior immunostaining against CORTACTIN (**J**, red). (j'-j''') higher magnification of areas selected in **J**. **K**, 3D intensity projection for CORTACTIN-associated fluorescence for j'-j'''. **L**, Number of closing CDR per nucleus (n=6–14 fields from 2 to 3 donors; $P < 0.05$ relative to Ctrl are shown). **M–R**, Primary hAT-ECs were cultured in the presence of Ctrl IGG or FcDLL4 for 24 hours. **M**, Immunodetection of CORTACTIN (red) in hAT-EC treated with FLC16 (green) for 2 hours. **N** and **O**, Surface of CORTACTIN-positive structures measured using ImageJ software (n=4 donors, 2–5 fields/donor). **P** through **R**, The presence of CD36 (**P**), FATP1 (**Q**), and FATP4 (**R**) at the cell surface was measured by flow cytometry in cells treated or not with FLC16 (750 nM) for 20 minutes and presented relative to T0 (n=4 donors; $P < 0.05$ relative to Ctrl T0 are shown). **S** and **T**, Primary hAT-ECs were pretreated or not with DAPT (25 μ M) for 24 hours then incubated with IPA3 (10 μ M) or vehicle control for 15 minutes prior incubation with FLC16 (750 nM). Overtime accumulation of fluorescence was assessed using Incucyte live imaging. Fold integrated green fluorescence per image (GCU μ m²/image) relative to T0 of respective control-treated cells (Ctrl/DAPT, IPA3/DAPT+IPA3) for each donor are shown overtime (n=3 donors, 2 wells/donor, 4 images/well; $P < 0.05$ relative to respective controls are shown [Ctrl/DAPT and IPA3/DAPT+IPA3]). Scale bars=20 μ m (**A–C**), 80 μ m (**J**), 40 μ m (**M** and **N**). Dapi: nuclei. $P < 0.05$ to T0/Ctrl are shown. Mean \pm SEM are shown. MFI indicates mean fluorescence intensity.

of *Jag1* expression was found in mature adipocytes with no fat depot-specific pattern (Figure S6C and S6D) while, the adipocyte transcript levels of *Lpl* (encoding Lipoprotein Lipase) were decreased under fasting condition as expected (Figure 5D and 5E).

In parallel, we examined microvascular endothelium morphology by transmission electron microscopy. Under both fed and fasted conditions, the AT endothelium, remained continuous and non-fenestrated (Figure 5F, yellow arrowheads) and exhibited intraluminal

protrusions (Figure 5F, red arrowheads), reminiscent of ruffles detected in human AT-EC in vitro. While the number of intraluminal protrusions was not dependent on the energy state (Figure 5G and 5H), their length was modulated by fasting specifically in PG-AT and not in Ing-AT capillaries (Figure 5I and 5J).

Finally, the systemic impact of fasting in wild-type mice (Ctrl; *Dll4*^{+/f}) and mice carrying an inducible deletion of *Dll4* in the endothelium (*Cdh5-Cre*^{ERT2} *Dll4*^{+/f}, *Dll4*^{ecKO}) was investigated (Figure 5K). While no significant

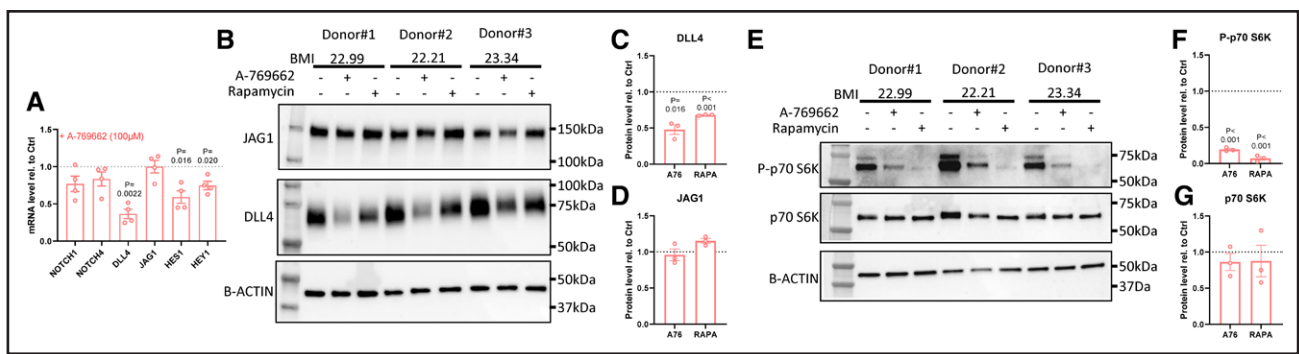


Figure 4. DLL4 (delta-like canonical notch ligand 4) is selectively modulated by signaling pathways sensitive to energy level.

A, Primary hAT-EC were treated with A-769662 (100 μ M) for 12 hours. Transcripts of interest were measured by qRT-PCR. Data are normalized to control-treated cells for each donor ($n=4$ donors). **B** through **G**, Primary hAT-ECs from lean individuals were treated with A-769662 (100 μ M; A76) or Rapamycin (50 ng/mL; RAPA) for 12 hours. DLL4 and JAG1 (**B–D**) and Phospho-p70 S6K (Thr389) and p70 S6K (**E–G**) protein levels were measured by Western blot. Relative protein amount to control-treated cells for each donor is shown. B-ACTIN was used as loading control ($n=3$ donors). $P<0.05$ to Ctrl are shown. Mean \pm SEM are shown. BMI indicates body mass index.

differences in body weight, plasma nonesterified fatty acids nor glucose levels were observed under fed condition between Ctrl and *Dll4*^{ecKO} littermates (Figure S6E), the expected rise in circulating nonesterified fatty acid in response to fasting observed in control mice was significantly blunted in *Dll4*^{ecKO} (Figure 5L; Figure S6F). No differences were observed related to changes in plasma glucose concentrations (Figure 5M; Figure S6F).

DLL4 Modulation With Energy Transition State Is Impaired in Obesogenic Condition

To explore whether adiposity may impact the AT-EC DLL4-mediated mechanisms, primary hAT-EC from overweight/obese donors (mean body mass index of 29.69 \pm 0.03) were treated with A-769662 or Rapamycin. Both treatments failed to significantly impact DLL4 protein levels (Figure 6A and 6B). This was associated with a defect in the inhibition of S6K phosphorylation by A-769662, while the response to Rapamycin remained robust (Figure 6C through 6E).

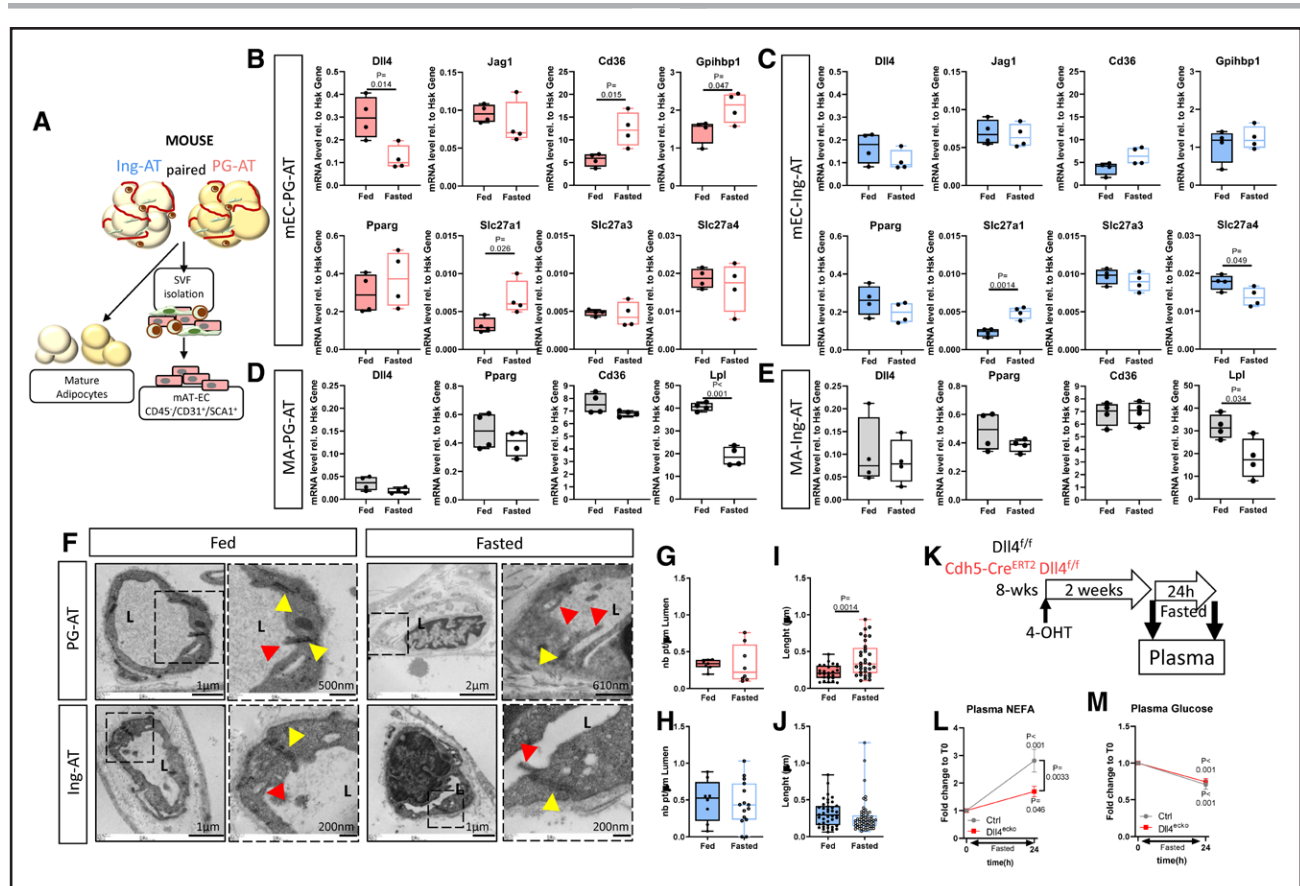
To further study the impact of obesogenic conditions, mice were maintained under a high fat diet for 4 weeks (HFD, 60% kcal from fat; Figure 6F), a time sufficient to achieve a modest increase in body weight (about approximately 15% higher than control-fed (control diet) mice; Figure S7A), and then submitted, or not, to a 24-hour fast. In the PG-AT isolated stroma-vascular fraction, in which the proportion of mAT-EC remained stable during the nutritional challenge (Figure S7D and S7E), the fasting-induced decrease in *Dll4* levels detected in control diet-fed animals was altered under the HFD-fed condition (Figure 6G). We also noticed that under an obesogenic diet, the depot-specific expression pattern of *Dll4* was lost (Figure 6H and 6I). Evaluation of circulating nonesterified fatty acid and glucose levels showed no significant differences between control diet-fed and HFD-fed mice under fed conditions (Figure S7B and S7C). However, the increase in plasma

nonesterified fatty acid induced by fasting was blunted in HFD-fed mice compared with control diet-fed mice, while their glucose profiles remained unchanged (Figure 6J and 6K). These data supported an early defect in AT adaptation to changes in energy transition under obesogenic conditions that was associated with a resistance to weight loss induced by fasting (Figure 6L; Figure S7F and S7G). In accordance with the literature,⁴⁴ we found that changes in adipocyte diameter repartition, induced by fasting, was restricted to PG-TA in control mice (Figure 6M and 6N; Figure S7H through S7K), suggesting that PG-AT is the main AT depot involved in rapid FA mobilization in response to fasting under healthy conditions. Noticeably, high fat feeding blunted the responsiveness of adipocytes from PG-AT to fasting (Figure 6O and 6P). Together, our data support an early dysfunction of endothelial *Dll4*-dependent adaptation to energy transition state with obesogenic conditions, which likely contributes to the alteration of systemic lipid homeostasis and body fat distribution.

Finally, exploration of the Type 2 diabetes knowledge portal (<http://www.type2diabetesgenetics.org>) revealed that common single nucleotides polymorphisms of *DLL4*, including “regulatory_region” and “missense” variants were significantly associated with waist to hip ratio adjusted to body mass index (WHRadjBMI) ranking in third position of associated phenotypes (Figure 6Q through 6R). These observations relying on multiple GWAS data sets further support, in addition to our present data, that the depot-specific expression patterns of *DLL4* in endothelial cells may be a determinant of body mass distribution through the control of FA turn-over in response to changes in energy state.

DISCUSSION

Through the storage and mobilization of fatty acids (FA), adipose tissues (AT) play a major role in energy homeostasis, providing energy fuel when glucose is unavailable



and contributing to protect other organs from the deleterious impact of ectopic lipid deposition.⁴⁵ To maintain this homeostasis, FA are channeled through the AT endothelium, which ability to sense and adapt to energy status remained to be identified. Using native and primary human and mouse endothelial cells from white adipose depots (AT-EC), our work provides new evidences on the rapid adaptation of the endothelium to changes in energy state in a fat depot-specific manner. In particular, we identified an original role for DLL4 that may be considered as a molecular hub relaying transcriptional and nontranscriptional clues to the endothelium in order to regulate FA fluxes.

Fat depot accumulation has a differential impact on metabolic and cardiovascular health according to its body distribution.¹ Besides differences in adipocyte metabolism, the cellular and molecular determinants involved in body fat distribution remain elusive. We uncovered that

the AT-EC transcriptome was sufficient to discriminate the fat depot of origin. In human AT-EC, we detected marked differences, based on depot location, in the expression of genes involved in lipoprotein and FA handling machinery. Enrichment in *GPIHBP1* and the FA transporter CD36 in EC from Abdo-AT was in agreement with data of the literature in favor of higher lipid turn-over in upper-body versus lower-body fat depots.³⁻⁵

In parallel, we found differential enrichment in Notch signaling components according to fat depots in EC from both human and mouse AT. The link between Notch signaling and nutrient-derived signals and by-products has been explored in other systems.¹⁶⁻²¹ In mice carrying endothelial inducible deletion of RBPJkappa (a co-effector of the canonical transcriptional activity of Notch⁴⁶), Jabs et al⁹ highlighted the contribution of Notch-associated transcriptional activity in lipid handling in the heart and

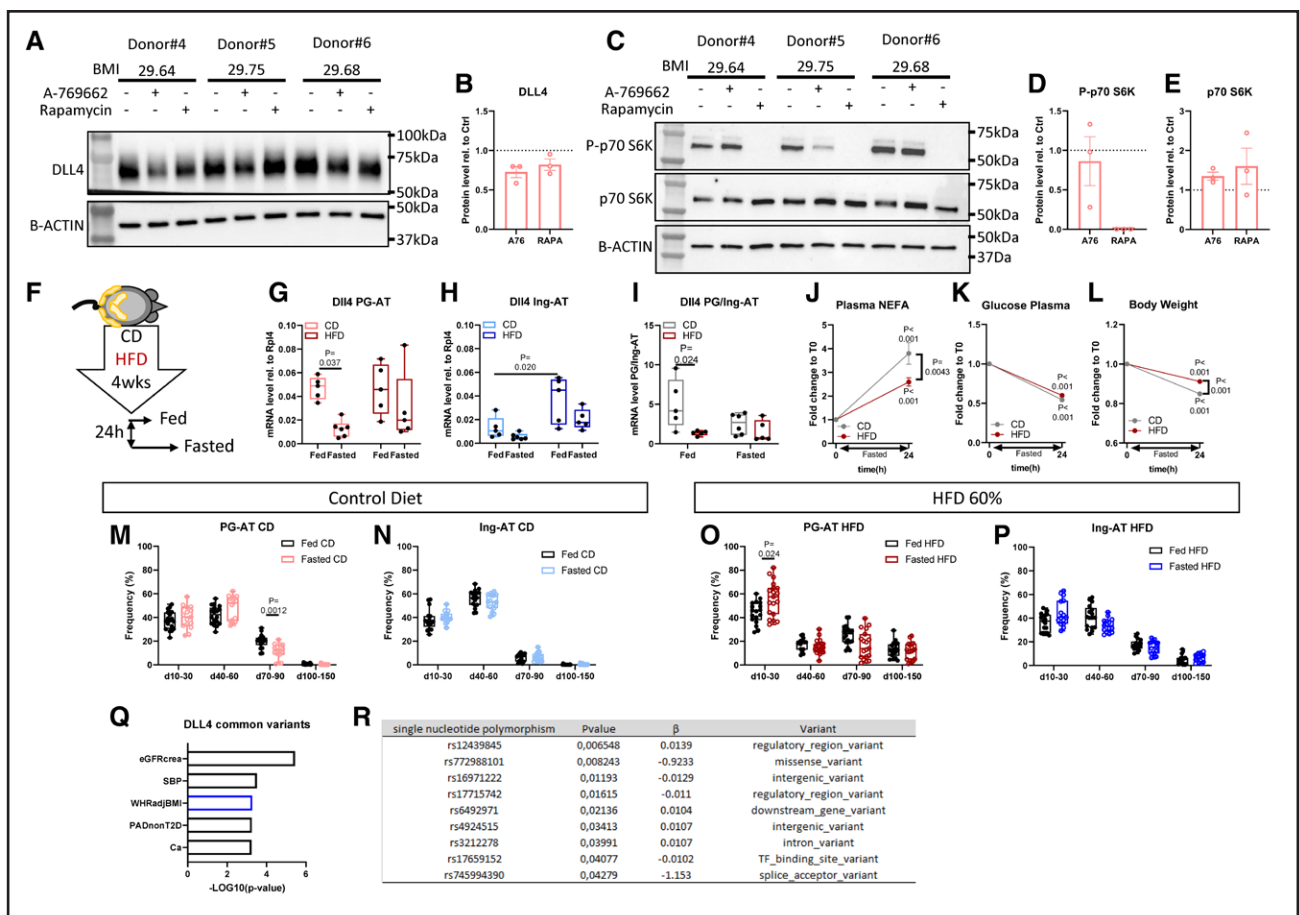


Figure 6. Dll4 (delta-like canonical notch ligand 4) modulation with energy transition state is impaired under obesogenic condition.

A through **E**, Primary hAT-ECs from overweight individuals were treated with A-769662 (100 μ M; A76) or Rapamycin (50 ng/mL; RAPA) for 12 hours. DLL4 (**A** and **B**) and Phospho-p70 S6K (Thr389) and p70 S6K protein levels (**C** through **E**) were measured by Western blot. Relative protein amount to control-treated cells for each donor is shown. B-ACTIN was used as loading control (n=3 donors; mean \pm SEM are shown). **F** through **P**, Mice were fed a control (CD) or high fat diet (HFD, 60% kcal from fat) for 4 weeks and then studied under fed ad libitum or fasted (24 hours) conditions. **G** through **I**, Stroma-vascular fraction was isolated from PG-AT and Ing-AT. Dll4 transcript levels were measured and presented relative to housekeeping gene Rpl4 (**G** and **H**). Ratio of Dll4 expression between PG-AT/Ing-AT was calculated for each animal (**I**; n=5–6, Max, Median and Min are shown). $P < 0.05$ across diet or Fed/Fasted are shown). **J** through **L**, Modulation of plasma nonesterified fatty acids (**J**; NEFA), glucose (**K**) levels and body weight (**L**) in response to fasting was measured relative to fed (T0) condition for each animal. (n=11–12. Mean \pm SEM are shown; $P < 0.05$ to T0 Fed and across diet are shown). **M** through **P**, Diameter (d, μ m) of mature adipocytes isolated from whole PG-AT and Ing-AT from mice fed or fasted was measured and the frequency distribution calculated (n=5–6 mice/condition, 2–3 suspensions analyzed per tissue, Max, Median and Min are shown). $P < 0.05$ across diet are shown). **Q** through **R**, Association of DLL4 common variants was explored using *The Type 2 Diabetes Knowledge Portal*. Top five associated phenotype are shown (**Q**). DLL4 variants significantly associated with WHRadjBMI are shown (**R**). BMI indicates body mass index; eGFRcrea, serum creatinine, PADnonT2D, peripheral artery disease in subjects without diabetes; SBP, systolic blood pressure; and WHRadjBMI, waist to hip ratio adjusted to BMI.

skeletal muscle. Here, in primary human AT-EC and native murine AT-EC, we found that the Notch ligand DLL4 was selectively reduced following activation of AMPK or inhibition of MTORC1^{47,48} and under fasting conditions in vivo, respectively. Importantly, the pattern of DLL4 modulation by fasting was specific to the endothelial cells, since it was not observed in adipocytes, and it was specific of the abdominal/perivisceral fat depots. This regulation, occurring at mRNA and protein levels, likely signals the endothelium to regulate transendothelial lipid shuttling. Recent work has shown that DLL4/Notch suppress transcytosis at the blood-retinal barrier through transcriptional

regulation.⁴⁹ In hAT-EC, we found that prolonged exposure to DLL4 reduced the expression of CD36 and in parallel the intracellular accumulation of long chain FA (LCFA), in agreement with a major role of CD36 in the uptake of LCFA by AT-EC as we previously reported.¹⁵ In addition to the transcriptional-mediated regulation, acute exposure to DLL4 is also sufficient to decrease LCFA uptake through nontranscriptional processes.

Transendothelial LCFA transport likely involves several routes of entry and regulatory mechanisms. Our work performed with primary hAT-EC revealed that LCFA uptake is sensitive to the activity of kinases such as class III PI3K

and PAK1 and associated with engulfment of FA transporters. In addition, we observed that human primary AT-EC in vitro and mouse native AT-EC in vivo exhibit cell surface protrusions that resemble dorsal ruffles previously shown to be related to receptor-mediated macropinocytosis⁴⁰ and lipoprotein margination at the microvascular endothelium surface.⁵⁰ In hAT-EC, the enrichment of CD36 at the edge of CORTACTIN-positive ruffles that rapidly close in the presence of LCFA suggests that these dynamic membrane structures contribute to FA uptake. Intriguingly, DLL4 exposure coincided with an alteration in the subcellular dynamic of FATPs and disrupted CORTACTIN patterning in the presence of LCFA. The non-selective effect of DLL4 exposure on surface transporter levels, supports that DLL4 impacts the overall cellular mechanism involved in LCFA engulfment rather than the sole expression of specific FA transporters. Previous work has shown that NOTCH and DLL4 regulate cytoskeleton-dependent cellular function including CORTACTIN-dependent lamellipodia⁵¹ and cell-cell junction assembly,⁵² through nontranscriptional mechanisms. CORTACTIN-dependent macropinocytosis was also described to lie downstream of signaling pathways involving PI3-kinases (Phosphoinositide 3-kinases) and PAK1.^{36–39} Blockade of these pathways in hAT-EC produced similar antagonist effects on LCFA uptake as exposure to DLL4 and inhibition of PAK1 completely abrogated the positive effect of DAPT on LCFA accumulation. Altogether, these data suggested that the DLL4/Notch axis is part of the regulatory machinery that modulate macropinocytosis-mediated LCFA uptake in AT-EC. Direct interaction of the NOTCH intracellular domain with PAK1⁵³ may be part of the underlying mechanism, although further investigations are required to precisely identify the molecular interactions and players involved. These mechanisms likely signal to the endothelium to regulate transendothelial FA handling in response to energy transition. In agreement with this hypothesis, our data show that the raise in circulating FA levels in response to fasting was significantly blunted in mice with a specific deletion of *Dll4* in the endothelium. Whether loss of endothelial *Dll4* in adipose depots would be associated with lipid redistribution and changes in fat stores repartition remains to be evaluated.

The present data clearly show that the DLL4-mediated control of LCFA uptake by endothelial cells is specific to adipose tissue as well as its anatomical location. Indeed, retrospective analysis of RNA sequencing datasets from Schupp et al. performed on PG-AT, skeletal muscle and liver (Figure S7L; GSE46495; associated study by Schupp et al⁵⁴) revealed a differential expression of *Dll4* in fed versus fasted state selectively in adipose tissue. These data support that endothelial DLL4 likely contributes to the adaptation to energy transition state in a tissue specific manner. Noticeably, analysis of the dataset from Tabula Muris consortium by Paik et al⁵⁵ revealed organ-specific EC signatures that highlight enrichment in the mTOR signaling pathway only in AT-EC, an observation in agreement with the present data

showing the peculiar ability of endothelium from fat depots to adapt to changes in energy level.

Single-cell transcriptional analyses of endothelial cells isolated from 11 murine,⁵⁶ highlighted subtypes of EC likely involved in lipid handling; however, this study did not include adipose depots. In hAT-EC, we observed only a partial decrease in FA uptake during the short-term response to PI3K-PAK1 inhibition and DLL4 exposure, supporting the hypothesis that EC subtypes possessing different capacities to sense and transport LCFA coexist in fat depots.^{57,58} Notch receptors and ligands are known determinants of endothelial identity, especially in regard to arterial and venous phenotypes.^{59,60} It is tempting to speculate that DLL4 may also define peculiar fat depot endothelial subsets involved in the response to energy transition state. Noticeably, murine EC from perigonadal AT, expressing higher levels of *Dll4*, exhibited a greater amplitude in the transcriptional and morphological response to fasting compared with inguinal AT-EC, properties reminiscent of those observed with the human abdominal subcutaneous adipose depot.

Over the past few years, an increasing number of studies have highlighted and documented the role of EC in the regulation of metabolic fluxes.⁶ However, the lack of in vivo models to assess candidate regulatory pathways in different vascular beds precludes the specific characterization of endothelial cell contribution to energy homeostasis. Periodic shift between carbohydrates and lipids as energy fuels is essential for metabolic organs including the heart and skeletal muscle.⁶¹ The identification of regulatory mechanisms allowing to properly channel FA toward adipose depots may contribute to maintain this balance in order to limit the deleterious impact of ectopic lipid deposition (lipotoxicity⁴⁵) and therefore to protect cardiometabolic health. Arteriovenous flux measurements of deuterium-coupled FA in Abdo-AT highlighted a dramatic decrease in lipid uptake and release in obese individuals, compared with lean subjects.⁶² Impairment of lipid handling by adipose tissues with obesity likely contributes to favor lipid redistribution and the development of cardiometabolic disorders. Our study supports that alteration of AT-EC adaptability to cope with metabolic fluxes contribute to AT dysfunction. Indeed, blunted modulation of endothelial DLL4 expression in response to nutrient responsive pathways or fasting was observed in AT-EC from overweight individuals or from mice fed an obesogenic diet for a short period of time. In addition, increased adiposity was also associated with a loss of territorial differences in *Dll4* expression patterns by AT-EC. This could contribute to body fat store redistribution toward deleterious adipose depots, a hypothesis also supported by the fact that common variants of DLL4 are associated with waist to hip ratio adjusted to body mass index. Therefore, it is tempting to speculate that changes affecting AT endothelium, already observed

at early stages in the onset of obesity, may preclude proper handling of LCFA fluxes and favor metabolic inflexibility. Thus, with specific abilities to sense, adapt to energy levels and handle lipid fluxes, endothelial cells from adipose depots may be considered a relevant target, deserving further investigation in the maintenance of energy homeostasis.

ARTICLE INFORMATION

Received March 31, 2022; accepted February 28, 2023.

Affiliations

Inserm, UMR1297, Team 1, I2MC, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, Université de Toulouse, France (A.A., P.D., C.B., J.G., A. Bouloumié, A. Briot). Inserm, UMR1297, Team ESTER, I2MC, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, Université de Toulouse, France (E.R., J.-F.A.). Inserm, UMR 1034, Biology of Cardiovascular Diseases, Univ. Bordeaux, Pessac, France (C.C., M.L.). Inserm, UMR1297, I2MC, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, Université de Toulouse, France (R.F.-F.). Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Toulouse University Hospital, France (B.C.). Laboratoires Clarins, Pontoise, France (K.V.).

Acknowledgments

We thank F. Martins and E. Lhuillier from GeT-Santé (transcriptomic); A. Zakaroff-Girard (TRI-cytometry) and CMEAB (Center for Electron Microscopy applied to Biology, Faculté de Médecine de Rangueil, Université de Toulouse III Paul Sabatier) from Genotoul-TRI; J.S. Iacovoni from Genotoul BioStats; We-Met (Functional Biochemistry Facility at I2MC); and CREFRE US006 (Genotoul ANEXPLO) for helpful assistance on their respective field of expertise. We thank C. Naylies and Y. Lippi for their contribution to microarray fingerprints acquisition and microarray data analysis carried out at GeT-Trix, Toulouse Midi-Pyrénées facility (<https://doi.org/10.15454/1.5572370921303193E12>). The authors gratefully thank the Pr. Grolleau-Raoux and Department of Plastic Surgery (Hôpital Universitaire Toulouse Rangueil, Toulouse, France), for their involvement in AT collection. A. Aupetit, P. Decaunes performed *in vitro* experiments with endothelial cells and *in vivo* approaches, collected data, and analyzed data. C. Belles, E. Riant, J. Galitzky performed experiments with human AT, collected and analyzed data. C. Chapouly and M. Laisné performed *in vivo* experiment on Dll4^{Cre}. R. Flores-Flores developed the Fiji plugin for adipocytes measurement. B. Chaput collected human AT and patient information in the frame of the ADIPENDO cohort. J.-F. Arnal managed the clinical ADIPENDO cohort. K. Vié designed the clinical study, A. Bouloumié designed research studies, analyzed data, and wrote the article. A. Briot designed research studies, conduct experiments, acquired and analyzed data, and wrote the article.

Sources of Funding

This study was supported by funds from the French National Institute for Health and Medical Research (Inserm), Aviesan, Région Occitanie (to A. Briot), PHRC interrégional 2012 Adipendo N° 1206708, CHU de Toulouse, Association Française d'Etude et de Recherche sur l'Obésité (AFERO (to A. Briot), Société Francophone du Diabète (SFD, to A. Briot) and Clarins. A. Aupetit is supported by PhD co-funding by Région Occitanie/Inserm.

Disclosures

None.

Supplemental Material

Expanded Materials and Methods
Tables S1–S3
Figures S1–S7
Major Resources Table
ARRIVE Essential 10

REFERENCES

- Piche ME, Poirier P, Lemieux I, Després J-P. Overview of epidemiology and contribution of obesity and body fat distribution to cardiovascular disease: an update. *Prog Cardiovasc Dis*. 2018;61:103–113. doi: 10.1016/j.pcad.2018.06.004
- Manolopoulos KN, Karpe F, Frayn KN. Gluteofemoral body fat as a determinant of metabolic health. *Int J Obes Lond*. 2010;34:949–959. doi: 10.1038/ijo.2009.286
- Karpe F, Pinnick KE. Biology of upper-body and lower-body adipose tissue-link to whole-body phenotypes. *Nat Rev Endocrinol*. 2015;11:90–100. doi: 10.1038/nrendo.2014.185
- Frayn KN. Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. *Diabetologia*. 2002;45:1201–1210. doi: 10.1007/s00125-002-0873-y
- Kramer FM, Stunkard AJ, Marshall KA, McKinney S, Liebschutz J. Breast-feeding reduces maternal lower-body fat. *J Am Diet Assoc*. 1993;93:429–433. doi: 10.1016/0002-8223(93)92289-a
- Pi XC, Xie L, Patterson C. Emerging roles of vascular endothelium in metabolic homeostasis. *Circ Res*. 2018;123:477–494. doi: 10.1161/circresaha.118.313237
- Gogg S, Nerstedt A, Boren J, Smith U, et al. Human adipose tissue microvascular endothelial cells secrete ppargamma ligands and regulate adipose tissue lipid uptake. *JCI Insight*. 2019;4:e125914. doi: 10.1172/jci.insight.125914
- Hagberg CE, Falkevall A, Wang X, Larsson E, Huusko J, Nilsson I, van Meeteren LA, Samen E, Lu L, Vanwildemeersch M, et al. Vascular endothelial growth factor b controls endothelial fatty acid uptake. *Nature*. 2010;464:917–921. doi: 10.1038/nature08945
- Jabs M, Rose AJ, Lehmann LH, Taylor J, Moll J, Sijmonsma TP, Herberich SE, Sauer SW, Poschet G, Federico G, et al. Inhibition of endothelial notch signaling impairs fatty acid transport and leads to metabolic and vascular remodeling of the adult heart. *Circulation*. 2018;137:2592–2608. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.029733
- Jang C, Oh SF, Wada S, Rowe GC, Liu L, Chan MC, Rhee J, Hoshino A, Kim B, et al. A branched-chain amino acid metabolite drives vascular fatty acid transport and causes insulin resistance. *Nat Med*. 2016;22:421–426. doi: 10.1038/nm.4057
- Crewe C, Joffin N, Rutkowski JM, Kim M, Zhang F, Towler DA, Gordillo R, Scherer PE. An endothelial-to-adipocyte extracellular vesicle axis governed by metabolic state. *Cell*. 2018;175:695–708.e13. doi: 10.1016/j.cell.2018.09.005
- Fischer AW, Jaeckstein MY, Gottschling K, Heine M, Sass F, Mangels N, Schlein C, Worthmann A, Bruns OT, Yuan Y, et al. Lysosomal lipoprotein processing in endothelial cells stimulates adipose tissue thermogenic adaptation. *Cell Metab*. 2021;33:547–564.e7. doi: 10.1016/j.cmet.2020.12.001
- Beigneux AP, Davies BS, Gin P, Weinstein MM, Farber E, Qiao X, Peale F, Bunting S, Walzem RL, Wong JS, et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 plays a critical role in the lipolytic processing of chylomicrons. *Cell Metab*. 2007;5:279–291. doi: 10.1016/j.cmet.2007.02.002
- Davies BS, Beigneux AP, Barnes RH, Tu Y, Gin P, Weinstein MM, Nobumori C, Nyrén R, Goldberg I, Olivecrona G, et al. Gpihbp1 is responsible for the entry of lipoprotein lipase into capillaries. *Cell Metab*. 2010;12:42–52. doi: 10.1016/j.cmet.2010.04.016
- Briot A, Decaunes P, Volat F, Belles C, Coupaye M, Ledoux S, Bouloumié A. Senescence alters PPARgamma-dependent fatty acid handling in human adipose tissue microvascular endothelial cells and favors inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018;38:1134–1146. doi: 10.1161/ATVBAHA.118.310797
- Briot A, Bouloumié A, Iruela-Arispe ML. Notch, lipids, and endothelial cells. *Curr Opin Lipidol*. 2016;27:513–520. doi: 10.1097/MOL.0000000000000337
- Briot A, Civelek M, Seki A, Hoi K, Mack JJ, Lee SD, Kim J, Hong C, Yu J, Fishbein GA, et al. Endothelial notch1 is suppressed by circulating lipids and antagonizes inflammation during atherosclerosis. *J Exp Med*. 2015;212:2147–2163. doi: 10.1084/jem.20150603
- Cheng CW, Biton M, Haber AL, Gunduz N, Eng G, Gaynor LT, Tripathi S, Calibasi-Kocal G, Rickelt S, Butty VL, et al. Ketone body signaling mediates intestinal stem cell homeostasis and adaptation to diet. *Cell*. 2019;178:1115–1131.e15. doi: 10.1016/j.cell.2019.07.048
- Hachisuga M, Oki S, Kitajima K, Ikuta S, Sumi T, Kato K, Wake N, Meno C. Hyperglycemia impairs left-right axis formation and thereby disturbs heart morphogenesis in mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015;112:E5300–E5307. doi: 10.1073/pnas.1504529112
- Jouandin P, Ghiglione C, Noselli S. Starvation induces foxo-dependent mitotic-to-endocycle switch pausing during drosophila oogenesis. *Development*. 2014;141:3013–3021. doi: 10.1242/dev.108399
- Obniski R, Sieber M, Spradling AC. Dietary lipids modulate notch signaling and influence adult intestinal development and metabolism in drosophila. *Dev Cell*. 2018;47:98–111.e5. doi: 10.1016/j.devcel.2018.08.013

22. Edgar R, Domrachev M, Lash AE. Gene expression omnibus: Ncbi gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res*. 2002;30:207–210. doi: 10.1093/nar/30.1.207
23. Huber W, Carey VJ, Gentleman R, Anders S, Carlson M, Carvalho BS, Bravo HC, Davis S, Gatto L, et al. Orchestrating high-throughput genomic analysis with bioconductor. *Nat Methods*. 2015;12:115–121. doi: 10.1038/nmeth.3252
24. Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*. 2003;19:185–193. doi: 10.1093/bioinformatics/19.2.185
25. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, Smyth GK. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:e47. doi: 10.1093/nar/gkv007
26. Chen EY, Tan CM, Kou Y, Duan Q, Wang Z, Meirelles GV, Clark NR, Ma'ayan A. Enrichr: Interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinf*. 2013;14:128. doi: 10.1186/1471-2105-14-128
27. Metsalu T, Vilo J. Clustvis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using principal component analysis and heatmap. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:W566–W570. doi: 10.1093/nar/gkv468
28. Koch U, Fiorini E, Benedito R, Besseyrias V, Schuster-Gossler K, Pierres M, Manley NR, Duarte A, Macdonald HR, et al. Delta-like 4 is the essential, nonredundant ligand for notch1 during thymic T cell lineage commitment. *J Exp Med*. 2008;205:2515–2523. doi: 10.1084/jem.20080829
29. Monelli E, Villacampa P, Zabala-Letona A, Martinez-Romero A, Llena J, Beiroa D, Gouveia L, Chivite I, Zagmutt S, Gama-Perez P, et al. Angiocrine polyamine production regulates adiposity. *Nat Metab*. 2022;4:327–343. doi: 10.1038/s42255-022-00544-6
30. Wang Y, Nakayama M, Pitulescu ME, Schmidt TS, Bochenek ML, Sakakibara A, Adams S, Davy A, Deutsch U, Lüthi U, et al. Ephrin-b2 controls vegf-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature*. 2010;465:483–486. doi: 10.1038/nature09002
31. Goto K, Iso T, Hanaoka H, Yamaguchi A, Suga T, Hattori A, Irie Y, Shinagawa Y, Matsui H, Syamsunarno MRAA, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in capillary endothelia promotes fatty acid uptake by heart during long-term fasting. *J Am Heart Assoc*. 2013;2:e004861. doi: 10.1161/JAHA.112.004861
32. Davies BS, Waki H, Beigneux AP, Farber E, Weinstein MM, Wilpitz DC, Tai L-J, Evans RM, Fong LG, et al. The expression of gp130, an endothelial cell binding site for lipoprotein lipase and chylomicrons, is induced by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Mol Endocrinol*. 2008;22:2496–2504. doi: 10.1210/me.2008-0146
33. Kanda T, Brown JD, Orasanu G, Vogel S, Gonzalez FJ, Sartoretto J, Michel T, Plutzky J. Ppargamma in the endothelium regulates metabolic responses to high-fat diet in mice. *J Clin Invest*. 2009;119:110–124. doi: 10.1172/JCI36233
34. Chusyd DE, Wang D, Huffman DM, Nagy TR. Relationships between rodent white adipose fat pads and human white adipose fat depots. *Front Nutr*. 2016;3:10. doi: 10.3389/fnut.2016.00010
35. Mercer J, Helenius A. Virus entry by macropinocytosis. *Nat Cell Biol*. 2009;11:510–520. doi: 10.1038/ncb0509-510
36. Araki N, Johnson MT, Swanson JA. A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *J Cell Biol*. 1996;135:1249–1260. doi: 10.1083/jcb.135.5.1249
37. Ferreira APA, Boucrot E. Mechanisms of carrier formation during clathrin-independent endocytosis. *Trends Cell Biol*. 2018;28:188–200. doi: 10.1016/j.tcb.2017.11.004
38. Hoon JL, Wong WK, Koh CG. Functions and regulation of circular dorsal ruffles. *Mol Cell Biol*. 2012;32:4246–4257. doi: 10.1128/MCB.00551-12
39. Quinn SE, Huang L, Kerkvliet JG, Swanson JA, Smith S, Hoppe AD, Anderson RB, Thien NW, Scott BL. The structural dynamics of macropinosome formation and pi3-kinase-mediated sealing revealed by lattice light sheet microscopy. *Nat Commun*. 2021;12:4838. doi: 10.1038/s41467-021-25187-1
40. Orth JD, Krueger EW, Weller SG, McNiven MA. A novel endocytic mechanism of epidermal growth factor receptor sequestration and internalization. *Cancer Res*. 2006;66:3603–3610. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2916
41. Valdivia A, Goicoechea SM, Awadia S, Zinn A, Garcia-Mata R. Regulation of circular dorsal ruffles, macropinocytosis, and cell migration by rhoG and its exchange factor, trio. *Mol Biol Cell*. 2017;28:1768–1781. doi: 10.1091/mbc.E16-06-0412
42. Stauffer W, Sheng H, Lim HN. Ezcolocalization: an imagej plugin for visualizing and measuring colocalization in cells and organisms. *Sci Rep*. 2018;8:15764. doi: 10.1038/s41598-018-33592-8
43. Goransson O, McBride A, Hawley SA, Ross FA, Shpiro N, Foretz M, Viollet B, Hardie DG, Sakamoto K. Mechanism of action of a-769662, a valuable tool for activation of AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 2007;282:32549–32560. doi: 10.1074/jbc.M706536200
44. Ding H, Zheng S, Garcia-Ruiz D, Hou D, Wei Z, Liao Z, Li L, Zhang Y, Han X, Zen K, et al. Fasting induces a subcutaneous-to-visceral fat switch mediated by miR-149-3p and suppression of prdm16. *Nat Commun*. 2016;7:11533. doi: 10.1038/ncomms11533
45. Schaffer JE. Lipotoxicity: When tissues overeat. *Curr Opin Lipidol*. 2003;14:281–287. doi: 10.1097/00041433-200306000-00008
46. Andersson ER, Sandberg R, Lendahl U. Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. *Development*. 2011;138:3593–3612. doi: 10.1242/dev.063610
47. Gonzalez A, Hall MN, Lin SC, Hardie DG. Ampk and tor: the yin and yang of cellular nutrient sensing and growth control. *Cell Metab*. 2020;31:472–492. doi: 10.1016/j.cmet.2020.01.015
48. Hardie DG, Schaffer BE, Brunet A. Ampk: an energy-sensing pathway with multiple inputs and outputs. *Trends Cell Biol*. 2016;26:190–201. doi: 10.1016/j.tcb.2015.10.013
49. Yang JM, Park CS, Kim SH, Noh TW, Kim J-H, Park S, Lee J, Park JR, et al. Dll4 suppresses transcytosis for arterial blood-retinal barrier homeostasis. *Circ Res*. 2020;126:767–783. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.119.316476
50. Goulbourne CN, Gin P, Tatar A, Nobumori C, Hoenger A, Jiang H, Grovener CRM, Adeyo O, Esko JD, et al. The gp130-IL6 complex is responsible for the margination of triglyceride-rich lipoproteins in capillaries. *Cell Metab*. 2014;19:849–860. doi: 10.1016/j.cmet.2014.01.017
51. Spuul P, Daubon T, Pitter B, Alonso F, Fremaux I, Montanez E, Génot E. Vegf-a/notch-induced podosomes proteolyse basement membrane collagen-iv during retinal sprouting angiogenesis. *Cell Rep*. 2016;17:484–500. doi: 10.1016/j.celrep.2016.09.016
52. Polacheck WJ, Kutys ML, Yang J, Eycckmans J, Wu Y, Vasavada H, Hirschi KK, Chen CS. A non-canonical notch complex regulates adherens junctions and vascular barrier function. *Nature*. 2017;552:25862. doi: 10.1038/nature24998
53. Yoon JH, Mo JS, Ann EJ, Ahn J-S, Jo E-H, Lee H-J, Hong S-H, et al. Notch1 intracellular domain negatively regulates pak1 signaling pathway through direct interaction. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1863:179–188. doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.11.001
54. Schupp M, Chen F, Briggs ER, Rao S, Pelzmann HJ, Pessentheiner AR, Bogner-Strauss JG, Lazar MA, Baldwin D, et al. Metabolite and transcriptome analysis during fasting suggest a role for the p53-ddit4 axis in major metabolic tissues. *BMC Genomics*. 2013;14:758. doi: 10.1186/1471-2164-14-758
55. Paik DT, Tian L, Williams IM, Rhee S, Zhang H, Liu C, Mishra R, Wu SM, Red-Horse K, Wu JC. Single-cell RNA sequencing unveils unique transcriptomic signatures of organ-specific endothelial cells. *Circulation*. 2020;142:1848–1862. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.119.041433
56. Kalucka J, de Rooij L, Goveia J, Rohelova K, et al. Single-cell transcriptome atlas of murine endothelial cells. *Cell*. 2020;180:764–779. doi: 10.1016/j.cell.2020.01.015
57. Vijay J, Gauthier MF, Biswell RL, Louise DA, Johnston JJ, Cheung WA, 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
58. Emont MP, Jacobs C, Essene AL, Pant D, Tenen D, Colletuori G, Di Vincenzo A, Jørgensen AM, 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
59. Lawson ND, Scheer N, Pham VN, Kim CH, Chitnis AB, Campos-Ortega JA, Weinstein BM. Notch signaling is required for arterial-venous differentiation during embryonic vascular development. *Development*. 2001;128:3675–3683. doi: 10.1242/dev.128.19.3675
60. Villa N, Walker L, Lindsell CE, Gasson J, Iruela-Arispe ML, Weinmaster G. Vascular expression of notch pathway receptors and ligands is restricted to arterial vessels. *Mech Dev*. 2001;108:161–164. doi: 10.1016/s0925-4773(01)00469-5
61. Smith RL, Soeters MR, Wust RC, Houtkooper RH. Metabolic flexibility as an adaptation to energy resources and requirements in health and disease. *Endocr Rev*. 2018;39:489–517. doi: 10.1210/er.2017-00211
62. McQuaid SE, Hodson L, Neville MJ, Dennis AL, Cheeseman J, Humphreys SM, Ruge T, Gilbert M, Fielding BA, et al. Downregulation of adipose tissue fatty acid trafficking in obesity: a driver for ectopic fat deposition? *Diabetes*. 2011;60:47–55. doi: 10.2337/db10-0867

SUPPLEMENTAL MATERIALS

Title: Endothelial DLL4 is an adipose depot specific fasting sensor regulating fatty acid fluxes

Alex Aupetit (MSc)¹, Pauline Decaunes (BSc)¹, Chloé Belles (MSc)¹, Elodie Riant (PhD)², Jean Galitzky (PhD)¹, Candice Chapouly (PhD)³, Margaux Laisné (MSc)³, Rémy Flores-Flores (MSc)⁴, Benoit Chapat (MD, PhD)⁵, Katell Vié (PharmD)⁶, Jean-François Arnal (MD, PhD)², Anne Bouloumié (PhD)^{1*}, Anaïs Briot (PhD)^{1*}

¹Inserm, UMR1297, Team 1, I2MC, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, Université de Toulouse, Toulouse, France

²Inserm, UMR1297, Team ESTER, I2MC, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, Université de Toulouse, Toulouse, France

³Univ. Bordeaux, INSERM, Biology of Cardiovascular Diseases, U1034, Pessac, France

⁴Inserm, UMR1297, I2MC, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, Université de Toulouse, Toulouse, France

⁵Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Toulouse University Hospital, Toulouse, France

⁶Laboratoires Clarins, Pontoise, France

*Co-Corresponding authors contact information:

***Anne Bouloumié, PhD**

I2MC, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, Université de Toulouse,

UMR1297 Inserm, Team 1, Toulouse, France

Phone: +33 (0)5 61 32 56 42

Email address: anne.bouloumié@inserm.fr

***Anaïs Briot, PhD**

I2MC, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, Université de Toulouse,

UMR1297 Inserm, Team 1, Toulouse, France

Phone: +33 (0)5 61 32 56 37

Email address: anaïs.briot@inserm.fr

Extended Methods

Tables S1-S3

Figures S1-S7

Major Resources Table

ARRIVE guideline 2.0 Essential 10

Extended Materials & Methods

Isolation of the human AT Cell Subtypes

Human AT was digested by successive incubation with Dispase (Gibco; 2.4U/ml, in PBS, pH7.4, v/v; 30 minutes at 37°C), and Type 2 collagenase (Sigma-Aldrich; 250U/ml, in PBS containing 2% BSA, pH7.4, v/v; 30 minutes at 37°C). Cells from the stroma-vascular fraction (SVF) were obtained after centrifugation followed by a 10-minute incubation with Erythrocyte Lysis Buffer (0.15M NH₄Cl, 10mM NaHCO₃, 0.1mM EDTA, pH7.3; ELB).

Cell subtypes were then separated by immunoselection-depletion. Immune cells were separated using CD45⁺ cell depletion set (EasySep™ Human CD45 Depletion Kit, StemCell Technologies). Human endothelial cells (hAT-EC; CD45⁻/CD31⁺) were selected from the CD45-negative population using anti-human CD31 isolation kit (Dynabeads™, LifeTechnologies). Progenitor cells were selected from the CD45⁻/CD31⁻ fraction using EasySep™ Human CD34 Selection Kit (StemCell Technologies). Purified cells were then plated or used for native transcriptional analysis.

Human primary AT-EC Culture and Treatments

hAT-EC *in vitro* experiments were conducted from passage 0 to 2 to limit replicative senescence. hAT-EC were grown in Endothelial Cell Growth Medium MV (PromoCell) supplemented with penicillin (100U/ml) and streptomycin (100mg/ml). Cells were cultured onto tissues culture dishes coated with 2µg/cm² of Fibronectin (Millipore), at 5% CO₂, 37°C. For AMPK activation or MTORC1 inhibition cells were incubated in the presence of A-769662 (100µM; APEX-BIO) or Rapamycin (50ng/ml; ThermoFisher Scientific) for 12 hours or vehicle control (DMSO).

Modulation of Notch signaling: Chimeric Fc-DLL4 (Invitrogen, #A42511), or IgG controls (Invitrogen, #A42561) were used to coat tissue culture dishes or slides (2µg/cm²). hAT-EC were then seeded onto the recombinant proteins (100000 cells/cm²) for 4 to 24 hours. Inhibition of Notch signaling was achieved by treating hAT-EC with γ -secretase inhibitor (DAPT, (2S)-N-[(3,5-Difluorophenyl)acetyl]-L-alanyl-L-phenylglycine 1,1-dimethylethyl ester ; 25µM; Sigma-Aldrich) or vehicle control (DMSO) for 4 to 24 hours. To identify active endocytic mechanisms, hAT-EC were pre-treated with Wortmannin (25nM, 15min, Sigma), IN1 (Vps34-IN1, 1µM, 30min, CAYMAN Chemical), IPA3 (1,1'-Dithiodi-2-naphthol; 10µM, 15min, CAYMAN Chemical), PP2 (3-(4-chlorophenyl)-1-(1,1-dimethylethyl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-amine ; 10µM, 30min, CAYMAN Chemical) or DMSO in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Sigma-Aldrich) supplemented with 0.1% BSA Fatty Acid-free. For long chain fatty acid uptake experiments, hAT-EC (pretreated or not) were cultured for 1 hour in HBSS 0.1% BSA Fatty acid-free and then incubated with BODIPY®FL C16 (750nM final) for 2 minutes to 2 hours. Incorporation of BODIPY®FL C16 was then measured by flow cytometry or imaged by confocal microscopy.

Flow Cytometry

Native cells from the human or mouse stroma-vascular fraction or primary hAT-EC (in the presence or not of BODIPY®FL C16) were incubated with fluorescent labeled primary antibodies (listed in the *Major Resources Table*) in FACS buffer (PBS 2mM EDTA, 0.5% BSA) for 20 minutes on ice. Cells were analyzed on a FACSCanto II™ Flow Cytometer using Diva Pro Software (DB Biosciences). Gating strategy for native human SVF is shown in Fig S1A-B (human cells)

Transcriptional Analysis

Total RNA from human and mouse endothelial cells were purified using Quick RNA MicroPrep Kit® (Zymo-Research). Total RNA from mouse mature adipocytes were purified following sample homogenization in Qiazol (Qiagen) using Direct-zol™ RNA Miniprep Plus (Zymo-Research). Complementary DNA synthesis was performed with Superscript III® reverse transcriptase (Invitrogen) using random hexamers primers. Quantitative RT-PCR was performed using human and mouse probe and primer sets (Applied Biosystems) described in the *Major Resources Table*. Each reaction was run in duplicate, using Takyon low Rox Probe MasterMix dTTP Blue® (Eurogentec) for mouse assay and TaqMan™ Fast Advanced MasterMix (Applied Biosystems) for human assays. The amplification reaction was performed on a QuantStudio™5 Real-Time PCR system (Applied Biosystems). *ACTIN-B* or *PP1B* (for human), and to *Rpl4* (for mice) were used as housekeeping genes. Analysis were performed with QuantStudio™ Design & Analysis Software.

Incucyte® Live Imaging

Primary human AT-EC were seeded in 48-wells plates. Following pretreatment of interest, they were incubated with BODIPY®FL C16 (750nM). For measurement of real time BODIPY®FL C16 accumulation, Incucyte SX5 Technology (Sartorius) was used. Images of green (FITC channel) and phase acquisition was taken every 20 minutes for 2 hours. 4 images per well were taken at each time point. Quantification was performed using the Incucyte® Basic Analyzer (to quantify total integrated Green Intensity GCU) and Cell-by-Cell (to quantify objects; Fig S3B, E, Fig S5B, D and R) analysis Software Module (Sartorius, France).

Western Blot Analysis

hAT-EC were lysed in modified RIPA buffer containing 1% Triton x-100, 0.1% SDS and supplemented with proteases (cOmplete™, Sigma-Aldrich) and phosphatases (PhosSTOP, Roche) inhibitor cocktails. 5 to 10µg of protein lysate were resolved and analyzed by western blot using primary antibodies (listed in the *Major Resources Table*) following recommendation of the manufacturer. Quantification of bands by densitometry was performed using ImageLab Software (Bio-Rad Laboratories).

Immunostaining and Confocal Imaging

hAT-EC were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 10 minutes at room temperature. Cells were sequentially incubated with primary antibodies (or immunoglobulin controls; Fig S4) and Alexa Fluor® labeled secondary antibodies (Life Technologies) listed in the *Major Resources Table*. Nuclei were stained with DAPI (0.5µg/ml; Invitrogen). Cells were imaged using an inverted fluorescent confocal microscope Zeiss LSM780 (Software Zen®) or an inverted fluorescence microscope (Nikon Eclipse TE300, software NIS-Elements 2.5 BR, Nikon®) for immunostaining performed on Incucyte® wells (Fig S3C, F). Image analyses were performed with ImageJ Software (imagej.nih.gov). To assess CORTACTIN/CD36 co-localization pattern, EzColocalization (Stauffer et al., 2018) plugin was applied.

Mouse AT-EC isolation and sorting

Perigonadal (PG) and subcutaneous inguinal (Ing) AT were harvested and rinsed in PBS. Tissues were minced and digested with Type-2 collagenase (Worthington, USA) for 30 minutes at 37°C. Lysate were then filtered (250µm) and the stroma-vascular

fraction (SVF) was separated from floating adipocytes by centrifugation (10g, 1min, RT). SVF suspension was then centrifuged (500g, 10min, RT) and the pellets re-suspended in ELB. ELB-treated SVF were then centrifuged (500g, 10min, RT), the pellets re-suspended in FACS buffer and filtered on a 37µm nylon meshes. Stroma-vascular cells were then incubated with fluorescent monoclonal antibodies listed in the *Major Resources Table*. AT-EC were isolated based on their surface markers (CD45-/CD31+/SCA1+) using Influx BD Cell Sorter (BD Biosciences). Doublets were eliminated using FSC and FSC-W, then SSC and SSC-W. CD45 negative cells were gated into single cells. CD31+/SCA1+ endothelial cells and CD31-/SCA1+ progenitor cells were gated into CD45-negative cells and sorted before lysis for transcriptional analysis (Fig S2A-D, Fig S6A-B).

Plasma profiling

Glycaemia was assessed at the tail vein using an Accu-Check glucometer (Roche Diabetes Care, France). Non-esterified fatty acids were quantified in plasma retrieved after tail vein collection of blood on Na-heparin treated micro-capillaries (HIRSCHMANN) using NEFA-HR(2) kit (FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH, Germany).

Transmission Electron Microscopy

Samples were fixed with 2% glutaraldehyde in Sorensen buffer (0.1M, pH7.4) for 1 hour, washed with Sorensen phosphate buffer (0.2M) for 12 hours and post-fixed with 1% OsO₄ in Sorensen buffer (0.05M Sorensen phosphate, 0.25M glucose, 1% OsO₄) for 1 hour. Samples were dehydrated in ethanol baths (up to 100% ethanol) and then with propylene oxide. Samples were embedded in epoxy resin (Epon 812). After 48 hours of polymerization at 60°C, ultra-thin sections (70nm) were mounted on 100 mesh collodion-

coated copper grids and post-stained with 3% uranyl acetate in 50% ethanol and with 8.5% lead citrate before being examined on a HT7700 Hitachi electron microscope at an accelerating voltage 80 KV.

Adipocyte measurement

Floating adipocytes were retrieved after AT digestion and fixed in a solution of 4% paraformaldehyde for 2 hours. Photographs of mature adipocytes were taken on an inverted phase contrast microscope (Nikon Eclipse TE300) using NIKON NIS software (software NIS-Elements 2.5 BR, Nikon®). An ImageJ (<https://imagej.nih.gov/>) plugin, *AdipoCarr*, was developed to automatically detect the adipocytes and measure their diameter and will be accessible on GitHub (<https://github.com>). This is achieved by cross-correlating the acquired image with adipocyte models of different diameter, followed by a local maxima detection. Finally, manual editing of the results is available.

Table S1- Clinical parameters of the donors from ADIPENDO cohort used in Figure 1

	Param	Number
BMI	25.14 ± 0.69	43
Age	39.69 ± 1.61	42
Fasting glucose (mmol/L)	4.48 ± 0.07	31
Triglycerides (mmol/L)	0.75 ± 0.06	29
Cholesterol (mmol/L)	4.22 ± 0.16	30

Mean values ± standard errors are presented.

BMI: Body Mass Index.

Table S2- Clinical parameters of the donors from ADIPENDO cohort used for Microarray analysis in Figure 1

	Donor1	Donor 2	Donor3	Donor 4
BMI	23	24.9	26.5	27
Age	48	45	43	41
Glucose (mmol/L)	4.5	5.1	5	n.d.
Triglycerides (mmol/L)	0.41	0.48	n.d.	n.d.
Cholesterol (mmol/L)	3.4	3.95	5.36	n.d.

BMI: Body Mass Index.

Table S3 – Genes contributing to pathway enrichment in EC from Abdo-AT in Figure 1

WP2019	Combined Score	AdjPvalue	Genes
Adipogenesis WP236	69.00	1.96E-06	CFD;CNTFR;CEBPA;IRS1;EPAS1;LPL;TWIST1;IRS2;AHR;GATA3;NR3C1;LIPE;CYP26B1;SOCS1;RXRA;FRZB;NDN;PPARGC1A;MEF2A;NCOA1;GDF10;TGFB1;PTGIS;GADD45B;STAT1;NR2F1;IGF1;CREB1;LEP;RARA;PNPLA3;PPARG;PLIN1;IL6ST;PPARA;PPARD
Prostaglandin Synthesis and Regulation WP98	66.34	5.30E-04	PTGER4;PTGIS;HPGD;ANXA3;PTGER2;AKR1C1;PTGER3;EDNRA;EDNRB;TBXA2R;TBXAS1;PPARG;PTGFRN;PTGDS;PPARGC1A;PPARGC1B
Transcription factor regulation in adipogenesis WP3599	85.66	2.24E-03	CEBPA;RXRA;CREB1;IRS1;LEP;TWIST1;IRS2;PPARG;NR3C1;PPARGC1A
Nuclear Receptors Meta-Pathway WP2882	19.40	4.14E-03	CDKN1C;SLC27A1;CDKN1B;ALAS1;IRS2;DBI;AHR;NR3C1;SLC6A2;ARL5B;SCP2;ENC1;SLC39A8;NCOA1;EDN2;SLC2A10;GPX3;NCOA3;CYP4A11;PTGR1;ACOX1;B3GNT5;PPARA;MFGE8;CES1;HBEGF;PPARD;FKBP5;MGST3;ABHD2;AMIGO2;MGST1;GSTT2;CYP3A5;SLC5A4;EGFR;CYP3A7;FGD4;RXRA;HES1;PPARGC1A;GSTM3;TGFB1;GADD45B;CAVIN2;PRDX6;SOD3;GPAM;GSTA4;ETNK2;CYP1A1;S100P;FGF13;GSTM5
Breast cancer pathway WP4262	22.52	5.92E-03	NOTCH2;NOTCH3;GSK3B;SHC2;NOTCH4;FLT4;ARAF;PTEN;PIK3R1;BRCA2;EGFR;LRP6;FGF7;WNT11;HEY1;HEY2;HES1;NBN;BAK1;HES5;NCOA1;TCF7L2;TCF7L1;GADD45B;FZD7;NCOA3;IGF1;AXIN2;GADD45G;HEYL;KIT
miRNA targets in ECM and membrane receptors WP2911	58.28	6.27E-03	COL3A1;COL1A2;COL4A1;COL6A2;ITGA1;COL5A2;COL6A1;COL6A3;THBS2
Type II interferon signaling	40.10	6.27E-03	CXCL10;CXCL9;SOCS1;NOS2;OAS1;STAT1;IFNGR1;PRKCD;IFI6;IRF8;ISG15;IFIT2

(IFNG) WP619	31.26	6.27E-03	CDKN1C;TGFB1;CAB39;STAT1;IGF2;PTH1R;IGF1;VEGFA;GHR;ADAMTS5;FRZB;TIMP3;PRKACA;CALM1;SOX5;DDR2;BMPR1A
Endochondral Ossification WP474	25.28	6.27E-03	PDGFRB;PDGFRA;PBRM1;TGFB1;KSR1;TGFB3;SHMT1;PTEN;TSC2;ACACB;EGFR;VEGFA;DEPTOR;RHEB;LDHD;SSPN;CDH13;PHGDH;CAMK1;KCNJ2
Pathways in clear cell renal cell carcinoma WP4018	16.39	6.27E-03	GSK3B;CDKN1B;CSF1;CAB39L;IRS1;FLT4;PTEN;IRS2;COMP;GHR;LIPE;FGF7;TNNI;ITGB8;PDGFRB;PDGFRA;TSC2;TBC1D1;CREB1;COL4A1;COL6A2;DDIT4;KIT;ITGA7;CREB5;CAB39;LAMA2;EPAS1;LAMA1;COL11A2;LPAR1;PIK3R1;THBS2;EGFR;THBS4;GNG7;PPARGC1A;NOS2;VEGFD;LAMB1;IGF1;VEGFA;COL3A1;COL1A2;LPAR6;RHEB;COL5A2;FGF13;FGF12;FGFR2
Focal Adhesion- PI3K-Akt- mTOR- signaling pathway WP3932	27.44	6.62E-03	SLC27A1;CYP4A11;AQP7;LPL;DBI;SORBS1;CPT1B;RXRA;FABP4;SCP2;ACOX2;ACOX1;PPARG;CD36;PLIN1;PPARA;PPARD
PPAR signaling pathway WP3942	33.73	2.46E-02	NOTCH2;NOTCH3;HEY1;RRAS;CNTN6;NOTCH4;MFAP2;HES1;DLK2
Canonical and Non- canonical Notch signaling WP3845	13.90	2.46E-02	GSK3B;SHC2;LAMA2;ROCK2;LAMA1;PTEN;PIK3R1;ARHGAP5;THBS2;EGFR;ARHGAP35;THBS4;COMP;TNN;CAPN2;ITGB8;VASP;VAV3;PDGFRB;PDGFRA;TNK2;ITGA1;PRKCA;VEGFD;LAMB1;IGF1;VEGFA;COL1A2;COL4A1;COL6A2;COL5A2;BCL2;ITGA7;MYL9
Focal Adhesion WP306	125.86	3.40E-02	FFAR3;GCG;FFAR2;PPARD
SCFA and skeletal muscle substrate			

metabolism

WP4030

PI3K-Akt

Signaling

Pathway

WP4172

11.08 3.40E-02 IFNA4;GSK3B;CDKN1B;CSF1;IRS1;FLT4;PTEN;COMP;GHR;FGF7;TNN;ITGB8;PDGFRB;PDGFRA;
ITGA1;TSC2;PRKCA;CREB1;COL4A1;COL6A2;DDIT4;KIT;COL6A1;COL6A3;ITGA7;COL6A6;TLR4;
TLR2;CREB5;LAMA2;LAMA1;LPAR1;PIK3R1;THBS2;EGFR;THBS4;GNG7;NTRK2;IGF2;VEGFD;
LAMB1;IGF1;VEGFA;COL1A2;LPAR6;RHEB;BCL2;PKN1;FGF13;FGF12;FGFR2

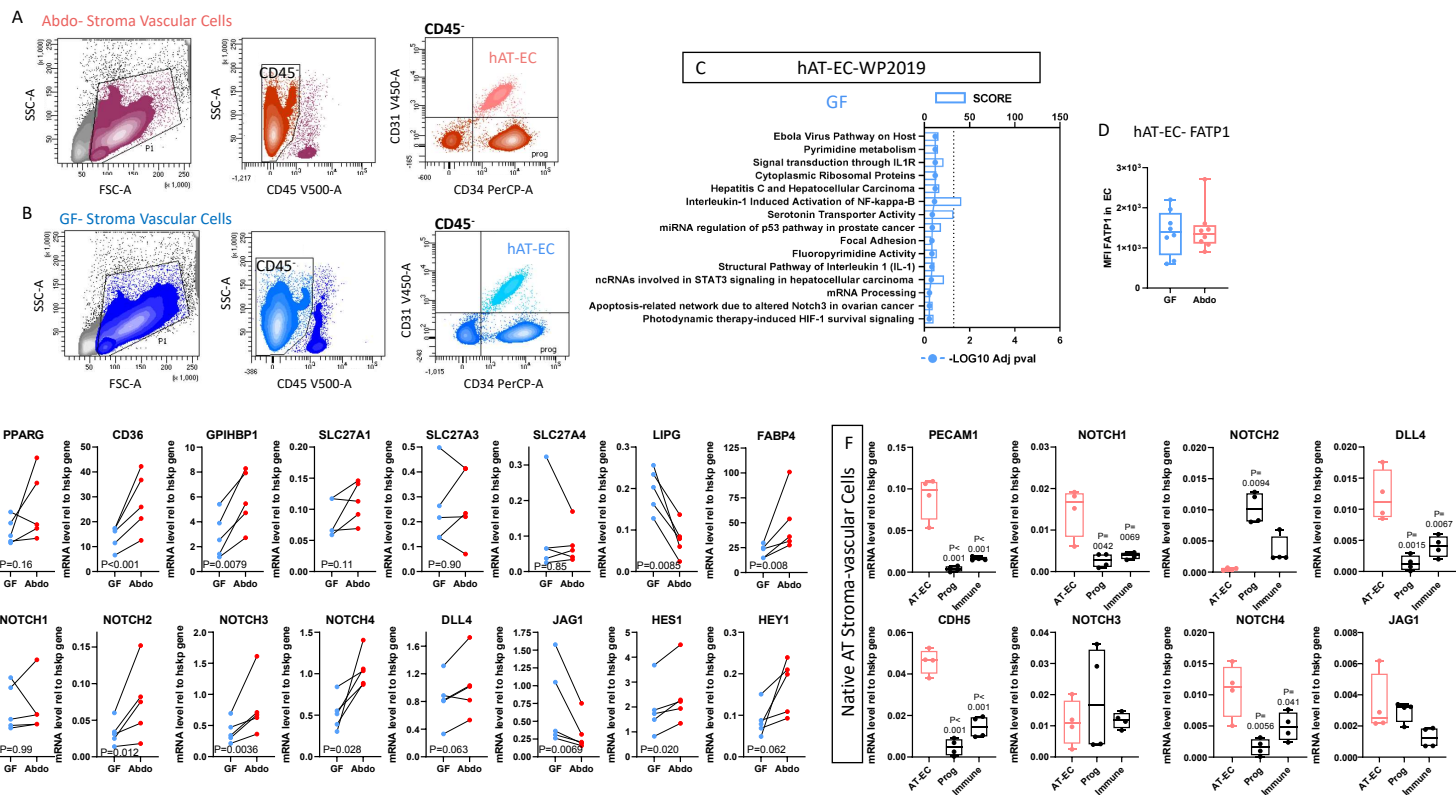


Figure S1 related to Figure 1- Microvascular endothelial cells exhibit a fat depot specific transcriptome

A-E- Human native stroma-vascular fraction (SVF) and microvascular endothelial cells (hAT-EC; CD45-/CD31+/CD34+) were isolated from paired biopsies of subcutaneous gluteofemoral (GF) and abdominal (Abdo) adipose tissue (AT) and studied by flow cytometry or gene microarray. (A-B) Gating strategy to study native hAT-EC in the SVF by flow cytometry according to the surface detection of CD45, CD31 and CD34 is shown. SSC: Side Scatter; FSC: Forward Scatter. (C) Transcripts enriched in GF-AT (DEG, paired $p < 0.05$) were studied using EnrichR. (D) Surface detection of FATP1 was performed by flow cytometry and quantified in the hAT-EC population in native SVF from GF and Abdo-AT ($n = 8$ donors). (E) Transcripts of interest were measured by qRT-PCR in paired hAT-EC from GF and Abdo AT ($n = 5$ donors, P values for paired ratio GF/Abdo AT-EC are shown). F- Transcripts of interest were measured by qRT-PCR in paired native immune, progenitor (Prog) and endothelial (AT-EC) cells from human Abdo-AT and presented relative to housekeeping gene expression ($n = 4$ donors; Max, Median and Min are shown). $P < 0.05$ to paired AT-EC are shown.

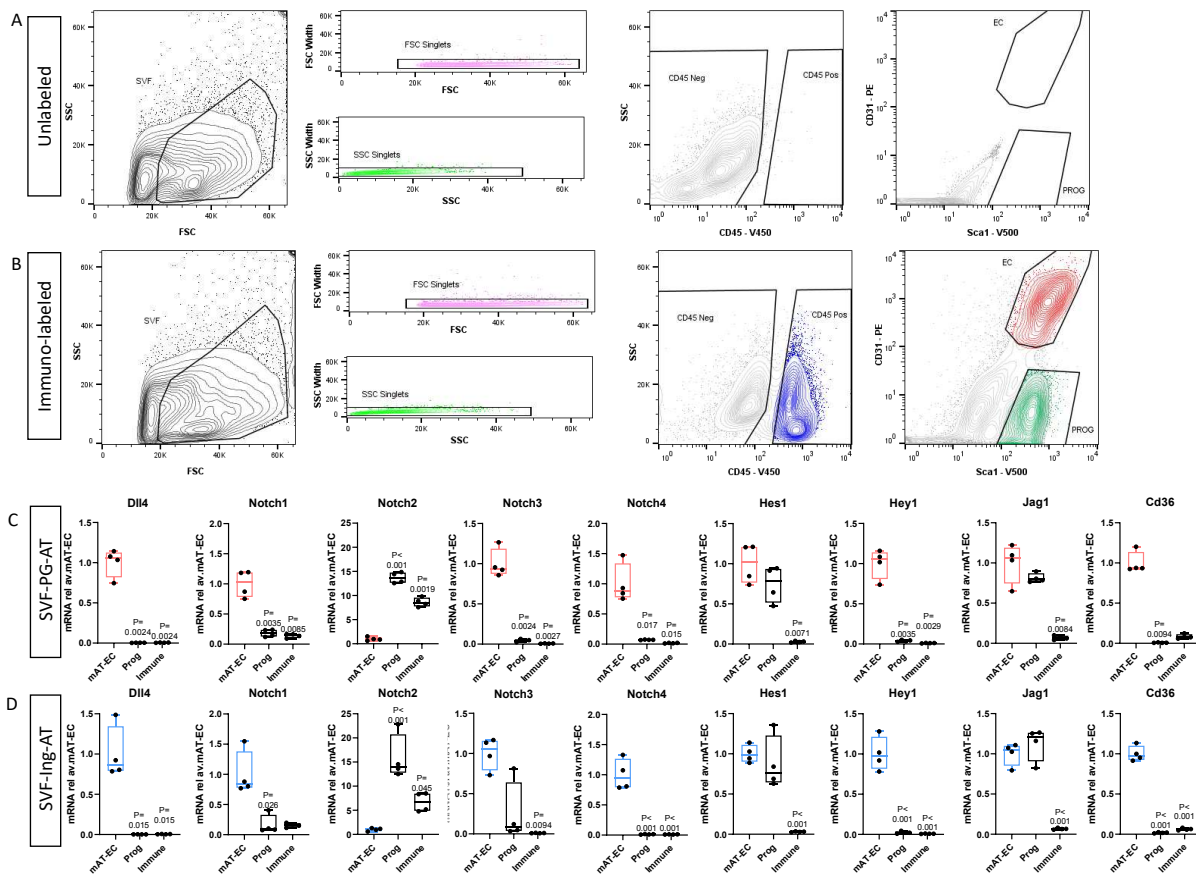


Figure S2 Related to Figure 1- Microvascular endothelial cells from mouse adipose tissues

A-B- Sorting strategy of native mouse AT-EC. EC (red; CD31+/SCA1+) were selected into the CD45-negative population. SVF: stroma-vascular fraction; SSC: Side Scatter; FSC: Forward Scatter. C-D- Transcript of interest were measured by qRT-PCR in paired native immune, progenitor (Prog) and endothelial (mAT-EC) cells from mouse PG-AT and Ing-AT and presented relative to mean expression in mEC-AT. n=4; Max, Median and Min are shown; P<0.05 to paired mAT-EC are shown.

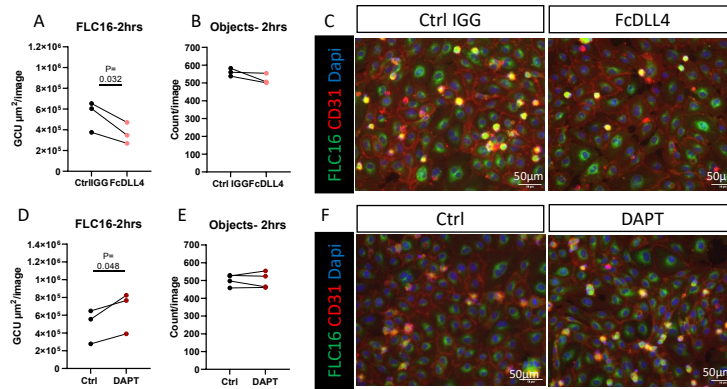


Figure S3 related to Figure 2- DII4/Notch blunts LCFA accumulation in human primary AT-EC

Primary hAT-EC were cultured in the presence of (A-C) control IGG (Ctrl IGG) or immobilized DLL4 (FcDLL4) or (D-F) γ -secretase inhibitor (DAPT, 25 μM) or vehicle control (DMSO) for 24 hours and then incubated with BODIPYTM FL C16 (FLC16, 750nM) for 2 hours. (A, D) Integrated green fluorescence per image (GCU $\mu\text{m}^2/\text{image}$) and (B, E) number of objects (cells) measured per area using Incucyte[®] at 2 hours are shown. $n=3$ donors, 2 wells/donor, 4 images/well. $P<0.05$ to paired control donor are shown. (C, F) Immunodetection of CD31 (red) over FLC16 (green) and Dapi (blue; nuclei) at 2 hours. $n=3$ donors. Scale bars= 50 μm .

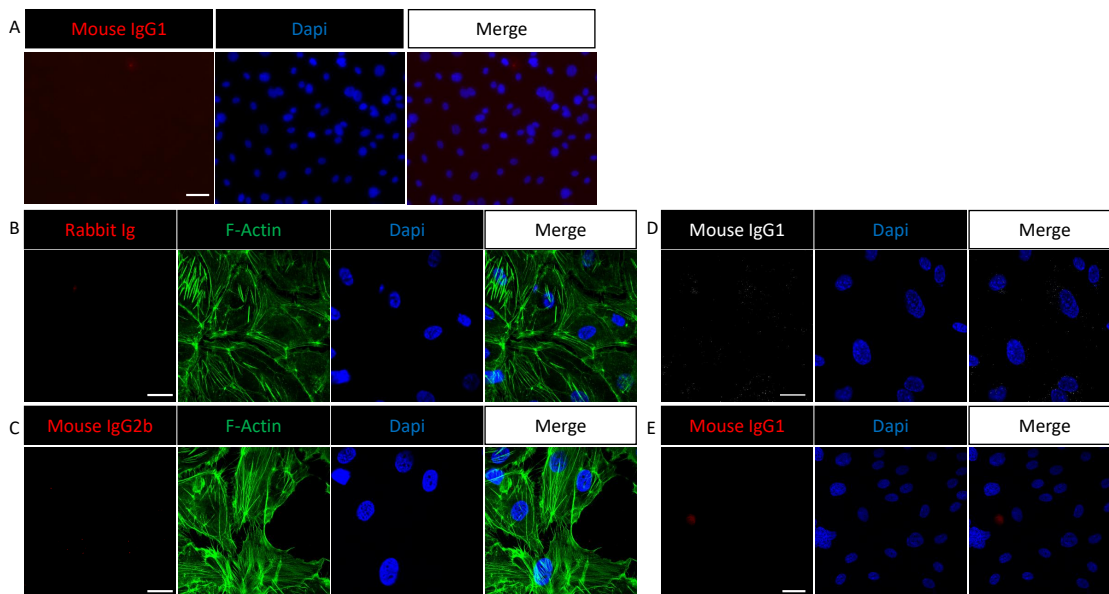


Figure S4 related to Figure 2 and Figure 3- Control immunoglobulins.

Primary hAT-EC were fixed and incubated with control immunoglobulins and appropriated secondary antibodies, in the presence or not of Phalloidin-AF488 (B-C, F-ACTIN, green), before imaging by fluorescence (A) or fluorescent confocal (B-E) microscopy. Mouse IgG1 isotype control (A, D : 2 μ g/mL; E: 10 μ g/mL). Rabbit normal Ig (B: 1 μ g/mL). Mouse IgG2b isotype control (C: 10 μ g/mL). Scale bars= 50 μ m (A), 20 μ m (B-D), 25 μ m (E). Dapi (Blue): nuclei.

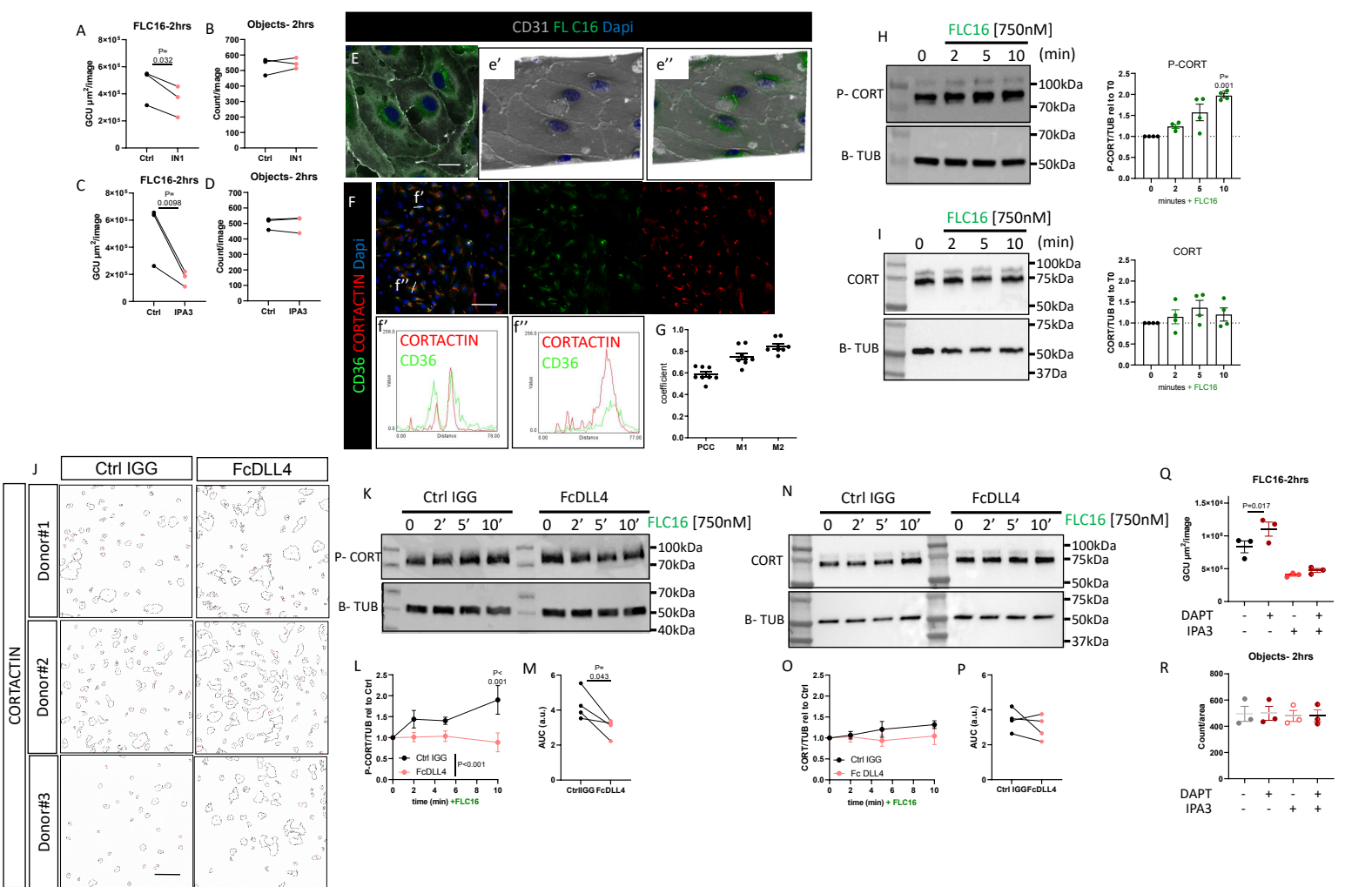


Figure S5 related to Figure 3- DLL4 antagonizes the rapid adaptation of human AT-EC associated with long chain fatty acids uptake
A-D- Primary hAT-EC were pretreated with vehicle control, IN1(1 μM) or IPA3 (10 μM) and then incubated with BODIPY™ FL C16 (FLC16, 750nM) for 2 hours. (A, C) Integrated green fluorescence per image (GCU $\mu\text{m}^2/\text{image}$) and (B, D) number of objects (cells) measured per area using Incucyte® at 2 hours are shown. n= 3 donors, 2 wells/donor, 4 images/well. P<0.05 to paired control donor are shown. E- CD31 was immuno-detected in primary hAT-EC loaded with FLC16 (750nM) and imaged by confocal microscopy. (e'-e'') 3-D reconstruction using Zen Software (Zeiss). F-G- Immuno-detection of CORTACTIN (red, F) and CD36 (green, F) in primary hAT-EC. (f', f'') CORTACTIN/CD36 RGB profile in selected areas. CD36/CORTACTIN correlation and co-localization coefficients (G) were measured using ImageJ software (PCC: Pearson's Correlation Coefficient; M1, M2: Manders' Colocalization Coefficients in Channel 1 and 2) (n=3 donors, 2-4 fields/donor; Mean +/- SEM are shown). H-I- Phosphorylated (Y421; H) and total (I) CORTACTIN were measured by western blot in primary hAT-EC treated or not with FLC16 for 2, 5 and 10 min (750nM). β -TUBULIN (B-TUB) was used as loading control. Relative amount of P-CORTACTIN and CORTACTIN overtime to untreated cells is shown (n=4 donors; Mean +/- SEM are shown; P<0.05 relative to T0 are shown). J- Primary hAT-EC were cultured in the presence of immobilized Ctrl IGG or FcDLL4 for 24 hours and then treated with FLC16 (750nM) for 2 hours. Mask of CORTACTIN positive areas generated using ImageJ software are shown (n=3 donors). K-P- Phosphorylated (Y421; K-M) and total (N-P) CORTACTIN were measured by western blot in primary hAT-EC cultured in the presence of Ctrl IGG or FcDLL4 for 4 hours and then treated or not with FLC16 for 2, 5 or 10 min (750nM). β -TUBULIN (B-TUB) was used as loading control. (L, O) Relative amount of P-CORTACTIN and CORTACTIN overtime to untreated cells (Mean +/- SEM; P<0.05 between Ctrl IGG/FcDLL4 are shown); and Area under the curve (AUC; M, P) are shown (n=4 donors; P<0.05 between paired Ctrl IGG/FcDLL4 are shown). Q-R- Primary hAT-EC were pre-treated or not with DAPT (25 μM) for 24hrs then incubated with IPA3 (10 μM) or vehicle control prior incubation with FLC16 for 2 hours. (Q) Integrated green fluorescence per image (GCU $\mu\text{m}^2/\text{image}$) and (R) number of objects (cells) measured per area using Incucyte® at 2 hours are shown. n= 3 donors, 2 wells/donor, 4 images/well. P<0.05 relative to respective control cells (Ctrl/DAPT, IPA3/DAPT+IPA3) are shown. Scale bars= 20 μm (E), 80 μm (E), 40 μm (J). Dapi: nuclei.

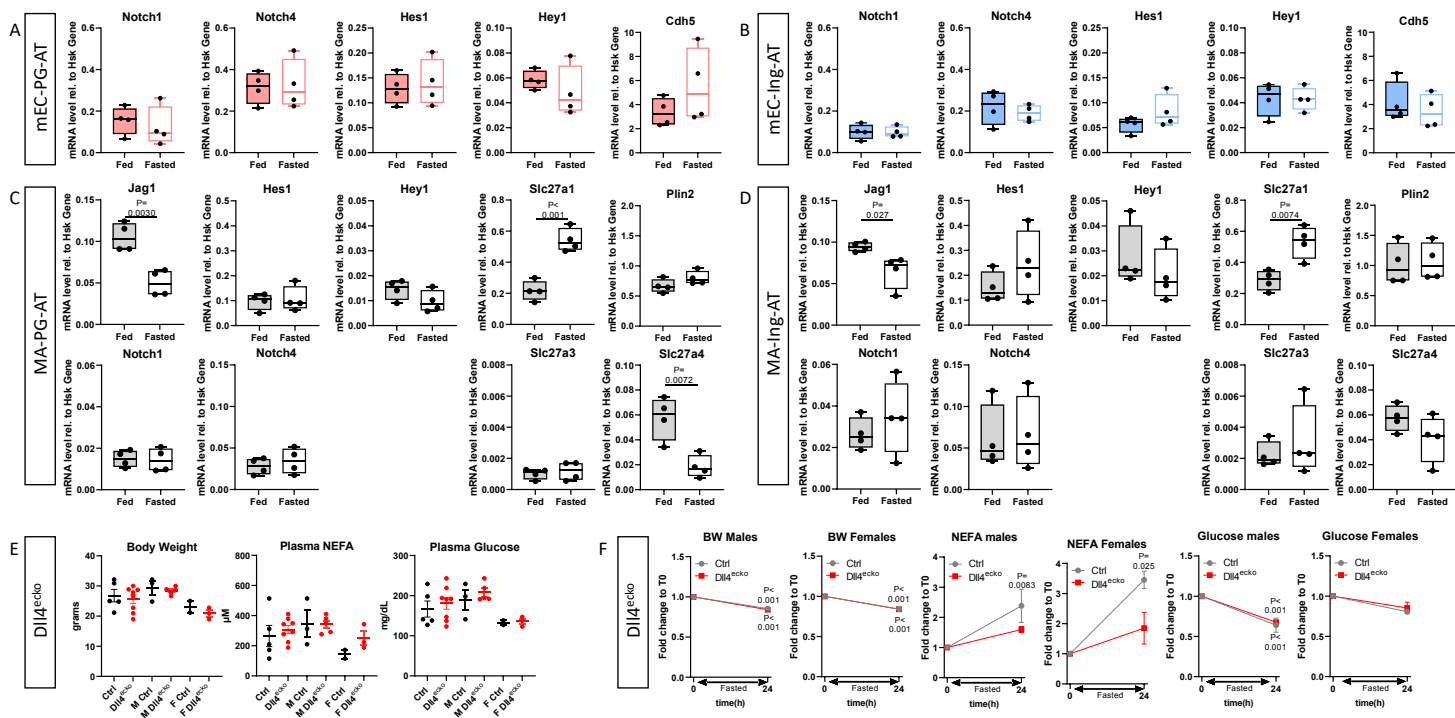


Figure S6 related to Figure 5- Adaptation of mAT-EC and adipocytes to fasting in vivo and contribution of endothelial Dll4 in systemic FA fluxes regulation

A-D- Transcripts of interest (expression relative to Rpl4 housekeeping gene) were measured by qRT-PCR in native EC-AT (A-B) or mature adipocytes (MA; C-D) isolated from PG-AT and Ing-AT of mice fed ad libitum or fasted for 24 hours (n=4). Max, Median and Min are shown; P<0.05 between Fed and Fasted are shown. E-F- Littermate control mice and mice with an inducible deletion of endothelial Dll4 (Dll4^{ecko}). (E) Body weight, plasma non-esterified fatty acids (NEFA) and glucose level from males (M) and females (F) in basal conditions (Fed) are shown. (F) Modulation of plasma NEFA, glucose and body weight in response to fasting was measured relative to fed (T0) condition in Males and Females. P<0.05 relative to T0Fed for each genotype (n=2-5 per genotype) are shown.

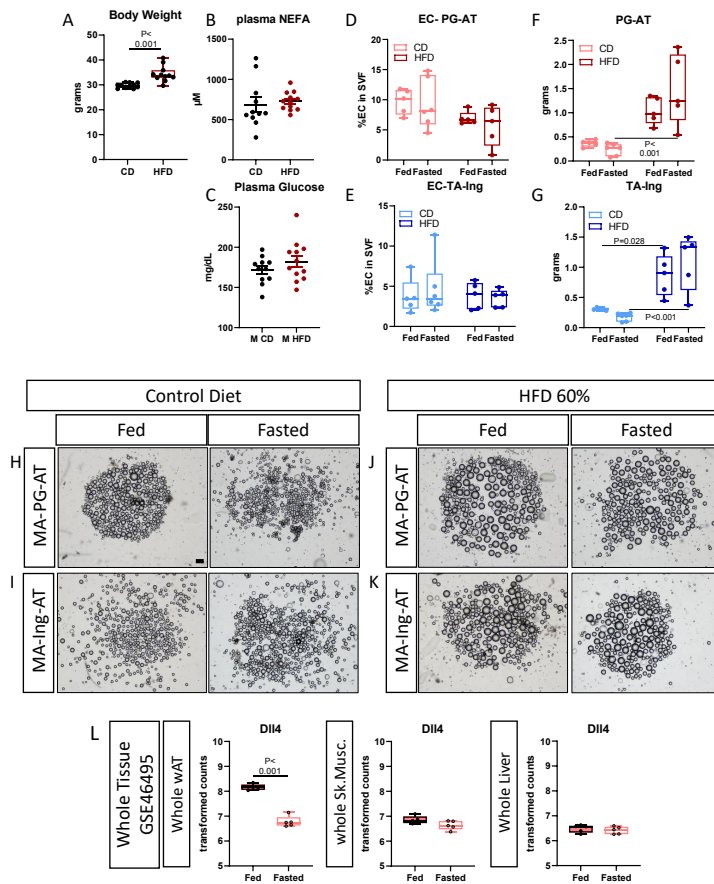


Figure S7 related to Figure 6- Adipose depots adaptation to fasting in obesogenic condition.

A-C- Mice were fed a control (CD) or High fat diet (HFD, 60% kcal from fat) for 4 weeks. Body weight (A), plasma NEFA (B) and glucose (C) were measure in basal (Fed) conditions after 4 weeks of diet ($n=11-12/\text{diet}$, $P < 0.05$ between diet are shown). D-K- PG-AT and Ing-AT were studied in mice fed or fasted for 24 hours. (D-E) Proportion (%) of AT-EC in the SVF measured by flow cytometry. (F-G) Adipose tissues weight. $n=5-6$, $P < 0.05$ across diet are shown. (H-K) Representative Photographs of adipocytes suspension from whole PG-AT and Ing-AT. Scale bar: $100\mu\text{m}$. L- Retrospective analysis of RNAseq dataset GSE46495 from whole white adipose tissue (wAT), skeletal muscle (Sk. Musc.) and liver of mice fed ad libitum or fasted for 24 hours. Transformed counts for DII4 are shown. $n=5$; Max, Median and Min are shown; $P < 0.05$ Fed/Fasted are shown.

Major Resources Table

In order to allow validation and replication of experiments, all essential research materials listed in the Methods should be included in the Major Resources Table below. Authors are encouraged to use public repositories for protocols, data, code, and other materials and provide persistent identifiers and/or links to repositories when available. Authors may add or delete rows as needed.

Animals (in vivo studies)

Species	Vendor or Source	Background Strain	Sex	Persistent ID / URL
Mus musculus	Charles River	C57BL/6J	M/F	https://www.criver.com/products-services/find-model/jax-c57bl6j-mice?region=29

Genetically Modified Animals

	Species	Vendor or Source	Background Strain	Other Information	Persistent ID / URL
Parent - 1	Mus musculus	The Jackson Laboratory	C57BL/6J	Dll4 flox/flox	http://www.informatics.jax.org/allele/MGI:3828266
Parent - 2	Mus musculus	The Jackson Laboratory	C57BL/6J	Cdh5-CRE ^{ERT2}	N/A

Antibodies

Target Antigen	Vendor or Source	Catalog #	Working concentration	Lot # (preferred but not required)	Persistent ID / URL
human CD31	DakoCytomation	M0823	2.05mg/L	20008748	https://www.agilent.com/store/productDetail.jsp?catalogId=GA61061-2
mouse CD31-PE	BioLegend	102404	5ug/mL	B159072	https://www.biolegend.com/en-us/products/biotin-anti-mouse-cd31-antibody-119
mouse CD31-APC	BD Horizon	561814	4ug/mL	6072069	https://www.bdbiosciences.com/en-us/products/reagents/flow-cytometry-reagents/research-reagents/single-color-antibodies-ruo/apc-rat-anti-mouse-cd31.561814
Mouse CD36-PE	BioLegend	102606	2ug/mL	B250588	https://production-dynamicweb.biolegend.com/fr-fr/products/pe-anti-mouse-cd36-antibody-2675
human CD31-V450	BD Horizon	561653	10ug/mL	2032948	https://www.bdbiosciences.com/en-fr/products/reagents/flow-cytometry-reagents/research-reagents/single-color-antibodies-ruo/v450-mouse-anti-human-cd31.561653
human CD34-PerCP	BD Biosciences	345803	2.5ug/mL	1314029	https://www.bdbiosciences.com/en-fr/search-results?searchKey=345803
human CD36	Sigma	HPA002018	1ug/mL	B105954	https://www.sigmaaldrich.com/FR/fr/product/sigma/hpa002018
human CD36-APC-Cy7	BioLegend	336215	2ug/mL	B155941	https://www.biolegend.com/en-us/products/purified-anti-human-cd36-maxpar-ready-antibody-10111

human CD45-B510	BioLegend	304036	5ug/mL	B360608	https://www.biolegend.com/en-us/products/brilliant-violet-510-anti-human-cd45-antibody-8006
mouse CD45-V450	BD Biosciences	560501	2ug/mL	2100552	https://www.bdbiosciences.com/en-fr/products/reagents/flow-cytometry-reagents/research-reagents/single-color-antibodies-ruo/v450-rat-anti-mouse-cd45.560501
human CORTACTIN	Millipore	05-180	10ug/mL	3153615	https://www.merckmillipore.com/FR/fr/product/Anti-Cortactin-p80-85-Antibody-clone-4F11,MM_NF-05-180-l-25UL
human DLL4	Cell Signaling	96406	51ng/mL	1	https://www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/dll4-d7n3h-rabbit-mab/96406?site-search-type=Products&N=4294956287&Ntt=d7n3h&fromPage=plp&requestid=2527159
human FATP1	Bio-Techne	MAB3304	10ug/mL	WSS0110101	https://www.bio-techne.com/p/antibodies/human-fatp1-antibody-308420_mab3304
human FATP1-Phycoerythrin	R&D Systems	IC3304P	N/A	AAMB0218031	https://www.rndsystems.com/search?keywords=FATP1++Phycoerythrin
human FATP4	Bio-Techne	MAB3650	10ug/mL	XWT016081	https://www.bio-techne.com/p/antibodies/human-fatp4-antibody-342142_mab3650
human FATP4-Allophycocyanin	R&D Systems	FAB3650A	N/A	AANS0115121	https://www.rndsystems.com/products/human-fatp4-apc-conjugated-antibody-342142_fab3650a
human JAGGED-1	Cell Signaling	70109	50ng/mL	1	https://www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/jagged1-d4y1r-xp-rabbit-mab/70109?site-search-type=Products&N=4294956287&Ntt=jagged-1&fromPage=plp
mouse LY-6A/E-V500 (SCA1)	BD Horizon	561228	2ug/mL	1165972	https://www.bdbiosciences.com/en-fr/products/reagents/flow-cytometry-reagents/research-reagents/single-color-antibodies-ruo/v500-rat-anti-mouse-ly-6a-e.561228
human Phospho-Cortactin (Y421)	Cell Signaling	4569	N/A	2	https://www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/phospho-cortactin-tyr421-antibody/4569
human Cortactin	Cell Signaling	3502	N/A	1	https://www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/cortactin-antibody/3502
human β -ACTIN	Cell Signaling	3700	N/A	17	https://www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/b-actin-8h10d10-mouse-mab/3700?site-search-type=Products&N=4294956287&Ntt=8h10d10&fromPage=plp
human β -TUBULIN	Cell Signaling	86298	N/A	3	https://www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/b-tubulin-d3u1w-mouse-mab/86298?site-search-type=Products&N=4294956287&Ntt=d3u1w&fromPage=plp&requestid=2527529
Mouse IgG AF546	Life Technologies	A10036	10ug/mL	1736962	https://www.thermofisher.com/antibody/product/Donkey-anti-Mouse-IgG-H-L-Highly-Cross-Adsorbed-Secondary-Antibody-Polyclonal/A10036

Anti-Rabbit IgG AF488	Life Technologies	A21206	10ug/mL	1674651	https://www.thermofisher.com/antibody/product/Donkey-anti-Rabbit-IgG-H-L-Highly-Cross-Adsorbed-Secondary-Antibody-Polyclonal/A-21206
Phospho-p70 -S6 Kinase	Cell Signaling	9205	8ng/mL	26	https://www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/phospho-p70-s6-kinase-thr389-antibody/9205
S6 Kinase	Cell Signaling	9202	30ng/mL	21	https://www.cellsignal.com/product/productDetail.jsp?productId=9202
Negative Control Rabbit Immunoglobulin	DAKO	X0936	1ug/mL	00051308	https://www.agilent.com/en/product/specific-proteins/normal-animal-sera-immunoglobulins/rabbit-immunoglobulin-fraction-(solid-phase-absorbed)-77063
Negative Control Mouse IgG1	DAKO	X0931	10ug/mL	00060474	https://www.agilent.com/store/fr_FR/Product-X093101-2/X093101-2
Mouse (E7Q5L) IgG2b Isotype Control	Cell Signalling	53484	10ug/mL	3	https://www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/mouse-e7q5l-mab-igg2b-isotype-control/53484
Anti-Mouse AF647	Life Technologies	A31571	10ug/mL	1900251	https://www.thermofisher.com/antibody/product/Donkey-anti-Mouse-IgG-H-L-Highly-Cross-Adsorbed-Secondary-Antibody-Polyclonal/A-31571

DNA/cDNA Clones: N/A

Clone Name	Sequence	Source / Repository	Persistent ID / URL
------------	----------	---------------------	---------------------

Cultured Cells:

Name	Vendor or Source	Sex (F, M, or unknown)	Persistent ID / URL
Primary Human EC-AT	Isolated in the lab	F, M	N/A

Data & Code Availability

Description	Source / Repository	Persistent ID / URL
GSE46495 from Schupp et al	NCBI, Gene Expression Omnibus	10.1186/1471-2164-14-758

Other

Description	Source / Repository	Persistent ID / URL
DAPT	D5942 / Sigma	https://www.sigmaaldrich.com/FR/fr/product/sigma/d5942
Type II Collagenase	C6885/ Sigma	https://www.sigmaaldrich.com/FR/fr/product/sigma/c6885
DISPASE II	17105041 / Gibco	https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/fr/fr/17105041
Wortmannin	W3144 / Sigma	https://www.sigmaaldrich.com/FR/fr/product/sigma/w3144
IPA-3	14759 / CAYMAN chemical	https://www.caymanchem.com/product/14759/ipa-3
Vps34-IN1	17392 / CAYMAN chemical	https://www.caymanchem.com/product/17392/vps34-in1

DOI [to be added]

A769662	A3963 / APEX BIO	https://gentaur.com/ape/a-769662-10mg-01010667819
Rapamycin	PHZ1235 ThermoFisher Scientific	https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/PHZ1235
PP2	13198 / CAYMAN chemical	https://www.caymanchem.com/product/13198/pp2
Fibronectin	FC010 / Sigma- Aldrich	https://www.merckmillipore.com/FR/fr/product/Human-Plasma-Fibronectin-Purified-Protein,MM_NF-FC010
BODIPY™ FL C16	D3821 ThermoFisher Scientific	https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/D3821?SID=srch-srp-D3821
Phalloidin AF 488	A12379 / Invitrogen	https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/fr/fr/A12379
BSA FFA free	A7030 /Sigma- Aldrich	https://www.sigmaaldrich.com/FR/fr/product/sigma/a7030
HBSS	H8264 /Sigma- Aldrich	https://www.sigmaaldrich.com/FR/fr/product/sigma/h8264
ECGM MV	C-22020 /Promocell	https://promocell.com/product/endothelial-cell-growth-medium-mv/
ECBM	C-22210 /Promocell	https://promocell.com/product/endothelial-cell-growth-medium/
Human chimeric Fc-DLL4	A42511 /Invitrogen	https://www.thermofisher.com/antibody/product/Human-DLL4-Fc-Chimera-Recombinant-Protein/A42511
Human chimeric Fc-IgG	A42561 /Invitrogen	https://www.thermofisher.com/antibody/product/Human-IgG1-Fc-Recombinant-Protein/A42561
TaqMan Probe/Primer ACTB (Human)	ThermoFisher Scientific	Hs01060665_g1
TaqMan Probe/Primer CD36 (Human)	ThermoFisher Scientific	Hs00169627-m1
TaqMan Probe/Primer CDH5 (Human)	ThermoFisher Scientific	Hs00174344-m1
TaqMan Probe/Primer DLL4 (Human)	ThermoFisher Scientific	Hs00184092-m1
TaqMan Probe/Primer FABP4 (Human)	ThermoFisher Scientific	Hs01086177-m1
TaqMan Probe/Primer GPIHBP1 (Human)	ThermoFisher Scientific	Hs01564843-m1
TaqMan Probe/Primer HES1 (Human)	ThermoFisher Scientific	Hs00172878-m1
TaqMan Probe/Primer HEY1 (Human)	ThermoFisher Scientific	Hs00232618-m1
TaqMan Probe/Primer JAG1 (Human)	ThermoFisher Scientific	Hs01070027-m1
TaqMan Probe/Primer LIPG (Human)	ThermoFisher Scientific	Hs00195812-m1
TaqMan Probe/Primer NOTCH1 (Human)	ThermoFisher Scientific	Hs00413187-m1
TaqMan Probe/Primer NOTCH2 (Human)	ThermoFisher Scientific	Hs01050702-m1
TaqMan Probe/Primer NOTCH3 (Human)	ThermoFisher Scientific	Hs01128537-m1
TaqMan Probe/Primer NOTCH4 (Human)	ThermoFisher Scientific	Hs00270200-m1
TaqMan Probe/Primer PECAM1 (Human)	ThermoFisher Scientific	Hs00169777-m1
TaqMan Probe/Primer PPARG (Human)	ThermoFisher Scientific	Hs00234592-m1

DOI [to be added]

TaqMan Probe/Primer PPIB (Human)	ThermoFisher Scientific	Hs00168719-m1
TaqMan Probe/Primer SLC27A1 (Human)	ThermoFisher Scientific	Hs01587917-m1
TaqMan Probe/Primer SLC27A3 (Human)	ThermoFisher Scientific	Hs00950760-g1
TaqMan Probe/Primer SLC27A4 (Human)	ThermoFisher Scientific	Hs00192700-m1
TaqMan Probe/Primer Cd36 (mouse)	ThermoFisher Scientific	Mm00432403-m1
TaqMan Probe/Primer Dll4 (mouse)	ThermoFisher Scientific	Mm00444619-m1
TaqMan Probe/Primer Gpihbp1 (mouse)	ThermoFisher Scientific	Mm01205849-g1
TaqMan Probe/Primer Hes1 (mouse)	ThermoFisher Scientific	Mm01342805-m1
TaqMan Probe/Primer Hey1 (mouse)	ThermoFisher Scientific	Mm00468895-m1
TaqMan Probe/Primer Jag1 (mouse)	ThermoFisher Scientific	Mm00496902-m1
TaqMan Probe/Primer Lpl (mouse)	ThermoFisher Scientific	Mm00434764-m1
TaqMan Probe/Primer Notch1 (mouse)	ThermoFisher Scientific	Mm00627185-m1
TaqMan Probe/Primer Notch4 (mouse)	ThermoFisher Scientific	Mm01135002-m1
TaqMan Probe/Primer Pparg (mouse)	ThermoFisher Scientific	Mm01184322-m1
TaqMan Probe/Primer Rpl4 (mouse)	ThermoFisher Scientific	Mm011713553-g1
TaqMan Probe/Primer Slc27a1 (mouse)	ThermoFisher Scientific	Mm00449511-m1
TaqMan Probe/Primer Slc27a3 (mouse)	ThermoFisher Scientific	Mm01220017-m1
TaqMan Probe/Primer Slc27a4 (mouse)	ThermoFisher Scientific	Mm01327405-m1
TaqMan Probe/Primer Plin2 (mouse)	ThermoFisher Scientific	Mm00475794_m1
TaqMan Probe/Primer Cdh5 (mouse)	ThermoFisher Scientific	Mm00486938-m1

The ARRIVE Essential 10

These items are the basic minimum to include in a manuscript. Without this information, readers and reviewers cannot assess the reliability of the findings.

Item	Recommendation	Section/line number, or reason for not reporting
Study design	1 For each experiment, provide brief details of study design including: <ol style="list-style-type: none"> The groups being compared, including control groups. If no control group has been used, the rationale should be stated. The experimental unit (e.g. a single animal, litter, or cage of animals). 	Methods, L190
		Methods, L190
Sample size	2 a. Specify the exact number of experimental units allocated to each group, and the total number in each experiment. Also indicate the total number of animals used.	Methods, L190
	b. Explain how the sample size was decided. Provide details of any <i>a priori</i> sample size calculation, if done.	Not Done
Inclusion and exclusion criteria	3 a. Describe any criteria used for including and excluding animals (or experimental units) during the experiment, and data points during the analysis. Specify if these criteria were established <i>a priori</i> . If no criteria were set, state this explicitly.	Not Done
	b. For each experimental group, report any animals, experimental units or data points not included in the analysis and explain why. If there were no exclusions, state so.	Not Done
	c. For each analysis, report the exact value of <i>n</i> in each experimental group.	Methods, L190
Randomisation	4 a. State whether randomisation was used to allocate experimental units to control and treatment groups. If done, provide the method used to generate the randomisation sequence.	Methods, L190
	b. Describe the strategy used to minimise potential confounders such as the order of treatments and measurements, or animal/cage location. If confounders were not controlled, state this explicitly.	Methods, L190
Blinding	5 Describe who was aware of the group allocation at the different stages of the experiment (during the allocation, the conduct of the experiment, the outcome assessment, and the data analysis).	Not Done
Outcome measures	6 a. Clearly define all outcome measures assessed (e.g. cell death, molecular markers, or behavioural changes).	Not Done
	b. For hypothesis-testing studies, specify the primary outcome measure, i.e. the outcome measure that was used to determine the sample size.	Not Done
Statistical methods	7 a. Provide details of the statistical methods used for each analysis, including software used.	Methods, L219
	b. Describe any methods used to assess whether the data met the assumptions of the statistical approach, and what was done if the assumptions were not met.	Methods, L219
Experimental animals	8 a. Provide species-appropriate details of the animals used, including species, strain and substrain, sex, age or developmental stage, and, if relevant, weight.	Methods, L219
	b. Provide further relevant information on the provenance of animals, health/immune status, genetic modification status, genotype, and any previous procedures.	Methods, L219
Experimental procedures	9 For each experimental group, including controls, describe the procedures in enough detail to allow others to replicate them, including:	Methods, L190
	a. What was done, how it was done and what was used.	Methods, L190
	b. When and how often.	Not Done
	c. Where (including detail of any acclimatisation periods).	Not Done
	d. Why (provide rationale for procedures).	Not Done
Results	10 For each experiment conducted, including independent replications, report:	Methods, L190
	a. Summary/descriptive statistics for each experimental group, with a measure of variability where applicable (e.g. mean and SD, or median and range).	Not Done
	b. If applicable, the effect size with a confidence interval.	Not Done

Discussion et Perspectives

La distribution des dépôts adipeux est un facteur déterminant pour la santé. Alors que l'accumulation de tissu adipeux dans les parties hautes du corps (sous-cutané abdominal, viscéral) est un facteur de risque dans le développement des pathologies cardiovasculaires et métaboliques, l'accumulation dans le bas du corps (sous-cutané glutéo-fémoral) est protectrice. L'impact différentiel des dépôts adipeux sur la santé serait dû en partie à des différences de gestion des flux lipidiques lors des transitions énergétiques. Les acteurs cellulaires et moléculaires spécifiques des dépôts adipeux restent à être précisés. Les cellules endothéliales microvasculaires du tissu adipeux occupent une position centrale pour le transport bidirectionnel des acides gras en fonction de l'état nutritionnel (nourri versus à jeun).

Mes travaux de thèse ont porté sur l'identification des mécanismes par lesquels les cellules endothéliales détectent les transitions énergétiques et adaptent les flux d'acides en fonction du territoire adipeux.

- **Caractérisation de l'hétérogénéité des cellules endothéliales des dépôts adipeux humains et murins**

Nous avons comparé le transcriptome des cellules endothéliales natives isolées de biopsies appariées de tissus adipeux humain sous-cutané abdominal et glutéo-fémoral. Nous avons observé que l'endothélium vasculaire des tissus adipeux porte une signature transcriptionnelle spécifique du dépôt d'origine avec un enrichissement dans les voies dépendantes de PPARG et de NOTCH. En particulier, les cellules endothéliales du tissu adipeux abdominal expriment des niveaux supérieurs de transcrits codant des acteurs de la gestion des flux d'acides gras tels que *CD36* et *GPIHBP1* et de la voie NOTCH incluant *NOTCH4*, *DLL4* et *HES1* comparé à l'endothélium du tissu adipeux glutéo-fémoral. Ce profil transcriptionnel est retrouvé chez la souris en comparant les dépôts périgonadique (viscéral) et inguinal (sous-cutané). De façon intéressante, les voies dépendantes de PPAR γ sont enrichies dans les cellules endothéliales du tissu adipeux sous-cutané abdominal. En accord avec une activation plus marquée de cette voie, les gènes cibles impliqués dans la gestion et la prise en charge des lipoprotéines et des acides gras tel que *GPIHBP1* et *CD36* sont plus exprimés dans les cellules endothéliales des tissus adipeux abdominaux par rapport à celle des tissus glutéofémoraux. Il est à noter que les individus porteurs d'une mutation dominante négative de *PPARG*, dont l'activité transcriptionnelle est altérée, présentent une lipodystrophie partielle au niveau des tissus adipeux glutéo-fémoraux⁴¹⁴. A l'inverse, les patients traités pour leur diabète de type 2 avec des agonistes de PPAR γ , présentent un développement de l'adiposité dans les parties basses du corps⁴¹⁵. Ces données impliquent les voies

dépendantes de PPAR γ dans la répartition des dépôts adipeux. Ces voies étant clés dans le contrôle de l'adipogénèse, on peut émettre l'hypothèse d'une réponse et/ou d'un équipement différentiel des cellules progénitrices mais également comme nos résultats le suggèrent des cellules endothéliales des dépôts adipeux à un stimuli PPAR γ -dépendant. En accord, les loci liés au WHR ajusté au BMI montrent des origines cellulaires prépondérantes dans les cellules progénitrices et les vaisseaux sanguins ⁴¹⁶. Les données précédentes de l'équipe ayant montré le rôle majeur de PPAR γ dans la gestion active des flux d'acides gras par les cellules endothéliales de tissu adipeux abdominal ²⁷⁵, il est tentant de spéculer que la fonction métabolique des cellules endothéliales de transport des lipides PPAR γ -dépendante pourrait être un mécanisme cellulaire déterminant la distribution des masses grasses.

En parallèle, nous avons montré qu'il existait un enrichissement des acteurs de la voie de signalisation NOTCH dépôt adipeux abdominal spécifique. Des associations entre la voie de signalisation NOTCH et la gestion des flux d'acides gras ont été décrites dans d'autres localisations vasculaires. Au niveau aortique, la présence de lipides oxydés diminue les niveaux de NOTCH1 et de ces cibles ⁴⁰⁴. Au niveau cardiaque, l'inhibition de la voie Notch endothéliale s'accompagne d'une altération du transport des acides gras ⁴¹⁷. Enfin, des travaux *in vitro* dans le modèle des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine montrent un impact transcriptionnel de la stimulation de la voie NOTCH via DLL4 sur l'expression de FABP4 ⁴¹⁸. Il semble donc que les cellules endothéliales des dépôts adipeux sous cutanés abdominaux (et viscéraux chez la souris) aient un équipement moléculaire en faveur d'une prise en charge contrôlée et réactive des flux d'acides gras comparés aux tissus adipeux glutéo-fémoraux (et inguinaux chez la souris) qui paraissent quant à elles plus passives. Ces données sont concordantes avec les observations de la littérature qui met en exergue une capacité « active » des tissus adipeux centraux impliquée dans la réponse à un besoin énergétique élevé et rapide via une capacité « passive » des tissus adipeux dans les parties basses du corps impliquée dans la réponse à un besoin énergétique soutenu dans le temps⁴¹⁹.

En perspective de cette partie, on peut se poser la question de l'origine de ce transcriptome endothélial tissu adipeux-spécifique.

La répartition des masses grasses étant sexuellement dimorphique, il serait intéressant dans des études futures de considérer un impact potentiel des chromosomes sexuels et des hormones sexuelles dans le transcriptome différentiel des cellules endothéliales. En effet, les femmes, avant la ménopause, présentent un profil d'adiposité gynoïde associé avec la protection cardiométabolique. Après la ménopause, des modifications de la répartition adipeuse vers un phénotype androïde sont observées avec la flambée du risque cardio vasculaire dans cette population ⁴²⁰. Ces données sont appuyées par le phénotype des patientes présentant une mutation inactivatrice de la production d'œstrogène (par

l'aromatase) qui présentent une obésité viscérale et des pathologies métaboliques associées⁴²¹. Ainsi, il conviendrait de statuer sur l'impact potentiel tissu adipeux-dépendant des stéroïdes sexuels sur l'endothélium vasculaire. Des traitements avec des stéroïdes sexuels pourraient être envisagés ou des études comparatives entre les cellules endothéliales issues de femmes et d'hommes (ou chez la souris de mâles et de femelles). En ce sens, l'analyse large échelle en cellule unique montre en effet des différences sexuelles dans le transcriptome des cellules des dépôts adipeux⁴²².

De plus, ces travaux et d'autres mettent en exergue la disparité des populations endothéliales entre les tissus mais aussi au sein d'un même tissu^{9,10,423}. Il serait donc intéressant d'une part de caractériser l'arbre vasculaire dans les différents dépôts adipeux (proportion de cellules endothéliales macro/microvasculaires du système artériel, veineux et capillaire) mais également les sous-populations révélées par les analyses en cellules uniques par des approches similaires sur les dépôts adipeux humains sous-cutanés abdominaux et glutéofémoraux. Des études ont pu montrer un recrutement sélectif de capillaires dans certaines régions cérébrales en réponse à une activité neuronale⁴²⁴. Cette « hyperémie » capillaire- apport plus important en sang) via un couplage neuro-vasculaire permet de garantir les apports suffisants en nutriments et oxygène aux régions cérébrales actives. Dans le tissu adipeux, les mécanismes qui régissent le recrutement de certains capillaires et donc les flux de nutriments pendant les transitions énergétiques ne sont pas connus et mériteraient une investigation détaillée par exemple avec des approches d'imagerie in vivo.

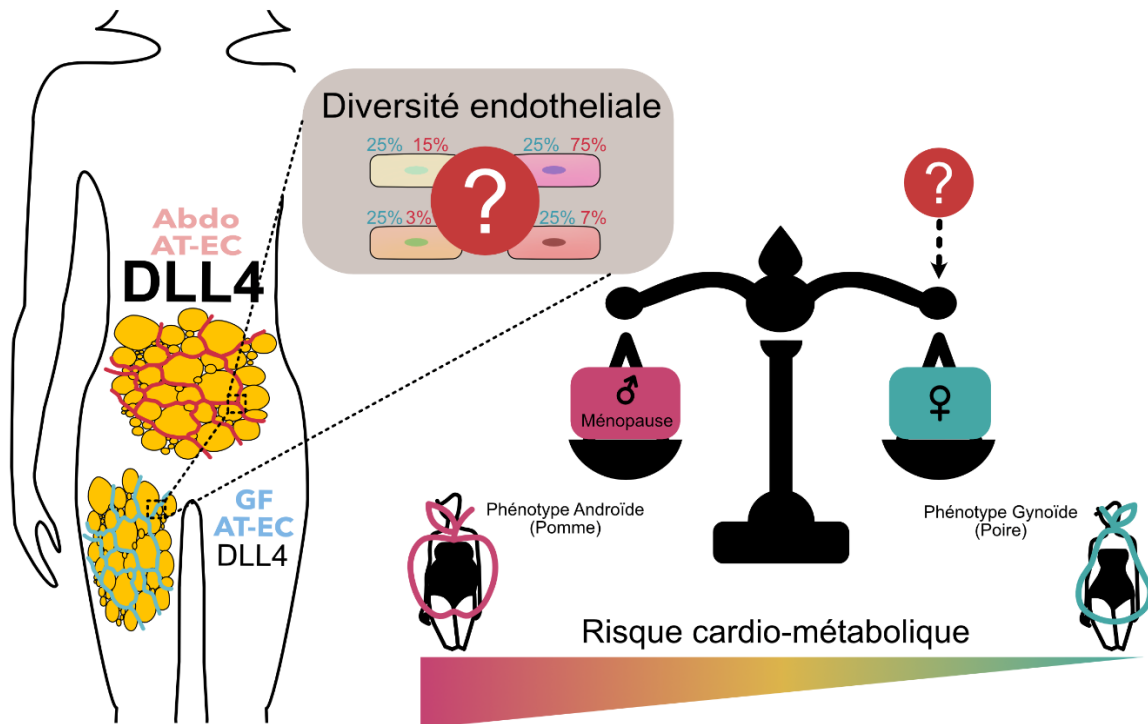


Figure 25 : Caractérisation de l'hétérogénéité des cellules endothéliales des dépôts adipeux humains et murins

D'après ⁴²⁵

- **Adaptation des cellules endothéliales des tissus adipeux aux transitions énergétiques**

Combinant des approches *in vitro* sur des cellules endothéliales primaires humaines isolées de tissu adipeux sous-cutané abdominal et des études *in vivo* chez le rongeur, nous avons établi un lien fonctionnel entre la gestion des flux d'acides gras et le ligand de Notch, DLL4 (Delta Like canonical Notch Ligand 4). Nos travaux réalisés sur des cellules endothéliales natives isolées de dépôt adipeux centraux (abdominal et viscéral) et fémoraux (glutéo-fémoral et inguinal) humains et murins ont permis de mettre en évidence une adaptation rapide et spécifique aux transitions d'état énergétique du ligand de la voie NOTCH, DLL4. Le recours à des agents pharmacologiques permettant de retranscrire au niveau cellulaire les stimuli semblables à une situation de jeûne via l'activation ou l'inhibition des voies AMPK et mTOR, montre que les niveaux protéiques de DLL4 pourraient être intrinsèquement régulés par les niveaux d'énergie cellulaire. En accord, nous avons montré chez des souris mâles C57Bl6/J nourris *ad libitum* ou mises à jeun pendant 24 heures que l'expression endothéliale de *Dll4* est diminuée avec le jeûne de manière spécifique aux cellules endothéliales du tissu adipeux périgonadique. Il est par ailleurs important de noter que l'analyse rétrospective des données transcriptionnelles issues du Tabula Muris révèle un enrichissement de la voie de

signalisations mTOR dans les cellules endothéliales des dépôts adipeux comparé aux endothélium des autres lits vasculaires étudiés²⁷⁷. Cette observation est également en faveur d'une capacité particulière des cellules endothéliales des dépôts adipeux à s'adapter aux transitions énergétiques et de leur contribution dans le maintien de la flexibilité métabolique à l'échelle de l'organisme.

Il serait maintenant intéressant de préciser les mécanismes et les acteurs moléculaires impliqués dans la régulation de l'expression de DLL4 dans les cellules endothéliales au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. Des effets directs des métabolites énergétiques pourraient être envisagés. Au niveau aortique, les niveaux transcriptionnels d'un autre acteur de la voie NOTCH, NOTCH1 sont affectés par les lipides oxydés. Les phases de transition énergétique entraînant une modification significative à la fois qualitative et quantitative du « circulome » (métabolome, lipidome, protéome), ces métabolites pourraient impacter directement DLL4 endothélial. Des intermédiaires pourraient également jouer un rôle. La transcription de DLL4 a été décrite comme étant induite par le VEGF qui en interagissant avec son récepteur VEGFR2 va activer les facteurs de transcription Foxc1/c2⁴²⁶. De plus, l'expression de VEGF est contrôlée par les voies mTOR et AMPK⁴²⁷. Il serait donc intéressant d'étudier les variations potentielles du VEGF dans nos approches. La contribution des facteurs externes de type neuro-humoraux ou inflammatoire ne doit pas non plus être ignorée. En effet, l'expression de DLL4 dans les macrophages est augmentée via le facteur de transcription NF-kB⁴²⁸. Ces mécanismes pourraient contribuer à l'adaptation transcriptionnelle des niveaux de *DLL4* mais ne rendent probablement pas compte de la régulation rapide des niveaux protéiques de DLL4. Des régulations associées à la stabilité et au recyclage de DLL4 comme montrées dans d'autres types cellulaires, pourraient contribuer à l'adaptation rapide des cellules endothéliales aux transitions énergétiques^{429,430}. Enfin, une cinétique plus fine serait nécessaire afin de confirmer les effets dépôt adipeux-spécifiques. En effet, nos données sont issues d'un jeûne de 24 h chez la souris, temps que nous avons choisi car il est suffisant pour mettre en place la mobilisation des stocks lipidiques dans le tissu adipeux. Cependant, il conviendrait de préciser la spécificité tissulaire en étudiant des phases plus précoces et les autres lits vasculaires.

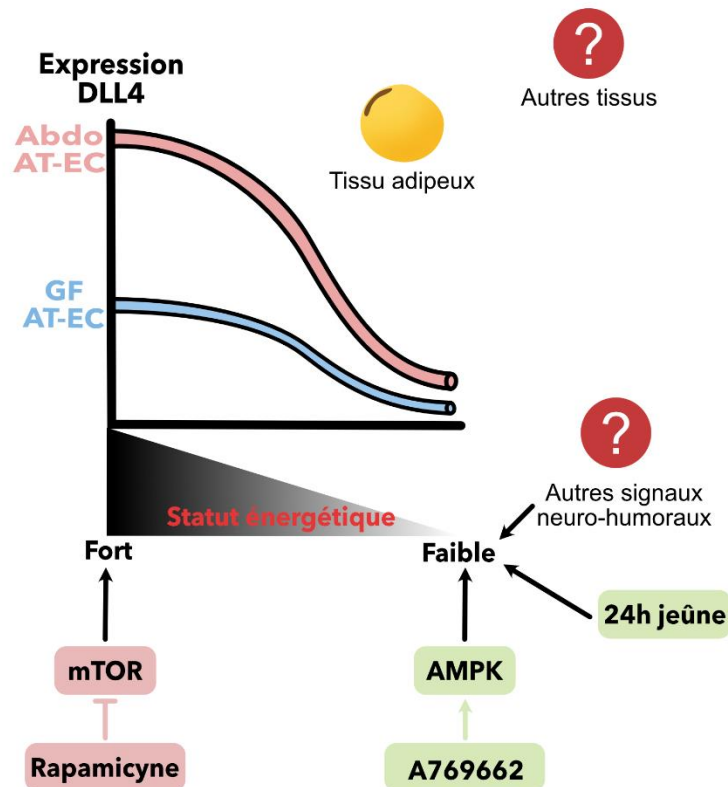


Figure 26 : Adaptation des cellules endothéliales des tissus adipeux aux transitions énergétiques

D'après ⁴²⁵

- **Mécanismes mis en jeu dans la gestion des flux de lipides**

Nos travaux montrent une régionalisation membranaire forte des acteurs du transport des acides gras CD36, FATP1 et FATP4. L'activation de la voie NOTCH par le ligand DLL4 est associée à une diminution des transcrits de CD36 et GPIHBP1. Ces gènes sont également des cibles de PPAR γ . Les niveaux d'ARNm de PPARG n'étant pas modulés dans ces mêmes conditions, il est tentant de spéculer que CD36 et GPIHBP1 pourraient être des cibles de la voie NOTCH via l'interaction directe du complexe NICD/RBPJ-k sur leur région promotrice ou par l'intermédiaire des inhibiteurs transcriptionnels cibles de NOTCH tel que HES1 et HEY1. Cependant il serait nécessaire de contrôler l'état d'activation de PPAR γ et/ou sa localisation nucléaire ainsi que de réaliser des cinétiques à des temps intermédiaires.

Par ailleurs, nos données sont en faveur d'une voie non canonique et non-transcriptionnelle résultant de l'activation de la voie NOTCH. En effet, nous observons des effets rapides tant sur la localisation membranaires des transporteurs d'acides gras, qu'au niveau de l'incorporation des acides gras fluorescents. Il serait bien sûr nécessaire de confirmer l'absence d'impact transcriptionnel et/ou traductionnel via des traitements pharmacologiques avec l'actinomycine D (inhibition de la transcription) ou la cycloheximide (inhibition de la traduction).

L'internalisation des transporteurs d'acides gras suggère la présence de mécanismes actifs d'endocytose. Dans ce sens, nous montrons *in vitro*, la présence de collerettes membranaires enrichies en cortactine semblables à des structures de macropinocytose, dont la fermeture est inhibée par DLL4. Les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu restent à être définis mais nos données suggèrent un lien entre DLL4 et la voie de signalisation PI3K-PAK1 impliquée dans la fermeture et l'internalisation des vésicules de macropinocytose. Des hypothèses peuvent toutefois être émises puisqu'il a été montré que le NICD interagit directement avec PAK1⁴³¹. Il est tentant de spéculer qu'en présence de DLL4, la voie NOTCH activée conduit au clivage du NICD, qui va séquestrer PAK1 et ainsi prévenir la fermeture des vésicules de macropinocytose.

L'ensemble de ces données suggèrent que le niveau endothélial de DLL4 définit en partie la dynamique membranaire impliquée dans la prise en charge des lipides. Chez la souris sauvage, la longueur des développements cytoplasmiques intraluminaux, semblables à des collerettes de macropinocytose, est modulée par l'état énergétique uniquement dans le tissu adipeux viscéral. Ces observations sont en accord avec nos données et celles de la littérature montrant que le tissu adipeux viscéral s'adapte de façon plus dynamique aux transitions énergétiques que le tissu adipeux inguinal⁴¹⁹. De plus, nos résultats impliquent les niveaux endothéliaux de DLL4 comme déterminant dans ces différences. Cette conclusion est renforcée par nos études préliminaires dans un modèle murin de délétion spécifique et inductible de DLL4 dans les cellules endothéliales montrant un défaut d'adaptation pendant les transitions énergétiques. Une étude plus approfondie de ces animaux et particulièrement de la redistribution des flux de lipides associée à la répartition des dépôts adipeux reste à être évaluée.

Il est à noter que nos données mettent l'accent sur DLL4 mais sans identifier le/les récepteurs mis en jeu. Les cellules endothéliales expriment les récepteurs NOTCH1 et NOTCH4. Nous avons au laboratoire les souris NOTCH1 hétérozygote dans les cellules endothéliales. Il serait intéressant de définir si la réduction de l'expression de NOTCH1 endothélial est associée avec des anomalies de réponses aux transitions énergétiques et à la gestion endothéliale des flux lipidique. Des approches d'édition du génome pourraient également *in vitro* permettre de mieux définir les acteurs moléculaires.

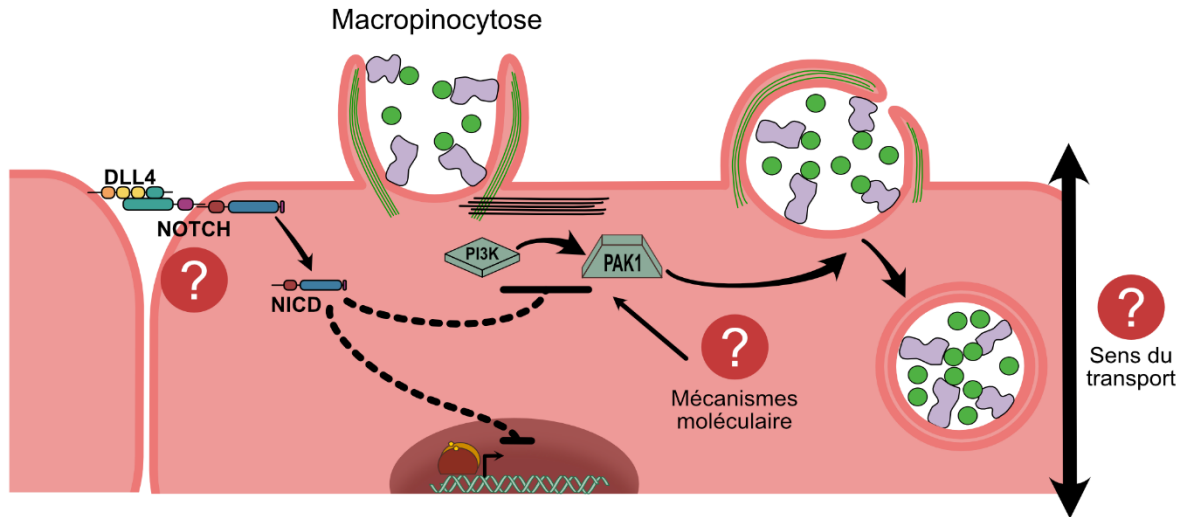


Figure 27 : Mécanismes mis en jeu dans la gestion des flux de lipides.

D'après ⁴²⁵

Il est toutefois important de prendre en considération les limites des approches *in vitro* avec l'immobilisation de DLL4. Ce modèle, probablement associé à une activation supra-physiologique de la voie Notch, pourrait aussi conduire à une altération de la polarisation des cellules endothéliales. Cependant, il n'existe pas actuellement d'alternatives à ce type de modèle d'activation de Notch.

- **Impact de l'obésité sur les mécanismes identifiés.**

Les changements périodiques d'utilisation des substrats énergétiques (lipides vs glucides) définissent la flexibilité métabolique et sont essentiels au fonctionnement normal des organes fortement demandeur en énergie tels que le cerveau, les muscles squelettiques ou le cœur ⁴³². Nos travaux ont permis d'identifier des mécanismes régulateurs des flux d'acides gras pendant les phases de transition énergétique. Des travaux antérieurs de la littérature montrent, grâce à la mesure de flux artérioveineux d'acides gras couplé à du deutérium, une diminution dramatique des flux entrant et sortant dans le tissu adipeux abdominal de patients obèses comparés à des individus normopondérés ⁴³³. L'altération de la gestion des flux lipides par les tissus adipeux contribue très probablement à favoriser la redistribution des lipides et leur dépôt ectopique en faveur du développement d'une inflexibilité métabolique et de pathologies cardiovasculaires ¹⁰⁴.

Dans ce sens, nos travaux ont pu montrer que la modulation de la DLL4 est diminuée dans les cellules endothéliales isolées à partir de tissu adipeux sous cutané abdominal de patientes en surpoids et chez les animaux nourris en régime hyper lipidique pendant 4 semaines. De plus, chez ces animaux, le régime hyperlipidique induit une altération de la réponse au jeûne tant au niveau des taux des acides

gras plasmatiques que de la perte de poids. Ces données sont en faveur d'une dégradation de la fonctionnalité de l'endothélium vasculaire précoce lors d'un régime hyperlipidique qui pourrait être un évènement initiateur dans l'apparition de l'inflexibilité métabolique. Il conviendrait donc de réaliser une étude cinétique de la fonction endothéliale et de la flexibilité métabolique systémique par des mesures de l'expression de DLL4 sur les cellules endothéliales et des taux plasmatiques des acides gras en réponse au jeûne, respectivement, chez des souris maintenues en régime hyperlipidique pendant 1 à 8 semaines, temps auquel la tolérance au glucose présente des altérations nettes. Les méthodes permettant d'évaluer la flexibilité métabolique soit la mesure du coefficient respiratoire qui renseigne de manière théorique sur le type de carburant utilisé à l'échelle de l'organisme pour produire de l'ATP soit des tests d'hyperglycémie provoquée par voie orale qui sont aujourd'hui les examens de routine réalisés en clinique dans le but d'évaluer la capacité de l'organisme à réguler la glycémie. Cependant ces approches sont difficiles à mettre en place ou statiques et il serait donc intéressant de proposer des mesures liées aux réponses aux transitions énergétiques pour évaluer comme le propose Stroeve et al. la « flexibilité phénotypique » ou la capacité d'un organisme à s'adapter face à des stress nutritionnels standardisés. Ce type d'évaluation de plusieurs paramètres en réponse aux modifications de l'environnement extérieur semble être un bon moyen d'évaluation de la flexibilité métabolique globale et dynamique ⁴³⁴.

Il serait également nécessaire d'étudier les mécanismes à l'origine de la dysfonction endothéliale précoce observée en condition de régime hyperlipidique. Nous montrons un défaut d'adaptation au jeûne des adipocytes de gros diamètre (70-90µm) du tissu adipeux viscéral des animaux en régime hyperlipidique. On pourrait donc se demander si l'hypertrophie adipocytaire, qui est associée à des défauts fonctionnels et notamment dans la réponse à l'insuline ⁴³⁵, pourrait également être responsable de la dysfonction endothéliale en terme de régulation de l'expression de DLL4 en fonction des états énergétiques ou si, à l'inverse, cette dysfonction endothéliale est responsable de l'altération de la réponse lipolytique au jeûne des adipocytes du tissu adipeux périgonadique. L'étude des souris portant une délétion spécifique de *Dll4* dans l'endothélium soumises à des challenges de jeûne en régime standard ou hyperlipidique permettrait d'apporter des éléments de réponse.

La détérioration de la fonctionnalité endothéliale avec l'obésité pourrait être en lien direct avec la redistribution des flux lipidiques vers des dépôts adipeux délétères voir ectopiques. Dans ce sens l'étude de variant commun de *DLL4* dans la population a pu montrer qu'il existait une association avec le ratio tour de taille sur tour de hanche ajusté à l'indice de masse corporelle sans cependant que l'on puisse donner de sens de variation à cette observation. Nos travaux se sont particulièrement axés sur l'obésité, qui peut être considérée comme une situation de vieillissement accéléré. En effet, de nombreuses études montrent une accumulation de cellules sénescences dans les dépôts adipeux et

leur délétion par des modèles animaux avec des mutations permettant de provoquer le « suicide » des cellules sénescentes (P16^{Ink4a}) ou traitement pharmacologique avec des sénolytiques (dasatinib et quercétin), restaure leurs fonctions métaboliques^{346,436}. Des travaux de l'équipe ont montré que les cellules endothéliales sénescentes présentent un déficit dans leur fonction de prise en charge des acides gras²⁷⁵. Il serait intéressant de définir l'impact de la sénescence sur l'expression endothéliale de DLL4. Il a été montré, et ce indépendamment du sexe, que la répartition des masses grasses évolue avec l'âge en faveur d'un ratio taille sur hanche supérieur et une augmentation des risques cardio-métaboliques. Cette redistribution des masses grasses est d'autant plus marquée chez la femme âgée. Il serait donc intéressant d'étudier les variations d'expression de *DLL4* endothélial en fonction des phases de transition énergétique pour chez des sujets plus âgés des deux sexes.

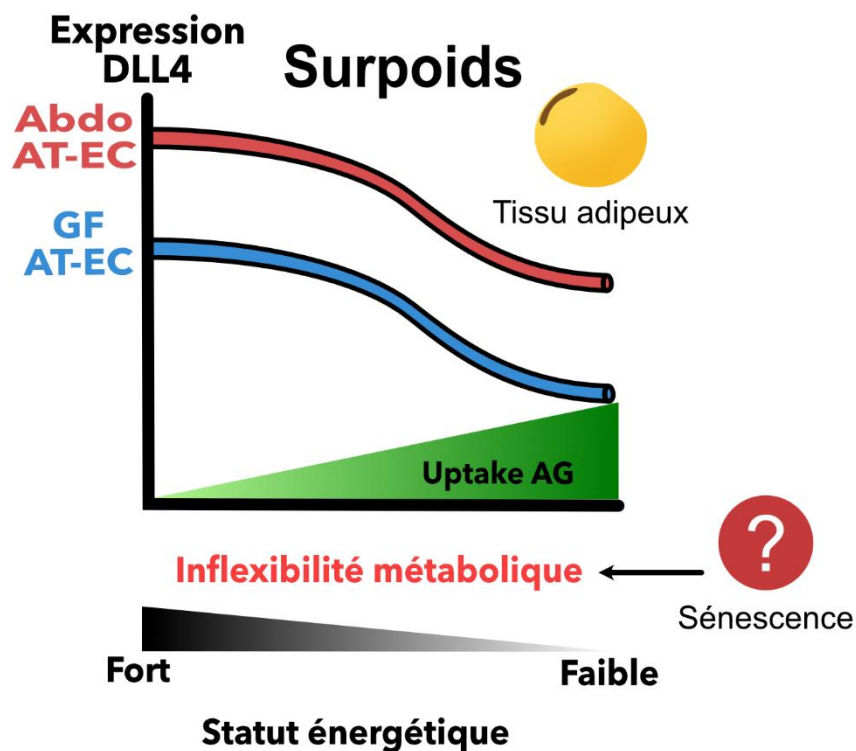


Figure 28 : Impact de l'obésité sur les mécanismes

D'après⁴²⁵

En conclusion, nos travaux ont permis d'identifier un rôle original de DLL4 qui peut être considéré comme une plateforme recevant les informations de transition énergétique et contrôlant de façon transcriptionnelle et non transcriptionnelle l'endothélium afin de réguler les flux d'acides gras. Grâce à leurs capacités spécifiques de détection, d'adaptation aux transitions énergétiques et de gestion des flux de lipides, les cellules endothéliales des dépôts adipeux peuvent être considérées comme une

cible pertinente pour maintenir ou restaurer l'homéodynamie énergétique. Pour cela il est donc nécessaire de poursuivre nos recherches afin de mieux comprendre comment la diversité endothéliale, le circonférence, le sexe et l'état d'obésité affectent la réponse des cellules endothéliales de façon spécifique aux changements d'états énergétiques et comment cette réponse est déterminante dans le maintien de la flexibilité métabolique. Nos travaux ont identifié des acteurs moléculaires et des régulateurs de la gestion par la cellule endothéliale des flux de lipides. Cependant il reste à caractériser les mécanismes mis en jeu dans le transport bidirectionnel de et vers les adipocytes.

Références

1. Bhaskaran, K., Dos-Santos-Silva, I., Leon, D. A., Douglas, I. J. & Smeeth, L. Association of BMI with overall and cause-specific mortality: a population-based cohort study of 3.6 million adults in the UK. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **6**, 944–953 (2018).
2. Karpe, F. & Pinnick, K. E. Biology of upper-body and lower-body adipose tissue—link to whole-body phenotypes. *Nat. Rev. Endocrinol.* **11**, 90–100 (2015).
3. Piché, M.-E., Poirier, P., Lemieux, I. & Després, J.-P. Overview of Epidemiology and Contribution of Obesity and Body Fat Distribution to Cardiovascular Disease: An Update. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **61**, 103–113 (2018).
4. Zwick, R. K., Guerrero-Juarez, C. F., Horsley, V. & Plikus, M. V. Anatomical, Physiological, and Functional Diversity of Adipose Tissue. *Cell Metab.* **27**, 68–83 (2018).
5. Sakers, A., De Siqueira, M. K., Seale, P. & Villanueva, C. J. Adipose-tissue plasticity in health and disease. *Cell* **185**, 419–446 (2022).
6. Cinti, S. Pink Adipocytes. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* **29**, 651–666 (2018).
7. Miranville, A. *et al.* Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation* **110**, 349–355 (2004).
8. Curat, C. A. *et al.* From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes* **53**, 1285–1292 (2004).
9. Bondareva, O. *et al.* Single-cell profiling of vascular endothelial cells reveals progressive organ-specific vulnerabilities during obesity. *Nat. Metab.* **4**, 1591–1610 (2022).
10. Kalucka, J. *et al.* Single-Cell Transcriptome Atlas of Murine Endothelial Cells. *Cell* **180**, 764–779.e20 (2020).
11. Sun, W. *et al.* snRNA-seq reveals a subpopulation of adipocytes that regulates thermogenesis. *Nature* **587**, 98–102 (2020).
12. Dos-Anjos Vilaboa, S., Navarro-Palou, M. & Llull, R. Age influence on stromal vascular fraction cell yield obtained from human lipoaspirates. *Cytotherapy* **16**, 1092–1097 (2014).
13. Silva, K. R. *et al.* Characterization of stromal vascular fraction and adipose stem cells from subcutaneous, preperitoneal and visceral morbidly obese human adipose tissue depots. *PLoS ONE* **12**, e0174115 (2017).
14. Davis, T. R., Johnston, D. R., Bell, F. C. & Cremer, B. J. Regulation of shivering and non-shivering heat production during acclimation of rats. *Am. J. Physiol.* **198**, 471–475 (1960).
15. Bonnot, E. The Interscapular Gland. *J. Anat. Physiol.* **43**, 43–58 (1908).
16. Leitner, B. P. *et al.* Mapping of human brown adipose tissue in lean and obese young men. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, 8649–8654 (2017).
17. Pfannenberger, C. *et al.* Impact of Age on the Relationships of Brown Adipose Tissue With Sex and Adiposity in Humans. *Diabetes* **59**, 1789–1793 (2010).
18. Yang, F. T. & Stanford, K. I. Batokines: Mediators of Inter-Tissue Communication (a Mini-Review). *Curr. Obes. Rep.* **11**, 1–9 (2022).
19. McNeill, B. T., Morton, N. M. & Stimson, R. H. Substrate Utilization by Brown Adipose Tissue: What’s Hot and What’s Not? *Front. Endocrinol.* **11**, 571659 (2020).
20. Becher, T. *et al.* Brown adipose tissue is associated with cardiometabolic health. *Nat. Med.* **27**, 58–65 (2021).
21. Cohen, P. & Kajimura, S. The cellular and functional complexity of thermogenic fat. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **22**, 393–409 (2021).
22. Berry, D. C., Stenesen, D., Zeve, D. & Graff, J. M. The developmental origins of adipose tissue. *Development* **140**, 3939–3949 (2013).

23. Sender, R. & Milo, R. The distribution of cellular turnover in the human body. *Nat. Med.* **27**, 45–48 (2021).
24. Spalding, K. L. *et al.* Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* **453**, 783–787 (2008).
25. White, U. & Ravussin, E. Dynamics of adipose tissue turnover in human metabolic health and disease. *Diabetologia* **62**, 17–23 (2019).
26. Brasaemle, D. L. Thematic review series: Adipocyte Biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J. Lipid Res.* **48**, 2547–2559 (2007).
27. Greenberg, A. S. *et al.* Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. *J. Biol. Chem.* **266**, 11341–11346 (1991).
28. Gallagher, D. *et al.* Healthy percentage body fat ranges: an approach for developing guidelines based on body mass index. *Am. J. Clin. Nutr.* **72**, 694–701 (2000).
29. Estève, D. *et al.* Lobular architecture of human adipose tissue defines the niche and fate of progenitor cells. *Nat. Commun.* **10**, 2549 (2019).
30. Mårin, P., Rebuffé-Scrive, M., Smith, U. & Björntorp, P. Glucose uptake in human adipose tissue. *Metabolism* **36**, 1154–1160 (1987).
31. DeFronzo, R. A. *et al.* The Effect of Insulin on the Disposal of Intravenous Glucose: Results from Indirect Calorimetry and Hepatic and Femoral Venous Catheterization. *Diabetes* **30**, 1000–1007 (1981).
32. Markan, K. R., Jurczak, M. J. & Brady, M. J. Stranger in a Strange Land: Roles of Glycogen Turnover in Adipose Tissue Metabolism. *Mol. Cell. Endocrinol.* **318**, 54–60 (2010).
33. Blanco, A. & Blanco, G. Chapter 14 - Carbohydrate Metabolism. in *Medical Biochemistry* (eds. Blanco, A. & Blanco, G.) 283–323 (Academic Press, 2017). doi:10.1016/B978-0-12-803550-4.00014-8.
34. Lafontan, M. Advances in adipose tissue metabolism. *Int. J. Obes. 2005* **32 Suppl 7**, S39-51 (2008).
35. Weiss, S. B., Kennedy, E. P. & Kiyasu, J. Y. The Enzymatic Synthesis of Triglycerides. *J. Biol. Chem.* **235**, 40–44 (1959).
36. Wilfling, F., Haas, J. T., Walther, T. C. & Farese, R. V. Lipid Droplet Biogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **29**, 39–45 (2014).
37. Salo, V. T. *et al.* Seipin regulates ER–lipid droplet contacts and cargo delivery. *EMBO J.* **35**, 2699–2716 (2016).
38. Magré, J. & Prieur, X. Seipin Deficiency as a Model of Severe Adipocyte Dysfunction: Lessons from Rodent Models and Teaching for Human Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 740 (2022).
39. Magré, J. *et al.* Identification of the gene altered in Berardinelli–Seip congenital lipodystrophy on chromosome 11q13. *Nat. Genet.* **28**, 365–370 (2001).
40. Murru, E., Manca, C., Carta, G. & Banni, S. Impact of Dietary Palmitic Acid on Lipid Metabolism. *Front. Nutr.* **9**, 861664 (2022).
41. Carper, D. *et al.* Atrial Natriuretic Peptide Orchestrates a Coordinated Physiological Response to Fuel Non-shivering Thermogenesis. *Cell Rep.* **32**, 108075 (2020).
42. Marcus, C., Ehrén, H., Bolme, P. & Arner, P. Regulation of lipolysis during the neonatal period. Importance of thyrotropin. *J. Clin. Invest.* **82**, 1793–1797 (1988).
43. Lafontan, M. & Langin, D. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog. Lipid Res.* **48**, 275–297 (2009).
44. Villena, J. A., Roy, S., Sarkadi-Nagy, E., Kim, K.-H. & Sul, H. S. Desnutrin, an Adipocyte Gene Encoding a Novel Patatin Domain-containing Protein, Is Induced by Fasting and Glucocorticoids: ECTOPIC EXPRESSION OF DESNUTRIN INCREASES TRIGLYCERIDE HYDROLYSIS*. *J. Biol. Chem.* **279**, 47066–47075 (2004).
45. Forest, C. *et al.* Fatty acid recycling in adipocytes: a role for glyceroneogenesis and phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 1125–1129 (2003).
46. Proença, A. R. G. *et al.* New concepts in white adipose tissue physiology. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Medicas E Biol.* **47**, 192–205 (2014).

47. Reshef, L., Hanson, R. W. & Ballard, F. J. Glyceride-Glycerol Synthesis from Pyruvate. *J. Biol. Chem.* **244**, 1994–2001 (1969).
48. Reilly, S. M. *et al.* Catecholamines suppress fatty acid re-esterification and increase oxidation in white adipocytes via STAT3. *Nat. Metab.* **2**, 620–634 (2020).
49. Ricquier, D. UCP1, the mitochondrial uncoupling protein of brown adipocyte: A personal contribution and a historical perspective. *Biochimie* **134**, 3–8 (2017).
50. Park, H., He, A. & Lodhi, I. J. Lipid Regulators of Thermogenic Fat Activation. *Trends Endocrinol. Metab.* **30**, 710–723 (2019).
51. Shin, H. *et al.* Lipolysis in Brown Adipocytes Is Not Essential for Cold-Induced Thermogenesis in Mice. *Cell Metab.* **26**, 764-777.e5 (2017).
52. Putri, M. *et al.* CD36 is indispensable for thermogenesis under conditions of fasting and cold stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **457**, 520–525 (2015).
53. Brychta, R. & Chen, K. Cold-induced thermogenesis in humans. *Eur. J. Clin. Nutr.* **71**, 345–352 (2017).
54. Contaldo, F., Scalfi, L., Coltorti, A. & Mancini, M. Post prandial thermogenesis in different pathophysiological conditions. *Int. J. Vitam. Nutr. Res. Int. Z. Vitam.-Ernährungsforschung J. Int. Vitaminol. Nutr.* **56**, 211–216 (1986).
55. Ikeda, K. *et al.* UCP1-independent signaling involving SERCA2b-mediated calcium cycling regulates beige fat thermogenesis and systemic glucose homeostasis. *Nat. Med.* **23**, 1454–1465 (2017).
56. Kazak, L. *et al.* A Creatine-Driven Substrate Cycle Enhances Energy Expenditure and Thermogenesis in Beige Fat. *Cell* **163**, 643–655 (2015).
57. Kazak, L. *et al.* Ablation of adipocyte creatine transport impairs thermogenesis and causes diet-induced obesity. *Nat. Metab.* **1**, 360–370 (2019).
58. Flachs, P. *et al.* Induction of lipogenesis in white fat during cold exposure in mice: link to lean phenotype. *Int. J. Obes.* **41**, 372–380 (2017).
59. Wang, Y. & Ye, L. Somatosensory innervation of adipose tissues. *Physiol. Behav.* **265**, 114174 (2023).
60. Yuko, O.-O. & Saito, M. Brown Fat as a Regulator of Systemic Metabolism beyond Thermogenesis. *Diabetes Metab. J.* **45**, 840–852 (2021).
61. Zhang, Y. *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**, 425–432 (1994).
62. Maeda, K. *et al.* cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (adipose most abundant gene transcript 1). 1996. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **425**, 556–559 (2012).
63. Fain, J. N., Madan, A. K., Hiler, M. L., Cheema, P. & Bahouth, S. W. Comparison of the Release of Adipokines by Adipose Tissue, Adipose Tissue Matrix, and Adipocytes from Visceral and Subcutaneous Abdominal Adipose Tissues of Obese Humans. *Endocrinology* **145**, 2273–2282 (2004).
64. Mizuno, T. M. & Mobbs, C. V. Hypothalamic agouti-related protein messenger ribonucleic acid is inhibited by leptin and stimulated by fasting. *Endocrinology* **140**, 814–817 (1999).
65. Villanueva-Carmona, T. *et al.* SUCNR1 signaling in adipocytes controls energy metabolism by modulating circadian clock and leptin expression. *Cell Metab.* **35**, 601-619.e10 (2023).
66. Considine, R. V. *et al.* Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N. Engl. J. Med.* **334**, 292–295 (1996).
67. Fischer-Posovszky, P., Funcke, J.-B. & Wabitsch, M. Biologically inactive leptin and early-onset extreme obesity. *N. Engl. J. Med.* **372**, 1266–1267 (2015).
68. Lazareva, J., Brady, S. M. & Yanovski, J. A. An evaluation of setmelanotide injection for chronic weight management in adult and pediatric patients with obesity due to Bardet-Biedl syndrome. *Expert Opin. Pharmacother.* **24**, 667–674 (2023).

69. Pajvani, U. B. *et al.* Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. *J. Biol. Chem.* **278**, 9073–9085 (2003).
70. Yamauchi, T. *et al.* Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* **423**, 762–769 (2003).
71. Yamauchi, T. *et al.* Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat. Med.* **8**, 1288–1295 (2002).
72. Ouchi, N., Kihara, S., Funahashi, T., Matsuzawa, Y. & Walsh, K. Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. *Curr. Opin. Lipidol.* **14**, 561–566 (2003).
73. Ouchi, N. *et al.* Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation* **102**, 1296–1301 (2000).
74. Romere, C. *et al.* Asprosin, a Fasting-Induced Glucogenic Protein Hormone. *Cell* **165**, 566–579 (2016).
75. Duerschmid, C. *et al.* Asprosin is a centrally acting orexigenic hormone. *Nat. Med.* **23**, 1444–1453 (2017).
76. Yuan, M., Li, W., Zhu, Y., Yu, B. & Wu, J. Asprosin: A Novel Player in Metabolic Diseases. *Front. Endocrinol.* **11**, (2020).
77. Ugur, K. & Aydin, S. Saliva and Blood Asprosin Hormone Concentration Associated with Obesity. *Int. J. Endocrinol.* **2019**, 2521096 (2019).
78. Mishra, I. *et al.* Asprosin-neutralizing antibodies as a treatment for metabolic syndrome. *eLife* **10**, e63784 (2021).
79. Ellulu, M. S., Patimah, I., Khaza'ai, H., Rahmat, A. & Abed, Y. Obesity and inflammation: the linking mechanism and the complications. *Arch. Med. Sci. AMS* **13**, 851–863 (2017).
80. Chen, L., Chen, R., Wang, H. & Liang, F. Mechanisms Linking Inflammation to Insulin Resistance. *Int. J. Endocrinol.* **2015**, e508409 (2015).
81. Dijk, W. & Kersten, S. Regulation of lipoprotein lipase by Angptl4. *Trends Endocrinol. Metab.* **25**, 146–155 (2014).
82. Kersten, S. Role and mechanism of the action of angiopoietin-like protein ANGPTL4 in plasma lipid metabolism. *J. Lipid Res.* **62**, 100150 (2021).
83. Ruppert, P. M. M. *et al.* Fasting induces ANGPTL4 and reduces LPL activity in human adipose tissue. *Mol. Metab.* **40**, 101033 (2020).
84. Holmes, D. Fasting induces FGF21 in humans. *Nat. Rev. Endocrinol.* **12**, 3–3 (2016).
85. Müssig, K. *et al.* RARRES2, encoding the novel adipokine chemerin, is a genetic determinant of disproportionate regional body fat distribution: a comparative magnetic resonance imaging study. *Metabolism* **58**, 519–524 (2009).
86. 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.* **3**, (2016).
87. Johnson, D., Dixon, A. K. & Abrahams, P. H. The abdominal subcutaneous tissue: computed tomographic, magnetic resonance, and anatomical observations. *Clin. Anat. N. Y. N* **9**, 19–24 (1996).
88. Merrick, D. *et al.* Identification of a mesenchymal progenitor cell hierarchy in adipose tissue. *Science* **364**, eaav2501 (2019).
89. Frontini, A. & Cinti, S. Distribution and Development of Brown Adipocytes in the Murine and Human Adipose Organ. *Cell Metab.* **11**, 253–256 (2010).
90. Dutton, D. J. & McLaren, L. The usefulness of “corrected” body mass index vs. self-reported body mass index: comparing the population distributions, sensitivity, specificity, and predictive utility of three correction equations using Canadian population-based data. *BMC Public Health* **14**, 430 (2014).
91. Borga, M. *et al.* Advanced body composition assessment: from body mass index to body composition profiling. *J. Investig. Med.* **66**, 1–9 (2018).
92. Linge, J. *et al.* Body Composition Profiling in the UK Biobank Imaging Study. *Obesity* **26**, 1785–1795 (2018).

93. Lobstein, T., Jackson-Leach, R., Powis, J., Brinsden, H. & Gray, M. World Obesity Atlas. (2023).
94. Cheng, D., Zhao, X., Yang, S., Cui, H. & Wang, G. Metabolomic Signature Between Metabolically Healthy Overweight/Obese and Metabolically Unhealthy Overweight/Obese: A Systematic Review. *Diabetes Metab. Syndr. Obes. Targets Ther.* **14**, 991–1010 (2021).
95. Tanriover, C. *et al.* Metabolically healthy obesity: Misleading phrase or healthy phenotype? *Eur. J. Intern. Med.* (2023) doi:10.1016/j.ejim.2023.02.025.
96. Blüher, M. Metabolically Healthy Obesity. *Endocr. Rev.* **41**, bnaa004 (2020).
97. Nilsson, P. M., Korduner, J. & Magnusson, M. Metabolically Healthy Obesity (MHO)-New Research Directions for Personalised Medicine in Cardiovascular Prevention. *Curr. Hypertens. Rep.* **22**, 18 (2020).
98. Velho, S., Paccaud, F., Waeber, G., Vollenweider, P. & Marques-Vidal, P. Metabolically healthy obesity: different prevalences using different criteria. *Eur. J. Clin. Nutr.* **64**, 1043–1051 (2010).
99. Aron-Wisnewsky, J. & Brindisi, M.-C. Obésité de l’adulte : prise en charge de 2e et 3e niveaux. (2022).
100. Wormser, D. *et al.* Separate and combined associations of body-mass index and abdominal adiposity with cardiovascular disease: collaborative analysis of 58 prospective studies. *Lancet Lond. Engl.* **377**, 1085–1095 (2011).
101. Leitzmann, M. F. *et al.* Waist circumference as compared with body-mass index in predicting mortality from specific causes. *PloS One* **6**, e18582 (2011).
102. Pudit, S. L. *et al.* Meta-analysis of genome-wide association studies for body fat distribution in 694 649 individuals of European ancestry. *Hum. Mol. Genet.* **28**, 166–174 (2019).
103. Agrawal, S. *et al.* BMI-adjusted adipose tissue volumes exhibit depot-specific and divergent associations with cardiometabolic diseases. *Nat. Commun.* **14**, 266 (2023).
104. Schaffer, J. E. Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr. Opin. Lipidol.* **14**, 281–287 (2003).
105. Nishi, H., Higashihara, T. & Inagi, R. Lipotoxicity in Kidney, Heart, and Skeletal Muscle Dysfunction. *Nutrients* **11**, 1664 (2019).
106. Jo, J. *et al.* Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth. *PLOS Comput. Biol.* **5**, e1000324 (2009).
107. Tchoukalova, Y. D. *et al.* Regional differences in cellular mechanisms of adipose tissue gain with overfeeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 18226–18231 (2010).
108. White, U., Fitch, M. D., Beyl, R. A., Hellerstein, M. K. & Ravussin, E. Adipose depot-specific effects of 16 weeks of pioglitazone on in vivo adipogenesis in women with obesity: a randomised controlled trial. *Diabetologia* **64**, 159–167 (2021).
109. Jensen, M. D., Cryer, P. E., Johnson, C. M. & Murray, M. J. Effects of epinephrine on regional free fatty acid and energy metabolism in men and women. *Am. J. Physiol.* **270**, E259–264 (1996).
110. Mårin, P., Rebuffé-Scrive, M. & Björntorp, P. Uptake of triglyceride fatty acids in adipose tissue in vivo in man. *Eur. J. Clin. Invest.* **20**, 158–165 (1990).
111. Wahrenberg, H., Lönnqvist, F. & Arner, P. Mechanisms underlying regional differences in lipolysis in human adipose tissue. *J. Clin. Invest.* **84**, 458–467 (1989).
112. Björntorp, P. ‘Portal’ adipose tissue as a generator of risk factors for cardiovascular disease and diabetes. *Arterioscler. Dallas Tex* **10**, 493–496 (1990).
113. Shoelson, S. E., Herrero, L. & Naaz, A. Obesity, Inflammation, and Insulin Resistance. *Gastroenterology* **132**, 2169–2180 (2007).
114. Estève, D. *et al.* Multiple Functions of MSCA-1/TNAP in Adult Mesenchymal Progenitor/Stromal Cells. *Stem Cells Int.* **2016**, 1815982 (2016).
115. Orsso, C. E. *et al.* Adipose Tissue Development and Expansion from the Womb to Adolescence: An Overview. *Nutrients* **12**, 2735 (2020).
116. Taylor, R. W., Grant, A. M., Williams, S. M. & Goulding, A. Sex differences in regional body fat distribution from pre- to postpuberty. *Obes. Silver Spring Md* **18**, 1410–1416 (2010).
117. Vague, J. [Sexual differentiations and distribution of fat]. *Sem. Hopitaux Organe Fonde Par Assoc. Enseign. Med. Hopitaux Paris* **26**, 2387–2390 (1950).

118. O’Keeffe, L. M. *et al.* Sex-specific associations of adiposity with cardiometabolic traits in the UK: A multi-life stage cohort study with repeat metabolomics. *PLoS Med.* **19**, e1003636 (2022).
119. Aggarwal, N. R. *et al.* Sex Differences in Ischemic Heart Disease: Advances, Obstacles, and Next Steps. *Circ. Cardiovasc. Qual. Outcomes* **11**, e004437 (2018).
120. Peters, S. A. E., Bots, S. H. & Woodward, M. Sex Differences in the Association Between Measures of General and Central Adiposity and the Risk of Myocardial Infarction: Results From the UK Biobank. *J. Am. Heart Assoc.* **7**, e008507 (2018).
121. Chen, X. *et al.* The number of x chromosomes causes sex differences in adiposity in mice. *PLoS Genet.* **8**, e1002709 (2012).
122. Hansen, G. T. *et al.* Genetics of sexually dimorphic adipose distribution in humans. *Nat. Genet.* 1–10 (2023) doi:10.1038/s41588-023-01306-0.
123. Shungin, D. *et al.* New genetic loci link adipose and insulin biology to body fat distribution. *Nature* **518**, 187–196 (2015).
124. Stein, A. D. *et al.* Anthropometric measures in middle age after exposure to famine during gestation: evidence from the Dutch famine. *Am. J. Clin. Nutr.* **85**, 869–876 (2007).
125. Andres, A. *et al.* Longitudinal body composition of children born to mothers with normal weight, overweight, and obesity. *Obes. Silver Spring Md* **23**, 1252–1258 (2015).
126. Sebo, Z. L. & Rodeheffer, M. S. Assembling the adipose organ: adipocyte lineage segregation and adipogenesis in vivo. *Dev. Camb. Engl.* **146**, dev172098 (2019).
127. White, U. A., Fitch, M. D., Beyl, R. A., Hellerstein, M. K. & Ravussin, E. Differences in In Vivo Cellular Kinetics in Abdominal and Femoral Subcutaneous Adipose Tissue in Women. *Diabetes* **65**, 1642–1647 (2016).
128. Zamboni, M. *et al.* Body fat distribution in pre- and post-menopausal women: metabolic and anthropometric variables and their inter-relationships. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* **16**, 495–504 (1992).
129. Boulet, N., Briot, A., Galitzky, J. & Bouloumié, A. The Sexual Dimorphism of Human Adipose Depots. *Biomedicines* **10**, 2615 (2022).
130. Heck, A. M., Yanovski, J. A. & Calis, K. A. Orlistat, a New Lipase Inhibitor for the Management of Obesity. *Pharmacotherapy* **20**, 270–279 (2000).
131. Filippatos, T. D. *et al.* Orlistat-Associated Adverse Effects and Drug Interactions. *Drug Saf.* **31**, 53–65 (2008).
132. Pedersen, S. D., Manjoo, P. & Wharton, S. Pharmacotherapy in Obesity Management. (2020).
133. Astrup, A. *et al.* Effects of liraglutide in the treatment of obesity: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *The Lancet* **374**, 1606–1616 (2009).
134. El Ansari, W. & Elhag, W. Weight Regain and Insufficient Weight Loss After Bariatric Surgery: Definitions, Prevalence, Mechanisms, Predictors, Prevention and Management Strategies, and Knowledge Gaps—a Scoping Review. *Obes. Surg.* **31**, 1755–1766 (2021).
135. King, W. C., Hinerman, A. S., Belle, S. H., Wahed, A. S. & Courcoulas, A. P. Comparison of the Performance of Common Measures of Weight Regain After Bariatric Surgery for Association With Clinical Outcomes. *JAMA* **320**, 1560–1569 (2018).
136. Switzer, N. J., Karmali, S., Gill, R. S. & Sherman, V. Revisional Bariatric Surgery. *Surg. Clin. North Am.* **96**, 827–842 (2016).
137. Cannon, W. Physiological regulation of normal states: some tentative postulates concerning biological homeostatics. *Éditions Médicales* p91 (1926).
138. Halberg, F. Circadian (about Twenty-four-hour) Rhythms in Experimental Medicine [Abridged]. *Proc. R. Soc. Med.* **56**, 253–257 (1963).
139. Lloyd, D., Aon, M. A. & Cortassa, S. Why Homeodynamics, Not Homeostasis? *Sci. World J.* **1**, 133–145 (2001).
140. Saltin, B. & Gollnick, P. D. Skeletal Muscle Adaptability: Significance for Metabolism and Performance. in *Comprehensive Physiology* 555–631 (John Wiley & Sons, Ltd, 1983). doi:10.1002/cphy.cp100119.

141. Kelley, D. E., Goodpaster, B., Wing, R. R. & Simoneau, J.-A. Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **277**, E1130–E1141 (1999).
142. Hainsworth, F. R., Collins, B. G. & Wolf, L. L. The Function of Torpor in Hummingbirds. *Physiol. Zool.* **50**, 215–222 (1977).
143. Dote-Montero, M., Sanchez-Delgado, G. & Ravussin, E. Effects of Intermittent Fasting on Cardiometabolic Health: An Energy Metabolism Perspective. *Nutrients* **14**, 489 (2022).
144. Silva, B. *et al.* Glia fuel neurons with locally synthesized ketone bodies to sustain memory under starvation. *Nat. Metab.* **4**, 213–224 (2022).
145. Robinson, A. M. & Williamson, D. H. Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues. *Physiol. Rev.* **60**, 143–187 (1980).
146. Deota, S. & Panda, S. New Horizons: Circadian Control of Metabolism Offers Novel Insight Into the Cause and Treatment of Metabolic Diseases. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **106**, e1488–e1493 (2021).
147. Longo, V. D. & Panda, S. Fasting, Circadian Rhythms, and Time-Restricted Feeding in Healthy Lifespan. *Cell Metab.* **23**, 1048–1059 (2016).
148. Hepler, C. *et al.* Time-restricted feeding mitigates obesity through adipocyte thermogenesis. *Science* **378**, 276–284 (2022).
149. Ravussin, E., Beyl, R. A., Poggiogalle, E., Hsia, D. S. & Peterson, C. M. Early Time-Restricted Feeding Reduces Appetite and Increases Fat Oxidation But Does Not Affect Energy Expenditure in Humans. *Obesity* **27**, 1244–1254 (2019).
150. Villareal, D. T., Shah, K., Banks, M. R., Sinacore, D. R. & Klein, S. Effect of Weight Loss and Exercise Therapy on Bone Metabolism and Mass in Obese Older Adults: A One-Year Randomized Controlled Trial. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **93**, 2181–2187 (2008).
151. WHO. UN Report: Global hunger numbers rose to as many as 828 million in 2021. <https://www.who.int/news/item/06-07-2022-un-report--global-hunger-numbers-rose-to-as-many-as-828-million-in-2021> (2022).
152. Buck, C. L. & Barnes, B. M. Effects of ambient temperature on metabolic rate, respiratory quotient, and torpor in an arctic hibernator. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **279**, R255–262 (2000).
153. Heldmaier, G. & Ruf, T. Body temperature and metabolic rate during natural hypothermia in endotherms. *J. Comp. Physiol. [B]* **162**, 696–706 (1992).
154. Tøien, Ø. *et al.* Hibernation in black bears: independence of metabolic suppression from body temperature. *Science* **331**, 906–909 (2011).
155. Boyer, B. B., Barnes, B. M., Kopecky, J., Jacobsson, A. & Hermanska, J. Molecular Control of Prehibernation Brown Fat Growth in Arctic Ground Squirrels. in *Life In The Cold* (CRC Press, 1993).
156. Cooney, G. *et al.* Activities of some key enzymes of carbohydrate, ketone body, adenosine and glutamine metabolism in liver, and brown and white adipose tissues of the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **138**, 687–692 (1986).
157. Le Maho, Y., Robin, J.-P. & Cherel, Y. Starvation as a Treatment of Obesity: The Need to Conserve Body Protein. *Physiology* **3**, 21–24 (1988).
158. Stewart, W. K. & Fleming, L. W. Features of a successful therapeutic fast of 382 days' duration. *Postgrad. Med. J.* **49**, 203–209 (1973).
159. Van Itallie, T. B. & Yang, M. U. Cardiac dysfunction in obese dieters: a potentially lethal complication of rapid, massive weight loss. *Am. J. Clin. Nutr.* **39**, 695–702 (1984).
160. Neel, J. V. Diabetes Mellitus: A “Thrifty” Genotype Rendered Detrimental by “Progress”? *Am. J. Hum. Genet.* **14**, 353–362 (1962).
161. Guan, D. & Lazar, M. A. Interconnections between circadian clocks and metabolism. *J. Clin. Invest.* **131**, (2021).
162. Neumann, A.-M., Schmidt, C. X., Brockmann, R. M. & Oster, H. Circadian regulation of endocrine systems. *Auton. Neurosci. Basic Clin.* **216**, 1–8 (2019).

163. Ralph, M. R., Foster, R. G., Davis, F. C. & Menaker, M. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* **247**, 975–978 (1990).
164. Olejniczak, I., Oster, H. & Ray, D. W. Glucocorticoid circadian rhythms in immune function. *Semin. Immunopathol.* **44**, 153–163 (2022).
165. Chung, S., Son, G. H. & Kim, K. Circadian rhythm of adrenal glucocorticoid: Its regulation and clinical implications. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **1812**, 581–591 (2011).
166. Liu, C., Liu, Y., Xin, Y. & Wang, Y. Circadian secretion rhythm of GLP-1 and its influencing factors. *Front. Endocrinol.* **13**, 991397 (2022).
167. Qian, J., Morris, C. J., Caputo, R., Garaulet, M. & Scheer, F. A. Ghrelin is Impacted by the Endogenous Circadian System and by Circadian Misalignment in Humans. *Int. J. Obes.* **2005** **43**, 1644–1649 (2019).
168. Duez, H., Sebti, Y. & Staels, B. Horloges circadiennes et métabolisme : intégration des signaux métaboliques et environnementaux. *médecine/sciences* **29**, 772–777 (2013).
169. Talamanca, L., Gobet, C. & Naef, F. Sex-dimorphic and age-dependent organization of 24-hour gene expression rhythms in humans. *Science* **379**, 478–483 (2023).
170. Woodie, L. N., Oral, K. T., Krusen, B. M. & Lazar, M. A. The Circadian Regulation of Nutrient Metabolism in Diet-Induced Obesity and Metabolic Disease. *Nutrients* **14**, 3136 (2022).
171. Nakahata, Y., Sahar, S., Astarita, G., Kaluzova, M. & Sassone-Corsi, P. Circadian control of the NAD⁺ salvage pathway by CLOCK-SIRT1. *Science* **324**, 654–657 (2009).
172. Lamia, K. A. *et al.* AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation. *Science* **326**, 437–440 (2009).
173. Duez, H. & Staels, B. Nuclear receptors linking circadian rhythms and cardiometabolic control. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 1529–1534 (2010).
174. Canaple, L. *et al.* Reciprocal regulation of brain and muscle Arnt-like protein 1 and peroxisome proliferator-activated receptor alpha defines a novel positive feedback loop in the rodent liver circadian clock. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **20**, 1715–1727 (2006).
175. Hamada, Y. & Hayashi, N. Chewing increases postprandial diet-induced thermogenesis. *Sci. Rep.* **11**, 23714 (2021).
176. Kazak, L. & Spiegelman, B. M. Mechanism of futile creatine cycling in thermogenesis. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **319**, E947–E949 (2020).
177. Brubaker, P. L. The glucagon-like peptides: pleiotropic regulators of nutrient homeostasis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1070**, 10–26 (2006).
178. Rocca, A. S. & Brubaker, P. L. Role of the vagus nerve in mediating proximal nutrient-induced glucagon-like peptide-1 secretion. *Endocrinology* **140**, 1687–1694 (1999).
179. Roberge, J. N. & Brubaker, P. L. Secretion of proglucagon-derived peptides in response to intestinal luminal nutrients. *Endocrinology* **128**, 3169–3174 (1991).
180. Deacon, C. F. *et al.* Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide I are rapidly degraded from the NH₂-terminus in type II diabetic patients and in healthy subjects. *Diabetes* **44**, 1126–1131 (1995).
181. Hansen, L., Deacon, C. F., Orskov, C. & Holst, J. J. Glucagon-like peptide-1-(7-36)amide is transformed to glucagon-like peptide-1-(9-36)amide by dipeptidyl peptidase IV in the capillaries supplying the L cells of the porcine intestine. *Endocrinology* **140**, 5356–5363 (1999).
182. Montrose-Rafizadeh, C. *et al.* Pancreatic glucagon-like peptide-1 receptor couples to multiple G proteins and activates mitogen-activated protein kinase pathways in Chinese hamster ovary cells. *Endocrinology* **140**, 1132–1140 (1999).
183. Holst, J. J., Orskov, C., Nielsen, O. V. & Schwartz, T. W. Truncated glucagon-like peptide I, an insulin-releasing hormone from the distal gut. *FEBS Lett.* **211**, 169–174 (1987).
184. Fehmann, H. C. & Habener, J. F. Functional receptors for the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-I(7-37) on a somatostatin secreting cell line. *FEBS Lett.* **279**, 335–340 (1991).
185. Heller, R. S., Kieffer, T. J. & Habener, J. F. Insulinotropic glucagon-like peptide I receptor expression in glucagon-producing alpha-cells of the rat endocrine pancreas. *Diabetes* **46**, 785–791 (1997).

186. Abbott, C. R. *et al.* The inhibitory effects of peripheral administration of peptide YY(3-36) and glucagon-like peptide-1 on food intake are attenuated by ablation of the vagal-brainstem-hypothalamic pathway. *Brain Res.* **1044**, 127–131 (2005).
187. Nikolaidis, L. A. *et al.* Recombinant glucagon-like peptide-1 increases myocardial glucose uptake and improves left ventricular performance in conscious dogs with pacing-induced dilated cardiomyopathy. *Circulation* **110**, 955–961 (2004).
188. Bose, A. K., Mocanu, M. M., Carr, R. D., Brand, C. L. & Yellon, D. M. Glucagon-like peptide 1 can directly protect the heart against ischemia/reperfusion injury. *Diabetes* **54**, 146–151 (2005).
189. Zhao, T. *et al.* Direct effects of glucagon-like peptide-1 on myocardial contractility and glucose uptake in normal and postischemic isolated rat hearts. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **317**, 1106–1113 (2006).
190. Kounatidis, D. *et al.* Therapeutic Potential of GLP-2 Analogs in Gastrointestinal Disorders: Current Knowledge, Nutritional Aspects, and Future Perspectives. *Curr. Nutr. Rep.* **11**, 618–642 (2022).
191. Salera, M. *et al.* Gastric inhibitory polypeptide release after oral glucose: relationship to glucose intolerance, diabetes mellitus, and obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **55**, 329–336 (1982).
192. Gromada, J. *et al.* Glucagon-like peptide 1 (7-36) amide stimulates exocytosis in human pancreatic beta-cells by both proximal and distal regulatory steps in stimulus-secretion coupling. *Diabetes* **47**, 57–65 (1998).
193. Miyawaki, K. *et al.* Inhibition of gastric inhibitory polypeptide signaling prevents obesity. *Nat. Med.* **8**, 738–742 (2002).
194. Galgani, J. E., Moro, C. & Ravussin, E. Metabolic flexibility and insulin resistance. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **295**, E1009–E1017 (2008).
195. Goodpaster, B. H. & Sparks, L. M. Metabolic flexibility in health and disease. *Cell Metab.* **25**, 1027–1036 (2017).
196. Calçada, D. *et al.* The role of low-grade inflammation and metabolic flexibility in aging and nutritional modulation thereof: A systems biology approach. *Mech. Ageing Dev.* **136–137**, 138–147 (2014).
197. Kimball, C. P. & Murlin, J. R. AQUEOUS EXTRACTS OF PANCREAS: III. SOME PRECIPITATION REACTIONS OF INSULIN. *J. Biol. Chem.* **58**, 337–346 (1923).
198. Skoglund, G., Lundquist, I. & Ahrén, B. Alpha 1- and alpha 2-adrenoceptor activation increases plasma glucagon levels in the mouse. *Eur. J. Pharmacol.* **143**, 83–88 (1987).
199. Xu, E. *et al.* Intra-islet insulin suppresses glucagon release via GABA-GABAA receptor system. *Cell Metab.* **3**, 47–58 (2006).
200. Jelinek, L. J. *et al.* Expression cloning and signaling properties of the rat glucagon receptor. *Science* **259**, 1614–1616 (1993).
201. Habegger, K. M. *et al.* The metabolic actions of glucagon revisited. *Nat. Rev. Endocrinol.* **6**, 689–697 (2010).
202. Christophe, J. Glucagon receptors: from genetic structure and expression to effector coupling and biological responses. *Biochim. Biophys. Acta* **1241**, 45–57 (1995).
203. Tschöp, M. H. *et al.* Unimolecular Polypharmacy for Treatment of Diabetes and Obesity. *Cell Metab.* **24**, 51–62 (2016).
204. Rix, I., Nexøe-Larsen, C., Bergmann, N. C., Lund, A. & Knop, F. K. Glucagon Physiology. in *Endotext* (eds Feingold, K. R. *et al.*) (MDText.com, Inc., 2000).
205. Wang, M., Wang, Q. & Whim, M. D. Fasting induces a form of autonomic synaptic plasticity that prevents hypoglycemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, E3029–E3038 (2016).
206. Geller, S. *et al.* Tanycytes Regulate Lipid Homeostasis by Sensing Free Fatty Acids and Signaling to Key Hypothalamic Neuronal Populations via FGF21 Secretion. *Cell Metab.* **30**, 833-844.e7 (2019).
207. Birk, J. B. & Wojtaszewski, J. F. P. Predominant alpha2/beta2/gamma3 AMPK activation during exercise in human skeletal muscle. *J. Physiol.* **577**, 1021–1032 (2006).
208. Adams, J. *et al.* Intrasteric control of AMPK via the gamma1 subunit AMP allosteric regulatory site. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **13**, 155–165 (2004).

209. Scott, J. W. *et al.* CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *J. Clin. Invest.* **113**, 274–284 (2004).
210. Davies, S. P., Helps, N. R., Cohen, P. T. & Hardie, D. G. 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C alpha and native bovine protein phosphatase-2AC. *FEBS Lett.* **377**, 421–425 (1995).
211. Woods, A. *et al.* LKB1 Is the Upstream Kinase in the AMP-Activated Protein Kinase Cascade. *Curr. Biol.* **13**, 2004–2008 (2003).
212. Valentine, R. J., Coughlan, K. A., Ruderman, N. B. & Saha, A. K. Insulin inhibits AMPK activity and phosphorylates AMPK Ser⁴⁸⁵/491 through Akt in hepatocytes, myotubes and incubated rat skeletal muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* **562**, 62–69 (2014).
213. Greco, S. J. *et al.* Leptin Boosts Cellular Metabolism by Activating AMPK and the Sirtuins to Reduce Tau Phosphorylation and β -Amyloid in Neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **414**, 170–174 (2011).
214. Zhang, B. B., Zhou, G. & Li, C. AMPK: An Emerging Drug Target for Diabetes and the Metabolic Syndrome. *Cell Metab.* **9**, 407–416 (2009).
215. Hardie, D. G. & Pan, D. A. Regulation of fatty acid synthesis and oxidation by the AMP-activated protein kinase. *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 1064–1070 (2002).
216. Li, Y. *et al.* AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice. *Cell Metab.* **13**, 376–388 (2011).
217. Habets, D. D. J. *et al.* Crucial role for LKB1 to AMPKalpha2 axis in the regulation of CD36-mediated long-chain fatty acid uptake into cardiomyocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **1791**, 212–219 (2009).
218. Garcia, D. & Shaw, R. J. AMPK: Mechanisms of Cellular Energy Sensing and Restoration of Metabolic Balance. *Mol. Cell* **66**, 789–800 (2017).
219. Garton, A. J. & Yeaman, S. J. Identification and role of the basal phosphorylation site on hormone-sensitive lipase. *Eur. J. Biochem.* **191**, 245–250 (1990).
220. Gaidhu, M. P. *et al.* Prolonged AICAR-induced AMP-kinase activation promotes energy dissipation in white adipocytes: novel mechanisms integrating HSL and ATGL. *J. Lipid Res.* **50**, 704–715 (2009).
221. Daval, M. *et al.* Anti-lipolytic action of AMP-activated protein kinase in rodent adipocytes. *J. Biol. Chem.* **280**, 25250–25257 (2005).
222. Jiang, S., Wang, W., Miner, J. & Fromm, M. Cross Regulation of Sirtuin 1, AMPK, and PPAR γ in Conjugated Linoleic Acid Treated Adipocytes. *PLOS ONE* **7**, e48874 (2012).
223. Yamaguchi, S. *et al.* Activators of AMP-activated protein kinase enhance GLUT4 translocation and its glucose transport activity in 3T3-L1 adipocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **289**, E643–649 (2005).
224. Hardie, D. G. AMPK: A Target for Drugs and Natural Products With Effects on Both Diabetes and Cancer. *Diabetes* **62**, 2164–2172 (2013).
225. Zhang, C.-S. *et al.* The Lysosomal v-ATPase-Ragulator Complex Is a Common Activator for AMPK and mTORC1, Acting as a Switch between Catabolism and Anabolism. *Cell Metab.* **20**, 526–540 (2014).
226. González, A., Hall, M. N., Lin, S.-C. & Hardie, D. G. AMPK and TOR: The Yin and Yang of Cellular Nutrient Sensing and Growth Control. *Cell Metab.* **31**, 472–492 (2020).
227. Timm, K. N. & Tyler, D. J. The Role of AMPK Activation for Cardioprotection in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **34**, 255–269 (2020).
228. Saxton, R. A. & Sabatini, D. M. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* **168**, 960–976 (2017).
229. Ben-Sahra, I., Hoxhaj, G., Ricoult, S. J. H., Asara, J. M. & Manning, B. D. mTORC1 induces purine synthesis through control of the mitochondrial tetrahydrofolate cycle. *Science* **351**, 728–733 (2016).
230. Peterson, T. R. *et al.* mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell* **146**, 408–420 (2011).

231. Düvel, K. *et al.* Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol. Cell* **39**, 171–183 (2010).
232. Kim, J. E. & Chen, J. Regulation of Peroxisome Proliferator–Activated Receptor- γ Activity by Mammalian Target of Rapamycin and Amino Acids in Adipogenesis. *Diabetes* **53**, 2748–2756 (2004).
233. Shimobayashi, M. & Hall, M. N. Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 155–162 (2014).
234. Ling, N. X. Y. *et al.* mTORC1 directly inhibits AMPK to promote cell proliferation under nutrient stress. *Nat. Metab.* **2**, 41–49 (2020).
235. García-Martínez, J. M. & Alessi, D. R. mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochem. J.* **416**, 375–385 (2008).
236. Kahan, B. D. Efficacy of sirolimus compared with azathioprine for reduction of acute renal allograft rejection: a randomised multicentre study. *The Lancet* **356**, 194–202 (2000).
237. Moses, J. W. *et al.* Sirolimus-Eluting Stents versus Standard Stents in Patients with Stenosis in a Native Coronary Artery. *N. Engl. J. Med.* **349**, 1315–1323 (2003).
238. Bjornsti, M.-A. & Houghton, P. J. The tor pathway: a target for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 335–348 (2004).
239. Tsuchiya, K. & Ogawa, Y. Forkhead box class O family member proteins: The biology and pathophysiological roles in diabetes. *J. Diabetes Investig.* **8**, 726–734 (2017).
240. Matsumoto, M., Han, S., Kitamura, T. & Accili, D. Dual role of transcription factor FoxO1 in controlling hepatic insulin sensitivity and lipid metabolism. *J. Clin. Invest.* **116**, 2464–2472 (2006).
241. Kamagate, A. *et al.* FoxO1 mediates insulin-dependent regulation of hepatic VLDL production in mice. *J. Clin. Invest.* **118**, 2347–2364 (2008).
242. Armoni, M. *et al.* FOXO1 Represses Peroxisome Proliferator-activated Receptor- γ 1 and - γ 2 Gene Promoters in Primary Adipocytes: A NOVEL PARADIGM TO INCREASE INSULIN SENSITIVITY*. *J. Biol. Chem.* **281**, 19881–19891 (2006).
243. Nakae, J. *et al.* Forkhead transcription factor FoxO1 in adipose tissue regulates energy storage and expenditure. *Diabetes* **57**, 563–576 (2008).
244. Tsuchiya, K. & Accili, D. Liver sinusoidal endothelial cells link hyperinsulinemia to hepatic insulin resistance. *Diabetes* **62**, 1478–1489 (2013).
245. Grygiel-Górniak, B. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications – a review. *Nutr. J.* **13**, 17 (2014).
246. Grabacka, M., Pierzchalska, M., Dean, M. & Reiss, K. Regulation of Ketone Body Metabolism and the Role of PPAR α . *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 2093 (2016).
247. Kersten, S. Integrated physiology and systems biology of PPAR α . *Mol. Metab.* **3**, 354–371 (2014).
248. Lundåsen, T. *et al.* PPARalpha is a key regulator of hepatic FGF21. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **360**, 437–440 (2007).
249. Hondares, E. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) induces PPAR γ coactivator 1 α (PGC-1 α) gene expression and contributes to thermogenic activation of brown fat: involvement of PRDM16. *J. Biol. Chem.* **286**, 43112–43122 (2011).
250. Giordano Attianese, G. M. & Desvergne, B. Integrative and systemic approaches for evaluating PPAR β/δ (PPAR δ) function. *Nucl. Recept. Signal.* **13**, e001 (2015).
251. Chao, Y. *et al.* Regulatory roles and mechanisms of alternative RNA splicing in adipogenesis and human metabolic health. *Cell Biosci.* **11**, 66 (2021).
252. Brun, R. P. *et al.* Differential activation of adipogenesis by multiple PPAR isoforms. *Genes Dev.* **10**, 974–984 (1996).
253. Barak, Y. *et al.* PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol. Cell* **4**, 585–595 (1999).
254. Imai, T. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is required in mature white and brown adipocytes for their survival in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 4543–4547 (2004).

255. Gatica, D., Lahiri, V. & Klionsky, D. J. Cargo recognition and degradation by selective autophagy. *Nat. Cell Biol.* **20**, 233–242 (2018).
256. Hosokawa, N. *et al.* Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol. Biol. Cell* **20**, 1981–1991 (2009).
257. Egan, D. F. *et al.* Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* **331**, 456–461 (2011).
258. Hayashi-Nishino, M. *et al.* A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat. Cell Biol.* **11**, 1433–1437 (2009).
259. Harnett, M. M. *et al.* From Christian de Duve to Yoshinori Ohsumi: More to autophagy than just dining at home. *Biomed. J.* **40**, 9–22 (2017).
260. Baerga, R., Zhang, Y., Chen, P.-H., Goldman, S. & Jin, S. Targeted deletion of autophagy-related 5 (atg5) impairs adipogenesis in a cellular model and in mice. *Autophagy* **5**, 1118–1130 (2009).
261. Cairó, M. *et al.* Thermogenic activation represses autophagy in brown adipose tissue. *Int. J. Obes.* **2005** **40**, 1591–1599 (2016).
262. Nuñez, C. E. *et al.* Defective regulation of adipose tissue autophagy in obesity. *Int. J. Obes.* **2005** **37**, 1473–1480 (2013).
263. Turner, B. M. Epigenetic responses to environmental change and their evolutionary implications. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **364**, 3403–3418 (2009).
264. Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. & Richmond, T. J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**, 251–260 (1997).
265. Fragoso, G., John, S., Roberts, M. S. & Hager, G. L. Nucleosome positioning on the MMTV LTR results from the frequency-biased occupancy of multiple frames. *Genes Dev.* **9**, 1933–1947 (1995).
266. Kouzarides, T. Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**, 693–705 (2007).
267. Wellen, K. E. *et al.* ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Science* **324**, 1076–1080 (2009).
268. Gagnon, J. *et al.* Undetectable histone O-GlcNAcylation in mammalian cells. *Epigenetics* **10**, 677–691 (2015).
269. Painter, R. C., Roseboom, T. J. & Bleker, O. P. Prenatal exposure to the Dutch famine and disease in later life: an overview. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* **20**, 345–352 (2005).
270. Hanafi, M. Y., Saleh, M. M., Saad, M. I., Abdelkhalek, T. M. & Kamel, M. A. Transgenerational effects of obesity and malnourishment on diabetes risk in F2 generation. *Mol. Cell. Biochem.* **412**, 269–280 (2016).
271. Aird, W. C. Phenotypic Heterogeneity of the Endothelium. *Circ. Res.* **100**, 158–173 (2007).
272. Bennett, H. S., Luft, J. H. & Hampton, J. C. Morphological classifications of vertebrate blood capillaries. *Am. J. Physiol.-Leg. Content* **196**, 381–390 (1959).
273. Palade, G. E. & Bruns, R. R. Structural modulations of plasmalemmal vesicles. *J. Cell Biol.* **37**, 633–649 (1968).
274. Cao, R., Brakenhielm, E., Wahlestedt, C., Thyberg, J. & Cao, Y. Leptin induces vascular permeability and synergistically stimulates angiogenesis with FGF-2 and VEGF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 6390–6395 (2001).
275. Briot Anaïs *et al.* Senescence Alters PPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma)-Dependent Fatty Acid Handling in Human Adipose Tissue Microvascular Endothelial Cells and Favors Inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **38**, 1134–1146 (2018).
276. Villaret, A. *et al.* Adipose Tissue Endothelial Cells From Obese Human Subjects: Differences Among Depots in Angiogenic, Metabolic, and Inflammatory Gene Expression and Cellular Senescence. *Diabetes* **59**, 2755–2763 (2010).
277. Paik, D. T. *et al.* Single-Cell RNA Sequencing Unveils Unique Transcriptomic Signatures of Organ-Specific Endothelial Cells. *Circulation* **142**, 1848–1862 (2020).
278. Bastard, J.-P. & Fève, B. *Physiologie et physiopathologie du tissu adipeux.* (Springer, 2012).
279. Frayn, K. N. & Karpe, F. Regulation of human subcutaneous adipose tissue blood flow. *Int. J. Obes.* **38**, 1019–1026 (2014).

280. Bulow, J., Astrup, A., Christensen, N. J. & Kastrup, J. Blood flow in skin, subcutaneous adipose tissue and skeletal muscle in the forearm of normal man during an oral glucose load. *Acta Physiol. Scand.* **130**, 657–661 (1987).
281. Tobin, L., Simonsen, L. & Bülow, J. Real-time contrast-enhanced ultrasound determination of microvascular blood volume in abdominal subcutaneous adipose tissue in man. Evidence for adipose tissue capillary recruitment. *Clin. Physiol. Funct. Imaging* **30**, 447–452 (2010).
282. Herd, J., Goodman, H. & Grose, S. Blood flow rates through adipose tissues of unanesthetized rats. *Am. J. Physiol.-Leg. Content* **214**, 263–268 (1968).
283. Karpe, F. *et al.* Impaired postprandial adipose tissue blood flow response is related to aspects of insulin sensitivity. *Diabetes* **51**, 2467–2473 (2002).
284. Ferrannini, E. *et al.* Adipose tissue and skeletal muscle insulin-mediated glucose uptake in insulin resistance: role of blood flow and diabetes. *Am. J. Clin. Nutr.* **108**, 749–758 (2018).
285. Millet, L., Barbe, P., Lafontan, M., Berlan, M. & Galitzky, J. Catecholamine effects on lipolysis and blood flow in human abdominal and femoral adipose tissue. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* **1985** **85**, 181–188 (1998).
286. Fleming, I. & Busse, R. Control and consequences of endothelial nitric oxide formation. *Adv. Pharmacol. San Diego Calif* **34**, 187–206 (1995).
287. Venema, R. C., Sayegh, H. S., Arnal, J. F. & Harrison, D. G. Role of the enzyme calmodulin-binding domain in membrane association and phospholipid inhibition of endothelial nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* **270**, 14705–14711 (1995).
288. Arnold, W. P., Mittal, C. K., Katsuki, S. & Murad, F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 3203–3207 (1977).
289. Ardilouze, J.-L., Fielding, B. A., Currie, J. M., Frayn, K. N. & Karpe, F. Nitric oxide and beta-adrenergic stimulation are major regulators of preprandial and postprandial subcutaneous adipose tissue blood flow in humans. *Circulation* **109**, 47–52 (2004).
290. Georgescu, A. *et al.* Dysfunction of human subcutaneous fat arterioles in obesity alone or obesity associated with Type 2 diabetes. *Clin. Sci. Lond. Engl.* **1979** **120**, 463–472 (2011).
291. Asmar, M. *et al.* GIP-induced vasodilation in human adipose tissue involves capillary recruitment. *Endocr. Connect.* **8**, 806–813 (2019).
292. van Hinsbergh, V. W. M. Endothelium--role in regulation of coagulation and inflammation. *Semin. Immunopathol.* **34**, 93–106 (2012).
293. Sagripanti, A. & Carpi, A. Antithrombotic and prothrombotic activities of the vascular endothelium. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* **54**, 107–111 (2000).
294. Vestweber, D. How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 692–704 (2015).
295. Panés, J., Perry, M. & Granger, D. N. Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. *Br. J. Pharmacol.* **126**, 537–550 (1999).
296. Hasegawa, Y. *et al.* Blockade of the nuclear factor- κ B pathway in the endothelium prevents insulin resistance and prolongs life spans. *Circulation* **125**, 1122–1133 (2012).
297. Ferri, C. *et al.* Early upregulation of endothelial adhesion molecules in obese hypertensive men. *Hypertens. Dallas Tex* **1979** **34**, 568–573 (1999).
298. Ito, H. *et al.* Weight reduction decreases soluble cellular adhesion molecules in obese women. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **29**, 399–404 (2002).
299. Mehta, D. & Malik, A. B. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol. Rev.* **86**, 279–367 (2006).
300. Milici, A. J., Watrous, N. E., Stukenbrok, H. & Palade, G. E. Transcytosis of albumin in capillary endothelium. *J. Cell Biol.* **105**, 2603–2612 (1987).
301. Falcone, S. *et al.* Macropinocytosis: regulated coordination of endocytic and exocytic membrane traffic events. *J. Cell Sci.* **119**, 4758–4769 (2006).

302. Dowrick, P., Kenworthy, P., McCann, B. & Warn, R. Circular ruffle formation and closure lead to macropinocytosis in hepatocyte growth factor/scatter factor-treated cells. *Eur. J. Cell Biol.* **61**, 44–53 (1993).
303. Gu, Z., Noss, E. H., Hsu, V. W. & Brenner, M. B. Integrins traffic rapidly via circular dorsal ruffles and macropinocytosis during stimulated cell migration. *J. Cell Biol.* **193**, 61–70 (2011).
304. Mellström, K., Heldin, C. H. & Westermark, B. Induction of circular membrane ruffling on human fibroblasts by platelet-derived growth factor. *Exp. Cell Res.* **177**, 347–359 (1988).
305. Krueger, E. W., Orth, J. D., Cao, H. & McNiven, M. A. A dynamin-cortactin-Arp2/3 complex mediates actin reorganization in growth factor-stimulated cells. *Mol. Biol. Cell* **14**, 1085–1096 (2003).
306. Wymann, M. & Arcaro, A. Platelet-derived growth factor-induced phosphatidylinositol 3-kinase activation mediates actin rearrangements in fibroblasts. *Biochem. J.* **298 Pt 3**, 517–520 (1994).
307. Lee, S.-W. *et al.* EGFR-Pak Signaling Selectively Regulates Glutamine Deprivation-Induced Macropinocytosis. *Dev. Cell* **50**, 381–392.e5 (2019).
308. Lou, J., Low-Nam, S. T., Kerkvliet, J. G. & Hoppe, A. D. Delivery of CSF-1R to the lumen of macropinosomes promotes its destruction in macrophages. *J. Cell Sci.* **127**, 5228–5239 (2014).
309. Ludwig, A., Nichols, B. J. & Sandin, S. Architecture of the caveolar coat complex. *J. Cell Sci.* **129**, 3077–3083 (2016).
310. Simionescu, M., Simionescu, N. & Palade, G. E. Morphometric data on the endothelium of blood capillaries. *J. Cell Biol.* **60**, 128–152 (1974).
311. Hao, J.-W. *et al.* CD36 facilitates fatty acid uptake by dynamic palmitoylation-regulated endocytosis. *Nat. Commun.* **11**, 4765 (2020).
312. Mironov, A. A., Mironov, A., Sanavio, B., Krol, S. & Beznoussenko, G. V. Intracellular Membrane Transport in Vascular Endothelial Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 5791 (2023).
313. Li, H.-H. *et al.* Caveolae-dependent and -independent uptake of albumin in cultured rodent pulmonary endothelial cells. *PLoS One* **8**, e81903 (2013).
314. Mellman, I. Endocytosis and molecular sorting. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**, 575–625 (1996).
315. Pi, X., Xie, L. & Patterson, C. Emerging Roles of Vascular Endothelium in Metabolic Homeostasis. *Circ. Res.* **123**, 477–494 (2018).
316. Beigneux, A. P. *et al.* Glycosylphosphatidylinositol-Anchored High-Density Lipoprotein-Binding Protein 1 Plays a Critical Role in the Lipolytic Processing of Chylomicrons. *Cell Metab.* **5**, 279–291 (2007).
317. Davies, B. S. J. *et al.* Assessing mechanisms of GPIHBP1 and lipoprotein lipase movement across endothelial cells. *J. Lipid Res.* **53**, 2690–2697 (2012).
318. Elmasri, H. *et al.* Fatty acid binding protein 4 is a target of VEGF and a regulator of cell proliferation in endothelial cells. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **23**, 3865–3873 (2009).
319. Greenwalt, D. E., Watt, K. W., Hasler, T., Howard, R. J. & Patel, S. Structural, functional, and antigenic differences between bovine heart endothelial CD36 and human platelet CD36. *J. Biol. Chem.* **265**, 16296–16299 (1990).
320. Abumrad, N. A., el-Maghrabi, M. R., Amri, E. Z., Lopez, E. & Grimaldi, P. A. Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J. Biol. Chem.* **268**, 17665–17668 (1993).
321. Coburn, C. T. *et al.* Defective uptake and utilization of long chain fatty acids in muscle and adipose tissues of CD36 knockout mice. *J. Biol. Chem.* **275**, 32523–32529 (2000).
322. Iso, T. *et al.* Capillary endothelial fatty acid binding proteins 4 and 5 play a critical role in fatty acid uptake in heart and skeletal muscle. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **33**, 2549–2557 (2013).
323. Ahmadian, M. *et al.* PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat. Med.* **19**, 10.1038/nm.3159 (2013).
324. Kanda, T. *et al.* PPAR γ in the endothelium regulates metabolic responses to high-fat diet in mice. *J. Clin. Invest.* **119**, 110–124 (2009).

325. Hagberg, C. E. *et al.* Vascular endothelial growth factor B controls endothelial fatty acid uptake. *Nature* **464**, 917–921 (2010).
326. Moessinger, C. *et al.* VEGF-B signaling impairs endothelial glucose transcytosis by decreasing membrane cholesterol content. *EMBO Rep.* **21**, e49343 (2020).
327. Taylor, G. I. & Palmer, J. H. The vascular territories (angiosomes) of the body: experimental study and clinical applications. *Br. J. Plast. Surg.* **40**, 113–141 (1987).
328. Ledoux, S. *et al.* Angiogenesis associated with visceral and subcutaneous adipose tissue in severe human obesity. *Diabetes* **57**, 3247–3257 (2008).
329. Bouloumié, A., Drexler, H. C., Lafontan, M. & Busse, R. Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis. *Circ. Res.* **83**, 1059–1066 (1998).
330. Kolonin, M. G., Saha, P. K., Chan, L., Pasqualini, R. & Arap, W. Reversal of obesity by targeted ablation of adipose tissue. *Nat. Med.* **10**, 625–632 (2004).
331. Nishimura, S. *et al.* Adipogenesis in Obesity Requires Close Interplay Between Differentiating Adipocytes, Stromal Cells, and Blood Vessels. *Diabetes* **56**, 1517–1526 (2007).
332. Sun, K. *et al.* Dichotomous effects of VEGF-A on adipose tissue dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 5874–5879 (2012).
333. Dumas, S. J., García-Caballero, M. & Carmeliet, P. Metabolic Signatures of Distinct Endothelial Phenotypes. *Trends Endocrinol. Metab.* **31**, 580–595 (2020).
334. Eelen, G. *et al.* Endothelial Cell Metabolism. *Physiol. Rev.* **98**, 3–58 (2018).
335. Monelli, E. *et al.* Angiocrine polyamine production regulates adiposity. *Nat. Metab.* **4**, 327–343 (2022).
336. Crewe, C. *et al.* An Endothelial to Adipocyte Extracellular Vesicle Axis Governed by Metabolic State. *Cell* **175**, 695 (2018).
337. Campisi, J. & d’Adda di Fagagna, F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 729–740 (2007).
338. Childs, B. G., Baker, D. J., Kirkland, J. L., Campisi, J. & van Deursen, J. M. Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep.* **15**, 1139–1153 (2014).
339. Muñoz-Espín, D. & Serrano, M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 482–496 (2014).
340. Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A. & Campisi, J. The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annu. Rev. Pathol.* **5**, 99–118 (2010).
341. Basisty, N. *et al.* A proteomic atlas of senescence-associated secretomes for aging biomarker development. *PLoS Biol.* **18**, e3000599 (2020).
342. González-Gualda, E., Baker, A. G., Fruk, L. & Muñoz-Espín, D. A guide to assessing cellular senescence in vitro and in vivo. *FEBS J.* **288**, 56–80 (2021).
343. Chang, J. *et al.* Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat. Med.* **22**, 78–83 (2016).
344. Khosla, S., Farr, J. N., Tchkonja, T. & Kirkland, J. L. The role of cellular senescence in ageing and endocrine disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* **16**, 263–275 (2020).
345. Roos, C. M. *et al.* Chronic senolytic treatment alleviates established vasomotor dysfunction in aged or atherosclerotic mice. *Aging Cell* **15**, 973–977 (2016).
346. Xu, M. *et al.* Targeting senescent cells enhances adipogenesis and metabolic function in old age. *eLife* **4**, e12997 (2015).
347. Spinelli, R. *et al.* Molecular basis of ageing in chronic metabolic diseases. *J. Endocrinol. Invest.* **43**, 1373–1389 (2020).
348. Gustafson, B., Nerstedt, A. & Smith, U. Reduced subcutaneous adipogenesis in human hypertrophic obesity is linked to senescent precursor cells. *Nat. Commun.* **10**, 2757 (2019).
349. Boulet, N. *et al.* Notch activation shifts the fate decision of senescent progenitors toward myofibrogenesis in human adipose tissue. *Aging Cell* **22**, e13776 (2023).
350. Xu, M. *et al.* Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nat. Med.* **24**, 1246–1256 (2018).

351. Wu, C.-M., Zheng, L., Wang, Q. & Hu, Y.-W. The emerging role of cell senescence in atherosclerosis. *Clin. Chem. Lab. Med.* **59**, 27–38 (2020).
352. Roger, I., Milara, J., Belhadj, N. & Cortijo, J. Senescence Alterations in Pulmonary Hypertension. *Cells* **10**, 3456 (2021).
353. Teti, G. *et al.* Cellular senescence in vascular wall mesenchymal stromal cells, a possible contribution to the development of aortic aneurysm. *Mech. Ageing Dev.* **197**, 111515 (2021).
354. Chala, N. *et al.* Mechanical Fingerprint of Senescence in Endothelial Cells. *Nano Lett.* **21**, 4911–4920 (2021).
355. Ma, S. *et al.* Caloric Restriction Reprograms the Single-Cell Transcriptional Landscape of Rattus Norvegicus Aging. *Cell* **180**, 984–1001.e22 (2020).
356. Yousefzadeh, M. J. *et al.* Tissue specificity of senescent cell accumulation during physiologic and accelerated aging of mice. *Aging Cell* **19**, e13094 (2020).
357. Maeda, M., Hayashi, T., Mizuno, N., Hattori, Y. & Kuzuya, M. Intermittent high glucose implements stress-induced senescence in human vascular endothelial cells: role of superoxide production by NADPH oxidase. *PLoS One* **10**, e0123169 (2015).
358. Mortuza, R., Chen, S., Feng, B., Sen, S. & Chakrabarti, S. High glucose induced alteration of SIRT6 in endothelial cells causes rapid aging in a p300 and FOXO regulated pathway. *PLoS One* **8**, e54514 (2013).
359. Oh, S.-T., Park, H., Yoon, H. J. & Yang, S. Y. Long-Term Treatment of Native LDL Induces Senescence of Cultured Human Endothelial Cells. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, 6487825 (2017).
360. Erusalimsky, J. D. & Kurz, D. J. Cellular senescence in vivo: its relevance in ageing and cardiovascular disease. *Exp. Gerontol.* **40**, 634–642 (2005).
361. Barinda, A. J. *et al.* Endothelial progeria induces adipose tissue senescence and impairs insulin sensitivity through senescence associated secretory phenotype. *Nat. Commun.* **11**, 481 (2020).
362. Grunewald, M. *et al.* Counteracting age-related VEGF signaling insufficiency promotes healthy aging and extends life span. *Science* **373**, (2021).
363. Bridges, C. B. Non-Disjunction as Proof of the Chromosome Theory of Heredity (Concluded). *Genetics* **1**, 107–163 (1916).
364. Fernández, R. & Gabaldón, T. Gene gain and loss across the metazoan tree of life. *Nat. Ecol. Evol.* **4**, 524–533 (2020).
365. Gazave, E. *et al.* Origin and evolution of the Notch signalling pathway: an overview from eukaryotic genomes. *BMC Evol. Biol.* **9**, 249 (2009).
366. Benmiloud, S. *et al.* Le syndrome d’Alagille. *J. Pédiatrie Puériculture* **22**, 278–285 (2009).
367. Ferrando, A. A. The role of NOTCH1 signaling in T-ALL. *Hematol. Educ. Program Am. Soc. Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 353–361 (2009) doi:10.1182/asheducation-2009.1.353.
368. Joutel, A. *et al.* Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature* **383**, 707–710 (1996).
369. Garg, V. *et al.* Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. *Nature* **437**, 270–274 (2005).
370. Kopan, R. & Ilagan, M. X. G. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* **137**, 216–233 (2009).
371. Kovall, R. A., Gebelein, B., Sprinzak, D. & Kopan, R. The Canonical Notch Signaling Pathway: Structural and Biochemical Insights into Shape, Sugar, and Force. *Dev. Cell* **41**, 228–241 (2017).
372. Logeat, F. *et al.* The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 8108–8112 (1998).
373. Bousseau, S. *et al.* Glycosylation as new pharmacological strategies for diseases associated with excessive angiogenesis. *Pharmacol. Ther.* **191**, 92–122 (2018).
374. Conner, S. D. Regulation of Notch Signaling Through Intracellular Transport. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **323**, 107–127 (2016).
375. Zhou, B. *et al.* Notch signaling pathway: architecture, disease, and therapeutics. *Signal Transduct. Target. Ther.* **7**, 95 (2022).
376. Antfolk, D., Antila, C., Kemppainen, K., Landor, S. K.-J. & Sahlgren, C. Decoding the PTM-switchboard of Notch. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **1866**, 118507 (2019).

377. Moretti, J. & Brou, C. Ubiquitinations in the Notch Signaling Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 6359–6381 (2013).
378. Fontana, J. R. & Posakony, J. W. Both inhibition and activation of Notch signaling rely on a conserved Neuralized-binding motif in Bearded proteins and the Notch ligand Delta. *Dev. Biol.* **333**, 373–385 (2009).
379. Zeronian, M. R. *et al.* Notch-Jagged signaling complex defined by an interaction mosaic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **118**, e2102502118 (2021).
380. Hoyne, G. F., Chapman, G., Sontani, Y., Pursglove, S. E. & Dunwoodie, S. L. A cell autonomous role for the Notch ligand Delta-like 3 in $\alpha\beta$ T-cell development. *Immunol. Cell Biol.* **89**, 696–705 (2011).
381. Nandagopal, N., Santat, L. A. & Elowitz, M. B. Cis-activation in the Notch signaling pathway. *eLife* **8**, e37880 (2019).
382. Stephenson, N. L. & Avis, J. M. Direct observation of proteolytic cleavage at the S2 site upon forced unfolding of the Notch negative regulatory region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, E2757–2765 (2012).
383. Groot, A. J. & Vooijs, M. A. The role of Adams in Notch signaling. *Adv. Exp. Med. Biol.* **727**, 15–36 (2012).
384. Steinbuck, M. P., Arakcheeva, K. & Winandy, S. Novel TCR-Mediated Mechanisms of Notch Activation and Signaling. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **200**, 997–1007 (2018).
385. Jing, E. *et al.* Sirtuin-3 (Sirt3) regulates skeletal muscle metabolism and insulin signaling via altered mitochondrial oxidation and reactive oxygen species production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 14608–14613 (2011).
386. Song, L. L. *et al.* Notch-1 associates with IKK α and regulates IKK activity in cervical cancer cells. *Oncogene* **27**, 5833–5844 (2008).
387. Yue, F. *et al.* Pten is necessary for the quiescence and maintenance of adult muscle stem cells. *Nat. Commun.* **8**, 14328 (2017).
388. Chen, L.-J. *et al.* Gm364 coordinates MIB2/DLL3/Notch2 to regulate female fertility through AKT activation. *Cell Death Differ.* **29**, 366–380 (2022).
389. Mangolini, M. *et al.* Notch2 controls non-autonomous Wnt-signalling in chronic lymphocytic leukaemia. *Nat. Commun.* **9**, 3839 (2018).
390. Luo, K. Signaling Cross Talk between TGF- β /Smad and Other Signaling Pathways. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **9**, a022137 (2017).
391. Polacheck, W. J. *et al.* A non-canonical Notch complex regulates adherens junctions and vascular barrier function. *Nature* **552**, 258–262 (2017).
392. Ferrara, N., Gerber, H.-P. & LeCouter, J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* **9**, 669–676 (2003).
393. Arima, S. *et al.* Angiogenic morphogenesis driven by dynamic and heterogeneous collective endothelial cell movement. *Dev. Camb. Engl.* **138**, 4763–4776 (2011).
394. Jandeleit-Dahm, K. A. M. & Schmidt, H. H. W. Comment on: Sukumar *et al.* Nox2 NADPH Oxidase Has a Critical Role in Insulin Resistance-Related Endothelial Cell Dysfunction. *Diabetes* **2013**;62:2130–2134. *Diabetes* **62**, e30 (2013).
395. Roukens, M. G. *et al.* Control of endothelial sprouting by a Tel-CtBP complex. *Nat. Cell Biol.* **12**, 933–942 (2010).
396. Ramasamy, S. K., Kusumbe, A. P., Wang, L. & Adams, R. H. Endothelial Notch activity promotes angiogenesis and osteogenesis in bone. *Nature* **507**, 376–380 (2014).
397. Masumura, T., Yamamoto, K., Shimizu, N., Obi, S. & Ando, J. Shear stress increases expression of the arterial endothelial marker ephrinB2 in murine ES cells via the VEGF-Notch signaling pathways. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 2125–2131 (2009).
398. Mack, J. J. *et al.* NOTCH1 is a mechanosensor in adult arteries. *Nat. Commun.* **8**, 1620 (2017).
399. Tarbell, J. M., Simon, S. I. & Curry, F.-R. E. Mechanosensing at the vascular interface. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **16**, 505–532 (2014).
400. Caolo, V. *et al.* Shear stress activates ADAM10 sheddase to regulate Notch1 via the Piezo1 force sensor in endothelial cells. *eLife* **9**, e50684 (2020).

401. Majumdar, U. *et al.* Nitric oxide prevents aortic valve calcification by S-nitrosylation of USP9X to activate NOTCH signaling. *Sci. Adv.* **7**, eabe3706 (2021).
402. Maillard, I., Adler, S. H. & Pear, W. S. Notch and the Immune System. *Immunity* **19**, 781–791 (2003).
403. Mantovani, A., Bussolino, F. & Introna, M. Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to the bedside. *Immunol. Today* **18**, 231–240 (1997).
404. Briot, A. *et al.* Endothelial NOTCH1 is suppressed by circulating lipids and antagonizes inflammation during atherosclerosis. *J. Exp. Med.* **212**, 2147–2163 (2015).
405. Boulday, G., Coupel, S., Coulon, F., Souillou, J.-P. & Charreau, B. Antigrft Antibody-Mediated Expression of Metalloproteinases on Endothelial Cells. *Circ. Res.* **88**, 430–437 (2001).
406. Quillard, T., Devallière, J., Coupel, S. & Charreau, B. Inflammation dysregulates Notch signaling in endothelial cells: Implication of Notch2 and Notch4 to endothelial dysfunction. *Biochem. Pharmacol.* **80**, 2032–2041 (2010).
407. Yang, J. M. *et al.* Dll4 Suppresses Transcytosis for Arterial Blood-Retinal Barrier Homeostasis. *Circ. Res.* **126**, 767–783 (2020).
408. Hasan, S. S. *et al.* Endothelial Notch signaling controls insulin transport in muscle. *EMBO Mol. Med.* **12**, e09271 (2020).
409. Lee, S. *et al.* Metalloproteinase processing of HBEGF is a proximal event in the response of human aortic endothelial cells to oxidized phospholipids. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 1246–1254 (2012).
410. Chillakuri, C. R. *et al.* Structural analysis uncovers lipid-binding properties of Notch ligands. *Cell Rep.* **5**, 861–867 (2013).
411. Hirata, N. *et al.* Sphingosine-1-phosphate promotes expansion of cancer stem cells via S1PR3 by a ligand-independent Notch activation. *Nat. Commun.* **5**, 4806 (2014).
412. Cheng, C.-W. *et al.* Ketone Body Signaling Mediates Intestinal Stem Cell Homeostasis and Adaptation to Diet. *Cell* **178**, 1115–1131.e15 (2019).
413. Hachisuga, M. *et al.* Hyperglycemia impairs left–right axis formation and thereby disturbs heart morphogenesis in mouse embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, E5300–E5307 (2015).
414. Capeau, J. *et al.* Human lipodystrophies: genetic and acquired diseases of adipose tissue. *Endocr. Dev.* **19**, 1–20 (2010).
415. Shadid, S. & Jensen, M. D. Effects of Pioglitazone Versus Diet and Exercise on Metabolic Health and Fat Distribution in Upper Body Obesity. *Diabetes Care* **26**, 3148–3152 (2003).
416. Rask-Andersen, M., Karlsson, T., Ek, W. E. & Johansson, Å. Genome-wide association study of body fat distribution identifies adiposity loci and sex-specific genetic effects. *Nat. Commun.* **10**, 339 (2019).
417. Jabs, M. *et al.* Inhibition of Endothelial Notch Signaling Impairs Fatty Acid Transport and Leads to Metabolic and Vascular Remodeling of the Adult Heart. *Circulation* **137**, 2592–2608 (2018).
418. Harjes, U., Bridges, E., McIntyre, A., Fielding, B. A. & Harris, A. L. Fatty Acid-binding Protein 4, a Point of Convergence for Angiogenic and Metabolic Signaling Pathways in Endothelial Cells*. *J. Biol. Chem.* **289**, 23168–23176 (2014).
419. Jensen, M. D. Role of Body Fat Distribution and the Metabolic Complications of Obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **93**, S57–S63 (2008).
420. Prabakaran, S., Schwartz, A. & Lundberg, G. Cardiovascular risk in menopausal women and our evolving understanding of menopausal hormone therapy: risks, benefits, and current guidelines for use. *Ther. Adv. Endocrinol. Metab.* **12**, 20420188211013916 (2021).
421. Morishima, A., Grumbach, M. M., Simpson, E. R., Fisher, C. & Qin, K. Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **80**, 3689–3698 (1995).
422. Emont, M. P. *et al.* A single-cell atlas of human and mouse white adipose tissue. *Nature* 1–8 (2022) doi:10.1038/s41586-022-04518-2.
423. Maniyadath, B., Zhang, Q., Gupta, R. K. & Mandrup, S. Adipose tissue at single-cell resolution. *Cell Metab.* **35**, 386–413 (2023).

424. Longden, T. A. *et al.* Capillary K⁺-sensing initiates retrograde hyperpolarization to increase local cerebral blood flow. *Nat. Neurosci.* **20**, 717–726 (2017).
425. Aupetit, A. *et al.* Endothelial DLL4 Is an Adipose Depot–Specific Fasting Sensor Regulating Fatty Acid Fluxes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **0**,
426. Kume, T. Novel insights into the differential functions of Notch ligands in vascular formation. *J. Angiogenesis Res.* **1**, 8 (2009).
427. Sun, S. *et al.* Constitutive Activation of mTORC1 in Endothelial Cells Leads to the Development and Progression of Lymphangiosarcoma through VEGF Autocrine Signaling. *Cancer Cell* **28**, 758–772 (2015).
428. Bi, P. & Kuang, S. Notch signaling as a novel regulator of metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* **26**, 248–255 (2015).
429. Obniski, R., Sieber, M. & Spradling, A. C. Dietary Lipids Modulate Notch Signaling and Influence Adult Intestinal Development and Metabolism in *Drosophila*. *Dev. Cell* **47**, 98-111.e5 (2018).
430. Eliazer, S., Sun, X., Barruet, E. & Brack, A. S. Heterogeneous levels of delta-like 4 within a multinucleated niche cell maintains muscle stem cell diversity. *eLife* **11**, e68180 (2022).
431. Yoon, J.-H. *et al.* NOTCH1 intracellular domain negatively regulates PAK1 signaling pathway through direct interaction. *Biochim. Biophys. Acta* **1863**, 179–188 (2016).
432. Smith, R. L., Soeters, M. R., Wüst, R. C. I. & Houtkooper, R. H. Metabolic Flexibility as an Adaptation to Energy Resources and Requirements in Health and Disease. *Endocr. Rev.* **39**, 489–517 (2018).
433. McQuaid, S. E. *et al.* Downregulation of Adipose Tissue Fatty Acid Trafficking in Obesity. *Diabetes* **60**, 47–55 (2011).
434. Stroeve, J. H. M., van Wietmarschen, H., Kremer, B. H. A., van Ommen, B. & Wopereis, S. Phenotypic flexibility as a measure of health: the optimal nutritional stress response test. *Genes Nutr.* **10**, 1–21 (2015).
435. Kim, J. I. *et al.* Lipid-Overloaded Enlarged Adipocytes Provoke Insulin Resistance Independent of Inflammation. *Mol. Cell. Biol.* **35**, 1686–1699 (2015).
436. Palmer, A. K. *et al.* Targeting senescent cells alleviates obesity-induced metabolic dysfunction. *Aging Cell* **18**, e12950 (2019).