



**HAL**  
open science

# Lipase hormono-sensible nucléaire et signalisation TGFbeta de l'adipocyte

Jeremy Dufau

► **To cite this version:**

Jeremy Dufau. Lipase hormono-sensible nucléaire et signalisation TGFbeta de l'adipocyte. Médecine humaine et pathologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2022. Français. NNT : 2022TOU30158 . tel-04743909

**HAL Id: tel-04743909**

**<https://theses.hal.science/tel-04743909v1>**

Submitted on 18 Oct 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.



# 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  
**Jérémy DUFAU**

Le 12 juillet 2022

**Lipase hormono-sensible nucléaire et signalisation TGFbeta de  
l'adipocyte**

---

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

Spécialité : **BIOLOGIE CELLULAIRE**

Unité de recherche :

**I2MC - Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires**

Thèse dirigée par

**Dominique LANGIN et Etienne MOISEL**

Jury

**M. Ulrich VALCOURT**, Rapporteur

**M. Philippe GUAL**, Rapporteur

**M. Xavier PRIEUR**, Rapporteur

**Mme Jennifer RIEUSSET**, Examinatrice

**Mme Isabelle CASTAN-LAURELL**, Examinatrice

**M. Dominique LANGIN**, Directeur de thèse

**M. Etienne MOISEL**, Co-directeur de thèse



## Sommaire

<b>Principales abréviations .....</b>	<b>4</b>
<b>Avant-propos .....</b>	<b>7</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>9</b>
<b>Chapitre 1 : Tissu adipeux et adipocytes .....</b>	<b>9</b>
<b>I. Description anatomique et composition cellulaire .....</b>	<b>9</b>
I.1 Localisation anatomique.....	9
I.2 L'adipocyte .....	11
I.3 La fraction stroma-vasculaire.....	12
<b>II. Diversité adipocytaire du tissu adipeux blanc.....</b>	<b>13</b>
II.1 Adipocyte blanc : métabolisme et sécrétions.....	14
II.2 Adipocyte beige : métabolisme et thermogénèse.....	18
<b>III. Modèles d'étude des adipocytes .....</b>	<b>23</b>
<b>Chapitre 2 : La lipase hormono-sensible.....</b>	<b>45</b>
<b>I. Description de la protéine .....</b>	<b>45</b>
I.1 Profil d'expression tissulaire .....	45
I.2 Domaines protéiques.....	46
<b>II. Rôles enzymatiques.....</b>	<b>47</b>
II.1 Substrats .....	47
II.2 Régulation .....	49
<b>III. Rôle non enzymatique.....</b>	<b>51</b>
<b>IV. Phénotype de la déficience <i>in vivo</i> .....</b>	<b>53</b>
IV.1 Lipodystrophie .....	53

IV.2 Beigissement.....	56
<b>Chapitre 3 : Les voies de la superfamille du TGF<math>\beta</math> dans le tissu adipeux.....</b>	<b>58</b>
<b>I. Les voies de la superfamille TGF<math>\beta</math>.....</b>	<b>58</b>
I.1 Ligands .....	58
I.2 Récepteurs .....	62
I.3 Les protéines SMADs .....	63
<b>II. Les voies de la superfamille du TGF<math>\beta</math> dans l'adipocyte.....</b>	<b>66</b>
II.1 Production de ligands dans le tissu adipeux.....	66
II.2 Prolifération des progéniteurs adipocytaires .....	67
II.3 Adipogenèse et métabolisme de l'adipocyte blanc.....	69
II.4 Formation d'adipocytes thermogéniques .....	71
<b>Objectifs de thèse .....</b>	<b>75</b>
<b>Objectif 1 .....</b>	<b>76</b>
I. Résultats .....	76
II. Article .....	80
III. Discussion et perspectives.....	104
<b>Objectif 2 .....</b>	<b>107</b>
I. Article .....	107
II. Données non montrées .....	160
III. Discussion et perspectives.....	167
<b>Conclusion Générale.....</b>	<b>184</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>187</b>

**Annexes ..... 205**

## Principales abréviations

AA : acide aminé

AAV : adeno-associated virus

ADP : adénosine diphosphate

AG : acide gras

AgRP : agouti-related protein

AMPC : adénosine monophosphate cyclique

AMPK : AMP-activated protein kinase

ATF : activating transcription factor

ATGL : adipose triglyceride lipase

ATP : adénosine triphosphate

BMP : bone morphogenic protein

C/EBP : CCAAT/enhancer-binding protein

CGI-58 : comparative gene identification-58

ChIP : chromatin immunoprecipitation

ChREBP : carbohydrate response element binding protein

CKB : creatine kinase B

CREB : cAMP response element binding protein

DG : diglycéride

DBHS : drosophila behavior/human splicing

eCLIP : enhanced UV crosslinking and immunoprecipitation

ELOVL : elongation of very long chain fatty acids protein

ERK : extracellular signal-regulated kinase

FABP : fatty acid binding protein

FAHFA : fatty acyl esters of hydroxy fatty acid

FSV : fraction stroma-vasculaire

GDF : growth differentiation factor

GL : gouttelette lipidique

GMPc : guanosine monophosphate cyclique

IL : interleukine

LHS : lipase hormono-sensible

LLC : large latent complex

LTBP : latent TGF $\beta$ -binding protein

MAPK : mitogen-activated protein kinase

MEC : matrice extracellulaire

MG : monoglycéride

MGL : monoglycéride lipase

NF $\kappa$ B : nuclear factor-kappa B

NES : nuclear export signal

NLS : nuclear localisation signal

NONO : Non-POU domain-containing octamer-binding protein

OMS : organisation mondiale de la santé

PGC-1 $\alpha$  : peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha

PHLPP2 : PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase 2

PKA : protéine kinase A

PKG : protéine kinase G



PLA : proximity ligation assay

PML : premyelocytic leukemia

POMC : proopiomélanocortine

PPAR : peroxisome proliferator-activated receptor

PTRF : polymerase I and transcript release factor

RBP : RNA binding protein

RIP140 : receptor-interacting protein 140

ROS : reactive oxygen species

SMAD : small mothers against decapentaplegic

SFPQ : splicing factor proline and glutamine rich

STAT : signal transducer and activator of transcription

TA : tissu adipeux

TG : triglycéride

TGF $\beta$  : transforming growth factor beta

TLR : toll-like receptor

TNAP : tissue-nonspecific alkaline phosphatase

TNF $\alpha$  : tumor necrosis factor alpha

UCP1 : uncoupling protein 1

UV : ultra-violets

## Avant-propos

L'obésité est définie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui peut nuire à la santé (OMS 2020). Elle estimait en 2016 que 39% de la population mondiale était en surpoids et 13% obèse, un chiffre en constante augmentation puisqu'ayant triplé depuis 1975. L'obésité est un facteur de risque majeur dans l'apparition de diverses complications métaboliques comme le diabète de type 2, mais également cardiovasculaires ainsi que de cancers. Le diabète de type 2 est une pathologie dont la prévalence ne cesse d'augmenter. Alors que des estimations au début des années 2000 prédisaient que 360 millions d'individus seraient atteints de diabète de type 2 en 2030, 422 millions de personnes ont été déclarés diabétiques en 2014, contre 108 millions en 1980 selon l'OMS. Elle estime également que 1,5 million de décès ont été directement provoqués par le diabète en 2019. Le diabète de type 2 est un facteur important de risque d'apparition de lésions vasculaires, entraînant des pathologies cardiaques, rénales, oculaires et nerveuses. D'un point de vue clinique, il est caractérisé par une hyperglycémie à jeun, résultante d'une résistance à l'action de l'hormone hypoglycémisante qu'est l'insuline au niveau de divers tissus dont le muscle squelettique, le foie et le tissu adipeux. La résistance à l'action de l'insuline découle de divers mécanismes, notamment du dépôt de substrats lipidiques dits ectopiques dans les différents tissus métaboliques qui ne peuvent plus être stockés correctement au niveau du tissu adipeux qui aura atteint sa capacité maximale de stockage (Klein et al. 2022). Cependant, les pathologies liées à des altérations de masse grasse ne se cantonnent pas uniquement à son surplus. Le terme clinique de lipodystrophies regroupe ainsi un ensemble de pathologies dans lesquelles les patients présentent un défaut de développement ou de répartition du tissu adipeux (Lim et al. 2021). Ces pathologies sont largement moins représentées dans la population, touchant environ 1 personne sur 1 million. Cependant, du fait d'une incapacité du tissu adipeux à stocker les substrats lipidiques de manière saine, elles entraînent ainsi les mêmes complications métaboliques que l'obésité, avec des formes avancées de diabète de type 2. De ce fait, le bon fonctionnement du tissu adipeux et de sa principale cellule, l'adipocyte, apparaît comme primordial dans le maintien d'une bonne santé chez l'humain, et l'étude de leurs fonctionnements physiologiques et physiopathologiques représente un enjeu de santé publique majeur. L'intérêt porté à l'étude du tissu adipeux ne cesse d'ailleurs d'augmenter (Rosen and Spiegelman 2014). Dans le tissu

adipeux, l'adipocyte est notamment responsable du stockage et de la mobilisation des substrats énergétiques lipidiques associés sous forme de triglycérides (Morigny et al. 2021). La mobilisation de ces triglycérides est assurée par un processus enzymatique appelé lipolyse, impliquant différentes enzymes dont la lipase hormono-sensible (LHS). La LHS est au centre d'une des principales thématiques de recherche de mon laboratoire d'accueil qui s'intéresse depuis longtemps aux mécanismes moléculaires en lien avec l'obésité et le développement des maladies métaboliques (Langin et al. 1993). Une étude antérieure réalisée au laboratoire met en évidence qu'une diminution de la quantité de LHS et donc de la capacité lipolytique améliore le phénotype obèse et ses complications métaboliques chez la souris (Girousse et al. 2013). Plus récemment, une autre étude a mis en évidence un nouveau rôle non enzymatique de la LHS dans le contrôle d'un facteur de transcription régulant la sensibilité de l'adipocyte à l'action de l'insuline (Morigny et al. 2019). Cette découverte a ouvert un champ de recherche innovant quant aux rôles non enzymatiques de la LHS dans la biologie de l'adipocyte, objet principal de mes travaux de thèse. Nous mettons en évidence un mode alternatif de régulation par la LHS d'une voie de signalisation appartenant à la superfamille TGF $\beta$ . Ces voies de signalisation sont de nature complexe malgré l'existence d'une littérature conséquente quant à leurs rôles cruciaux dans la majorité des processus biologiques physiologiques et physiopathologiques. Cependant, leurs implications dans le métabolisme, notamment adipocytaire, restent très peu décrits, et font partie intégrante de ce manuscrit de thèse.

## Introduction

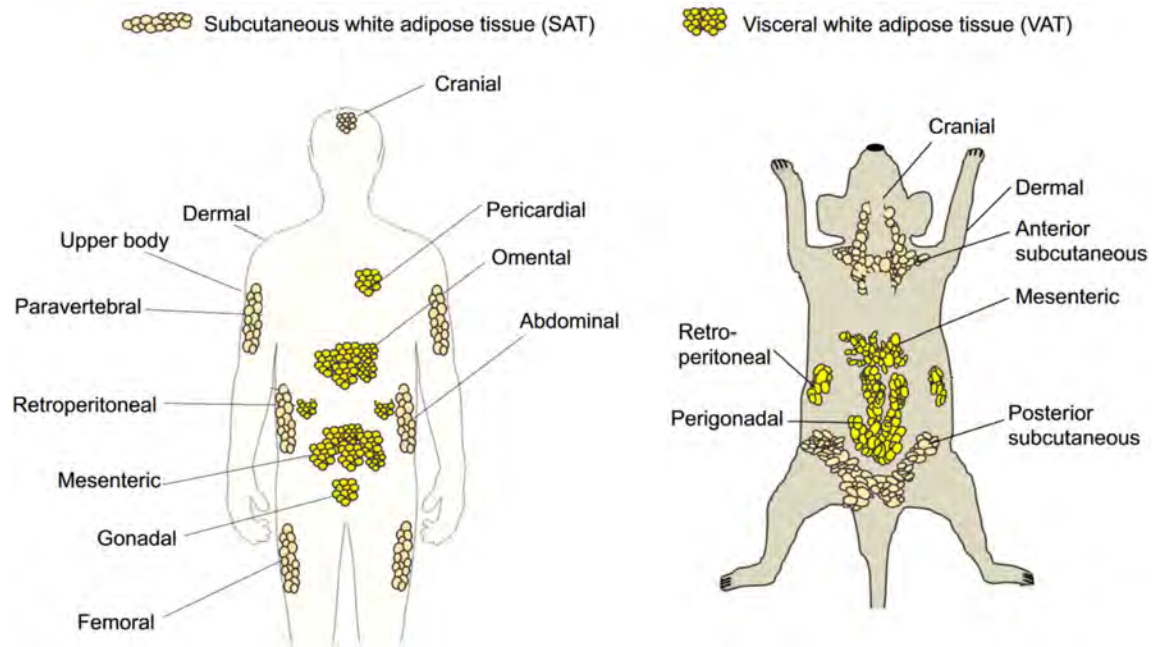
### Chapitre 1 : Tissu adipeux et adipocytes

La masse grasse se répartit dans l'organisme essentiellement sous forme de tissus adipeux (TA). Bien qu'historiquement décrit comme simple mais acteur crucial du métabolisme lipidique, il s'agit d'un tissu aux multiples facettes dont les principales fonctions sont détaillées dans ce chapitre (Rosen and Spiegelman 2014; Sakers et al. 2022; Zwick et al. 2018). Il existe différents types de TA auxquels sont attribuées des fonctions spécifiques. Le TA blanc fait fonction d'entrepôt énergétique par le stockage d'acides gras (AG) sous formes de triglycérides (TG), qui pourront être mobilisés selon les besoins énergétiques. Il joue également un rôle important dans le métabolisme glucidique, ce qui en fait un acteur majeur dans le maintien de l'homéostasie énergétique. En plus de ces fonctions métaboliques, il exerce aussi des rôles mécaniques, endocriniens, inflammatoires, reproductifs et thermorégulateurs. C'est, en effet, le TA brun qui, de par sa spécialisation dans la production de chaleur, est responsable de la majeure partie de la thermogénèse assurée par le TA. Lors d'une exposition au froid, le TA brun va, *a contrario* du TA blanc, utiliser les substrats énergétiques pour produire de la chaleur et assurer le maintien de la température corporelle.

#### I. Description anatomique et composition cellulaire

##### I.1 Localisation anatomique

Le TA blanc est réparti dans la quasi-totalité de l'organisme sous forme de dépôts de taille variable (Sakers et al. 2022; Zwick et al. 2018). Chez l'Homme, on catégorise généralement les dépôts adipeux en deux grandes sous-catégories. Les dépôts présents sous la peau, dits sous-cutanés, regroupent les TA abdominaux, glutéo-fémoraux et mammaires. Les dépôts dits profonds correspondent aux dépôts viscéraux englobant mésentériques, omentaux, rétropéritonéaux, péri-gonadiques et épicaudiques, et d'autres dépôts non viscéraux, notamment au niveau de la moelle osseuse (Figure 1).



**Figure 1 : Localisation anatomique des principaux dépôts adipeux blancs.** *Adapté de (Schoettl, Fischer, and Ussar 2018)*

Localisation des dépôts adipeux sous-cutanés (SAT) et viscéraux (VAT) chez l'humain et la souris.

Les TA sous-cutanés et profonds peuvent être discriminés quant à leurs propriétés tissulaires et métaboliques, ayant fait l'objet de plusieurs revues (Bluher 2013; Schoettl, Fischer, and Ussar 2018; Tchkonja et al. 2013; White and Tchoukalova 2014). Pour citer quelques exemples, les TA viscéraux sont plus sensibles aux signaux pro-lipolytiques (cf. page 14) et plus résistants à l'action de l'insuline que les TA sous-cutanés (Tchkonja et al. 2013). Du fait de leurs positions anatomiques profondes, notamment de la proximité avec le foie, leur expansion au cours de l'obésité est un facteur de risque important quant au développement de complications métaboliques, ce qui serait principalement associé à son inflammation (Item and Konrad 2012; Lee, Wu, and Fried 2013; Rytka et al. 2011). En effet, bien que le TA soit doté d'une « redoutable » capacité d'expansion lui permettant de faire face à un apport chronique trop important en substrats énergétiques, il arrive à terme à saturation. Le surplus de substrats lipidiques va alors se déposer dans les autres organes périphériques sous forme de dépôts dits ectopiques. C'est notamment le cas du muscle ou du foie lors de la stéatose hépatique. Ces dépôts ectopiques entraînent des conséquences délétères, phénomène appelé lipotoxicité qui est à l'origine de complications métaboliques, notamment une résistance à l'action de l'insuline, qui aboutira à l'apparition d'un diabète de type 2. A l'opposé, les TA sous-cutanés ont une capacité d'expansion plus importante que les TA viscéraux (Tchkonja et al. 2013),

probablement car les progéniteurs adipocytaires qui s'y trouvent ont une capacité de prolifération plus importante, et expriment de façon plus importante des facteurs de transcription clés de l'adipogenèse que sont PPAR $\gamma$  et C/EBP (Tchkonia et al. 2002; Tchkonia et al. 2006). La combinaison de la capacité d'expansion et de la position anatomique sans danger des TA sous-cutanés font de leur développement un mécanisme protecteur vis-à-vis des complications métaboliques liées au surpoids et à l'obésité (Bluher 2013; Tan and Vidal-Puig 2008). De plus, leur profil sécrétoire est moins délétère que les TA viscéraux (Tchkonia et al. 2013). Une autre particularité des TA sous-cutanés est leur capacité de pouvoir acquérir une fonction thermogénique lors d'expositions chroniques au froid, permettant ainsi le maintien de la température corporelle (Rosen and Spiegelman 2014). Nous reviendrons dans une partie dédiée sur ce phénomène dit de beigissement correspondant à l'apparition de sous-types cellulaires particuliers (cf. page 20).

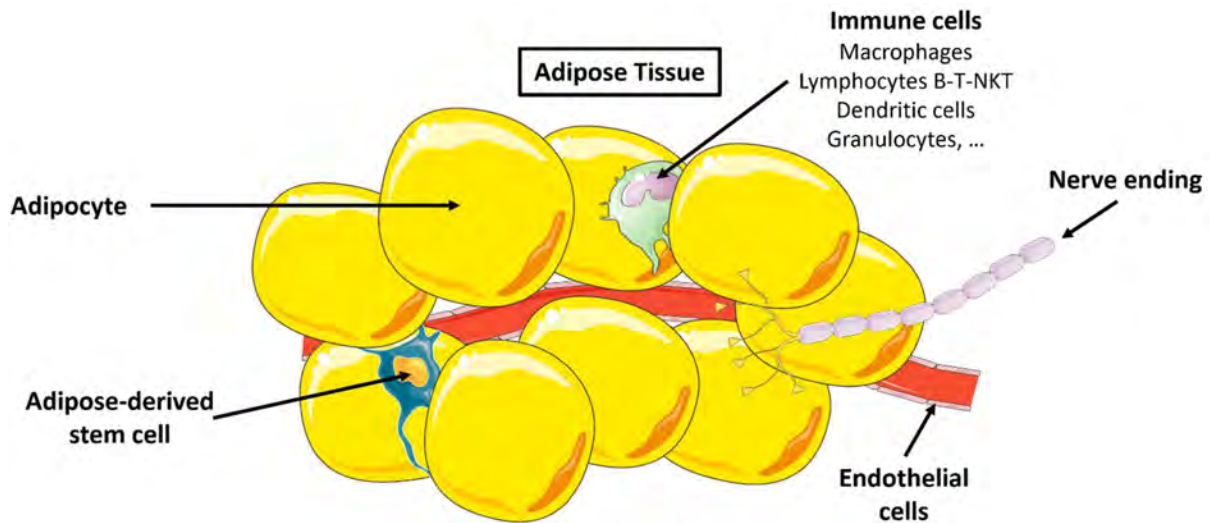
## 1.2 L'adipocyte

L'adipocyte est une cellule très spécialisée qui confère sa nature au TA (Rosen and Spiegelman 2014) (Figure 2). Elle stocke des substrats lipidiques, principalement des TG, dans un organite appelé gouttelette lipidique (GL). Bien que retrouvée dans une grande variété de types cellulaires, la GL atteint dans l'adipocyte des dimensions inégalées (Ottaviani, Malagoli, and Franceschi 2011). Ainsi, bien que les adipocytes ne semblent représenter qu'environ 40% des cellules contenues dans le TA (les 60% restants étant attribués aux cellules de la fraction stromale décrite dans la partie suivante), ils occupent 95% de son volume (Backdahl et al. 2021; Rosen and Spiegelman 2014). En plus du phénomène d'hyperplasie via le recrutement de progéniteurs permettant une augmentation du nombre d'adipocytes, l'expansion du TA est aussi assurée par l'hypertrophie des adipocytes, qui est directement fonction de la taille de la GL. Dans l'adipocyte blanc, la GL occupera la quasi-totalité du cytosol et pourra mesurer jusqu'à plusieurs centaines de microns de diamètre chez l'Homme. En lien avec cette remarquable plasticité de taille, l'adipocyte est équipé d'une importante machinerie enzymatique permettant de stocker et libérer les substrats énergétiques sous forme de TG (cf. page 14). Cependant, bien que la biogenèse de la GL soit un mécanisme bien décrit, bourgeonnant à partir du réticulum endoplasmique à l'aide d'une machinerie protéique, les mécanismes permettant son expansion à de tels niveaux de tailles restent encore de nos jours flous (Walther, Chung, and Farese 2017). Outre ses fonctions métaboliques, l'adipocyte est

aussi une cellule endocrine, sécrétant des peptides et lipides de signalisation, respectivement nommés adipokines et lipokines (Scheja and Heeren 2019). Ces sécrétions peuvent avoir des rôles endocrine, paracrine et autocrine. Les différents types de TA possèdent des adipocytes aux propriétés et fonctions particulières. Nous nous intéresserons dans la partie suivante aux types d'adipocytes retrouvés dans le TA blanc.

### 1.3 La fraction stroma-vasculaire

Le TA est souvent décrit comme composé d'adipocytes, la cellule caractéristique de ce tissu, et d'une fraction stroma-vasculaire (FSV) regroupant l'ensemble des autres types cellulaires que l'on y retrouve (Vijay et al. 2020) (Figure 2). Le TA étant vascularisé et innervé, on trouve dans la FSV des cellules endothéliales, composant les vaisseaux sanguins, et des projections de neurones du système nerveux sympathique qui vont moduler diverses fonctions de l'adipocyte comme les niveaux de lipolyse (cf. page 14) lors de besoins énergétiques ou encore leur niveau de beigissement (cf. page 20) (Guilherme et al. 2019). Elle contient également une grande variété de cellules immunitaires, principalement des macrophages, mais aussi des cellules dendritiques, granulocytes ou encore des lymphocytes de type B, T ou NKT. Ces cellules immunitaires participent de façon importante au maintien de l'homéostasie tissulaire du TA (Chung et al. 2018). A l'inverse, lors de l'obésité, une inflammation chronique se met en place via l'apparition de cellules pro-inflammatoires, ce qui peut conduire à la fibrose du TA. Enfin, la FSV contient des cellules souches adipocytaires qui pourront se différencier en adipocytes pour assurer leur renouvellement au cours du temps, mais également permettre l'expansion du TA par hyperplasie (Park, Halperin, and Tontonoz 2008). Il existe des subtilités de nomenclatures quant à la dénomination des populations de cellules progénitrices contenues dans la FSV. A la suite de la digestion enzymatique du TA et à l'ensemencement *in vitro* de la FSV, la quasi-totalité des cellules adhérentes, d'apparence fibroblastique, pourront être différenciées pharmacologiquement en adipocytes (Dufau et al. 2021). L'ensemble des cellules de la FSV contribue ainsi de façon importante au bon fonctionnement du TA.

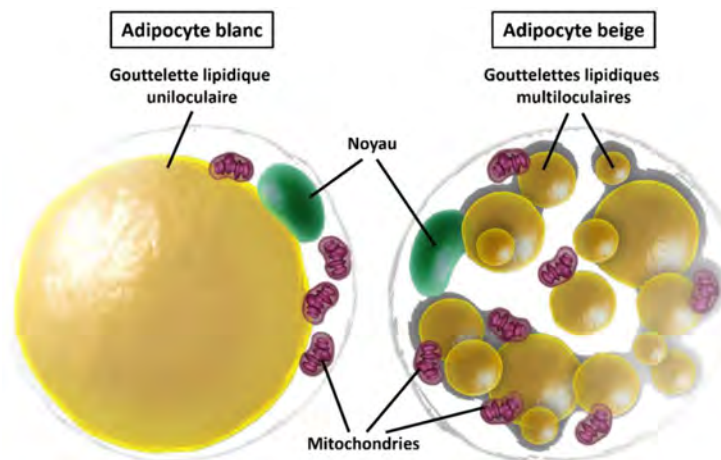


**Figure 2 : Tissu adipeux blanc.** Adapté de (Dufau et al. 2021)

Le tissu adipeux est composé de cellules nommées adipocytes. En plus de l'adipocyte, le tissu adipeux contient une fraction stroma-vasculaire, regroupant les autres types cellulaires trouvés dans ce tissu, tel que des cellules endothéliales, neuronales, immunitaires, et progénitrices.

## II. Diversité adipocytaire du tissu adipeux blanc

Nous nous intéressons ici aux deux grands types d'adipocytes contenus dans le TA blanc, les adipocytes blancs, aux fonctions métaboliques et sécrétoires, et les adipocytes beiges, qui sont en plus spécialisés dans la dissipation d'énergie sous forme de chaleur pour permettre la thermorégulation (Figure 3).



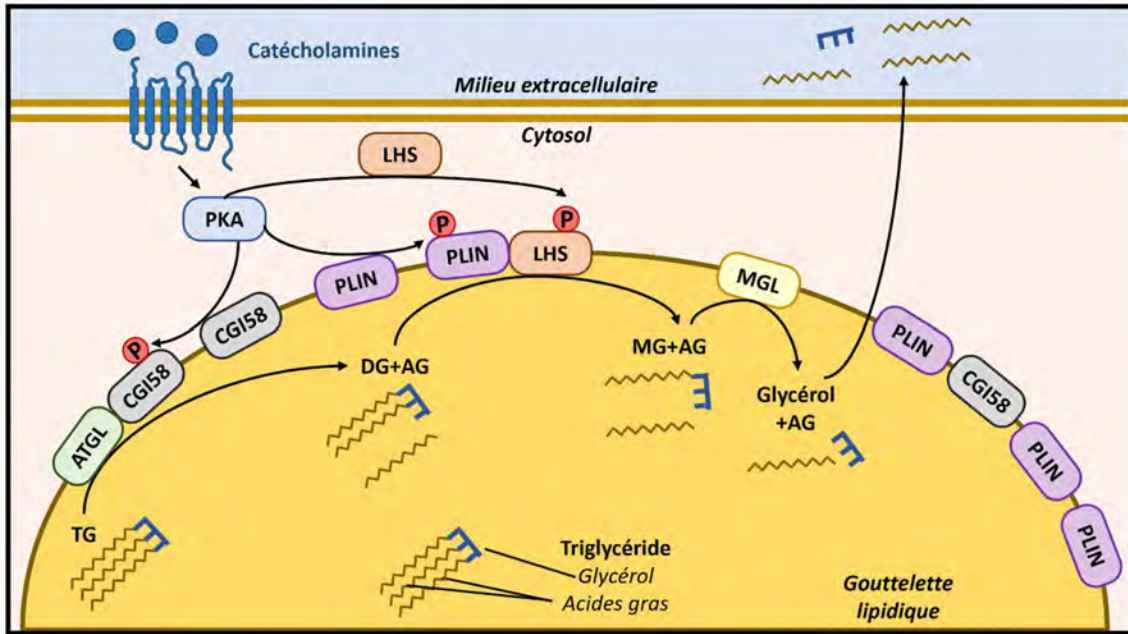
**Figure 3 : Adipocyte blanc et beige.** Adapté de (Scherer 2019).

L'adipocyte blanc est caractérisé par une gouttelette lipidique uniloculaire, occupant l'ensemble du cytosol, dans laquelle sont stockés les triglycérides. Les autres organites sont poussés au bord de la membrane plasmique. Il contient une faible quantité de mitochondries. L'adipocyte beige, au contraire, possède un grand nombre de mitochondries, associées à sa fonction de thermogénèse, et de nombreuses gouttelettes lipidiques multiloculaires.



## II.1 Adipocyte blanc : métabolisme et sécrétions

L'adipocyte blanc est spécialisé dans la gestion des substrats énergétiques, notamment lipidiques, qu'il stocke dans une GL uniloculaire (Morigny et al. 2021). Lors d'un repas, les AG issus de l'alimentation vont être transportés dans l'adipocyte pour être estérifiés au nombre de trois sur un squelette de glycérol, formant les TG. Les AG peuvent également être synthétisés dans l'adipocyte à partir des atomes de carbone du glucose via les enzymes de la lipogenèse *de novo*. A l'inverse, lors d'une demande énergétique comme l'exercice physique, le jeûne ou l'exposition au froid, l'adipocyte va libérer ce stock de lipides via le phénomène de lipolyse (Morigny et al. 2016). Les TG vont être hydrolysés par l'action séquentielle de trois lipases, l'ATGL (Adipose Triglycerides Lipase), la LHS (Lipase Hormono-Sensible) puis la MGL (MonoGlyceride Lipase), afin de libérer AG et glycérol dans la circulation sanguine où ils pourront rejoindre d'autres tissus afin de servir de substrats énergétiques (Figure 4). Ce processus est principalement stimulé en réponse aux catécholamines par différents mécanismes très bien décrits dans la littérature (Bartness et al. 2010; Lafontan and Langin 2009; Morigny et al. 2016). Brièvement, l'augmentation des taux intracellulaires d'AMP cyclique va induire l'activation de la protéine kinase A (PKA). La PKA va à son tour entraîner l'activation de l'ATGL, ce en phosphorylant son co-facteur CGI-58, favorisant son interaction avec la lipase et ainsi l'activité enzymatique de cette dernière. La PKA va également phosphoryler la principale protéine couvrant la GL qu'est la périlipine 1, permettant de faciliter l'accès des lipases à la GL, notamment en interagissant avec la LHS (Wang et al. 2009). Enfin, la PKA va également activer la LHS qui va transloquer à la surface de la GL et participer à la lipolyse (cf. page 48). De façon intéressante, une étude récente met en évidence l'existence d'un mécanisme alternatif de libération d'AG par l'adipocyte via des exosomes, indépendamment des lipases (Flaherty et al. 2019). Ce phénomène est accru au cours de l'obésité et module notamment le phénotype des macrophages environnants.



**Figure 4 : Lipolyse adipocytaire.**

Lors d'un besoin énergétique, le système nerveux sympathique va induire la lipolyse pour fournir des substrats énergétiques à l'organisme. A la suite d'une stimulation aux catécholamines, la protéine kinase A (PKA) va phosphoryler la lipase hormono-sensible (LHS) qui va transloquer à la gouttelette lipidique et participer à l'hydrolyse des triglycérides (TG). Elle phosphoryle également la périlipine (PLIN) et CGI58 qui interagissent avec la LHS et l'ATGL, respectivement, pour augmenter leurs activités respectives. Suite à l'action séquentielle des trois enzymes lipolytiques ATGL, LHS, et MGL, les produits de la lipolyse, acides gras (AG) et glycérol, sont exportés vers la circulation sanguine via laquelle ils pourront rejoindre d'autres organes.

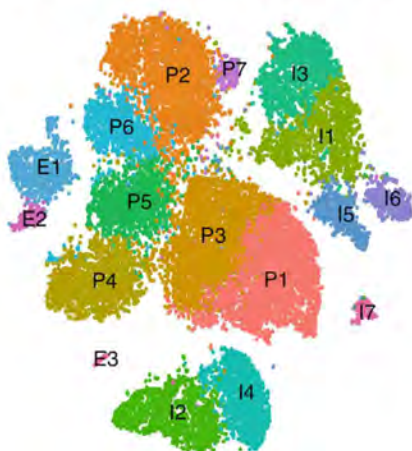
Longtemps considéré comme un tissu inerte aux simples fonctions de stockage (Pond 1992), la recherche sur le TA et l'adipocyte a connu un regain d'intérêt à la suite de la découverte d'une capacité sécrétoire. La leptine fut la première hormone d'une longue série montrée comme produite par l'adipocyte (Friedman 2019; Zhang et al. 1994). Sa production est proportionnelle à la taille adipocytaire et agit au niveau du système nerveux central pour inhiber la prise alimentaire et ainsi maintenir le poids corporel. Les souris déficientes en leptine (*ob/ob*) ou son récepteur (*db/db*) sont de célèbres modèles d'obésité induite par hyperphagie. L'adiponectine et l'apeline sont d'autres exemples célèbres dont les propriétés sensibilisantes à l'insuline en font des hormones bénéfiques (Castan-Laurell et al. 2011; Wang and Scherer 2016). Cependant, l'adipocyte blanc sécrète également des molécules délétères telles que la résistine, ou encore le trio pro-inflammatoire  $TNF\alpha$ ,  $IL1\beta$  et  $IL6$ . L'obésité est ainsi associée à une augmentation de la production de ces cytokines pro-inflammatoires par l'adipocyte, amenant à une inflammation chronique de bas bruit ayant des conséquences délétères (Scheja and Heeren 2019). Il est important de noter que de nombreux facteurs sont

également produits dans le TA par les cellules de la FSV. Ainsi, une grande variété de ligands de la superfamille du Transforming Growth Factor (TGF)  $\beta$ , sur laquelle nous reviendrons dans un chapitre dédié, est produite par le TA, à la fois par l'adipocyte et les cellules de la FSV, et pourra avoir des actions paracrines sur ces cellules.

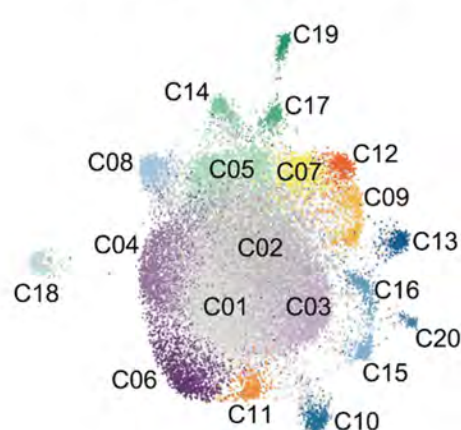
L'avènement récent des techniques de séquençage à haut débit sur cellules uniques (single cell RNA-seq) rend possible l'étude de l'existence de divers sous-types cellulaires au sein du TA. Bien que d'intérêt moindre pour ce manuscrit, ce type d'étude a été adressé en premier lieu à la FSV, facilement isolable. Brièvement, une étude chez l'humain met en avant l'existence au sein du TA de diverses populations de cellules endothéliales et immunitaires, mais également l'existence de certaines populations de progéniteurs adipocytaires spécifiques des dépôts sous-cutanés et viscéraux, en lien avec le statut métabolique des individus (Vijay et al. 2020) (Figure 5). L'application de ce genre d'approche aux adipocytes a été freinée du fait de la fragilité cellulaire de ces derniers, notamment lors de leur isolement, décrit précédemment, qui peut défavoriser celui des adipocytes les plus larges. La création d'un modèle de souris transgénique palliant ces limites techniques a été récemment rapportée dans une élégante étude (Sun et al. 2020). L'expression d'un marqueur nucléaire fluorescent sous contrôle d'un promoteur spécifique de l'adipocyte permet l'isolement de ces noyaux adipocytaires par cytométrie en flux, suivi de leur séquençage (single nucleus RNA-seq). Les auteurs mettent ainsi en évidence l'existence de divers sous-types d'adipocytes dans les TA blancs et bruns de la souris, en se concentrant sur une population d'adipocytes productrice d'acétate et associée au contrôle de la thermogenèse, exprimant le marqueur *CYP2E1*. L'existence de cette population a également été validée chez l'humain au niveau des TA brun et blanc sous-cutané, grâce à du single cell RNA-seq associé à une étude bio-informatique et de l'imagerie. Cependant, cette étude se concentre particulièrement sur le TA brun et sur un sous-type particulier d'adipocytes. De plus, du fait de la limite technique, aucune information n'est disponible quant à la microarchitecture du TA et à l'organisation dans l'espace des différents sous-types d'adipocytes, ni à leurs morphologies ou à des différences de métabolismes. Une étude plus récente basée sur de la transcriptomique spatiale du TA blanc humain a permis d'apporter de premières réponses à ces questions (Backdahl et al. 2021). Les auteurs mettent en évidence l'existence de trois sous-populations d'adipocytes sur la base d'une expression forte de trois marqueurs que sont la leptine (*LEP*),

la périlipine (*PLIN*) et la sérum amyloïde A (*SAA*) (Figure 5). De façon intéressante, aucun lien entre la taille adipocytaire et le type d'adipocyte n'a pu être mis en évidence. Néanmoins, les auteurs démontrent *in vivo* que seule la sous-population dite « *PLIN* » répond à l'insuline, et que la proportion de cette dernière est réduite au cours de l'obésité. De plus, grâce à la spatialité de cette technique, les auteurs mettent en avant une microarchitecture tissulaire plus organisée que les connaissances actuelles ne permettaient de l'imaginer. Concernant ces adipocytes, il est notamment montré que les adipocytes « *SAA* » forment des clusters homotypiques de cellules indépendants au regard des adipocytes « *PLIN* » et « *LEP* » qui forment des clusters hétérotypiques bien distincts. Cependant, cette étude se base fortement sur des approches de transcriptomique et d'analyses bioinformatiques ainsi que sur l'exploitation de grands jeux de données issues de cohortes de patients. Aussi, bien qu'un rôle physiologique soit attribué aux adipocytes « *PLIN* », le rôle des deux autres sous-populations d'adipocytes reste aujourd'hui un mystère. En accord avec ces résultats, une étude chez la souris révèle la présence de trois sous-populations d'adipocytes dans le TA périgonadique, dont une est perdue au cours de l'obésité (Sarvari et al. 2021). Ces deux études chez l'humain et la souris n'ayant pas été comparées, il est difficile de faire des liens quant à la similitude de ces trois sous-populations entre les deux espèces. Cependant, il est montré chez l'humain que la population « *PLIN* » est seule répondante à l'insuline *in vivo*, corrélant avec les niveaux de lipogenèse *de novo* (Backdahl et al. 2021). Chez la souris, au cours de l'obésité, la sous-population dite « lipogénique » est perdue, en lien avec l'apparition des complications métaboliques (Sarvari et al. 2021). Ainsi, il est possible de spéculer que ces 2 sous-populations soient relativement similaires dans les deux espèces.

**A) Fraction stroma-vasculaire**



**B) Tissu adipeux entier**



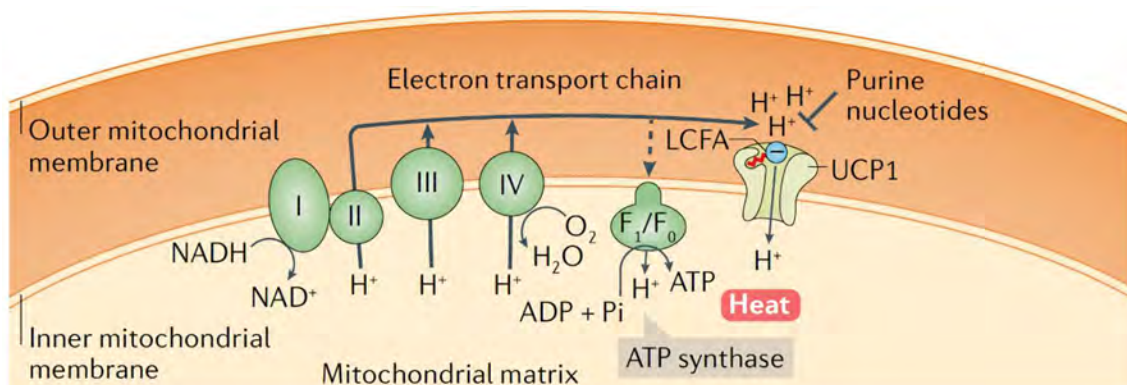
**Figure 5 : Populations cellulaires du tissu adipeux blanc.**

Clustering de populations cellulaires sur la base de single cell RNA-seq dans A) la fraction stroma vasculaire (FSV, issu de (Vijay et al. 2020)) et B) le tissu adipeux entier (issu de (Backdahl et al. 2021)). Sur la base des résultats d'expression génique, sont trouvées dans la FSV 17 populations de cellules, dont des cellules endothéliales (E), immunitaires (I) et progénitrices (P). En accord, 20 populations de cellules sont trouvées sur tissu adipeux entier, correspondant aux 17 populations de la FSV précédemment décrites et aux 3 populations d'adipocytes (PLIN, LEP et SAA) définies dans cette étude.

**II.2 Adipocyte beige : métabolisme et thermogénèse**

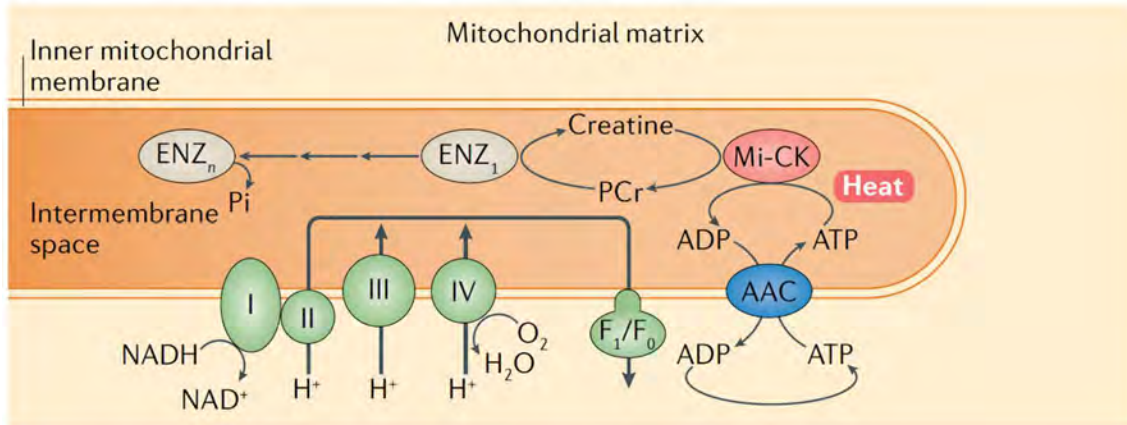
Certaines populations d'adipocytes, dit thermogéniques, ont pour fonction principale la lutte de l'organisme contre le froid (Rosen and Spiegelman 2014). On distingue habituellement les adipocytes bruns, retrouvés dans le TA brun du même nom, et les adipocytes beiges, localisés dans les dépôts de TA blanc (Cohen and Kajimura 2021). Contrairement aux adipocytes blancs, les adipocytes bruns/beiges possèdent des GL multiloculaires et un grand nombre de mitochondries dont résulte la couleur de ces cellules/tissus. Bien que ces adipocytes soient capables des mêmes procédés métaboliques que les adipocytes blancs, ils sont donc en plus spécialisés dans la thermogénèse, dont les principaux mécanismes moléculaires sont décrits dans ce chapitre.

Dans la majorité des types cellulaires, à la suite de l'oxydation des substrats énergétiques dans la mitochondrie, les co-enzymes au stade réduit vont être oxydés par les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale via un processus nommé oxydations phosphorylantes. Les protons issus de l'oxydation des co-enzymes sont alors transportés par les complexes dans l'espace intermembranaire mitochondrial. Le gradient de proton ainsi créé alimente la production d'ATP par l'ATP synthase (Fernie, Carrari, and Sweetlove 2004). Les nombreuses mitochondries trouvées dans les adipocytes bruns/beiges expriment la protéine découplante UCP1 (Cohen and Kajimura 2021), qui va découpler le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale de la production d'ATP, et ainsi dissiper le gradient de proton sous forme de chaleur (Figure 6).



**Figure 6 : Respiration mitochondriale et thermogénèse adipocytaire.** *Issu de (Cohen and Kajimura 2021).* Dans la mitochondrie, les co-enzymes réduits par l'oxydation des substrats énergétiques vont être oxydés par les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale. Les protons suivant le transport des électrons sont exportés par les complexes dans l'espace intermembranaire mitochondrial, créant un gradient de charge. Ce gradient sert habituellement à alimenter le complexe V qu'est l'ATP synthase, dont le modèle s'assimile à une turbine dans laquelle les protons passent, générant de l'ATP. Dans les adipocytes thermogéniques, l'expression de la protéine découplante UCP1 permet de dissocier la respiration de la production d'ATP. L'énergie stockée dans le gradient de proton est ainsi dissipée sous forme de chaleur.

Alors que la thermogénèse médiée par UCP1 est aujourd'hui largement décrite (Chouchani, Kazak, and Spiegelman 2019), il a récemment été mis en évidence des systèmes de thermogénèse basés sur des cycles de substrats métaboliques, le plus décrit étant celui de la créatine (Kazak et al. 2015). Dans les adipocytes bruns/beiges, l'ATP produit par la chaîne respiratoire va être transporté dans l'espace intermembranaire mitochondrial où il va servir de donneur de phosphate pour la créatine, donnant ainsi de l'ADP et de la phospho-créatine, qui va par la suite être hydrolysée (Figure 7). Ce système est induit lors d'une exposition au froid et permet une production de chaleur indépendante d'UCP1 et dépendante de la production d'ATP. Depuis, une série d'importantes études a été conduite dans le but de définir les acteurs et mécanismes précis impliqués dans la génération de ces cycles de la créatine (Bertholet et al. 2017; Kazak et al. 2017; Kazak et al. 2019; Rahbani et al. 2021; Sun et al. 2021). Il a notamment été montré que la kinase CKB et la phosphatase TNAP étaient à l'origine de la synthèse et dégradation de la phospho-créatine, respectivement. Il semblerait que ce système soit favorisé par une faible présence d'ADP et lié à la quantité d'enzymes disponibles, l'expression de ces dernières étant accrue à la suite d'une exposition au froid. Cependant, bien que les études précédemment citées indiquent qu'une déplétion des taux de créatine disponible nuise à la mise en place des cycles, une supplémentation en créatine dans une cohorte humaine présentant de faibles taux de créatine du fait d'un régime végétarien n'induit pas d'activation de la capacité thermogénique du TA brun (Connell et al. 2021). Enfin, et simplement pour les citer, d'autres cycles de substrats participant à la thermogénèse ont été récemment décrits hors de la mitochondrie, à savoir le transport de  $\text{Ca}^{2+}$  et des cycles de synthèse/dégradation de TG, tous deux dépendants de l'utilisation d'ATP (Cohen and Kajimura 2021; Guan et al. 2002; Ikeda et al. 2017).



**Figure 7 : Cycle de la créatine.** Issu de (Cohen and Kajimura 2021).

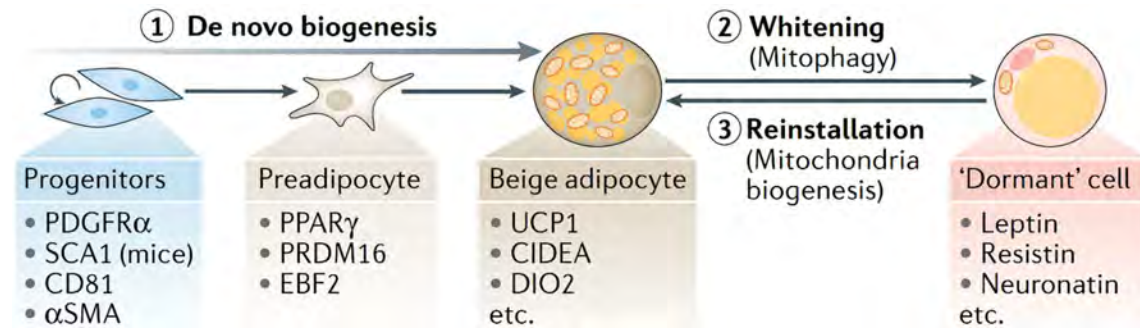
A la différence du découplage de la respiration et de la production d'ATP, le cycle de la créatine se base sur l'utilisation d'ATP comme donneur de  $P_i$  pour la phosphorylation de la créatine. Le cycle de phosphorylation/déphosphorylation entraîne ainsi la production de chaleur.

L'acquisition d'un phénotype brun/beige par les adipocytes est associée à une biogenèse mitochondriale ainsi qu'à l'expression des protéines permettant les mécanismes thermogéniques précédemment décrits. Le co-facteur de transcription PGC-1 $\alpha$  est un activateur fondamental de ces phénomènes (Harms and Seale 2013; Jornayvaz and Shulman 2010; Shapira and Seale 2019). Son expression est notamment stimulée par les facteurs de transcription de la famille CREB/ATF, eux-mêmes activés notamment par phosphorylation par la PKA à la suite d'une stimulation catécholaminergique (Shi and Collins 2017). Ainsi, l'implication du système adrénergique et les mécanismes de transduction du signal dans le recrutement et l'activation d'adipocytes thermogéniques sont largement décrits. Toutefois, une importante étude met récemment en avant l'implication d'un récepteur couplé aux protéines G constitutivement actif GPR3 dont l'expression est initiée par un mécanisme lipolytique en réponse au froid, indépendamment d'un stimulus adrénergique, et qui va permettre l'acquisition d'un phénotype thermogénique (Sveidahl Johansen et al. 2021). De plus, une récente série d'importantes études démontre l'implication de divers autres types de projections neuronales au niveau du TA blanc dans le développement d'adipocytes beiges (Dodd et al. 2015; McGlashon et al. 2015; Ruan et al. 2014; Williams et al. 2014; Zhu et al. 2016). Brièvement, il y est décrit que les neurones à POMC et à sérotonine vont être activateurs du beigissement du TA blanc, alors que les neurones à AgRP vont en être inhibiteurs.

Les adipocytes bruns et beiges sont extrêmement proches dans leurs fonctions, morphologies et métabolismes. Les études permettant de définir leurs différences sont ainsi en plein essor, notamment concernant leurs développements respectifs. En effet, il est aujourd'hui admis que le développement des adipocytes bruns implique la différenciation de progéniteurs exprimant les marqueurs *En1*, *Myf5*, *Pax3*, *Pax7* et *Meox1*, alors que les progéniteurs recrutés dans la formation d'adipocytes beiges au niveau du TA sous-cutané expriment les marqueurs *Acta2*, *Sm22*, *Pax3*, *Cd81*, *Pdgfra*, ou encore *Myh11* et *Pdgfrb* (Cohen and Kajimura 2021; Ikeda, Maretich, and Kajimura 2018; Wang et al. 2013) (Figure 8). Néanmoins, comme introduit dans le chapitre précédent, la mise en évidence de l'existence de populations de progéniteurs adipocytaires spécifiques des différents dépôts adipeux blancs soulève la possibilité d'une origine multiple dans le développement des adipocytes beiges suivant la localisation anatomique (Macotela et al. 2012; Vijay et al. 2020). Récemment, il a ainsi été montré qu'une partie des adipocytes beiges était formée à partir de progéniteurs particuliers de muscle lisse vasculaire (Shamsi et al. 2021). De plus, la formation d'adipocytes beiges, contrairement aux bruns, peut également se faire par conversion d'adipocytes blancs en beiges (Himms-Hagen et al. 2000; Vitali et al. 2012), indiquant certainement une origine multiple de ces cellules. Cependant, il a été démontré que les adipocytes beiges recrutés par différenciation lors d'expositions au froid, retrouvaient un phénotype blanc en quelques semaines lorsque le stress thermique était levé, et pouvaient réacquérir une capacité thermogénique lorsque nécessaire, faisant ainsi des « va-et-vient » entre les deux phénotypes (Rosenwald et al. 2013) (Figure 8). Ce phénomène de blanchiment est notamment dépendant des mécanismes de mitophagie qui vont ramener le pool de mitochondries à un niveau proche de celui des adipocytes blancs (Cho et al. 2021; Lu et al. 2018). Des modifications épigénétiques seraient responsables de la rapide reconversion en adipocytes beiges lors d'expositions au froid (Sakers et al. 2022). Il est ainsi possible que les études montrant un événement de conversion aient été biaisées par ce phénomène, et que la différenciation de progéniteurs particuliers soit l'origine première de cette population d'adipocytes thermogéniques. De façon intéressante, une récente étude met en évidence qu'une certaine population d'adipocytes beiges au sein du TA blanc est capable de division cellulaire en réponse à un stimulus adrénérgique, participant au recrutement de nouveau adipocytes beiges (Park et al. 2021). En ce qui concerne les mécanismes de thermogénèse, il semblerait que les adipocytes beiges soient plus enclins et dépendants de l'utilisation des cycles



métaboliques nécessitant de l'ATP du fait d'une plus grande production (notamment du cycle du  $\text{Ca}^{2+}$ ), alors que la faible production d'ATP par les adipocytes bruns les rendrait plus dépendants de la thermogénèse médiée par UCP1 (Ikeda, Maretich, and Kajimura 2018).



**Figure 8 : Développement des adipocytes beiges.** Issu de (Cohen and Kajimura 2021).

La biogenèse *de novo* (1) d'adipocytes beiges se fait par recrutement de cellules progénitrices particulières. Ces adipocytes beiges vont se convertir en adipocytes au phénotype blanc lorsque leur fonction thermogénique n'est plus nécessaire, phénomène nommé ici « blanchiment » (2). A l'inverse, lorsque l'organisme lutte pour maintenir sa température corporelle, ces adipocytes pourront être rapidement re-mobilisés (3). La possibilité d'une conversion directe d'un adipocyte blanc natif en adipocyte beige reste cependant plausible.

En lien avec les études récentes montrant l'existence de plusieurs sous-populations d'adipocytes blancs, les études de transcriptomique sur cellules uniques ont permis de révéler l'existence de certaines sous-populations d'adipocytes thermogéniques. Il a notamment été démontré chez la souris l'existence de sous-populations d'adipocytes bruns avec un haut ou bas potentiel thermogénique, définis sur la base des niveaux d'expression d'UCP1 et de l'adiponectine (Song et al. 2020). Cependant, il est montré dans cette étude une dynamique d'interconversion des cellules entre ces deux phénotypes en fonction du besoin de thermogénèse, n'appuyant pas l'existence de populations bien distinctes. Chez l'Homme, l'étude introduite dans la partie précédente révèle toutefois l'existence de la population d'adipocytes producteurs d'acétate en lien avec le contrôle de l'activité thermogénique des adipocytes également au niveau du TA brun (Sun et al. 2020). Très peu d'informations sont disponibles dans la littérature quant aux possibles sous-populations d'adipocytes beiges. Cependant, une étude récente met en évidence l'existence d'une catégorie d'adipocytes beiges fonctionnels à haut potentiel glycolytique en comparaison des adipocytes beiges dits conventionnels, et possédant en plus une origine développementale différente puisque produits à partir de cellules progénitrices passant par un stade myogénique (Chen et al. 2019). Il est ainsi fort probable de voir apparaître dans les années à venir d'autres études de cette

importance qui amèneront des réponses quant à la diversité de population d'adipocytes thermogéniques.

D'un point de vue physiopathologique, il a été montré dans plusieurs études majeures que l'activation du TA brun chez l'humain, notamment par exposition au froid, permettait d'accroître l'utilisation de substrats énergétiques (Chondronikola et al. 2016; Hanssen et al. 2015), ce qui est d'un intérêt actuel majeur en recherche médicale dans la lutte contre le surpoids, l'obésité, et leurs complications. Plus récemment, des études ont mis en évidence la présence de TA brun actif chez les personnes obèses, et que la présence de TA brun diminuait le risque de diabète de type 2, dyslipidémies et maladies cardiovasculaires, et était associée à une amélioration de divers paramètres plasmatiques incluant les taux de glucose, AG et cholestérol (Becher et al. 2021; Herz et al. 2021). De plus, ces effets bénéfiques sont conservés dans des populations en surpoids et obèses. Le beigissement du TA blanc et l'activation de ces adipocytes beiges est donc de grand intérêt dans la lutte contre les maladies métaboliques. Chez la souris, il a été montré dans divers contextes physiopathologiques que la transplantation d'adipocytes bruns et le beigissement amélioraient le statut métabolique alors qu'une altération de la capacité thermogénique adipocytaire produit le phénomène opposé (Feldmann et al. 2009; Harms and Seale 2013; Liu et al. 2013). Outre les bénéfices métaboliques précédemment cités, le développement d'adipocytes beiges s'oppose également à la fibrose du TA (Hasegawa et al. 2018; Wang et al. 2019), un mécanisme délétère bien connu pouvant apparaître au cours de l'obésité (Sun et al. 2013). Cependant, malgré les efforts de recherche se concentrant sur le développement et l'activation de TA thermogénique, il n'existe pas de traitement permettant d'induire ces phénomènes chez l'humain à l'heure actuelle.

### **III. Modèles d'étude des adipocytes**


Comme nous venons de l'introduire, l'adipocyte est un acteur clé du métabolisme et du maintien de l'homéostasie énergétique. L'étude de sa physiologie et de son remodelage dans des contextes physiopathologiques est donc de grand intérêt. Cependant, l'étude *in vitro* de ce type cellulaire reste limitée à l'heure actuelle. En effet, la fragilité cellulaire due à la présence de cette GL de grande taille rend complexe la culture d'adipocytes matures *ex vivo*. De plus, la différenciation *in vitro* de cellules progénitrices en adipocytes atteint des niveaux

limités, avec des adipocytes demeurants immatures, possédant des GL multiloculaires et non uniloculaires. Au cours de ma thèse, j'ai écrit une revue portant sur l'étude *in vitro* des adipocytes, récapitulant les modèles existants mais également les avancées actuelles en termes de culture cellulaire, et leurs limites (Dufau et al. 2021). Une place de choix est consacrée aux récents développements de sphéroïdes de progéniteurs adipocytaires, modèle que j'ai pu mettre au point au cours de ma thèse au laboratoire et qui a conduit à une publication en collaboration avec un laboratoire du Karolinska Institute de Stockholm (Shen et al. 2021).

## THEME

### Making Cell Culture More Physiological

## In vitro and ex vivo models of adipocytes

Jérémy Dufau,<sup>1,2</sup> Joanne X. Shen,<sup>3</sup> Morgane Couchet,<sup>4</sup> Thais De Castro Barbosa,<sup>4</sup> Niklas Mejhert,<sup>4</sup> Lucas Massier,<sup>4</sup> Elena Grisetti,<sup>1,2</sup> Etienne Mouisel,<sup>1,2</sup> Ez-Zoubir Amri,<sup>5</sup> Volker M. Lauschke,<sup>3</sup> Mikael Rydén,<sup>4</sup> and  Dominique Langin<sup>1,2,6</sup>

<sup>1</sup>Inserm, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases (I2MC), UMR1297, Toulouse, France; <sup>2</sup>Faculté de Médecine, I2MC, UMR1297, Université de Toulouse, Université Paul Sabatier, Toulouse, France; <sup>3</sup>Karolinska Institutet, Department of Physiology and Pharmacology, Stockholm, Sweden; <sup>4</sup>Karolinska Institutet, Department of Medicine (H7), Stockholm, Sweden; <sup>5</sup>Université Côte d'Azur, CNRS, Inserm, iBV, Nice, France; and <sup>6</sup>Toulouse University Hospitals, Department of Biochemistry, Toulouse, France

### Abstract

Adipocytes are specialized cells with pleiotropic roles in physiology and pathology. Several types of fat cells with distinct metabolic properties coexist in various anatomically defined fat depots in mammals. White, beige, and brown adipocytes differ in their handling of lipids and thermogenic capacity, promoting differences in size and morphology. Moreover, adipocytes release lipids and proteins with paracrine and endocrine functions. The intrinsic properties of adipocytes pose specific challenges in culture. Mature adipocytes float in suspension culture due to high triacylglycerol content and are fragile. Moreover, a fully differentiated state, notably acquirement of the unilocular lipid droplet of white adipocyte, has so far not been reached in two-dimensional culture. Cultures of mouse and human-differentiated preadipocyte cell lines and primary cells have been established to mimic white, beige, and brown adipocytes. Here, we survey various models of differentiated preadipocyte cells and primary mature adipocyte survival describing main characteristics, culture conditions, advantages, and limitations. An important development is the advent of three-dimensional culture, notably of adipose spheroids that recapitulate in vivo adipocyte function and morphology in fat depots. Challenges for the future include isolation and culture of adipose-derived stem cells from different anatomic location in animal models and humans differing in sex, age, fat mass, and pathophysiological conditions. Further understanding of fat cell physiology and dysfunction will be achieved through genetic manipulation, notably CRISPR-mediated gene editing. Capturing adipocyte heterogeneity at the single-cell level within a single fat depot will be key to understanding diversities in cardiometabolic parameters among lean and obese individuals.

*adipocyte; adipose tissue; cell culture; 2D and 3D; fat cell*

### INTRODUCTION

White adipose tissue (WAT) displays a remarkable capacity for undergoing changes in size and morphology. The close relationship between WAT mass and common cardiometabolic disorders such as insulin resistance, type 2 diabetes, and hypertension has prompted intense research into the mechanisms driving WAT plasticity and phenotype. In addition, WAT displays distinct cell heterogeneity. For example, the role of infiltrating immune cells in attenuating insulin sensitivity is well documented. Nevertheless, adipocytes constitute almost 90% of the volume and up to 40% of the cells present in WAT (1). Moreover, changes in adipocyte lipid storage (uptake and release) are believed to play a central role in promoting ectopic lipid deposition in tissues like liver and skeletal muscle, which can ultimately lead to lipotoxicity and

insulin resistance in these tissues (2). Brown adipose tissue (BAT) is specialized in energy dissipation as heat. Induction of BAT thermogenesis as well as transdifferentiation followed by activation of white into brown-like (so-called beige or brite for brown-in-white) adipocytes has raised interest as a therapeutic strategy (1). Therefore, functional studies of adipocytes and their (dys)regulation under different conditions are of obvious interest for the understanding of systemic metabolic regulation. However, studies of mature adipocytes are hampered by a number of technical hurdles, including high lipid content of these cells that makes them float in suspension, their short life ex vivo span, and the often harsh methods that are required to isolate them, which may impact on their transcriptional and functional fingerprint. In addition, understanding adipogenesis and the mechanisms that drive adipocyte differentiation requires a cell system that allows

detailed temporal assessments and the ability to follow individual cells/groups of cells (Fig. 1). Finally, more mechanistic studies require approaches where gene expression can be manipulated, which has proven very difficult for this cell type.

Consequently, many groups have aimed at developing renewable, cryopreservable cell sources of adipocyte progenitors that would allow the study of relevant phenotypes of mature fat cells, i.e., uptake of glucose/lipids, fatty acid esterification and oxidation, release of these fatty acids through lipolysis, effects of insulin on glucose and lipid handling, and secretion of key adipokines such as leptin and adiponectin. This review discusses the different models of adipocyte culture developed over the last decades. In addition to widely used two-dimensional (2D) culture methods, we also discuss more recent advances in 3D culture of adipocytes, which can produce cells that are more similar to freshly isolated mature fat cells.

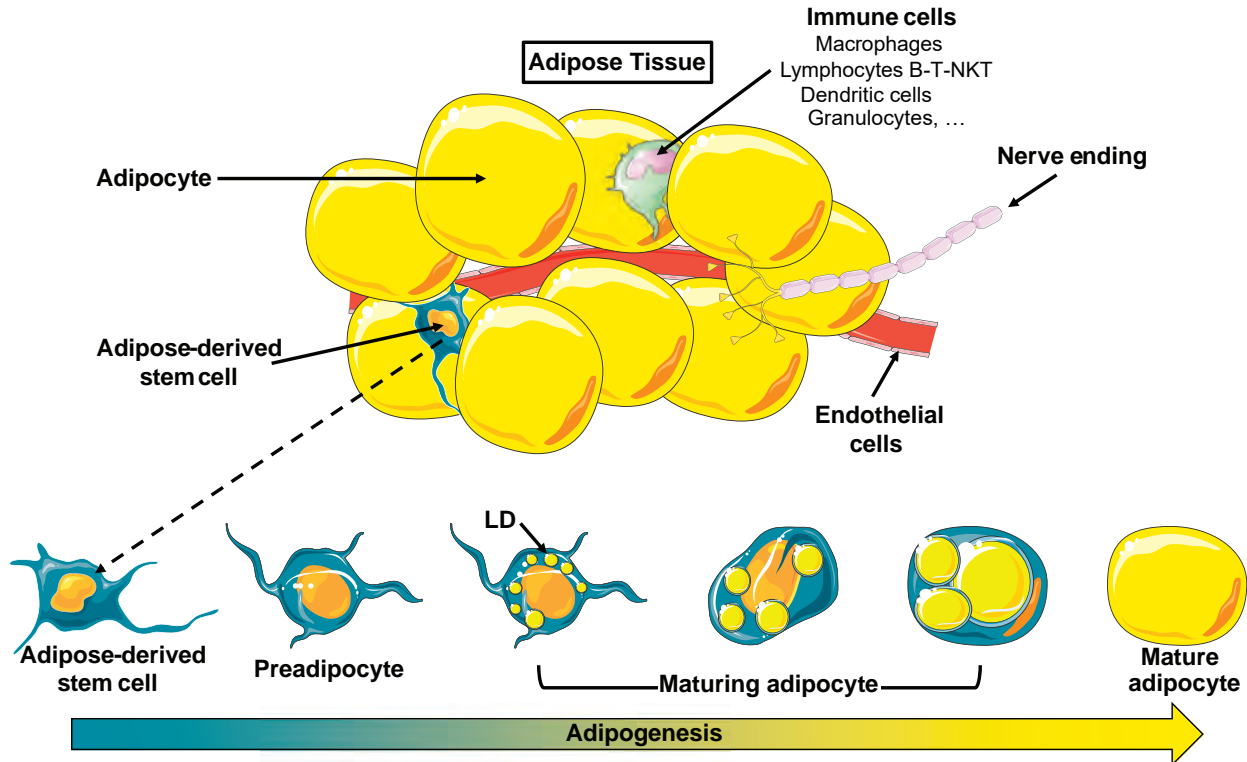
## CELL CULTURE MODELS FOR THE STUDY OF WHITE AND BROWN ADIPOCYTES

### Cell Lines

#### Mouse cell lines.

Todaro and Green (3) first reported cell isolation and culture from disaggregated 17- to 19-day-old Swiss mouse embryos

in the early 1960s. They described several culture protocols, leading to the establishment of aneuploid fibroblast-like cell lines sensitive to contact inhibition. Different sublines were generated, among which 3T3-L1 displayed an adipogenic potential (Table 1 and Fig. 2) (4). After an intense proliferation phase, leading to confluence, 10–50% of 3T3-L1 cells reached a resting state and started accumulating lipids (Fig. 1) (23). During subsequent years, investigations of the underlying mechanisms of 3T3-L1 adipose conversion led to identification of highly pro-adipogenic compounds and their transcription factor targets. An early observation was that adipogenesis could be stimulated by high insulin concentrations (4). Although this is mediated through pleiotropic mechanisms that are still not fully understood, the adipogenic action of insulin is in part mediated by the transcription factor FOXO (24). It was further shown that both 1-methyl-3-isobutylxanthine (IBMX), a phosphodiesterase inhibitor leading to elevated intracellular cAMP levels (5), and dexamethasone, a glucocorticoid analog (6), increase adipose conversion of 3T3-L1 cells. Members of the CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP) family were later characterized as adipogenic transcription factors (25, 26) induced by cAMP-mediated CREB activation (27) and glucocorticoid receptor stimulation (28). Upon induction of differentiation process, cells undergo about two rounds of division. C/EBPβ plays a crucial role during mitotic clonal expansion (29). The importance of mitotic clonal expansion in human cell



**Figure 1.** Schematic overview of adipogenesis. White adipose tissue is composed of mature adipocytes and cells from the stroma vascular fraction, including immune, endothelial, and neural cells, as well as adipocyte precursors named adipose-derived stem cells. De novo formation of adipocytes through adipogenesis occurs mainly during adipose tissue development. It may take place during adulthood, allowing adipocyte turnover and adipose tissue expansion in response to overfeeding. Upon adipogenic stimuli, which partly remain elusive in vivo, adipose stem cells are committed to preadipocytes. Once committed, preadipocytes progressively acquire an adipocyte-specific gene expression pattern along with lipid droplet (LD) formation. Eventually, multilocular LDs fuse to form a large and unique LD that characterizes mature white adipocytes.

**Table 1.** Components frequently found in adipocyte culture media

Cell Model	Serum	Insulin	IBMX	Dexamethasone	PPAR $\gamma$ Agonist	Transferrin	T <sub>3</sub>	Fetuin	Cortisol
Mouse									
3T3-L1	+	+ (4)	+ (5)	+ (6)	+/- (7-9)	-	-	-	-
3T3-F442A (10)	+	+	-	-	-	-	-	-	-
C3H/10T1/2 (11)	+	+	+	+	+ (12)	-	-	-	-
OP9 (13)	+/-	+	+	+	-	-	-	-	-
MEF (14)	+	+	+	+	+ (12)	-	-	-	-
SVF (15)	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Human									
PAZ6 (16)	-	+	+	+	+	-	+	-	-
Chub-S7 (17)	-	+	+	+	+/-	+	+	+	-
LiSa-2 (18)	-	+	-	-	-	-	+	-	+
SGBS (19)	-	+	+	+	+	+ (20)	+	-	+
hMADS (21,22)	-	+	+	+	+	+	+	-	-

hMADS, human multipotent adipose-derived stem; IBMX, 3-isobutyl-1-methylxanthine; MEF, mouse embryonic fibroblasts; SGBS, Simpson-Golabi-Behmel syndrome; SVF, stromal-vascular fraction; T<sub>3</sub>, triiodothyronine.

models remains debated. Thiazolidinedione effects on adipogenesis (7–9), along with the identification of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) as the predominant transcription factor of adipose conversion, were also first described in 3T3-L1 cells (30). These breakthrough advances in the understanding of adipogenesis were possible in 3T3-L1 cells, because they do not express the major adipogenic transcription factors unless they are pharmacologically induced. In contrast, more committed 3T3 cell lines such as F442A only require insulin for induction of adipogenesis (see below). Over the years, 3T3-L1 cells have become the most commonly used preadipocyte model for the study of adipocyte development and biology because of their ease of use, assay scalability, and reproducibility in differentiation that can today reach 100% in optimal conditions (9). However, transfection of differentiated 3T3-L1 preadipocytes with expression vectors often does not lead to robust expression of the corresponding proteins (31). Today, 3T3-L1 cells are still extensively used to investigate the effects of molecules/compounds on adipogenesis (32), inflammation (33), and metabolism (34). The function and importance of various proteins are studied through gene silencing using siRNA (35–37). High-throughput approaches have been applied to 3T3-L1 cells for screening of chemical compounds and siRNA (38, 39). Use of CRISPR-Cas9-mediated gene editing has recently been reported (40). Differentiated 3T3-L1 preadipocytes express brown adipocyte markers and increased mitochondrial respiration in response to catecholamines (41). Although this has prompted testing of the browning effect of various compounds (42–44), it should be kept in mind that even upon  $\beta$ -adrenergic stimulation, the level of expression of the prototypical brown adipocyte marker UCP1 is low (45). 3T3-L1 cells may not be considered as a bona fide brown adipocyte model.

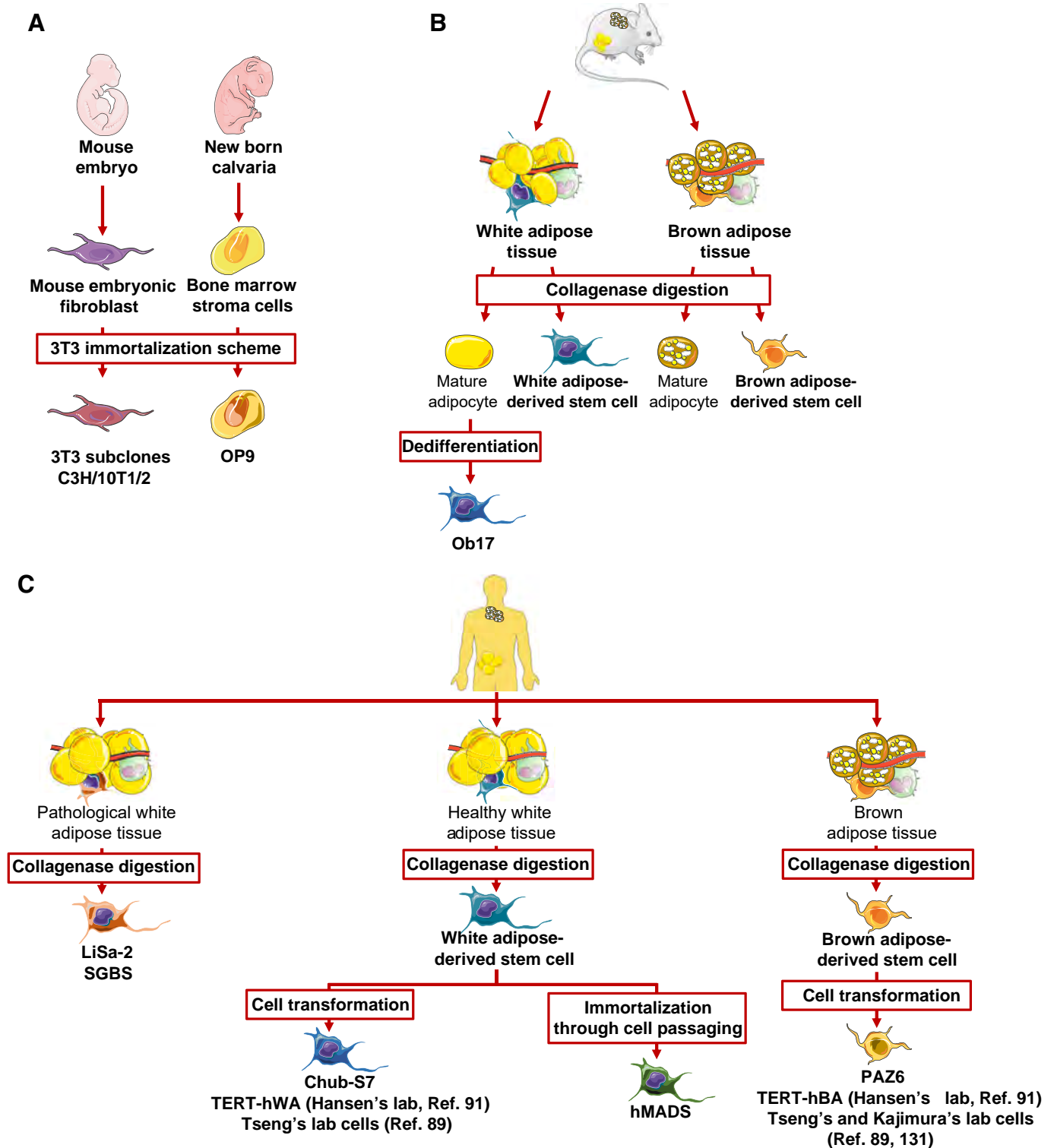
Besides 3T3-L1, other sublines of 3T3 cells have been selected according to their capacity to accumulate fat. Among them, Green and Kehinde (46) described the 3T3-F442A clone obtained from a third selection of clones as being more committed to the adipocyte lineage. The cells are differentiated through mere addition of insulin into a serum-containing medium (10, 47). Despite a higher differentiation potential, 3T3-F442A cells have been used to a much lesser extent than 3T3-L1 (31), which is due primarily to the initial lack of commercial availability. Nevertheless, 3T3-

F442A cells helped characterize the transcriptional program of adipogenesis (48, 49) and are a useful tool when it comes to in vitro study of pharmacological effects on adipocyte biology (50–52). The two 3T3 lines share common advantages and limitations (Table 2).

The C3H/10T1/2 cell line was established during the early 1970s from C3H mouse embryos in a similar way as 3T3 cells (53). Like 3T3 cells, C3H/10T1/2 cells are aneuploid and sensitive to postconfluence arrest of proliferation. Using the demethylating agent 5-azacytidine after seeding, C3H/10T1/2 can differentiate into myocyte, adipocyte, and chondrocyte cells, whose clones can be isolated (54–56). Adipocyte differentiation protocols for C3H/10T1/2 cells have been refined over the years. Treatment with bone morphogenic protein 4 during proliferation followed by treatment with the classical 3T3-L1 adipogenic cocktail leads to more than 90% of cells committed into the adipocyte lineage with high lipid accumulation and adipose-specific gene expression (Table 1) (11). Of note is that adipose conversion of C3H/10T1/2 cells is strictly dependent on PPAR $\gamma$  agonists (12). Besides study of adipogenesis, C3H/10T1/2 cells have been useful for investigating brown adipocyte biology. Treatment of multipotent C3H/10T1/2 cells revealed the importance of BMP7 in acquisition of a brown adipocyte phenotype (57). C3H/10T1/2 cells have also been successfully used for siRNA-mediated gene silencing (58, 59).

Ob17 cells were derived through dedifferentiation of mature adipocytes (acquired through collagenase digestion) obtained from the epididymal fat pad of leptin-deficient *ob/ob* mice (60). Upon seeding, these cells gave rise to colonies, among which the Ob17 subclone was selected based on postconfluence growth arrest and high adipogenic potential. Adipogenic conversion can be achieved without transformation in both serum-containing and serum-free media supplemented with insulin after several passages (60–63). Ob17 cells have been used in the past to investigate the biology of adipocyte lipoprotein lipase (64–67). Similarly, the HGFu cell line has been isolated from epididymal fat pad of lean wild-type mice, and these cells differentiate in a similar manner compared with Ob17 cells (68, 69).

BFC-1, a clonal aneuploid cell line established from the interscapular brown adipose tissue of the C57 BL/6J mouse, was used to study  $\beta$ -adrenergic and insulin response (70). These cells differentiate into adipocytes and do not express



**Figure 2.** Origin of preadipocyte models for cell culture. **A:** mouse 3T3 immortalization scheme. The vast majority of rodent preadipocyte cell lines has been obtained from mouse embryos or pups. Disaggregation of mouse embryos allowed the obtention of mouse embryonic fibroblasts that were used as preadipocyte models in primary culture or were immortalized to obtain 3T3 subclones (Swiss mouse strain) or a variant for C3H subclones (C3H mouse strain). The OP9 cell line has been obtained, submitting bone marrow stroma cell isolated from newborn calvaria deficient in macrophage colony-stimulating factor to the same immortalization scheme as 3T3 cells. **B:** mouse primary culture. Following collagenase digestion of adipose tissue, mature adipocytes may be directly investigated, and stem cells from the stroma vascular fraction may be differentiated in primary cultures. The Ob17 cell line model of preadipocytes was obtained through dedifferentiation of mature adipocytes. **C:** human adipocyte models. Following collagenase digestion, stem cells from the stroma vascular fraction may be differentiated in primary cultures (not shown). Immortalization of human preadipocytes is achieved through cell transformation or extensive cell passaging. LiSa-2 and Simpson-Golabi-Behmel syndrome (SGBS) cell lines have been obtained through collagenase digestion of adipose tissues from patients with rare poorly differentiated pleomorphic liposarcoma and X-linked Simpson-Golabi-Behmel syndrome, respectively. hMADS, human multipotent adipose derived stem cell.

**Table 2.** Advantages and limitations of adipocyte cell models

	Main Advantages			Main Limitations		
	Chromosomal status	Differentiation medium	General features	Chromosomal status	Differentiation medium	General features
<i>Mouse</i>						
Cell lines						
3T3-L1			Precisely established protocol	Aneuploidy	Serum-supplemented media	Transfection issues
3T3-F442A		Insulin only	High differentiation potential	Aneuploidy	Serum-supplemented media	Transfection issues
C3H/10T1/2			Browning potential	Aneuploidy	Serum-supplemented media	
OP9	Unknown		Fast differentiation, CRISPR-Cas9 gene editing	Unknown	Serum-supplemented media	Limited hindsight
Primary cells						
MEF	Euploidy		Use of knockout mouse models, Recapitulate in vivo features (SVF)		Serum-supplemented media	
SVF	Euploidy		Use of knockout mouse models, Recapitulate in vivo features (SVF)		Serum-supplemented media	
<i>Human</i>						
Cell lines						
Immortalized cell lines	Unknown	Fully defined media	Large amount of cells	Unknown		Immortalization procedure and its consequences
Cells derived from pathological conditions		Fully defined media	Large amount of cells	Chromosomal rearrangement and mutations		AT availability, numerous models with poor cross-comparison
Derived hADSC	Euploidy	Fully defined media	Better recapitulate in vivo features			AT availability, numerous models with poor cross-comparison
Primary cells						
hADSC	Euploidy	Fully defined media	Better recapitulate in vivo features			AT availability, numerous models with poor cross-comparison

AT, adipose tissue; hADSC, human adipose-derived stem cells; MEF, mouse embryonic fibroblasts; SVF, stromal-vascular fraction.

the uncoupling protein 1 (UCP1) even upon  $\beta$ -adrenergic agonist treatment (71). BFC-1 cells have been used for characterization of metabolic pathways in a few studies (72).

OP9 cells originate from mice deficient in macrophage colony-stimulating factor (73). They were derived from bone marrow cells isolated from newborn mouse calvaria and were cultured using 3T3 protocols, giving rise to different OP cell lines (Table 1). Among these, OP9 displayed the most pronounced mesenchymal stem cell properties, including surface marker immunophenotype and multiple lineage differentiation potential (74, 75). Following work on lymphohematopoietic differentiation (74, 76), the adipogenic potential of OP9 cells was first described by the Bickel group (13). Unlike 3T3 and C3H cells, induction of OP9 cells leading to expression of adipogenic genes and lipid accumulation is achieved in only 3 days. A derived cell line from OP9, OP9-K, has been reported to be more robust in terms of adipogenesis, easily imaged, and useful for screening of molecules (77). Despite fast differentiation, OP9 cells keep adipogenic potential over time and passages even if propagated from confluent cells, unlike other cell lines. The cells are easy to transfect with plasmids as well as with retroviruses and siRNAs (13, 77). Using CRISPR-mediated genome editing, Bahrami-Nejad et al. (78) recently generated single OP9 cell colonies with tagged endogenous PPAR $\gamma$  and C/EBP $\beta$  proteins. Although OP9 is one of the most recent preadipocyte cell lines, it has been used over the past few years to

investigate adipogenesis and cross-talks between cell types in coculture systems (79–81). Advantages and limitations are not yet fully appreciated. Of note is that OP9 cells need to be continuously cultured at high cell density to obtain optimal differentiation. Moreover, differentiation protocols used for other preadipocyte cell lines lead to pronounced fat accumulation, resulting in cell fragility that compromises cell manipulation, especially immunocytochemistry (13, 31, 77).

#### Human cell lines.

To our knowledge, PAZ6 is the first human preadipocyte cell line, described in the late 1990s (Fig. 2) (16). PAZ6 cells are preadipocytes isolated from infant BAT transformed with a vector containing the SV40 T and T-antigen coding genes. Once differentiated, PAZ6 adipocytes accumulate lipids and express brown/beige markers such as UCP1 and  $\beta_3$ -adrenergic receptors. PAZ6 cells have been used both as white and brown preadipocyte models (82–84). Retrospectively, it appears that other models better recapitulate white and brown adipocyte phenotypes (see below). Darimont et al. (17) described the generation of the Chub-S7 cell line through transformation of human white subcutaneous preadipocytes with papillomavirus E7 oncoprotein and human telomerase reverse transcriptase. An adipogenic capacity is maintained across passages. Chub-S7 adipocytes display expression of adipogenic markers and classical adipocyte metabolic pathway activities. Chub-S7 adipocytes have been used for



studying cellular metabolism (85), adipogenic differentiation, and miRs regulation (86). Other human preadipocyte cell lines were established through the transformation of human adipose-derived stem cells (hADSC) from adipose tissue (AT) stromal vascular fraction. In many attempts, immortalization was accompanied by a decrease in adipogenic potential. Successful examples include the development of cell lines producing prolactin (87), retaining depot-specific features (88), or the isolation of clones of brown and white preadipocytes, allowing characterization of molecular signatures and thermogenic potential (89). These immortalized human white preadipocytes were recently genetically engineered through a CRISPR-derived system activating the UCP1 promoter. Transplantation of engineered precursor cells in mice led to improved metabolic phenotype (90). Markussen et al. (91) isolated TERT-hBA and TERT-hWA cells upon immortalization of brown and white stromal-vascular cells from a single donor. TERT-hWA cells differentiate into adipocytes and are able to convert into beige adipocytes upon rosiglitazone treatment. These cells have not been widely used yet.

Other cellular models of preadipocytes have been obtained from AT of patients with pathological conditions without the need of transformation or immortalization. In the early 2000s, Wabitsch et al. (18) described the development of two cell lines displaying adipogenic potential derived from patients with cancer or rare genetic conditions. The first is the aneuploid LiSa-2 cell line, isolated from a poorly differentiated pleomorphic liposarcoma. Following adipose conversion, LiSa-2 cells accumulate lipids and exhibit adipose metabolic and gene expression features (18). Although LiSa-2 cells have not been extensively used as a preadipocyte model, it should be noted that transcriptomic analysis comparing isolated mature adipocytes, LiSa-2 cells, and PAZ6 cells revealed that LiSa-2 cells resemble primary white adipocytes more closely than PAZ6 cells but still display strong differences concerning lipid metabolism (92). An additional preadipocyte line was derived from subcutaneous stromal-vascular fraction (SVF) of an infant with X-linked Simpson-Golabi-Behmel syndrome (19). Interestingly, although the so-called SGBS cells do not display karyotype aberrations even after several cell divisions and are not immortalized, they remain proliferative in serum-containing medium for around 70 passages, which is likely due to point mutations and chromosomal rearrangements in the *GPC3*, *GPC4*, and *OFD1* genes, which encode proteins that control cell division and growth (93, 94). Despite these chromosomal aberrations, SGBS adipocytes have been widely used (20). Once differentiated, SGBS adipocytes accumulate lipids and display classical adipocyte gene marker expression, including *LPL*, *GPD1*, *SLC2A4*, and *LEP*, and activities of metabolic pathways such as stimulated lipolysis and glucose uptake (19). SGBS cells have been used in studies describing transcriptomic analysis of adipogenesis (95), adipocyte metabolism (96), and inflammation (97). Recent work also highlights the potential of SGBS cells for the study of adipocyte browning, as the transcriptomic profiles differ from that of primary subcutaneous white adipocytes with UCP1 protein expression and metabolic signatures closer to those of brown/beige adipocytes (94). Accentuated

browning can be achieved through sustained PPAR $\gamma$  agonist or BMP7 treatment (98).

Recently, there has been a growing interest in the derivation of hADSCs that does not require cell transformation. During the early 2000s, Rodriguez and colleagues (21, 22) described the isolation of human multipotent adipose-derived stem (hMADS) cells obtained from the SVF of subcutaneous WAT from different infants. The different lines of hMADS cells display donor-specific differences. In the absence of karyotype alterations, significant telomerase activity allows proliferation in serum-containing medium supplemented with human fibroblast growth factor. However, it should be noted that they will eventually cease proliferating, as they are not immortalized. hMADS cells can differentiate into adipocytes, osteoblasts, and chondrocytes. Adipose conversion leads to lipid accumulation in more than 90% of cells exhibiting key adipocyte characteristics (21, 22). hMADS adipocytes have proven to be very useful tools for studying adipocyte biology. Some examples are provided by studies of effects of miRNAs on adipogenesis (99) or of serum amyloid A on lipolysis and adipokine and inflammatory cytokine secretion (100) or the respective importance of lipases in lipolysis through gene silencing, overexpression, and pharmacological modulation (101). Combining siRNA approaches with metabolic, lipidomic, and molecular studies unveiled new pathways in the control of human adipocyte insulin sensitivity (102). hMADS adipocytes acquire a beige adipocyte phenotype upon sustained PPAR $\gamma$  activation, resulting in strong UCP1 expression along with increased expression of beige adipocyte markers and mitochondrial content (103). Therefore, hMADS adipocytes facilitate studies of metabolic adaptations (104) and mitochondrial plasticity linked to being (105). hMADS cells proliferate extensively without being transformed. As they originate from healthy individuals, they may be considered as more physiologically relevant than SGBS cells. Several groups have established equivalent hADSC models with similar characteristics and advantages to hMADS cells (106). Importantly, cryopreserved hADSCs can be successfully established from adult donors, although older donor age (>40–50 yr of age) may negatively impact on the proliferative and differentiation capacity of the cells. As further discussed below, it is a common experience that cell cultures from subcutaneous WAT are relatively easily established, whereas cells from the visceral depot are much less prone to differentiate in hADSC cultures.

## Primary Cell Culture

### Mouse embryonic fibroblasts.

In addition to immortalized mouse embryonic fibroblast (MEF) lines, such as the various 3T3 or C3H subclonal cell lines, primary MEF cells can also be used as preadipocyte models (Table 1 and Fig. 2). These cells are generally subjected to the same differentiation protocols (14). Because MEFs represent a pool of diverse stem cells, only a small percentage of cells differentiate into adipocytes (14). Moreover, earlier passages are used to ensure maximal adipose conversion. Primary MEFs isolated from mice deficient for or overexpressing a gene of interest have been used to investigate the impact of genetic modification on adipogenesis (107, 108).

Modulation of gene expression can also be achieved *in vitro* using siRNA or cDNA transfection (109, 110). Interestingly, similar to the cell types described above, adipose conversion of MEFs leads to expression of classical brown adipocyte markers, including PRDM16 and UCP1 (111). Functional aspects of adipocyte browning have not been thoroughly investigated in primary MEFs.

#### **Rodent adipose tissue-derived progenitors.**

In 1964, Rodbell (112) first described the isolation of SVF from rat AT (Table 1). Once seeded, adipocyte conversion of progenitor cells present in the SVF can be achieved in medium supplemented with fetal calf serum, glucose, and insulin (113) and further enhanced by the addition of classical adipogenic compounds (114, 115). Of note, AT-derived SVF cells are able to differentiate in serum-free media (116). Unlike preadipocyte cell lines, SVF cells proliferate not more than a few passages and rapidly lose their adipogenic potential. However, primary preadipocyte cultures have seen a renewed interest during the last few years as they better recapitulate *in vivo* adipocyte biology (117). Preadipocyte adipogenic potential varies across depots being higher in subcutaneous than in perigonadal fat in mice (118). Of interest, SVF progenitor cells can be obtained from various fat depots with preservation of properties associated with anatomic origin (119–121). SVF can be prepared from rodents of different ages (119, 122), fed different diets (123), and genetically (124, 125) or hormonally modified (126). Preadipocytes can also be isolated and cultured from BAT. The cells differentiate into adipocytes displaying brown adipocyte features when exposed to serum-containing media supplemented with insulin, IBMX, dexamethasone, triiodothyronine ( $T_3$ ), and rosiglitazone (127, 128). Primary brown SVF cells have helped elucidate several aspects of brown adipocyte development and biology (129–132).

#### **Human adipose tissue-derived progenitors.**

Similar to isolation from murine AT, adipocyte progenitors can be routinely obtained from the SVF of human AT (Table 1). Pioneering work in the late 1980s characterized serum-free cell culture media that induced differentiation into adipocytes (133). These protocols have subsequently been optimized by altering the composition, concentration, and timing of pro-adipogenic agents (134). Usually, SVF cells are plated in a medium containing fetal calf serum for the first 24 h. This enables the cells to rest and undergo one round of replication. The following day, cells are washed and incubated in a chemically defined medium supplemented with a cocktail of pro-adipogenic factors, including insulin,  $T_3$ , glucocorticoids, IBMX, and PPAR $\gamma$  agonists. This cell system has been used by a large number of groups and has enabled detailed functional studies, for example, the respective contribution of PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  to adipocyte lipid and glucose metabolism through pharmacological modulation (135), as well as gene knockdown on adipogenesis (136) or overexpression on browning capacity (137). As discussed below, the fact that serum can be omitted in the differentiation medium of human adipocyte progenitors is a clear difference to cultures of murine preadipocytes. Nevertheless, similar to other primary cell systems, an important caveat is the interindividual differences between cells from different donors. For

example, it is commonly observed that cells from older donors (138, 139) or donors with higher body mass index (140) display an attenuated differentiation capacity. Moreover, SVF from subcutaneous and visceral (greater omentum) depots display qualitative differences in differentiation capacity (139, 141). This implies that studies on *in vitro*-differentiated primary adipocytes often require SVF obtained from several donors in order to provide reproducible results. It should be noted that subcutaneous WAT-differentiated preadipocytes can be converted into brown-like adipocytes upon activation of PPAR $\gamma$  (142). Genome editing using CRISPR-Cas9 has been achieved in primary human preadipocytes, leading to robust downregulation of target genes (143).

#### **Common Features and Limitations of 2D Adipocyte Culture Models**

A noticeable redundancy exists between all preadipocytes models concerning both advantages and limitations. Table 2 is an overview of such characteristics that may help in apprehending the interest and limit of each model.

#### **Species differences in composition of differentiation medium.**

Because 3T3-L1 cells provided a framework for the molecular mechanisms of adipogenesis, use of their specific pharmacological activators became the gold standard of adipogenesis induction *in vitro*. As described in Table 1, the composition of pro-adipogenic media is similar for most of the cell types. However, some peculiarities and species-specific features can be observed. Briefly, the use of a cocktail containing insulin, dexamethasone, and IBMX is broadly used in the various cell models, except for 3T3-F442A and LiSa-2 cells. Whereas the requirement of PPAR $\gamma$  agonists is mandatory for optimal differentiation of human preadipocyte models, it is usually optional for rodent cells, with the exception of MEF and C3H/10T1/2 cells. This may be due to the ability of rodent cells to produce endogenous PPAR $\gamma$  ligands during adipose conversion in contrast to human cells (144). *In vivo*, PPAR $\gamma$  ligands have recently been suggested to be produced by endothelial cells of human WAT (145, 146). Another major point is supplementation with serum. It was shown earlier that human primary cells and human cell lines engage in adipose conversion using chemically defined media (133, 147). On the other hand, mouse cells require the use of serum, except for OP9 cell line differentiated in serum-free medium with high concentrations of the hormonal cocktail compounds. Finally, the use of  $T_3$  is important for culturing human cells, whereas it is often dispensable in mouse cell cultures, as serum is present.

#### **Intrinsic cellular characteristics of 2D preadipocyte models.**

*In vitro* differentiation of primary and cell line-derived preadipocytes leads to lipid accumulation in small multilocular lipid droplets (LD), reflecting the immaturity of such white adipocytes compared with the mature white adipocytes observed *in vivo*, which contain a large unilocular LD. Therefore, *in vitro* investigations of LD dynamics in 2D cultures remain limited, and although recent advances have allowed better understanding of LD biogenesis (148), the

mechanisms controlling LD size remain elusive. It seems that components of the volume-regulated anion current play an important role in the ability of adipocytes to expand that is linked mainly to both insulin and fibroblast growth factor signaling (149–151). The large variation in adipocyte unilocular LD size under various pathophysiological conditions likely involves other molecular mechanisms.

Although primary preadipocytes represent the most physiological model of adipose precursors, the cells lose their adipogenic potential after a few rounds of division. Cell lines often display aneuploidy and karyotype aberrations (Table 2). Specific consequences of aneuploidy on preadipocytes and adipocyte cell biology are poorly documented. The general cellular consequences of aneuploidy have recently been reviewed (152). Briefly, despite conferring a proliferative behavior in embryonic mouse cells, aneuploidy is associated with increased mRNA and protein expression due to increased chromosome copies that can result in aberrant induction of signaling pathways, proteotoxic stress with increased autophagy and lysosomal activity resulting from accumulation of misfolded proteins, and genomic instability that can further induce DNA damage.

#### Commercial availability and use.

The mouse preadipocyte cell lines described herein are commercially available. Among them, 3T3-L1 is the most widely used today. The use of human cell lines is much more limited and restricted to a few groups because they are not commercially available and usually have to be provided under specific MTAs. As an example, PubMed data from 2015 to 2020, including “3T3-L1” in the title search, gives around 3,000 publications, whereas “3T3-F442A” and “SGBS” give 35 and 76 publications, respectively.

## PRIMARY MATURE ADIPOCYTE SURVIVAL

To circumvent the limitations of 2D cultures, methods have been developed to directly investigate mature adipocytes.

### Isolated Mature Adipocytes

When Rodbell (112, 153) and Rodbell and Jones (154) set up the method for mature adipocyte isolation through collagenase digestion, they could describe novel aspects of fat cell glucose and lipid metabolism and their hormonal regulation. Isolated adipocytes have since been used extensively to investigate fat cell metabolism. However, isolated adipocytes are fragile and survive only a few hours (112), and thus various attempts have been made to develop protocols to maintain mature adipocytes in culture for longer periods.

### Scaffold-Embedded Adipocytes

Because adipocyte survival is compromised *in vitro* due to their buoyancy in the liquid phase, multiple methods embed mature adipocytes in a semi-solid matrix. Sugihara et al. (155) were the first to describe the maintenance of freshly isolated mature human and rat adipocytes in a collagen 3D scaffold. In this setup, the adipocytes could be maintained in culture for several days with preserved catecholamine-induced lipolysis. However, cells rapidly showed signs of dedifferentiation, acquiring a fibroblast-like morphology containing multi-

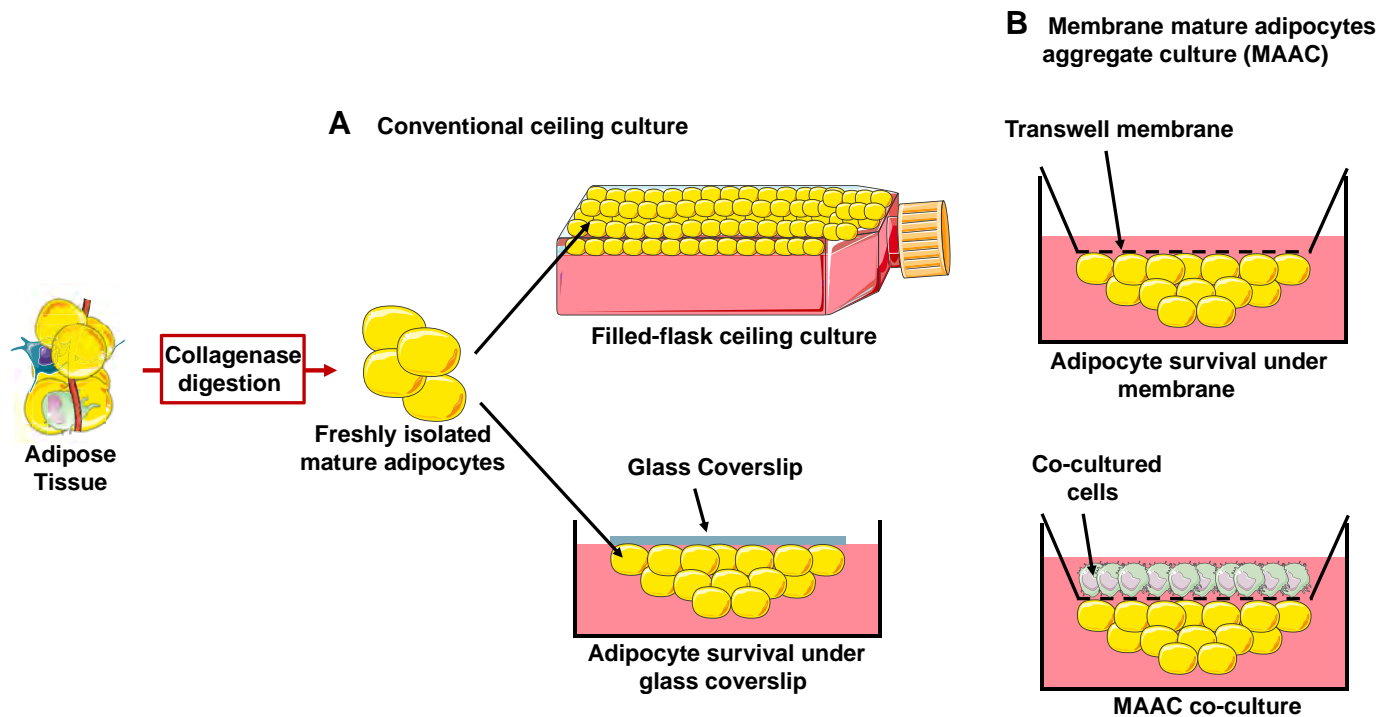
locular LD and re-entering the cell cycle. Moreover, collagen-derived matrices are semiliquid at 37°C, impairing proper cell embedding (156). A few years later, embedding of mature adipocytes in Matrigel was reported to allow the maintenance of cells for at least 6 days, during which they retained a unilocular LD as well as adipose marker protein expression and gene induction by insulin (157). More recently, Hong et al. (156) used a hyaluronan-based hydrogel to investigate the impact of hypoxia on murine and human mature adipocytes. A small proportion of the adipocytes embedded in this hydrogel re-entered the cell cycle and started to proliferate, but most of them retained a unilocular shape for several days. The proliferation observed might be due to dedifferentiation or to contaminating fibroblasts that remain attached to adipocytes during cell isolation. Another major issue is the poor transduction of mature adipocytes with lentiviral vectors (158). Altogether, only a few studies have been performed using adipocytes in 3D matrix cultures.

### Ceiling Cultures

For ceiling cultures, isolated mature adipocytes are placed in a classical plastic culture flask completely filled in with culture medium supplemented with fetal calf serum to avoid cell-air interface (Fig. 3; also see Ref. 159). Because of their buoyancy, floating mature adipocytes accumulate on the upper side of the flask and eventually firmly adhere to it, allowing the flask to be turned upside down for inspection and imaging of cell morphology. The adipocytes respond to insulin with increased lipogenic activity, resulting in increased LD size, or to norepinephrine with increased lipolysis-mediated glycerol release. Although adipocytes survive in ceiling culture for several days, they display progressive changes toward fibroblastic morphologies with multilocular LD due to dedifferentiation (159). In the early 2000s, Zhang et al. (160) revisited the ceiling culture system with small numbers of freshly isolated mature adipocytes cultured in six-well plates covered with glass coverslips (Fig. 3). Once adipocytes adhered to the coverslip, they survived for 10 to 14 days with preserved metabolic activity and no sign of dedifferentiation (160). The use of glass coverslips facilitates imaging procedures, such as confocal microscopy. However, mature adipocyte ceiling cultures have not been extensively used. During the last few years, they have gained renewed interest in research on cell therapy and tissue engineering, as mature adipocytes eventually dedifferentiate into precursors cells that retain the ability to undergo adipogenesis (161, 162) and display pluripotency markers along with stem cell multiple lineage potential (163).

### Membrane Mature Adipocyte Aggregate Culture

Recently, Harms et al. (164) described a variant of the ceiling culture in which a small amount of human mature adipocytes aggregate under permeable small pore Transwell membranes (Fig. 3). The authors showed that cells retained mature adipocyte gene expression signature, functional response, and fat depot-specific difference. Dedifferentiation is moderate. Culturing under Transwells facilitates the establishment of coculture systems. As a proof of concept, the authors cocultured human membrane mature adipocyte aggregate culture (MAAC) and murine RAW264 macrophages



**Figure 3.** Ceiling culture techniques for mature adipocyte survival. **A:** conventional ceiling culture. Conventional ceiling can be achieved culturing isolated mature adipocytes in a flask fully filled with culture media. Due to buoyancy, adipocytes adhere to the top of the flask and avoid direct contact with air. Culture under a glass coverslip in a multiwell plate improves adipocyte survival, facilitates microscopy, and reduces dedifferentiation. **B:** membrane mature adipocyte aggregate culture (MAAC). A Transwell membrane is used as support. The setting allows maintenance of mature adipocytes without dedifferentiation for several days and cocultures with other cell types.

with synergistic response to lipopolysaccharides. Similar to hADSC adipocytes and human-differentiated preadipocytes in primary culture, MAAC cells are efficiently transduced with adenoviruses. Long-term treatments with rosiglitazone and insulin lead to the induction of a brown-like phenotype with increased expression of UCPL. MAACs have also been established from mouse WAT.

### Adipose Tissue Explant Cultures

The first AT explant culture is attributed to the work of Smith (165) and Smith And Jacobsson (166) during the early 1970s. Explants are small pieces of WAT containing AT-resident cell types that can be maintained in culture for several weeks between two coverslips. Whereas adipocyte spherical morphology in AT explant did not change when maintained in the absence of serum, serum addition to the medium resulted in proliferation of fibroblast-like cells. Collagenase digestion of AT explants yielded adipocytes containing large unilocular LD, but whose diameter was smaller than freshly isolated adipocytes. Cell size directly measured on explants revealed that the decrease in cell size was higher when cells were incubated with serum. Interestingly, even after 2 wk of culture, AT explants remain metabolically active (165, 166).

AT explants have been widely used to investigate the lipolytic response of AT under various conditions and the impact of this lipolysis on stromal cells contained in the explant (167, 168). They also represent an interesting model to investigate AT inflammation as well as angiogenesis (169) and have been used to investigate adipokine and cytokine secretion in response to pharmacological treatments (170).

Although the explant model of mature adipocyte maintenance seems to be a useful tool to investigate adipocyte biology, explant culture is also associated with changes in adipocyte phenotype, such as increased expression of pro-inflammatory factors, resulting in altered pattern of adipocyte marker gene expression and substantial dedifferentiation (171). Recently, Huang et al. (172) described mouse BAT explant culture for 24 h to investigate signaling pathways.

### Sandwiched WAT

A new kind of AT explant method has recently been reported: a small human AT fragment being enclosed between two monolayers of adipose stromal cells (173). The so-called sandwiched WAT remains viable for 7 wk. Mature adipocytes can be released from the scaffold through collagenase digestion. Sandwiched WAT has maintained secretory activity such as leptin release. Following decrease during the first day of culture compared with native tissue, expression of adipose marker gene expression is maintained thereafter for several weeks. Catecholamine and insulin stimulation lead to comparable lipolysis and glycolysis, as in freshly harvested WAT, during at least 5 days. Sandwiched WAT can be reimplanted in vivo in mice with viable adipocytes of normal size after 10 days. This model offers an interesting new tool to investigate mid- to long-term mature adipocyte culture, as the sandwiched WAT adipocytes do not dedifferentiate into fibroblast-like cells for at least 4 wk. The procedure is time consuming and not easy to set up.

## Limitations and Progress

Although various attempts have been made to allow middle- and long-term maintenance of primary mature adipocytes in vitro, each approach leads to changes in adipocyte characteristics, notably cell morphology and gene expression pattern. Mature adipocyte buoyancy remains a constraint. A constant need for fresh tissue is another important limitation, especially for human WAT. It must be kept in mind that isolation of mature fat cells by collagenase digestion is per se responsible of phenotypic changes such as decrease in adipocyte marker gene expression and induction of pro-inflammatory factors. However, the detrimental effect of collagenase digestion on inflammatory response can be mitigated through optimization of digestion conditions (174).

## ADVENT OF SPHEROID MODELS

Spheroid cultures have been developed for differentiation of progenitor cells or culture of differentiated cells in 3D as a means to get closer to mature cells in native tissues. Before the recent development in adipose spheroid culture is described, a rapid survey of progress for other cell types provides essential features of this approach.

The context and microenvironment of a cell play essential roles in the control of cellular decision making. Cell-cell and cell-matrix interactions shape molecular phenotypes and regulate cell morphology (175), migration (176), metabolism (177), and proliferation (178). In conventional 2D monolayer cultures, these interactions are grossly perturbed. To more closely recapitulate the cellular microenvironment, 3D cell cultures were developed, with the first seminal publications reporting carcinoma cell culture in spheroidal aggregates published almost 50 years ago (179). Not long after, such spheroid cultures were also established for the culture of primary cells. Specifically, the authors noted that 3D cultures of murine mammary epithelium were phenotypically stable and more closely resembled their in situ tissue counterparts than conventional 2D cultures (180). Despite these early successes, the use of 3D methods for the culture of primary human cells has lagged considerably behind and received widespread attention only in the last decade.

By now, a multitude of methodologically diverse 3D culture protocols have been developed that support the maintenance of primary human cells, including spheroid cultures, hollow-fiber bioreactors, and microfluidic organ-on-a-chip systems (181–188). Spheroids arguably constitute the most extensively studied 3D culture method for mature human cells. Single-cell suspensions with defined cell concentrations are seeded into ultra-low attachment plates or hanging drops in the presence or absence of extracellular scaffolds such as matrigel, alginate, or collagens. Over the course of hours to days, depending on the cell type, the cells in suspension aggregate into spheroidal structures with highly homogenous and well-defined sizes, typically in the range of 200–400  $\mu\text{m}$  in diameter.

Spheroid cultures have been used extensively for the culture of human hepatocytes, cardiomyocytes, and neuronal cells. Spheroid cultures of primary human hepatocytes retained their transcriptomic (189, 190), proteomic (190, 191), and metabolomic signatures (192) for multiple weeks,

whereas 2D monolayer or sandwich cultures from the same donors rapidly deteriorated. Spheroid cultures similarly extended the functionality and lifespan of human stem cell-derived cardiomyocytes (193, 194) and of various neuronal cell types (195, 196). Whereas early 3D cultures were established mostly from single cell types, more advanced models have been developed that allow the coculture of multiple tissue resident cell types, including immune cells, endothelial cells, or pericytes.

## SPHEROIDS OF ADIPOCYTE PROGENITORS

Given the encouraging results on morphology, molecular phenotype, and functional characteristics observed with spheroid culture in various tissues, similar approaches have recently been established for the differentiation of adipocyte progenitor cells in 3D. Adipose spheroid culture may address some of the limitations observed with primary adipocyte survival.

### 3T3-L1- and 3T3-F442A-Based Spheroid Cultures

Turner et al. (197) described one of the first 3T3-L1 spheroid cultures generated by seeding cells on plates coated with positively charged elastin-like polypeptide-polyethyleneimine conjugates. However, attachment forces were mild, resulting in spheroids of heterogeneous sizes. Compared with 2D cultures, these spheroids displayed increased triglyceride content and higher expression of *Pparg*, *Adipoq*, *Cd36*, and *Cd40* (198, 199). Spheroids also exhibited more robust effects of TNF $\alpha$  on lipolysis compared with monolayer cultures. Other spheroid cultures of adipocyte-like cell lines use a variety of different scaffolds. Spheroid cultures of 3T3-L1 and 3T3-F442A cells in a cross-linked hyaluronic acid scaffold featuring key adipose extracellular matrix components (collagens I and VI and the cell-binding domain of fibronectin) in microwell plates displayed greater lipid accumulation than those in 2D monolayer cultures (200). Furthermore, stimulation with the  $\beta$ -adrenergic agonist isoproterenol resulted in an increase in lipolysis in 3D-differentiated 3T3-F442A cultures, with 3T3-F442A cells featuring more pronounced adipocyte features than 3T3-L1 (201). Alternatively, 3T3-L1 spheroids can be generated using cellular bioprinting of cell-hydrogel droplets in an oil mixture before gelation and subsequent transfer to low-cell attachment microwell plates (202). However, although 3D cultures in this setup exhibited higher expression of *Pparg*, *Fabp4*, *Adipoq*, *Fasn*, and *Plin1* compared with monolayer culture, spheroids displayed multilocular cells. Normalized lipid levels, as well as leptin and adiponectin secretion, were higher in 2D cultures.

Interestingly, culture of 3T3-L1 cells suspended in agarose promoted differentiation without the need for additional chemical adipogenic induction (203). In these cultures, a compact spheroid is not formed, and cells remain only loosely associated. The authors reported LD formation as early as after 24 h of culture, whereas prolonged culture with fetal bovine serum for 2 wk resulted in the greatest lipid accumulation. Although this method allows for single-cell observation and analysis, lipid accumulation remains limited. Medium exchange and cell extraction complicate the approach.

## Human Adipose-Derived Stem Cell-Based 3D Cultures

One of the first 3D reconstructions of AT included the encapsulation of hADSCs in poly(ethylene glycol) diacrylate hydrogel (204, 205). These tissue constructs accumulated lipids, secreted adipokines, and were susceptible to  $\beta$ -adrenergic receptor-stimulated lipolysis. Verseijden et al. (206) compared adipogenesis of hADSCs in scaffold-free spheroids and fibrin-based constructs and found that fibrin-based constructs exhibited lipid accumulation and significant increase in *PPARG*, *PLINI*, *FABP4*, or *LEP* expression. Notably, coculture of 3D hADSC spheroids with human umbilical vein endothelial cells allowed for the formation of vascular structures while adipogenic differentiation was induced (207). Implantation of the spheroids in mice resulted in increased vasculogenesis within the constructs, suggesting interaction with the host vascular system.

Other culture approaches used for the formation of hADSC-derived adipose spheroids include hanging drops (208), ultra-low attachment plates (209), rotating bioreactors (208), bioprinting of methacrylated gelatin ink-encapsulated spheroids (210), culture on elastin-like polypeptide-polyethyleneimine surfaces (211), and hydrogels within well plates (212, 213). Spheroids can also be formed from UET-13 cells, which are bone marrow stromal cells with a prolonged lifespan through retroviral transduction using plates featuring microfabricated honeycomb arrangements (214). Furthermore, a recent study generated hADSC spheroids using a liquid overlay technique by coating 96-well plates with agarose, followed by cell culture in growth medium on an orbital shaker (215). Although lipid accumulation was not extensive, the authors reported the formation of an extracellular microenvironment containing collagens, laminin, and low fibronectin levels, which resembled native AT. The use of hADSCs may be beneficial for vascularization and in vivo transplantation due to their ability to secrete angiogenic factors (206).

## Stromal Vascular Fraction-Based 3D Cultures

To our knowledge, the first attempt of 3D culture of mouse adipose SVF was successfully achieved in a collagen hydrogel (216). In this study, an increased adipogenic differentiation of subcutaneous AT-derived progenitors compared with 2D cultures was observed, as indicated by higher expression levels of adipocyte-specific genes and unilocular LD formation. Even more interestingly, the study described similar differentiation levels between subcutaneous and visceral progenitor in 3D culture, as shown by similar levels of expression of *Adipoq*, *Fabp4*, and *Pparg* and other metabolic genes, similar lipid accumulation, and unilocular LD formation. Although both subcutaneous and visceral 3D cultures displayed inducible lipolysis and thermogenesis when stimulated with isoproterenol, they retained depot-specific features, including distinct transcriptional profiles, but also higher thermogenic gene expression in subcutaneous as well as higher cytokine expression and secretion in visceral AT-derived progenitor cultures.

Recently, human and mouse SVF-derived adipose spheroids were generated using scaffold-free hanging drops before transfer to ultra-low attachment plates (217). A noticeable advantage of these primary human SVF-derived spheroids is their

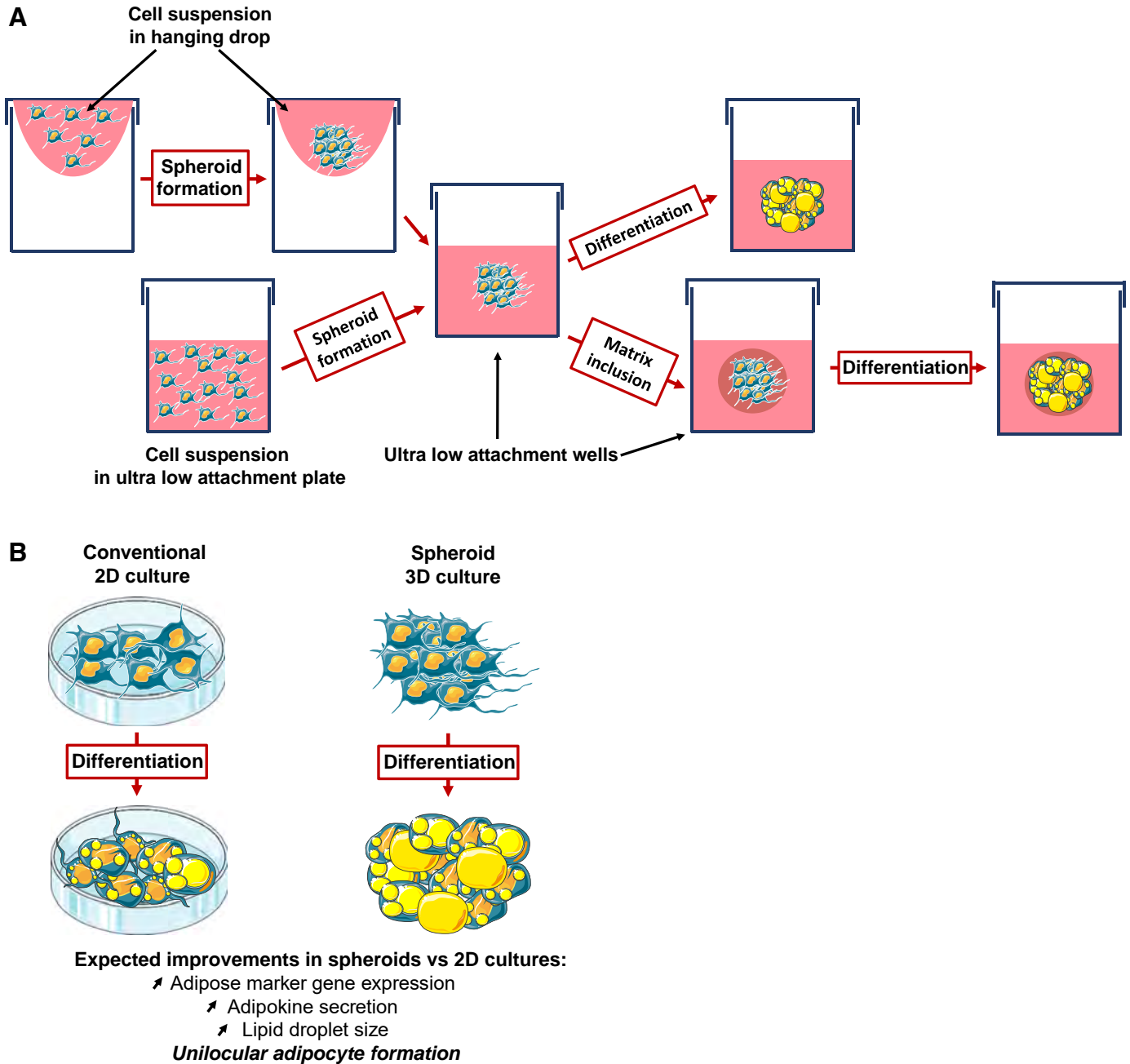
scalability, large number of unilocular LD, and relevant molecular phenotype after 31 days of differentiation. Spheroids were also sensitive to environmental toxins, exhibiting fewer and smaller LD, lower adiponectin secretion, and higher IL-8 production. However, expression of key adipocyte markers in the spheroids was less than twofold higher compared with 2D cultures, suggesting the need for further optimization of the protocols. A schematic overview of the main approaches to generate adipose spheroids is given in Fig. 4.

Coculture of preadipocyte spheroids with the corresponding endothelial cells from the same SVF allowed for the recapitulation of some aspects of in vivo vascularization (218). Constructs were formed using ultra-low attachment surfaces and stirring of cultures allowed for nutrient diffusion and sprouting before cells were incorporated into Matrigel droplets. Subsequently, to maintain endothelial cells, differentiation was performed using a medium omitting the typical pro-adipogenic differentiation medium components (IBMX and rosiglitazone) and indomethacin, striking a balance between sufficient adipogenic induction and endothelial cell preservation. Moreover, fatty acids in the differentiation medium facilitated lipid loading. Consequently, endothelial cells self-assembled into vascular networks featuring tubular structures, and transplantation of the vascularized adipose constructs in mice resulted in vessels containing both human and mouse endothelial cells. Although multilocular adipocytes were still present, several unilocular cells were observable in the cultures, in which early and late adipocyte differentiation markers were upregulated after 10 days of differentiation.

Co-culture of adipocyte spheroids has also been generated from perinephric AT-derived SVF to recapitulate the perinephric adipose microenvironment using liquid overlay-based culture (219). Ultimately, coculture with the adipocyte spheroids could shift unpolarized macrophages to acquire an alternatively activated M2 phenotype. The heterogeneity of the SVF allows for the possibility of incorporating different cell types in addition to preadipocytes into the adipose model, more closely mimicking the tissue in vivo. Another advantage of SVF is that it is more easily obtained than hADSCs (220).

## Main Advantages and Limitations

Spheroid culture systems of adipose progenitor cells reveal striking advantages over conventional 2D culture approaches. 3D-cultured cells exhibit higher differentiation levels, as indicated by increased adipocyte gene expression and also unilocular LD formation, which cannot be achieved in 2D cultures (Fig. 4). Therefore, 3D cultures recapitulate much more closely the adipocyte function and morphology observed in vivo. Another interesting aspect is the ability to efficiently differentiate visceral adipose progenitors, which is only poorly achieved in 2D culture. The preservation of depot-specific features is promising but has so far been shown only for murine cells. Finally, the possibility of adding other cell types like endothelial cells, which can provide vascular structures, enables advances beyond adipocyte monocultures toward complex AT organoids. However, 3D culture is technically more challenging and time consuming compared with 2D cultures, as the individual aggregates can be easily damaged and require the use of expensive plates or scaffolds.



**Figure 4.** Schematic overview of preadipocyte spheroid culture. *A*: spheroid formation. Isolated primary adipocytes spontaneously gather in a spheroid shape when placed in an ultra-low attachment plate or in hanging drop. Once formed, the spheroids are kept in ultra-low attachment wells to be differentiated scaffold free or following matrix inclusion. *B*: improved differentiation in adipose spheroids. Compared with conventional 2-dimensional (2D) culture, primary preadipocytes differentiated into spheroid structures display increased adipose marker gene expression, adipokine secretion, and lipid droplet size. The formation of unilocular fat cell can be achieved in such conditions, which is not the case in 2D culture. 3D, 3-dimensional.

## CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES: MODELING FAT CELL DYSFUNCTION

In mammals, white adipocytes ensure safe and efficient storage of triacylglycerols and their mobilization via fatty acids. Lipid turnover in white adipocytes confers to AT an essential role in whole body metabolic homeostasis. Fat cells are also recognized as important producers of paracrine and endocrine factors. The endocrine function of AT is considered as an essential link between increased fat mass and the

development of insulin resistance, and adipocyte dysfunction constitutes a cardinal event in the development of insulin resistance and associated disorders. Key to the recognition of these essential roles has been the development of appropriate cellular models. Major methodological progress has been achieved since the pioneering development of the 3T3-L1 mouse preadipocyte cell line. The main challenges today include the establishment of better protocols to isolate proliferative and cryopreservable hADSCs from donors of different sexes, ages, body mass indexes, and pathophysiological

conditions. Such efforts will help define the intrinsic and interindividual diversity at the cellular level and how it links to clinical phenotypes and may also reveal which properties are retained after multiple passages, e.g., through epigenetic imprinting.

A major challenge remains to establish hADSCs from the visceral fat depot; these attempts have not been fully satisfactory so far. Whether this is due to intrinsic differences of visceral compared with subcutaneous hADSCs or to environmental cues (e.g., the influence of neighboring immune and endothelial cells, which are more abundant in visceral than in subcutaneous WAT) remains unknown. Moreover, functional investigation of adipocytes from smaller depots such as bone marrow, perivascular, mammary, epicardial, joint, dermal, retro-orbital, and plantar WAT is needed. ADSCs from other depots will help in understanding adipocyte heterogeneity in relation to anatomic and developmental origins and may possibly uncover new disease mechanisms. Another layer of heterogeneity is provided by the recent recognition of diversity among adipocytes within a fat depot. Several populations of white and beige adipocytes with unique metabolic and endocrine properties and differential response to exogenous stimuli have been identified within a fat depot (221). This challenge will be addressed by further developments in 2D and 3D cultures of ADSCs and primary mature adipocytes possibly combined with novel single-cell approaches. Addressing the roles of proteins and cognate pathways will be achieved through the large number of novel gene editing tools that can be used in vivo to produce mouse transgenic lines and derive ex vivo adipose culture models and in vitro to generate genetically engineered hADSCs. A better understanding of adipocyte biology may allow refined patient stratification and help identify individuals who could benefit the most from existing therapeutic approaches. Moreover, it may enable the development of future adipocyte-targeted strategies for the treatment of metabolic diseases.

## GRANTS

This work was produced within the framework of the European Research Council (ERC) Synergy Grant SPHERES (agreement no. 856404) under the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Programme (erc-spheres.univ-tlse3.fr). D.L. is supported by Inserm, Paul Sabatier University, Fondation Pour la Recherche Médicale (DEQ20170336720), Agence Nationale de la Recherche (ANR-17-CE14-0015Hepadiologie), Région Occitanie (DIALOGUE projects), FORCE/F-CRIN, and AstraZeneca France. D.L. is a member of Institut Universitaire de France. M.R. is supported by grants from Knut and Alice Wallenberg's foundation, Margareta af Uggle's foundation, the Swedish Research Council, the NovoNordisk Foundation (NNF15CC0018486 and NNF15SA0018346), CIMED, the Swedish Diabetes Foundation, the Stockholm County Council and the Strategic Research Program in Diabetes at Karolinska Institutet.

## DISCLOSURES

V.M.L. is CEO and shareholder of HepaPredict AB, as well as CSO and chairman of the board of PersoMedix AB. In addition, V.M.L. discloses consultancy work for Enginzyme AB. None of the other authors has any conflicts of interest, financial or otherwise, to disclose.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

J.D., M.R., and D.L. drafted manuscript; J.D., V.M.L., M.R., D.L., J.X.S., M.C., T.d.C.B., N.M., L.M., E.G., E.M., and E.Z.A. edited and revised manuscript; J.D., V.M.L., M.R., D.L., J.X.S., M.C., T.d.C.B., N.M., L.M., E.G., E.M., and E.Z.A. approved final version of manuscript.

## REFERENCES

- Rosen ED, Spiegelman BM. What we talk about when we talk about fat. *Cell* 156: 20–44, 2014. doi:10.1016/j.cell.2013.12.012.
- Carobbio S, Pellegrielli V, Vidal-Puig A. Adipose tissue function and expandability as determinants of lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Adv Exp Med Biol* 960: 161–196, 2017. doi:10.1007/978-3-319-48382-5\_7.
- Todaro GJ, Green H. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol* 17: 299–313, 1963. doi:10.1083/jcb.17.2.299.
- Green H, Kehinde O. An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* 5: 19–27, 1975. doi:10.1016/0092-8674(75)90087-2.
- Russell TR, Ho R. Conversion of 3T3 fibroblasts into adipose cells: triggering of differentiation by prostaglandin F2alpha and 1-methyl-3-isobutyl xanthine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73: 4516–4520, 1976. doi:10.1073/pnas.73.12.4516.
- Rubin CS, Hirsch A, Fung C, Rosen OM. Development of hormone receptors and hormonal responsiveness in vitro. Insulin receptors and insulin sensitivity in the preadipocyte and adipocyte forms of 3T3-L1 cells. *J Biol Chem* 253: 7570–7578, 1978. doi:10.1016/S0021-9258(17)34541-6.
- Kletzien RF, Clarke SD, Ulrich RG. Enhancement of adipocyte differentiation by an insulin-sensitizing agent. *Mol Pharmacol* 41: 393–398, 1992.
- Vishwanath D, Srinivasan H, Patil MS, Seetarama S, Agrawal SK, Dixit MN, Dhar K. Novel method to differentiate 3T3 L1 cells in vitro to produce highly sensitive adipocytes for a GLUT4 mediated glucose uptake using fluorescent glucose analog. *J Cell Commun Signal* 7: 129–140, 2013. doi:10.1007/s12079-012-0188-9.
- Zebisch K, Voigt V, Wabitsch M, Brandsch M. Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. *Anal Biochem* 425: 88–90, 2012. doi:10.1016/j.ab.2012.03.005.
- Djian P, Phillips M, Green H. The activation of specific gene transcription in the adipose conversion of 3T3 cells. *J Cell Physiol* 124: 554–556, 1985. doi:10.1002/jcp.1041240327.
- Tang QQ, Otto TC, Lane MD. Commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 9607–9611, 2004. doi:10.1073/pnas.0403100101.
- Alexander DL, Ganem LG, Fernandez-Salguero P, Gonzalez F, Jefcoate CR. Aryl-hydrocarbon receptor is an inhibitory regulator of lipid synthesis and of commitment to adipogenesis. *J Cell Sci* 111: 3311–3322, 1998.
- Wolins NE, Quaynor BK, Skinner JR, Tzekov A, Park C, Choi K, Bickel PE. OP9 mouse stromal cells rapidly differentiate into adipocytes: characterization of a useful new model of adipogenesis. *J Lipid Res* 47: 450–460, 2006. doi:10.1194/jlr.D500037-JLR200.
- Swiersz LM, Giaccia AJ, Yun Z. Oxygen-dependent regulation of adipogenesis. *Methods Enzymol* 381: 387–395, 2004. doi:10.1016/S0076-6879(04)81026-7.
- Kilroy G, Dietrich M, Wu X, Gimble JM, Floyd ZE. Isolation of murine adipose-derived stromal/stem cells for adipogenic differentiation or flow cytometry-based analysis. *Methods Mol Biol* 1773: 137–146, 2018. doi:10.1007/978-1-4939-7799-4\_11.
- Zilberfarb V, Piétri-Rouxel F, Jockers R, Krief S, Delouis C, Issad T, Strosberg AD. Human immortalized brown adipocytes express functional beta3-adrenoceptor coupled to lipolysis. *J Cell Sci* 110: 801–807, 1997.
- Darimont C, Zbinden I, Avanti O, Leone-Vautravers P, Giusti V, Burckhardt P, Pfeifer AM, Macé K. Reconstitution of telomerase activity combined with HPV-E7 expression allow human preadipocytes to preserve their differentiation capacity after immortalization. *Cell Death Differ* 10: 1025–1031, 2003. doi:10.1038/sj.cdd.4401273.
- Wabitsch M, Bründlerlein S, Melzner I, Braun M, Mechtersheimer G, Möller P. LiSa-2, a novel human liposarcoma cell line with a high



- capacity for terminal adipose differentiation. *Int J Cancer* 88: 889–894, 2000. doi:10.1002/1097-0215(20001215)88:6<889:AJD-JC8>3.0.CO;2-N.
19. **Wabitsch M, Brenner RE, Melzner I, Braun M, Möller P, Heinze E, Debatin KM, Hauner H.** Characterization of a human preadipocyte cell strain with high capacity for adipose differentiation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25: 8–15, 2001. doi:10.1038/sj.jco.0801520.
  20. **Fischer-Posovszky P, Newell FS, Wabitsch M, Tornqvist HE.** Human SGBS cells - a unique tool for studies of human fat cell biology. *Obes Facts* 1: 184–189, 2008. doi:10.1159/000145784.
  21. **Rodriguez AM, Elabd C, Delteil F, Astier J, Vernochet C, Saint-Marc P, Guesnet J, Guezennec A, Amri EZ, Dani C, Ailhaud G.** Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 315: 255–263, 2004. doi:10.1016/j.bbrc.2004.01.053.
  22. **Rodriguez AM, Pisani D, Dechesne CA, Turc-Carel C, Kurzenne JY, Wdziekonski B, Villageois A, Bagnis C, Breittmayer JP, Groux H, Ailhaud G, Dani C.** Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J Exp Med* 201: 1397–1405, 2005. doi:10.1084/jem.20042224.
  23. **Green H, Meuth M.** An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* 3: 127–133, 1974. doi:10.1016/0092-8674(74)90116-0.
  24. **Ghaben AL, Scherer PE.** Adipogenesis and metabolic health. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20: 242–258, 2019. doi:10.1038/s41580-018-0093-z.
  25. **Cao Z, Umek RM, McKnight SL.** Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev* 5: 1538–1552, 1991. doi:10.1101/gad.5.9.1538.
  26. **Christy RJ, Yang VW, Ntambi JM, Geiman DE, Landschulz WH, Friedman AD, Nakabeppu Y, Kelly TJ, Lane MD.** Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes: CCAAT/enhancer-binding protein interacts with and activates the promoters of two adipocyte-specific genes. *Genes Dev* 3: 1323–1335, 1989. doi:10.1101/gad.3.9.1323.
  27. **Zhang JW, Klemm DJ, Vinson C, Lane MD.** Role of CREB in transcriptional regulation of CCAAT/enhancer-binding protein beta gene during adipogenesis. *J Biol Chem* 279: 4471–4478, 2004. doi:10.1074/jbc.M311327200.
  28. **Wiper-Bergeron N, Salem HA, Tomlinson JJ, Wu D, Haché RJ.** Glucocorticoid-stimulated preadipocyte differentiation is mediated through acetylation of C/EBPbeta by GCN5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 2703–2708, 2007. doi:10.1073/pnas.0607378104.
  29. **Tang QQ, Lane MD.** Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annu Rev Biochem* 81: 715–736, 2012. doi:10.1146/annurev-biochem-052110-115718.
  30. **Brun RP, Tontonoz P, Forman BM, Ellis R, Chen J, Evans RM, Spiegelman BM.** Differential activation of adipogenesis by multiple PPAR isoforms. *Genes Dev* 10: 974–984, 1996. doi:10.1101/gad.10.8.974.
  31. **Ruiz-Ojeda FJ, Ruperez AI, Gomez-Llorente C, Gil A, Aguilera CM.** Cell models and their application for studying adipogenic differentiation in relation to obesity: a review. *Int J Mol Sci* 17: 1040, 2016. doi:10.3390/ijms17071040.
  32. **Chang YH, Tsai JN, Chang SW, Hsu WT, Yang CP, Hsiao CW, Shiau MY.** Regulation of adipogenesis and lipid deposits by collapsin response mediator protein 2. *Int J Mol Sci* 21: 2172, 2020. doi:10.3390/ijms21062172.
  33. **Cisneros-Zevallos L, Bang WY, Delgadillo-Puga C.** Ellagic acid and urolithins A and B differentially regulate fat accumulation and inflammation in 3T3-L1 adipocytes while not affecting adipogenesis and insulin sensitivity. *Int J Mol Sci* 21: 2086, 2020. doi:10.3390/ijms21062086.
  34. **Tie F, Wang J, Liang Y, Zhu S, Wang Z, Li G, Wang H.** Proanthocyanidins ameliorated deficits of lipid metabolism in type 2 diabetes mellitus via inhibiting adipogenesis and improving mitochondrial function. *Int J Mol Sci* 21: 2029, 2020. doi:10.3390/ijms21062029.
  35. **Burrell JA, Richard AJ, King WT, Stephens JM.** Mitochondrial pyruvate carriers are not required for adipogenesis but are regulated by high-fat feeding in brown adipose tissue. *Obesity (Silver Spring)* 28: 293–302, 2020. doi:10.1002/oby.22678.
  36. **Lee WH, Rho JG, Han HS, Kweon S, Nguyen VQ, Park JH, Kim W.** Self-assembled hyaluronic acid nanoparticle suppresses fat accumulation via CD44 in diet-induced obese mice. *Carbohydr Polym* 237: 116161, 2020. doi:10.1016/j.carbpol.2020.116161.
  37. **Puri V, Virbasius JV, Guilherme A, Czech MP.** RNAi screens reveal novel metabolic regulators: RIP140, MAP4k4 and the lipid droplet associated fat specific protein (FSP) 27. *Acta Physiol (Oxf)* 192: 103–115, 2008. doi:10.1111/j.1748-1716.2007.01786.x.
  38. **Mosqueda-Solis A, Lasa A, Gómez-Zorita S, Eseberri I, Picó C, Portillo MP.** Screening of potential anti-adipogenic effects of phenolic compounds showing different chemical structure in 3T3-L1 preadipocytes. *Food Funct* 8: 3576–3586, 2017. doi:10.1039/C7FO00679A, 10.1039/c7fo00679a.
  39. **Tang X, Guilherme A, Chakladar A, Powelka AM, Konda S, Virbasius JV, Nicoloso SM, Straubhaar J, Czech MP.** An RNA interference-based screen identifies MAP4K4/NIK as a negative regulator of PPARgamma, adipogenesis, and insulin-responsive hexose transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 2087–2092, 2006. doi:10.1073/pnas.0507660103.
  40. **Oh J, Kim CS, Kim M, Jo W, Sung YH, Park J.** Type VI collagen and its cleavage product, endotrophin, cooperatively regulate the adipogenic and lipolytic capacity of adipocytes. *Metabolism* 114: 154430, 2021. doi:10.1016/j.metabol.2020.154430.
  41. **Morrison S, McGee SL.** 3T3-L1 adipocytes display phenotypic characteristics of multiple adipocyte lineages. *Adipocyte* 4: 295–302, 2015. doi:10.1080/21623945.2015.1040612.
  42. **Lee K, Lee YJ, Kim KJ, Chei S, Jin H, Oh HJ, Lee BY.** Gomisin N from Schisandra chinensis ameliorates lipid accumulation and induces a brown fat-like phenotype through AMP-activated protein kinase in 3T3-L1 adipocytes. *Int J Mol Sci* 21: 2153, 2020. doi:10.3390/ijms21062153.
  43. **Nueda ML, González-Gómez MJ, Rodríguez-Cano MM, Monsalve EM, Díaz-Guerra MJM, Sánchez-Solana B, Laborda J, Baladrón V.** DLK proteins modulate NOTCH signaling to influence a brown or white 3T3-L1 adipocyte fate. *Sci Rep* 8: 16923, 2018 [Erratum in *Sci Rep* 8: 17784, 2018]. doi:10.1038/s41598-018-35252-3.
  44. **Parray HA, Yun JW.** Cannabidiol promotes browning in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biochem* 416: 131–139, 2016. doi:10.1007/s11010-016-2702-5.
  45. **Asano H, Kanamori Y, Higurashi S, Nara T, Kato K, Matsui T, Funaba M.** Induction of beige-like adipocytes in 3T3-L1 cells. *J Vet Med Sci* 76: 57–64, 2014. doi:10.1292/jvms.13-0359.
  46. **Green H, Kehinde O.** Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells. *Cell* 7: 105–113, 1976. doi:10.1016/0092-8674(76)90260-9.
  47. **Pairault J, Lasnier F.** Control of the adipogenic differentiation of 3T3-F442A cells by retinoic acid, dexamethasone, and insulin: a topographic analysis. *J Cell Physiol* 132: 279–286, 1987. doi:10.1002/jcp.1041320212.
  48. **Samuelsson L, Strömberg K, Vikman K, Bjursell G, Enerbäck S.** The CCAAT/enhancer binding protein and its role in adipocyte differentiation: evidence for direct involvement in terminal adipocyte development. *EMBO J* 10: 3787–3793, 1991. doi:10.1002/j.1460-2075.1991.tb04948.x.
  49. **Tontonoz P, Hu E, Devine J, Beale EG, Spiegelman BM.** PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol Cell Biol* 15: 351–357, 1995. doi:10.1128/MCB.15.1.351. doi:10.1128/mcb.15.1.351.
  50. **Carreira MC, Andrade S, Gonzalez-Izquierdo A, Amil M, Folgueira C, Monteiro MP, Sanz E, Crujeiras AB, Casanueva FF.** Anti-obesity activity of OBEX is regulated by activation of thermogenesis and decreasing adiposity gain. *Sci Rep* 8: 17155, 2018. doi:10.1038/s41598-018-34840-7.
  51. **Héliès-Toussaint C, Fouché E, Naud N, Blas-Y-Estrada F, Del Socorro Santos-Diaz M, Nègre-Salvayre A, Barba de la Rosa AP, Guéraud F.** Opuntia cladode powders inhibit adipogenesis in 3 T3-F442A adipocytes and a high-fat-diet rat model by modifying metabolic parameters and favouring faecal fat excretion. *BMC Complement Med Ther* 20: 33, 2020. doi:10.1186/s12906-020-2824-x.
  52. **Pushpakom SP, Adaikalakoteswari A, Owen A, Back DJ, Tripathi G, Kumar S, McTernan P, Pirmohamed M.** Telmisartan reverses antiretroviral-induced adipocyte toxicity and insulin resistance in vitro. *Diab Vasc Dis Res* 15: 233–242, 2018. doi:10.1177/1479164118757924.
  53. **Reznikoff CA, Brankow DW, Heidelberger C.** Establishment and characterization of a cloned line of C3H mouse embryo cells

- sensitive to postconfluence inhibition of division. *Cancer Res* 33: 3231–3238, 1973.
54. **Gregoire FM, Smas CM, Sul HS.** Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 78: 783–809, 1998. doi:10.1152/physrev.1998.78.3.783.
  55. **Konieczny SF, Emerson CP Jr.** 5-Azacytidine induction of stable mesodermal stem cell lineages from 10T1/2 cells: evidence for regulatory genes controlling determination. *Cell* 38: 791–800, 1984. doi:10.1016/0092-8674(84)90274-5.
  56. **Taylor SM, Jones PA.** Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell* 17: 771–779, 1979. doi:10.1016/0092-8674(79)90317-9.
  57. **Tseng YH, Kokkotou E, Schulz TJ, Huang TL, Winnay JN, Taniguchi CM, Tran TT, Suzuki R, Espinoza DO, Yamamoto Y, Ahrens MJ, Dudley AT, Norris AW, Kulkarni RN, Kahn CR.** New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature* 454: 1000–1004, 2008. doi:10.1038/nature07221.
  58. **Cho E, Jung W, Joo HY, Park ER, Kim MY, Kim SB, Kim KS, Lim YB, Lee KH, Shin HJ.** Clu1 plays a pivotal role during adipogenesis by regulating the activity of mitochondria. *Sci Rep* 9: 6820, 2019. doi:10.1038/s41598-019-43410-4.
  59. **Sim CK, Kim SY, Brunmeir R, Zhang Q, Li H, Dharmasegaran D, Leong C, Lim YY, Han W, Xu F.** Regulation of white and brown adipocyte differentiation by RhoGAP DLC1. *PLoS One* 12: e0174761, 2017. doi:10.1371/journal.pone.0174761.
  60. **Négre R, Grimaldi P, Ailhaud G.** Establishment of preadipocyte clonal line from epididymal fat pad of ob/ob mouse that responds to insulin and to lipolytic hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75: 6054–6058, 1978. doi:10.1073/pnas.75.12.6054.
  61. **Gaillard D, Ailhaud G, Négre R.** Fetuin modulates growth and differentiation of Ob17 preadipose cells in serum-free hormone-supplemented medium. *Biochim Biophys Acta* 846: 185–191, 1985. doi:10.1016/0167-4889(85)90125-9.
  62. **Gaillard D, Négre R, Lagarde M, Ailhaud G.** Requirement and role of arachidonic acid in the differentiation of pre-adipose cells. *Biochem J* 257: 389–397, 1989. doi:10.1042/bj2570389.
  63. **Grimaldi P, Djan P, Negrel R, Ailhaud G.** Differentiation of Ob17 preadipocytes to adipocytes: requirement of adipose conversion factor(s) for fat cell cluster formation. *EMBO J* 1: 687–692, 1982. doi:10.1002/j.1460-2075.1982.tb01231.x.
  64. **Amri EZ, Vannier C, Etienne J, Ailhaud G.** Maturation and secretion of lipoprotein lipase in cultured adipose cells. II. Effects of tunicamycin on activation and secretion of the enzyme. *Biochim Biophys Acta* 875: 334–343, 1986. doi:10.1016/0005-2760(86)90184-0.
  65. **Pradines-Figueres A, Vannier C, Ailhaud G.** Short-term stimulation by insulin of lipoprotein lipase secretion in adipose cells. *Biochem Biophys Res Commun* 154: 982–990, 1988. doi:10.1016/0006-291x(88)90236-7.
  66. **Vannier C, Amri EZ, Etienne J, Négre R, Ailhaud G.** Maturation and secretion of lipoprotein lipase in cultured adipose cells. I. Intracellular activation of the enzyme. *J Biol Chem* 260: 4424–4431, 1985. doi:10.1016/S0021-9258(85)8282-1.
  67. **Vannier C, Etienne J, Ailhaud G.** Intracellular localization of lipoprotein lipase in adipose cells. *Biochim Biophys Acta* 875: 344–354, 1986. doi:10.1016/0005-2760(86)90185-2.
  68. **Cadrin M, McFarlane-Anderson N, Bégin-Heick N.** Identification and localization of G(i) alpha 3 in the clonal adipocyte cell lines HGFu and Ob17. *Biochem Cell Biol* 71: 518–521, 1993. doi:10.1139/o93-074.
  69. **Forest C, Grimaldi P, Czerucka D, Negrel R, Ailhaud G.** Establishment of a preadipocyte cell line from the epididymal fat pad of the lean C57 BL/6J mouse—long term effects of insulin and triiodothyronine on adipose conversion. *In Vitro* 19: 344–354, 1983. doi:10.1007/BF02619512.
  70. **Forest C, Doglio A, Ricquier D, Ailhaud G.** A preadipocyte clonal line from mouse brown adipose tissue. Short- and long-term responses to insulin and beta-adrenergics. *Exp Cell Res* 168: 218–232, 1987. doi:10.1016/0014-4827(87)90430-7.
  71. **Forest C, Doglio A, Casteilla L, Ricquier D, Ailhaud G.** Expression of the mitochondrial uncoupling protein in brown adipocytes. Absence in brown preadipocytes and BFC-1 cells. Modulation by isoproterenol in adipocytes. *Exp Cell Res* 168: 233–246, 1987. doi:10.1016/0014-4827(87)90431-9.
  72. **Plée-Gautier E, Grober J, Duplus E, Langin D, Forest C.** Inhibition of hormone-sensitive lipase gene expression by cAMP and phorbol esters in 3T3-F442A and BFC-1 adipocytes. *Biochem J* 318: 1057–1063, 1996. doi:10.1042/bj3181057.
  73. **Yoshida H, Hayashi S, Kunisada T, Ogawa M, Nishikawa S, Okamura H, Sudo T, Shultz LD, Nishikawa S.** The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature* 345: 442–444, 1990. doi:10.1038/345442a0.
  74. **Gao J, Yan XL, Li R, Liu Y, He W, Sun S, Zhang Y, Liu B, Xiong J, Mao N.** Characterization of OP9 as authentic mesenchymal stem cell line. *J Genet Genomics* 37: 475–482, 2010. doi:10.1016/S1673-8527(09)60067-9.
  75. **Kodama H, Nose M, Niida S, Yamasaki A.** Essential role of macrophage colony-stimulating factor in the osteoclast differentiation supported by stromal cells. *J Exp Med* 173: 1291–1294, 1991. doi:10.1084/jem.173.5.1291.
  76. **Nakano T, Kodama H, Honjo T.** Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science* 265: 1098–1101, 1994. doi:10.1126/science.8066449.
  77. **Lane JM, Doyle JR, Fortin JP, Kopin AS, Ordovás JM.** Development of an OP9 derived cell line as a robust model to rapidly study adipocyte differentiation. *PLoS One* 9: e112123, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0112123.
  78. **Bahrami-Nejad Z, Zhao ML, Tholen S, Hunerdosse D, Tkach KE, van Schie S, Chung M, Teruel MN.** A Transcriptional circuit filters oscillating circadian hormonal inputs to regulate fat cell differentiation. *Cell Metab* 27: 854–868.e8, 2018. doi:10.1016/j.cmet.2018.03.012.
  79. **Bie J, Zhao B, Song J, Ghosh S.** Improved insulin sensitivity in high fat- and high cholesterol-fed Ldlr<sup>-/-</sup> mice with macrophage-specific transgenic expression of cholesteryl ester hydrolase: role of macrophage inflammation and infiltration into adipose tissue. *J Biol Chem* 285: 13630–13637, 2010. doi:10.1074/jbc.M109.069781.
  80. **Li D, Kang Q, Wang DM.** Constitutive coactivator of peroxisome proliferator-activated receptor (PPARgamma), a novel coactivator of PPARgamma that promotes adipogenesis. *Mol Endocrinol* 21: 2320–2333, 2007. doi:10.1210/me.2006-0520.
  81. **Yang H, Youm YH, Dixit VD.** Inhibition of thymic adipogenesis by caloric restriction is coupled with reduction in age-related thymic involution. *J Immunol* 183: 3040–3052, 2009. doi:10.4049/jimmunol.0900562.
  82. **Jockers R, Issad T, Zilberfarb V, de Coppet P, Marullo S, Strosberg AD.** Desensitization of the beta-adrenergic response in human brown adipocytes. *Endocrinology* 139: 2676–2684, 1998. doi:10.1210/endo.139.6.6050.
  83. **Kazantzis M, Takahashi V, Hinkle J, Kota S, Zilberfarb V, Issad T, Abdelkarim M, Chouchane L, Strosberg AD.** PAZ6 cells constitute a representative model for human brown pre-adipocytes. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3: 13, 2012. doi:10.3389/fendo.2012.00013.
  84. **Zilberfarb V, Siquier K, Strosberg AD, Issad T.** Effect of dexamethasone on adipocyte differentiation markers and tumour necrosis factor-alpha expression in human PAZ6 cells. *Diabetologia* 44: 377–386, 2001. doi:10.1007/s001250051630.
  85. **Jackisch L, Murphy AM, Kumar S, Randeva H, Tripathi G, McTernan PG.** Tunicamycin-induced Endoplasmic Reticulum stress mediates mitochondrial dysfunction in human adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab*, 2020.
  86. **Adaikalakoteswari A, Vatish M, Alam MT, Ott S, Kumar S, Saravanan P.** Low vitamin b12 in pregnancy is associated with adipose-derived circulating miRs targeting PPARgamma and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 102: 4200–4209, 2017. doi:10.1210/jc.2017-01155.
  87. **Hugo ER, Brandebourg TD, Comstock CE, Gersin KS, Sussman JJ, Ben-Jonathan N.** LS14: a novel human adipocyte cell line that produces prolactin. *Endocrinology* 147: 306–313, 2006. doi:10.1210/en.2005-0989.
  88. **Tchkonja T, Giorgadze N, Pirtskhalava T, Thomou T, DePonte M, Koo A, Forse RA, Chinnappan D, Martin-Ruiz C, von Zglinicki T, Kirkland JL.** Fat depot-specific characteristics are retained in strains derived from single human preadipocytes. *Diabetes* 55: 2571–2578, 2006. doi:10.2337/db06-0540.
  89. **Xue R, Lynes MD, Dreyfuss JM, Shamsi F, Schulz TJ, Zhang H, Huang TL, Townsend KL, Li Y, Takahashi H, Weiner LS, White AP,**

- Lynes MS, Rubin LL, Goodyear LJ, Cypess AM, Tseng YH. Clonal analyses and gene profiling identify genetic biomarkers of the thermogenic potential of human brown and white preadipocytes. *Nat Med* 21: 760–768, 2015. doi:10.1038/nm.3881.
90. Wang CH, Lundh M, Fu A, Kriszt R, Huang TL, Lynes MD, Leiria LO, Shamsi F, Darcy J, Greenwood BP, Narain NR, Tolstikov V, Smith KL, Emanuelli B, Chang YT, Hagen S, Danial NN, Kiebish MA, Tseng YH. CRISPR-engineered human brown-like adipocytes prevent diet-induced obesity and ameliorate metabolic syndrome in mice. *Sci Transl Med* 12: eaaz8664, 2020. doi:10.1126/scitranslmed.aaz8664.
  91. Markussen LK, Isidor MS, Breining P, Andersen ES, Rasmussen NE, Petersen LI, Pedersen SB, Richelsen B, Hansen JB. Characterization of immortalized human brown and white pre-adipocyte cell models from a single donor. *PLoS One* 12: e0185624, 2017. doi:10.1371/journal.pone.0185624.
  92. van Beek EA, Bakker AH, Kruyt PM, Vink C, Saris WH, Franssen-van Hal NL, Keijzer J. Comparative expression analysis of isolated human adipocytes and the human adipose cell lines LiSa-2 and PAZ6. *Int J Obes (Lond)* 32: 912–921, 2008. doi:10.1038/ijo.2008.10.
  93. Vuillaume ML, Moizard MP, Rossignol S, Cottereau E, Vonwill S, Alessandri JL, Busa T, Colin E, Gérard M, Giuliano F, Lambert L, Lefevre M, Kotecha U, Nampoothiri S, Netchine I, Raynaud M, Brioude F, Toutain A. Mutation update for the GPC3 gene involved in Simpson-Golabi-Behmel syndrome and review of the literature. *Hum Mutat* 39: 790–805, 2018 [Erratum in *Hum Mutat* 39: 2110–2112, 2018]. doi:10.1002/humu.23428.
  94. Yeo CR, Agrawal M, Hoon S, Shabbir A, Shrivastava MK, Huang S, Khoo CM, Chhay V, Yassin MS, Tai ES, Vidal-Puig A, Toh SA. SGBS cells as a model of human adipocyte browning: A comprehensive comparative study with primary human white subcutaneous adipocytes. *Sci Rep* 7: 4031, 2017. doi:10.1038/s41598-017-04369-2.
  95. Galhardo M, Sinkkonen L, Berninger P, Lin J, Sauter T, Heinäniemi M. Transcriptomics profiling of human SGBS adipogenesis. *Genom Data* 2: 246–248, 2014. doi:10.1016/j.gdata.2014.07.004.
  96. Keuper M, Sachs S, Walheim E, Berti L, Raedle B, Tews D, Fischer-Posovszky P, Wabitsch M, Hrabec D, Angelis M, Kastenmüller G, Tschöp MH, Jastroch M, Staiger H, Hofmann SM. Activated macrophages control human adipocyte mitochondrial bioenergetics via secreted factors. *Mol Metab* 6: 1226–1239, 2017. doi:10.1016/j.molmet.2017.07.008.
  97. Scoditti E, Carpi S, Massaro M, Pellegrino M, Polini B, Carluccio MA, Wabitsch M, Verri T, Nieri P, De Caterina R. Hydroxytyrosol modulates adipocyte gene and miRNA expression under inflammatory condition. *Nutrients* 11: 2493, 2019. doi:10.3390/nu1102493.
  98. Klusóczyki Á, Veréb Z, Vámos A, Fischer-Posovszky P, Wabitsch M, Bacso Z, Fésüs L, Kristóf E. Differentiating SGBS adipocytes respond to PPARgamma stimulation, irisin and BMP7 by functional browning and beige characteristics. *Sci Rep* 9: 5823, 2019. doi:10.1038/s41598-019-42256-0.
  99. Yang L, Shi CM, Chen L, Pang LX, Xu GF, Gu N, Zhu LJ, Guo XR, Ni YH, Ji CB. The biological effects of hsa-miR-1908 in human adipocytes. *Mol Biol Rep* 42: 927–935, 2015. doi:10.1007/s11033-014-3830-1.
  100. Faty A, Ferré P, Commans S. The acute phase protein Serum Amyloid A induces lipolysis and inflammation in human adipocytes through distinct pathways. *PLoS One* 7: e34031, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0034031.
  101. Bezaire V, Mairal A, Ribet C, Lefort C, Girousse A, Jocken J, Laurencikienė J, Anesia R, Rodriguez AM, Ryden M, Stenson BM, Dani C, Ailhaud G, Arner P, Langin D. Contribution of adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase to lipolysis in hMADS adipocytes. *J Biol Chem* 284: 18282–18291, 2009. doi:10.1074/jbc.M109.008631.
  102. Morigny P, Houssier M, Mairal A, Ghilain C, Mouisel E, Benhamed F, Masri B, Recazens E, Denechaud PD, Tavernier G, Caspar-Bauguil S, Virtue S, Sramkova V, Monbrun L, Mazars A, Zanoun M, Guilmeau S, Barquissau V, Beuzelin D, Bonnel S, Marques M, Monge-Roffarello B, Lefort C, Fielding B, Sulpice T, Astrup A, Payrastré B, Bertrand-Michel J, Meugnier E, Ligat L, Lopez F, Guillou H, Ling C, Holm C, Rabasa-Lhoret R, Saris WHM, Stich V, Arner P, Rydén M, Moro C, Viguier N, Harms M, Hallén S, Vidal-Puig A, Vidal H, Postic C, Langin D. Interaction between hormone-sensitive lipase and ChREBP in fat cells controls insulin sensitivity. *Nat Metab* 1: 133–146, 2019. doi:10.1038/s42255-018-0007-6.
  103. Pisani DF, Djedaini M, Beranger GE, Elabd C, Scheideler M, Ailhaud G, Amri EZ. Differentiation of human adipose-derived stem cells into “brite” (brown-in-white) adipocytes. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2: 87, 2011. doi:10.3389/fendo.2011.00087.
  104. Barquissau V, Beuzelin D, Pisani DF, Beranger GE, Mairal A, Montagner A, Roussel B, Tavernier G, Marques MA, Moro C, Guillou H, Amri EZ, Langin D. White-to-brite conversion in human adipocytes promotes metabolic reprogramming towards fatty acid anabolic and catabolic pathways. *Mol Metab* 5: 352–365, 2016. doi:10.1016/j.molmet.2016.03.002.
  105. Pisani DF, Barquissau V, Chambard JC, Beuzelin D, Ghandour RA, Giroud M, Mairal A, Pagnotta S, Cinti S, Langin D, Amri EZ. Mitochondrial fission is associated with UCP1 activity in human brite/beige adipocytes. *Mol Metab* 7: 35–44, 2018. doi:10.1016/j.molmet.2017.11.007.
  106. Ehrlund A, Mejhert N, Lorente-Cebrián S, Aström G, Dahlman I, Laurencikienė J, Rydén M. Characterization of the Wnt inhibitors secreted frizzled-related proteins (SFRPs) in human adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 98: E503–E508, 2013. doi:10.1210/jc.2012-3416.
  107. Fei Z, Bera TK, Liu X, Xiang L, Pastan I. Ankrd26 gene disruption enhances adipogenesis of mouse embryonic fibroblasts. *J Biol Chem* 286: 27761–27768, 2011. doi:10.1074/jbc.M111.248435.
  108. Hakim-Weber R, Krogsdam AM, Jørgensen C, Fischer M, Prokesch A, Bogner-Strauss JG, Bornstein SR, Hansen JB, Madsen L, Kristiansen K, Trajanoski Z, Hackl H. Transcriptional regulatory program in wild-type and retinoblastoma gene-deficient mouse embryonic fibroblasts during adipocyte differentiation. *BMC Res Notes* 4: 157, 2011. doi:10.1186/1756-0500-4-157.
  109. Ding L, Zhang L, Biswas S, Schugar RC, Brown JM, Byzova T, Podrez E. Akt3 inhibits adipogenesis and protects from diet-induced obesity via WNK1/SGK1 signaling. *JCI Insight* 2, 2017. doi:10.1172/jci.insight.95687.
  110. Merksteijn M, Laber S, McMurray F, Andrew D, Sachse G, Sanderson J, Li M, Usher S, Sellayah D, Ashcroft FM, Cox RD. FTO influences adipogenesis by regulating mitotic clonal expansion. *Nat Commun* 6: 6792, 2015. doi:10.1038/ncomms7792.
  111. Braga M, Reddy ST, Vergnes L, Pervin S, Grijalva V, Stout D, David J, Li X, Tomasian V, Reid CB, Norris KC, Devaskar SU, Reue K, Singh R. Follistatin promotes adipocyte differentiation, browning, and energy metabolism. *J Lipid Res* 55: 375–384, 2014. doi:10.1194/jlr.M039719.
  112. Rodbell M. Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J Biol Chem* 239: 375–380, 1964. doi:10.1016/S0021-9258(18)51687-2.
  113. Van RL, Roncari DA. Complete differentiation of adipocyte precursors. A culture system for studying the cellular nature of adipose tissue. *Cell Tissue Res* 195: 317–329, 1978. doi:10.1007/BF00236728.
  114. Björntorp P, Karlsson M, Pertoff H, Pettersson P, Sjöström L, Smith U. Isolation and characterization of cells from rat adipose tissue developing into adipocytes. *J Lipid Res* 19: 316–324, 1978. doi:10.1016/S0022-2275(20)41303-3.
  115. Wiederer O, Löffler G. Hormonal regulation of the differentiation of rat adipocyte precursor cells in primary culture. *J Lipid Res* 28: 649–658, 1987. doi:10.1016/S0022-2275(20)38656-9.
  116. Deslex S, Negrel R, Ailhaud G. Development of a chemically defined serum-free medium for differentiation of rat adipose precursor cells. *Exp Cell Res* 168: 15–30, 1987. doi:10.1016/0014-4827(87)90412-5.
  117. Hausman DB, Park HJ, Hausman GJ. Isolation and culture of preadipocytes from rodent white adipose tissue. *Methods Mol Biol* 456: 201–219, 2008. doi:10.1007/978-1-59745-245-8\_15.
  118. Macotela Y, Emanuelli B, Mori MA, Gesta S, Schulz TJ, Tseng YH, Kahn CR. Intrinsic differences in adipocyte precursor cells from different white fat depots. *Diabetes* 61: 1691–1699, 2012. doi:10.2337/db11-1753.
  119. Djan P, Roncari AK, Hollenberg CH. Influence of anatomic site and age on the replication and differentiation of rat adipocyte precursors in culture. *J Clin Invest* 72: 1200–1208, 1983. doi:10.1172/JCI11075.
  120. Hausman GJ, Basu U, Wei S, Hausman DB, Dodson MV. Preadipocyte and adipose tissue differentiation in meat animals:

- influence of species and anatomical location. *Annu Rev Anim Biosci* 2: 323–351, 2014. doi:10.1146/annurev-animal-022513-114211.
121. **Silva KR, Baptista LS.** Adipose-derived stromal/stem cells from different adipose depots in obesity development. *World J Stem Cells* 11: 147–166, 2019. doi:10.4252/wjsc.v11.i3.147.
  122. **Karagiannides I, Tchkonja T, Dobson DE, Stepan CM, Cummins P, Chan G, Salvatori K, Hadzopoulou-Cladaras M, Kirkland JL.** Altered expression of C/EBP family members results in decreased adipogenesis with aging. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280: R1772–1780, 2001. doi:10.1152/ajpregu.2001.280.6.R1772.
  123. **Shillabeer G, Lau DC.** Regulation of new fat cell formation in rats: the role of dietary fats. *J Lipid Res* 35: 592–600, 1994. doi:10.1016/S0022-2275(20)41173-3.
  124. **Hilgendorf KI, Johnson CT, Mezger A, Rice SL, Norris AM, Demeter J, Greenleaf WJ, Reiter JF, Kopinke D, Jackson PK.** Omega-3 Fatty Acids Activate Ciliary FFAR4 to Control Adipogenesis. *Cell* 179: 1289–1305.e21, 2019. doi:10.1016/j.cell.2019.11.005.
  125. **Simon MF, Daviaud D, Pradère JP, Grès S, Guigné C, Wabitsch M, Chun J, Valet P, Saulnier-Blache JS.** Lysophosphatidic acid inhibits adipocyte differentiation via lysophosphatidic acid 1 receptor-dependent down-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma2. *J Biol Chem* 280: 14656–14662, 2005. doi:10.1074/jbc.M412585200.
  126. **Lacasa D, Garcia E, Henriot D, Agli B, Giudicelli Y.** Site-related specificities of the control by androgenic status of adipogenesis and mitogen-activated protein kinase cascade/c-fos signaling pathways in rat preadipocytes. *Endocrinology* 138: 3181–3186, 1997. doi:10.1210/endo.138.8.5290.
  127. **Né Chad M.** Development of brown fat cells in monolayer culture. II. Ultrastructural characterization of precursors, differentiating adipocytes and their mitochondria. *Exp Cell Res* 149: 119–127, 1983. doi:10.1016/0014-4827(83)90385-3.
  128. **Né Chad M, Kuusela P, Carneheim C, Björntorp P, Nedergaard J, Cannon B.** Development of brown fat cells in monolayer culture. I. Morphological and biochemical distinction from white fat cells in culture. *Exp Cell Res* 149: 105–118, 1983. doi:10.1016/0014-4827(83)90384-1.
  129. **Chen Y, Ikeda K, Yoneshiro T, Scaramozza A, Tajima K, Wang Q, Kim K, Shinoda K, Sponton CH, Brown Z, Brack A, Kajimura S.** Thermal stress induces glycolytic beige fat formation via a myogenic state. *Nature* 565: 180–185, 2019. doi:10.1038/s41586-018-0801-z.
  130. **Kannabiran SA, Gosejacob D, Niemann B, Nikolaev VO, Pfeifer A.** Real-time monitoring of cAMP in brown adipocytes reveals differential compartmentation of beta1 and beta3-adrenoceptor signalling. *Mol Metab* 37: 100986, 2020. doi:10.1016/j.molmet.2020.100986.
  131. **Shinoda K, Luijten IH, Hasegawa Y, Hong H, Sonne SB, Kim M, Xue R, Chondronikola M, Cypess AM, Tseng YH, Nedergaard J, Sidossis LS, Kajimura S.** Genetic and functional characterization of clonally derived adult human brown adipocytes. *Nat Med* 21: 389–394, 2015. doi:10.1038/nm.3819.
  132. **Schweizer S, Liebisch G, Oeckl J, Hoering M, Seeliger C, Schiebel C, Klingenspor M, Ecker J.** The lipidome of primary murine white, brite, and brown adipocytes-Impact of beta-adrenergic stimulation. *PLoS Biol* 17: e3000412, 2019. doi:10.1371/journal.pbio.3000412.
  133. **Hauner H, Entenmann G, Wabitsch M, Gaillard D, Ailhaud G, Negrel R, Pfeiffer EF.** Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J Clin Invest* 84: 1663–1670, 1989. doi:10.1172/JCI114345.
  134. **van Harmelen V, Skurk T, Hauner H.** Primary culture and differentiation of human adipocyte precursor cells. *Methods Mol Med* 107: 125–135, 2005. doi:10.1385/1-59259-861-7.125.
  135. **Ribet C, Montastier E, Valle C, Bezaire V, Mazzucotelli A, Mairal A, Viguier N, Langin D.** Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha control of lipid and glucose metabolism in human white adipocytes. *Endocrinology* 151: 123–133, 2010. doi:10.1210/en.2009-0726.
  136. **Lee MJ, Fried SK.** The glucocorticoid receptor, not the mineralocorticoid receptor, plays the dominant role in adipogenesis and adipokine production in human adipocytes. *Int J Obes (Lond)* 38: 1228–1233, 2014. doi:10.1038/ijo.2014.6.
  137. **Tiraby C, Tavernier G, Lefort C, Larrouy D, Bouillaud F, Ricquier D, Langin D.** Acquisition of brown fat cell features by human white adipocytes. *J Biol Chem* 278: 33370–33376, 2003. doi:10.1074/jbc.M305235200.
  138. **Ding DC, Chou HL, Hung WT, Liu HW, Chu TY.** Human adipose-derived stem cells cultured in keratinocyte serum free medium: Donor's age does not affect the proliferation and differentiation capacities. *J Biomed Sci* 20: 59, 2013. doi:10.1186/1423-0127-20-59.
  139. **Schipper BM, Marra KG, Zhang W, Donnemberg AD, Rubin JP.** Regional anatomic and age effects on cell function of human adipose-derived stem cells. *Ann Plast Surg* 60: 538–544, 2008. doi:10.1097/SAP.0b013e3181723bbe.
  140. **van Harmelen V, Skurk T, Rohrig K, Lee YM, Halbleib M, Aprath-Husmann I, Hauner H.** Effect of BMI and age on adipose tissue cellularity and differentiation capacity in women. *Int J Obes* 27: 889–895, 2003. doi:10.1038/sj.ijo.0802314.
  141. **Van Harmelen V, Röhrig K, Hauner H.** Comparison of proliferation and differentiation capacity of human adipocyte precursor cells from the omental and subcutaneous adipose tissue depot of obese subjects. *Metabolism* 53: 632–637, 2004. doi:10.1016/j.metabol.2003.11.012.
  142. **Kroon T, Harms M, Maurer S, Bonnet L, Alexandersson I, Lindblom A, Ahnmark A, Nilsson D, Gennemark P, O'Mahony G, Osinski V, McNamara C, Boucher J.** PPARgamma and PPARalpha synergize to induce robust browning of white fat in vivo. *Mol Metab* 36: 100964, 2020. doi:10.1016/j.molmet.2020.02.007.
  143. **Kamble PG, Hetty S, Vranic M, Almby K, Castillejo-López C, Abalo XM, Pereira MJ, Eriksson JW.** Proof-of-concept for CRISPR/Cas9 gene editing in human preadipocytes: Deletion of FKBP5 and PPARG and effects on adipocyte differentiation and metabolism. *Sci Rep* 10: 10565, 2020. doi:10.1038/s41598-020-67293-y.
  144. **Tzamelis I, Fang H, Ollero M, Shi H, Hamm JK, Kievit P, Hollenberg AN, Flier JS.** Regulated production of a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand during an early phase of adipocyte differentiation in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 279: 36093–36102, 2004. doi:10.1074/jbc.M405346200.
  145. **Gogg S, Nerstedt A, Boren J, Smith U.** Human adipose tissue microvascular endothelial cells secrete PPARgamma ligands and regulate adipose tissue lipid uptake. *JCI Insight* 4, 2019. doi:10.1172/jci.insight.125914.
  146. **Gustafson B, Smith U.** The WNT inhibitor Dickkopf 1 and bone morphogenetic protein 4 rescue adipogenesis in hypertrophic obesity in humans. *Diabetes* 61: 1217–1224, 2012. doi:10.2337/db11-1419.
  147. **Deslex S, Negrel R, Vannier C, Etienne J, Ailhaud G.** Differentiation of human adipocyte precursors in a chemically defined serum-free medium. *Int J Obes* 11: 19–27, 1987.
  148. **Olzmann JA, Carvalho P.** Dynamics and functions of lipid droplets. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20: 137–155, 2019. doi:10.1038/s41580-018-0085-z.
  149. **Wang S, Cao S, Arhatte M, Li D, Shi Y, Kurz S, Hu J, Wang L, Shao J, Atzberger A, Wang Z, Wang C, Zang W, Fleming J, Wettschureck N, Honoré E, Offermanns S.** Adipocyte Piezo1 mediates obesogenic adipogenesis through the FGF1/FGFR1 signaling pathway in mice. *Nat Commun* 11: 2303, 2020. doi:10.1038/s41467-020-16026-w.
  150. **Zhang Y, Xie L, Gunasekar SK, Tong D, Mishra A, Gibson WJ, Wang C, Fidler T, Marthaler B, Klingelutz A, Abel ED, Samuel I, Smith JK, Cao L, Sah R.** SWELL1 is a regulator of adipocyte size, insulin signalling and glucose homeostasis. *Nat Cell Biol* 19: 504–517, 2017. doi:10.1038/ncb3514.
  151. **Zhao C, Sun Q, Tang L, Cao Y, Nourse JL, Pathak MM, Lu X, Yang Q.** Mechanosensitive ion channel piezo1 regulates diet-induced adipose inflammation and systemic insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)* 10: 373, 2019. doi:10.3389/fendo.2019.00373.
  152. **Chunduri NK, Storchová Z.** The diverse consequences of aneuploidy. *Nat Cell Biol* 21: 54–62, 2019. doi:10.1038/s41556-018-0243-8.
  153. **Rodbell M.** Metabolism of isolated fat cells. II. The similar effects of phospholipase C (Clostridium perfringens alpha toxin) and of insulin on glucose and amino acid metabolism. *J Biol Chem* 241: 130–139, 1966. doi:10.1016/S0021-9258(18)96967-X.
  154. **Rodbell M, Jones AB.** Metabolism of isolated fat cells. 3. The similar inhibitory action of phospholipase C (Clostridium perfringens alpha toxin) and of insulin on lipolysis stimulated by lipolytic hormones and theophylline. *J Biol Chem* 241: 140–142, 1966. [Mismatch]PMC doi:10.1016/S0021-9258(18)96968-1.
  155. **Sugihara H, Yonemitsu N, Toda S, Miyabara S, Funatsumaru S, Matsumoto T.** Unilocular fat cells in three-dimensional collagen gel

- matrix culture. *J Lipid Res* 29: 691–697, 1988. doi:10.1016/S0022-2275(20)38514-X.
156. **Hong SJ, Jin DP, Buck DW 2nd, Galiano RD, Mustoe TA.** Impaired response of mature adipocytes of diabetic mice to hypoxia. *Exp Cell Res* 317: 2299–2307, 2011. doi:10.1016/j.yexcr.2011.07.004.
  157. **Hazen SA, Rowe WA, Lynch CJ.** Monolayer cell culture of freshly isolated adipocytes using extracellular basement membrane components. *J Lipid Res* 36: 868–875, 1995. doi:10.1016/S0022-2275(20)40069-0.
  158. **Hong SJ, Park E, Xu W, Jia S, Galiano RD, Mustoe TA.** Response of human mature adipocytes to hypoxia-reoxygenation. *Cytotherapy* 16: 1656–1665, 2014. doi:10.1016/j.jcyt.2014.07.008.
  159. **Sugihara H, Yonemitsu N, Miyabara S, Yun K.** Primary cultures of unilocular fat cells: characteristics of growth in vitro and changes in differentiation properties. *Differentiation* 31: 42–49, 1986. doi:10.1111/j.1432-0436.1986.tb00381.x.
  160. **Zhang HH, Kumar S, Barnett AH, Eggo MC.** Ceiling culture of mature human adipocytes: use in studies of adipocyte functions. *J Endocrinol* 164: 119–128, 2000. doi:10.1677/joe.0.1640119.
  161. **Asada S, Kuroda M, Aoyagi Y, Fukaya Y, Tanaka S, Konno S, Tanio M, Aso M, Satoh K, Okamoto Y, Nakayama T, Saito Y, Bujo H.** Ceiling culture-derived proliferative adipocytes retain high adipogenic potential suitable for use as a vehicle for gene transduction therapy. *Am J Physiol Cell Physiol* 301: C181–185, 2011. doi:10.1152/ajpcell.00080.2011.
  162. **Kosaka K, Kubota Y, Adachi N, Akita S, Sasahara Y, Kira T, Kuroda M, Mitsukawa N, Bujo H, Satoh K.** Human adipocytes from the subcutaneous superficial layer have greater adipogenic potential and lower PPAR-gamma DNA methylation levels than deep layer adipocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 311: C322–329, 2016. doi:10.1152/ajpcell.00301.2015.
  163. **Jumabay M, Abdmaulen R, Ly A, Cubberly MR, Shahmirian LJ, Heydarkhan-Hagvall S, Dumesic DA, Yao Y, Boström KI.** Pluripotent stem cells derived from mouse and human white mature adipocytes. *Stem Cells Transl Med* 3: 161–171, 2014. doi:10.5966/sctm.2013-0107.
  164. **Harms MJ, Li Q, Lee S, Zhang C, Kull B, Hallen S, Thorell A, Alexandersson I, Hagberg CE, Peng XR, Mardinoglu A, Spalding KL, Boucher J.** Mature human white adipocytes cultured under membranes maintain identity, function, and can transdifferentiate into brown-like adipocytes. *Cell Rep* 27: 213–225.e5, 2019. doi:10.1016/j.celrep.2019.03.026.
  165. **Smith U.** Morphologic studies of human subcutaneous adipose tissue in vitro. *Anat Rec* 169: 97–104, 1971. doi:10.1002/ar.1091690109.
  166. **Smith U, Jacobsson B.** Studies of human adipose tissue in culture. II. Effects of insulin and of medium glucose on lipolysis and cell size. *Anat Rec* 176: 181–183, 1973. doi:10.1002/ar.1091760206.
  167. **Auger C, Knuth CM, Abdullahi A, Samadi O, Parousis A, Jeschke MG.** Metformin prevents the pathological browning of subcutaneous white adipose tissue. *Mol Metab* 29: 12–23, 2019. doi:10.1016/j.molmet.2019.08.011.
  168. **Gao H, Volat F, Sandhow L, Galitzky J, Nguyen T, Esteve D, Åström G, Mejhert N, Ledoux S, Thalamos C, Arner P, Guillemot JC, Qian H, Rydén M, Bouloumié A.** cd36 is a marker of human adipocyte progenitors with pronounced adipogenic and triglyceride accumulation potential. *Stem Cells* 35: 1799–1814, 2017. doi:10.1002/stem.2635.
  169. **Gealekman O, Guseva N, Hartigan C, Apotheker S, Gorgoglione M, Gurav K, Tran KV, Straubhaar J, Nicoloso S, Czech MP, Thompson M, Perugini RA, Corvera S.** Depot-specific differences and insufficient subcutaneous adipose tissue angiogenesis in human obesity. *Circulation* 123: 186–194, 2011 [Erratum in *Circulation* 140: e693, 2019]. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.970145.
  170. **Moro C, Klimcakova E, Lomède K, Berlan M, Lafontan M, Stich V, Bouloumié A, Galitzky J, Arner P, Langin D.** Atrial natriuretic peptide inhibits the production of adipokines and cytokines linked to inflammation and insulin resistance in human subcutaneous adipose tissue. *Diabetologia* 50: 1038–1047, 2007. doi:10.1007/s00125-007-0614-3.
  171. **Gesta S, Lomède K, Daviaud D, Berlan M, Bouloumié A, Lafontan M, Valet P, Saulnier-Blache JS.** Culture of human adipose tissue explants leads to profound alteration of adipocyte gene expression. *Horm Metab Res* 35: 158–163, 2003. doi:10.1055/s-2003-39070.
  172. **Huang B, Zhao H, Huang C, Wu L, Xiang L, Chen J, Wang B, Xiao T, Li M, Ren L, Niu J, Zhang JV.** CMKLR1 deficiency attenuates androgen-induced lipid accumulation in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 318: E371–E380, 2020. doi:10.1152/ajpendo.00176.2019.
  173. **Lau FH, Vogel K, Luckett JP, Hunt M, Meyer A, Rogers CL, Tessler O, Dupin CL, St Hilaire H, Islam KN, Frazier T, Gimble JM, Scahill S.** Sandwiched white adipose tissue: a microphysiological system of primary human adipose tissue. *Tissue Eng Part C Methods* 24: 135–145, 2018. doi:10.1089/ten.TEC.2017.0339.
  174. **Thompson AC, Nuñez M, Davidson R, Horm T, Schnittker K, Hart MV, Suarez AM, Tsao TS.** Mitigation of isolation-associated adipocyte interleukin-6 secretion following rapid dissociation of adipose tissue. *J Lipid Res* 53: 2797–2805, 2012. doi:10.1194/jlr.D031286.
  175. **Anderson AR, Weaver AM, Cummings PT, Quaranta V.** Tumor morphology and phenotypic evolution driven by selective pressure from the microenvironment. *Cell* 127: 905–915, 2006. doi:10.1016/j.cell.2006.09.042.
  176. **Doyle AD, Carvajal N, Jin A, Matsumoto K, Yamada KM.** Local 3D matrix microenvironment regulates cell migration through spatiotemporal dynamics of contractility-dependent adhesions. *Nat Commun* 6: 8720, 2015. doi:10.1038/ncomms9720.
  177. **Sullivan WJ, Mullen PJ, Schmid EW, Flores A, Momcilovic M, Sharpley MS, Jelinek D, Whiteley AE, Maxwell MB, Wilde BR, Banerjee U, Collier HA, Shackelford DB, Braas D, Ayer DE, de Aguiar Vallim TQ, Lowry WE, Christofk HR.** Extracellular matrix remodeling regulates glucose metabolism through TXNIP destabilization. *Cell* 175: 117–132.e21, 2018. doi:10.1016/j.cell.2018.08.017.
  178. **Loessner D, Rockstroh A, Shokohmand A, Holzapfel BM, Wagner F, Baldwin J, Boxberg M, Schmalfeldt B, Lengyel E, Clements JA, Hutmacher DW.** A 3D tumor microenvironment regulates cell proliferation, peritoneal growth and expression patterns. *Biomaterials* 190-191: 63–75, 2019. doi:10.1016/j.biomaterials.2018.10.014.
  179. **Sutherland RM, McCredie JA, Inch WR.** Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 46: 113–120, 1971.
  180. **Emerman JT, Pitelka DR.** Maintenance and Induction of Morphological-Differentiation in Dissociated Mammary Epithelium on Floating Collagen Membranes. *In Vitro* 13: 316–328, 1977. doi:10.1007/BF02616178.
  181. **Ewart L, Dehne EM, Fabre K, Gibbs S, Hickman J, Hornberg E, Ingelman-Sundberg M, Jang KJ, Jones DR, Lauschke VM, Marx U, Mettetal JT, Pointon A, Williams D, Zimmermann WH, Newham P.** Application of microphysiological systems to enhance safety assessment in drug discovery. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 58: 65–82, 2018. doi:10.1146/annurev-pharmtox-010617-052722.
  182. **Lauschke VM, Hendriks DF, Bell CC, Andersson TB, Ingelman-Sundberg M.** Novel 3D Culture Systems for Studies of Human Liver Function and Assessments of the Hepatotoxicity of Drugs and Drug Candidates. *Chem Res Toxicol* 29: 1936–1955, 2016. doi:10.1021/acs.chemrestox.6b00150.
  183. **Lauschke VM, Shafagh RZ, Hendriks DFG, Ingelman-Sundberg M.** 3D primary hepatocyte culture systems for analyses of liver diseases, drug metabolism, and toxicity: emerging culture paradigms and applications. *Biotechnol J* 14: e1800347, 2019. doi:10.1002/biot.201800347.
  184. **Ravi M, Paramesh V, Kaviya SR, Anuradha E, Solomon FD.** 3D cell culture systems: advantages and applications. *J Cell Physiol* 230: 16–26, 2015. doi:10.1002/jcp.24683.
  185. **Shen JX, Youhanna S, Zandi Shafagh R, Kele J, Lauschke VM.** Organotypic and microphysiological models of liver, gut, and kidney for studies of drug metabolism, pharmacokinetics, and toxicity. *Chem Res Toxicol* 33: 38–60, 2020. doi:10.1021/acs.chemrestox.9b00245.
  186. **Underhill GH, Khetani SR.** Bioengineered liver models for drug testing and cell differentiation studies. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 5: 426–439.e1, 2018. doi:10.1016/j.jcmgh.2017.11.012.
  187. **Youhanna S, Lauschke VM.** The past, present and future of intestinal in vitro cell systems for drug absorption studies. *J Pharm Sci* 110: 50–65, 2021. doi:10.1016/j.xphs.2020.07.001.
  188. **Zhou Y, Shen JX, Lauschke VM.** Comprehensive Evaluation of Organotypic and Microphysiological Liver Models for Prediction of Drug-Induced Liver Injury. *Front Pharmacol* 10: 1093, 2019. doi:10.3389/fphar.2019.01093.

189. Bell CC, Dankers ACA, Lauschke VM, Sison-Young R, Jenkins R, Rowe C, Goldring CE, Park K, Regan SL, Schofield C, Baze A, Foster AJ, Williams DP, van de Ven AWM, Jacobs F, Houdt JV, Lähteenmäki T, Snoeys J, Juhila S, Richert L, Ingelman-Sundberg M. Comparison of hepatic 2D sandwich cultures and 3D spheroids for long-term toxicity applications: a multicenter study. *Toxicol Sci* 162: 655–666, 2018. doi:10.1093/toxsci/kfx289.
190. Oliva-Vilarnau N, Vorrink SU, Ingelman-Sundberg M, Lauschke VM. A 3D cell culture model identifies Wnt/ $\beta$ -catenin mediated inhibition of p53 as a critical step during human hepatocyte regeneration. *Adv Sci (Weinh)* 7: 2000248, 2020. doi:10.1002/adv.202000248.
191. Bell CC, Hendriks DF, Moro SM, Ellis E, Walsh J, Renblom A, Fredriksson Puigvert L, Dankers AC, Jacobs F, Snoeys J, Sison-Young RL, Jenkins RE, Nordling Å, Mkrtchian S, Park BK, Kitteringham NR, Goldring CE, Lauschke VM, Ingelman-Sundberg M. Characterization of primary human hepatocyte spheroids as a model system for drug-induced liver injury, liver function and disease. *Sci Rep* 6: 25187, 2016. doi:10.1038/srep25187.
192. Vorrink SU, Ullah S, Schmidt S, Nandania J, Velagapudi V, Beck O, Ingelman-Sundberg M, Lauschke VM. Endogenous and xenobiotic metabolic stability of primary human hepatocytes in long-term 3D spheroid cultures revealed by a combination of targeted and untargeted metabolomics. *FASEB J* 31: 2696–2708, 2017. doi:10.1096/fj.201601375R.
193. Beauchamp P, Moritz W, Kelm JM, Ullrich ND, Agarkova I, Anson BD, Suter TM, Zuppinger C. Development and Characterization of a Scaffold-Free 3D Spheroid Model of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Human Cardiomyocytes. *Tissue Eng Part C Methods* 21: 852–861, 2015. doi:10.1089/ten.tec.2014.0376.
194. Polonchuk L, Chabria M, Badi L, Hoflack JC, Figtree G, Davies MJ, Gentile C. Cardiac spheroids as promising in vitro models to study the human heart microenvironment. *Sci Rep* 7: 7005, 2017. doi:10.1038/s41598-017-06385-8.
195. Cho CF, Wolfe JM, Fadzen CM, Calligaris D, Hornburg K, Chiocca EA, Agar NYR, Pentelute BL, Lawler SE. Blood-brain-barrier spheroids as an in vitro screening platform for brain-penetrating agents. *Nat Commun* 8: 15623, 2017. doi:10.1038/ncomms15623.
196. Dingle Y-TL, Boutin ME, Chirila AM, Livi LL, Labriola NR, Jakubek LM, Morgan JR, Darling EM, Kauer JA, Hoffman-Kim D. Three-dimensional neural spheroid culture: an in vitro model for cortical studies. *Tissue Engineering Part C: Methods* 21: 1274–1283, 2015. doi:10.1089/ten.tec.2015.0135.
197. Turner PA, Harris LM, Purser CA, Baker RC, Janorkar AV. A surface-tethered spheroid model for functional evaluation of 3T3-L1 adipocytes. *Biotechnol Bioeng* 111: 174–183, 2014. doi:10.1002/bit.25099.
198. Turner PA, Garrett MR, Didion SP, Janorkar AV. Spheroid culture system confers differentiated transcriptome profile and functional advantage to 3T3-L1 adipocytes. *Ann Biomed Eng* 46: 772–787, 2018. doi:10.1007/s10439-018-1993-y.
199. Turner PA, Tang Y, Weiss SJ, Janorkar AV. Three-dimensional spheroid cell model of in vitro adipocyte inflammation. *Tissue Eng Part A* 21: 1837–1847, 2015. doi:10.1089/ten.tea.2014.0531.
200. Louis F, Pannetier P, Souguir Z, Le Cerf D, Valet P, Vannier JP, Vidal G, Demange E. A biomimetic hydrogel functionalized with adipose ECM components as a microenvironment for the 3D culture of human and murine adipocytes. *Biotechnol Bioeng* 114: 1813–1824, 2017. doi:10.1002/bit.26306.
201. Ruiz-Ojeda F, Rupérez A, Gomez-Llorente C, Gil A, Aguilera C. Cell models and their application for studying adipogenic differentiation in relation to obesity: a review. *Int J Mol Sci* 17: 1040–1026, 2016. doi:10.3390/ijms17071040.
202. Graham AD, Pandey R, Tsancheva VS, Candeo A, Botchway SW, Allan AJ, Teboul L, Madi K, Babra TS, Zolkiewski LAK, Xue X, Bentley L, Gannon J, Olof SN, Cox RD. The development of a high throughput drug-responsive model of white adipose tissue comprising adipogenic 3T3-L1 cells in a 3D matrix. *Biofabrication* 12: 015018, 2019. doi:10.1088/1758-5090/ab56fe.
203. Aulthouse AL, Freeh E, Newstead S, Stockert AL. Part 1: A Novel model for three-dimensional culture of 3T3-L1 preadipocytes stimulates spontaneous cell differentiation independent of chemical induction typically required in monolayer. *Nutr Metab Insights* 12: 1178638819841399, 2019. doi:10.1177/1178638819841399.
204. Alhadlaq A, Tang M, Mao JJ. Engineered adipose tissue from human mesenchymal stem cells maintains predefined shape and dimension: implications in soft tissue augmentation and reconstruction. *Tissue Eng* 11: 556–566, 2005. doi:10.1089/ten.2005.11.556.
205. Vermette M, Trottier V, Ménard V, Saint-Pierre L, Roy A, Fradette J. Production of a new tissue-engineered adipose substitute from human adipose-derived stromal cells. *Biomaterials* 28: 2850–2860, 2007. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.02.030.
206. Verseijden F, Posthumus-van Sluijs SJ, Van Neck JW, Hofer SOP, Hovius SER, Van Osch GJVM. Comparing scaffold-free and fibrin-based adipose-derived stromal cell constructs for adipose tissue engineering: an in vitro and in vivo study. *Cell Transplant* 21: 2283–2297, 2012. doi:10.3727/096368912X653129.
207. Verseijden F, Sluijs SV, Farrell E, van Neck JW, Hovius SER, Hofer SO, Hovius SE, van Osch GJ. Prevascular structures promote vascularization in engineered human adipose tissue constructs upon implantation. *Cell Transplant* 19: 1007–1020, 2010. doi:10.3727/096368910X492571.
208. Naderi N, Wilde C, Haque T, Francis W, Seifalian AM, Thornton CA, Xia Z, Whitaker IS. Adipogenic differentiation of adipose-derived stem cells in 3-dimensional spheroid cultures (microtissue): implications for the reconstructive surgeon. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery: J Plast Reconstr Aesthet Surg* 67: 1726–1734, 2014. doi:10.1016/j.bjps.2014.08.013.
209. Wang YH, Wu JY, Chou PJ, Chen CH, Wang CZ, Ho ML, Chang JK, Yeh ML, Chen CH. Characterization and evaluation of the differentiation ability of human adipose-derived stem cells growing in scaffold-free suspension culture. *Cytotherapy* 16: 485–495, 2014. doi:10.1016/j.jcyt.2013.07.015.
210. Colle J, Blondeel P, De Bruyne A, Bochar S, Tytgat L, Vercruyse C, Van Vierberghe S, Dubruel P, Declercq H. Bioprinting pre-differentiated adipose-derived mesenchymal stem cell spheroids with methacrylated gelatin ink for adipose tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med* 31: 36, 2020. doi:10.1007/s10856-020-06374-w.
211. Turner PA, Gurumurthy B, Bailey JL, Elks CM, Janorkar AV. Adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells grown as spheroids. *Process Biochem* 59: 312–320, 2017. doi:10.1016/j.procbio.2017.02.003.
212. Tsai CC, Hong YJ, Lee RJ, Cheng NC, Yu J. Enhancement of human adipose-derived stem cell spheroid differentiation in an in situ enzyme-crosslinked gelatin hydrogel. *J Mater Chem B* 7: 1064–1075, 2019. doi:10.1039/C8TB02835D.
213. Zhang K, Song L, Wang J, Yan S, Li G, Cui L, Yin J. Strategy for constructing vascularized adipose units in poly(l-glutamic acid) hydrogel porous scaffold through inducing in-situ formation of ASCs spheroids. *Acta Biomater* 51: 246–257, 2017. doi:10.1016/j.actbio.2017.01.043.
214. Miyagawa Y, Okita H, Hiroyama M, Sakamoto R, Kobayashi M, Nakajima H, Katagiri YU, Fujimoto J, Hata J-I, Umezawa A, Kiyokawa N. A microfabricated scaffold induces the spheroid formation of human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells and promotes efficient adipogenic differentiation. *Tissue Eng Part A* 17: 513–521, 2011. doi:10.1089/ten.tea.2009.0810.
215. Hoefner C, Muhr C, Horder H, Wiesner M, Wittmann K, Lukaszyk D, Radloff K, Winnefeld M, Becker M, Blunk T, Bauer-Kreisel P. Human adipose-derived mesenchymal stromal/stem cell spheroids possess high adipogenic capacity and acquire an adipose tissue-like extracellular matrix pattern. *Tissue Eng Part A* 26: 915–926, 2020. doi:10.1089/ten.tea.2019.0206. 10.1089/ten.TEA.2019.0206.
216. Emont MP, Yu H, Jun H, Hong X, Maganti N, Stegemann JP, Wu J. Using a 3D Culture System to Differentiate Visceral Adipocytes In Vitro. *Endocrinology* 156: 4761–4768, 2015. doi:10.1210/en.2015-1567.
217. Klingelhutz AJ, Gourronc FA, Chaly A, Wadkins DA, Burand AJ, Markan KR, Idiga SO, Wu M, Potthoff MJ, Ankrum JA. Scaffold-free generation of uniform adipose spheroids for metabolomics research and drug discovery. *Sci Rep* , 8: 1–12, 2018. doi:10.1038/s41598-017-19024-z.
218. Muller S, Ader I, Creff J, Leménager H, Achard P, Casteilla L, Sensebé L, Carrière A, Deschaseaux F. Human adipose stromal-

- vascular fraction self-organizes to form vascularized adipose tissue in 3D cultures. *Sci Rep* 9: 31, 2019. doi:[10.1038/s41598-019-43624-6](https://doi.org/10.1038/s41598-019-43624-6).
219. **Shen K, Vesey DA, Hasnain SZ, Zhao KN, Wang H, Johnson DW, Saunders N, Burgess M, Gobe GC.** A cost-effective three-dimensional culture platform functionally mimics the adipose tissue microenvironment surrounding the kidney. *Biochem Biophys Res Commun* 522: 736–742, 2020. doi:[10.1016/j.bbrc.2019.11.119](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.11.119).
220. **Bora P, Majumdar AS.** Adipose tissue-derived stromal vascular fraction in regenerative medicine: a brief review on biology and translation. *Stem Cell Res Ther* 8: 145–110, 2017. doi:[10.1186/s13287-017-0598-y](https://doi.org/10.1186/s13287-017-0598-y).
221. **Lee KY, Luong Q, Sharma R, Dreyfuss JM, Ussar S, Kahn CR.** Developmental and functional heterogeneity of white adipocytes within a single fat depot. *EMBO J* 38, 2019. doi:[10.15252/embj.201899291](https://doi.org/10.15252/embj.201899291).

## Chapitre 2 : La lipase hormono-sensible

La lipase hormono-sensible (LHS) est une enzyme fortement exprimée dans le TA où elle est principalement connue pour être limitante de la lipolyse, i.e. la cascade enzymatique responsable de l'hydrolyse des TG et de la libération d'AG lors d'un besoin énergétique. La LHS étant au cœur de ce projet de thèse, nous nous attarderons dans ce chapitre sur diverses caractéristiques de cette protéine, en débutant par sa fonction principale d'enzyme et la régulation de cette fonction. Nous nous intéresserons dans les dernières parties à un rôle non enzymatique récemment découvert que possède cette protéine ainsi qu'aux phénotypes complexes de déficience en LHS *in vivo* chez la souris et l'Homme. Une revue complète sur la LHS a été récemment écrite par Emeline Recazens, avec qui j'ai mené de concert mon principal projet de thèse (Recazens, Mouisel, and Langin 2021).

### I. Description de la protéine

#### I.1 Profil d'expression tissulaire

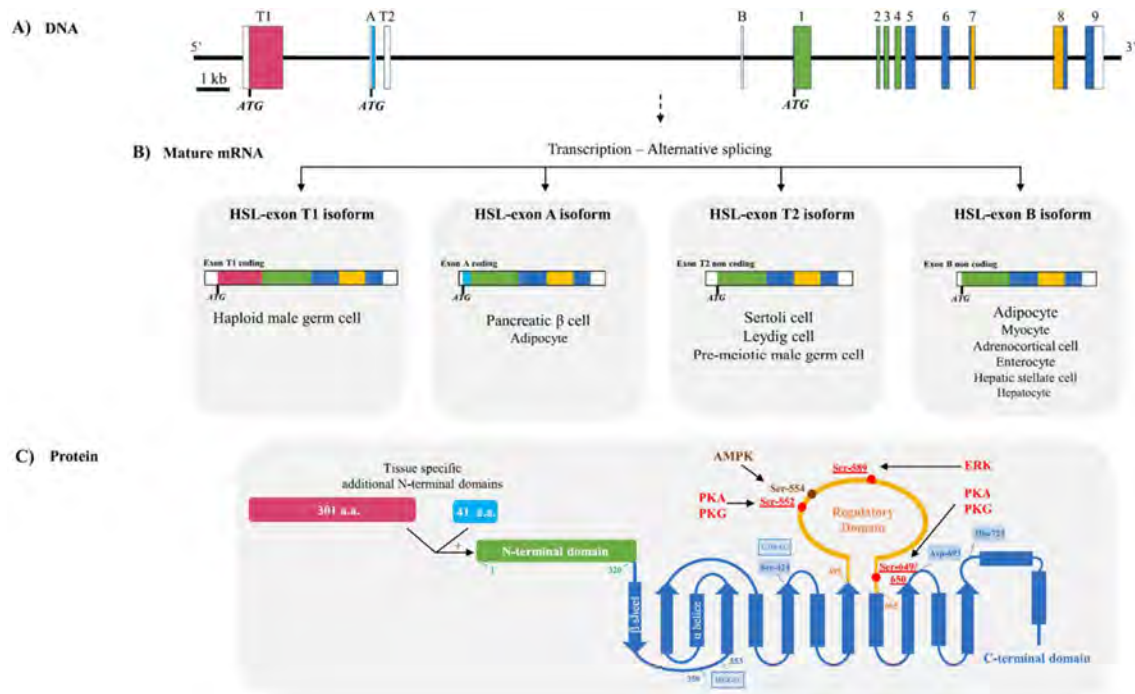
Le gène *LIPF*, codant la LHS chez l'Homme, fut initialement décrit comme composé de 9 exons codant une protéine de 775 acides aminés (AA) (Langin et al. 1993). Cependant, il existe plusieurs exons alternatifs qui conduisent à l'expression d'isoformes tissu-spécifiques de la protéine. L'isoforme produit à partir de l'exon non-codant B est le plus courant. Bien que fortement exprimé dans l'adipocyte, on le retrouve également dans les transcrits du muscle squelettique, du cœur, du foie, de l'intestin et des glandes surrénales. L'exon A possède une région codant 41 AA supplémentaires, entraînant l'expression d'une LHS plus longue, retrouvée essentiellement dans les cellules  $\beta$  du pancréas et les entérocytes, mais également en faible quantité dans l'adipocyte. Il existe enfin deux exons T produisant des isoformes de la LHS spécifiques du testicule, l'exon non codant T2 qui produit une LHS similaire à celle exprimée dans l'adipocyte, et l'exon T1 qui, lui, code 301 AA supplémentaires. Ce dernier long isoforme est exprimé seulement dans les spermatides, alors que l'isoforme court est trouvé dans divers types cellulaires du testicule, à savoir spermatogonies et spermatocytes, ainsi que dans les cellules de Leydig, de Sertoli, et péricubulaires. Il est intéressant de noter que les exons codants, c'est-à-dire A et T1, produisent des isoformes dont la partie supplémentaire se trouve en N-terminal, région de la protéine dont la fonction reste inconnue à ce jour (Recazens, Mouisel, and Langin 2021).



## I.2 Domaines protéiques

On trouve dans la partie C-terminale de la LHS, codée par les exons 5 à 9, son domaine catalytique (Osterlund et al. 1999; Osterlund, Contreras, and Holm 1997), organisé en un enchaînement d'hélices  $\alpha$  et de feuillets  $\beta$ , comme c'est le cas pour d'autres enzymes de type hydrolase (Contreras et al. 1996; Holmquist 2000; Osterlund et al. 1999; Wei et al. 1999). Le site catalytique actif est composé de trois AA appelés triade catalytique, habituellement un premier résidu acide et un deuxième basique, formant un environnement favorable à l'attaque du substrat par le troisième résidu nucléophile (Rauwerdink and Kazlauskas 2015). Chez l'Homme, les Ser-424, Asp-693 et His-723 forment la triade catalytique (Osterlund, Contreras, and Holm 1997). On trouve dans ce même domaine catalytique le domaine régulateur de la LHS, allant des AA 495 à 665 codés par les exons 7 et 8 (Osterlund, Contreras, and Holm 1997). Ce domaine régulateur est le siège de phosphorylations contrôlant l'activité enzymatique de la LHS, sur laquelle nous reviendrons dans une partie dédiée (cf. page 48). La séquence de ce domaine régulateur n'a pas de similarité avec d'autres protéines humaines et sa présence fait figure d'exception dans la famille de la LHS. Les analyses bio-informatiques estiment une apparition à partir des mammifères au cours de l'évolution.

Enfin, comme introduit précédemment, le domaine N-terminal ne possède pas de fonction connue à ce jour. Cependant, il a été montré que ce dernier était nécessaire à l'interaction physique de la LHS avec son partenaire connu FABP4 (Smith et al. 2007). De plus, la LHS est capable d'homo-dimérisation, phénomène observé entre les parties N-terminale et C-terminale, ce qui suggère une interaction en tête-à-queue (Krintel et al. 2010). Ainsi, il est supposé que le domaine N-terminal de la LHS fasse fonction d'amarrage pour l'interaction avec divers partenaires. Il est donc possible que les isoformes longs de la LHS produits à partir des exons A et T1, dont la partie N-terminale est rallongée, possèdent un interactome différent de celui de la LHS adipocytaire produite à partir de l'exon B. Pour exemple, une région riche en proline, connue comme potentiel motif d'interaction avec des domaines de type SH3, a été identifiée spécifiquement dans la région N-terminale codée par l'exon T1, bien que sa fonctionnalité n'ait jamais été évaluée (Holst et al. 1996). Comme pour le domaine régulateur, la région N-terminale de la LHS n'a pas d'équivalent dans d'autres protéines humaines, soulignant de nouveau la singularité de cette lipase.



**Figure 9 : Le gène *LIPE*, ses transcrits, et les isoformes de la LHS associés.** Adapté de (Reczens, Mouisel, and Langin 2021)

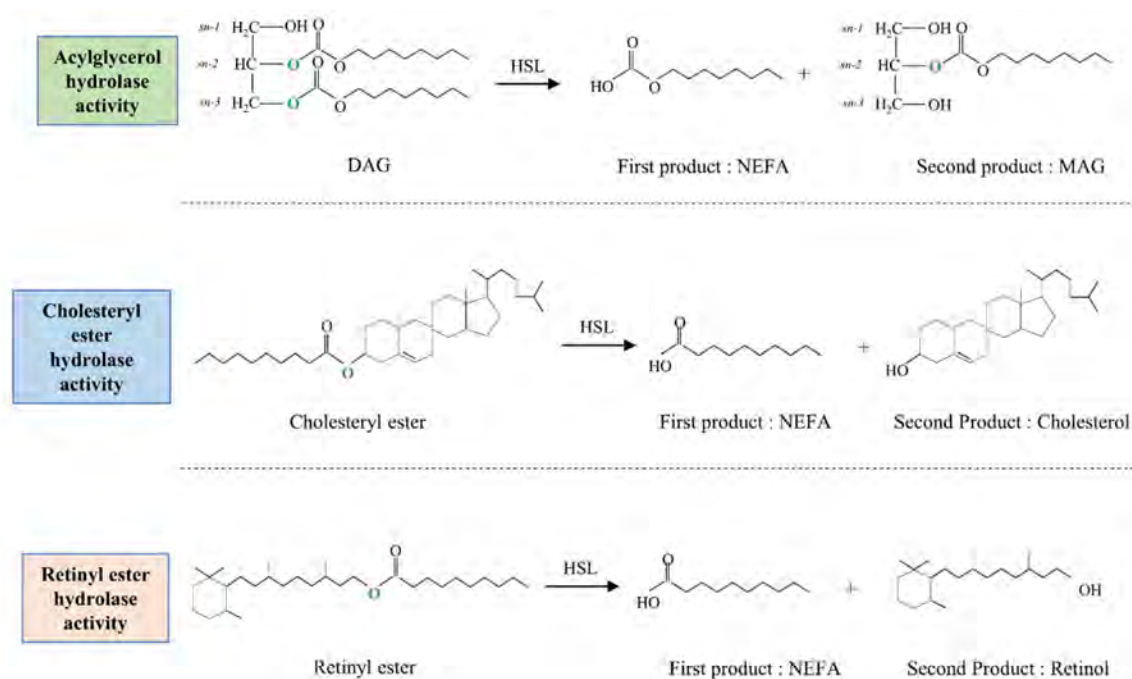
A) Structure du gène *LIPE*, contenant 9 exons codant les domaines de la LHS. En vert les exons codant la partie N-terminale, en bleu le domaine catalytique, et en orange le domaine régulateur. 4 exons alternatifs produisent des transcrits différents. Les exons T2 et B sont non-codants, les exons T1 et A ajoutent 301 et 41 acides aminés en N-terminal, respectivement. B) Structure et profil d'expression tissulaire des ARN messagers issus des différents exons alternatifs du gène *LIPE*. C) Structure de la protéine LHS. En bleu le domaine catalytique, formé d'hélices  $\alpha$  et feuillets  $\beta$ , contenant la triade catalytique. En orange le domaine régulateur, indiquant la position des sites de phosphorylation et la kinase les ciblant. En vert le domaine N-terminal, et les régions additionnelles spécifiques des isoformes produits par les exons T1 et A sont représentés en rose et bleu, respectivement. Cette région pourrait être impliquée dans les interactions protéine-protéine.

## II. Rôles enzymatiques

### II.1 Substrats

La LHS est une lipase neutre, capable d'hydrolyser des fonctions esters covalentes par l'utilisation d'une molécule d'eau, libérant un acide carboxylique et un alcool. Elle possède la particularité de reconnaître une grande variété de substrats (Figure 10). Historiquement, la LHS est connue pour sa fonction hydrolase d'acylglycérols (Fredrikson et al. 1981). Elle est en effet un acteur clé du processus de lipolyse, qui permet d'hydrolyser les TG stockés dans l'adipocyte lors d'un besoin énergétique, et relarguer AG et glycérol qui seront transportés dans le sang. Ce processus résulte de l'action séquentielle des trois lipases suivantes, l'ATGL, la LHS puis la MGL (Morigny et al. 2021). L'inhibition pharmacologique de l'action de la LHS *in*

*in vivo* conduisant à une diminution des taux plasmatiques de glycérol et AG témoigne du rôle important de la lipase dans ce processus (Claus et al. 2005). La LHS est l'enzyme limitante de la deuxième étape, consistant en l'hydrolyse des diglycérides (DG) en monoglycérides (MG). Ainsi, les souris déficientes en LHS présentent une accumulation de DG dans le TA, ainsi que dans les autres tissus exprimant la LHS (Haemmerle et al. 2002). Toutefois, bien que l'ATGL et la MGL soient responsables de la majorité de l'hydrolyse des TG en DG lors de la première étape et des MG en AG et glycérol lors de la troisième étape de la lipolyse, respectivement, la LHS est capable *in vitro* d'hydrolyser TG, DG et MG (Fredrikson et al. 1981). Ainsi, on observe une activité TG hydrolase résiduelle chez les souris déficientes pour l'ATGL, ce qui n'est pas le cas pour les souris double déficientes pour l'ATGL et la LHS (Zhang et al. 2019), et une activité MG hydrolase est également maintenue chez les souris déficientes en MGL (Taschler et al. 2011).



**Figure 10 : Activités enzymatiques de la LHS.** Issu de (Reczens, Mouisel, and Langin 2021)

La LHS hydrolyse les liaisons ester (O) de différents esters d'acides gras (NEFA). C'est notamment le cas des acylglycérols, principalement les diglycérides (DAG) qu'elle hydrolyse en NEFA + monoglycéride (MG). Elle hydrolyse également les esters de cholestérol en NEFA + cholestérol, et les esters de rétinol en NEFA + rétinol.

La LHS est également capable d'hydrolyser d'autres esters stockés dans la GL de l'adipocyte. C'est notamment le cas d'esters de cholestérol, que la LHS hydrolyse avec une plus grande préférence vis-à-vis des TG, ce qui est rarement le cas dans la famille des lipases (Ali et al.

2005; Fredrikson et al. 1981). La LHS est la principale hydrolase d'esters de cholestérol dans de nombreux tissus (Cook et al. 1982), lui conférant un rôle important dans le métabolisme intracellulaire du cholestérol. De façon similaire, la lipase est également capable d'hydrolyser des esters de rétinol, une stimulation de l'activité de la lipase diminuant la quantité intracellulaire de cette espèce tandis que le rétinol s'accumule dans le milieu de culture d'adipocytes murins (Wei et al. 1997), participant ainsi à la disponibilité de la vitamine A. Enfin, il est intéressant de noter que de nombreux autres lipides peuvent être estérifiés sur des squelettes carbonés de glycérol, formant de potentiels substrats que la LHS pourrait hydrolyser tels que les céramides stockés sous forme d'acylcéramides (Senkal et al. 2017). Une récente étude montre que la LHS est capable d'hydrolyser les TG contenant les lipides bioactifs FAHFAs, une forme d'AG branchés (Brejchova et al. 2021; Tan et al. 2019). Il y est montré qu'en plus d'hydrolyser la liaison ester liant les FAHFAs et le glycérol, comme le fait l'ATGL, la LHS est également capable d'hydrolyser les FAHFAs en FA.

## II.2 Régulation

Comme abordé précédemment, une particularité de la LHS est la présence de son domaine régulateur, où l'on trouve des sites de phosphorylation dépendants de signaux hormonaux et qui régulent son activité, ce qui lui doit son titre de lipase « sensible aux hormones ». Dans l'adipocyte, les hormones pro- et anti- lipolytiques comme les catécholamines et l'insuline, respectivement, contrôlent directement l'activité acylglycérol hydrolase de la LHS en modulant les taux intracellulaires d'AMPc (Lafontan and Langin 2009). La phosphorylation de la LHS par la PKA, dépendante de l'AMPc, va à la fois induire sa translocation à la GL et augmenter son activité enzymatique via un changement de conformation favorisant l'exposition de la partie hydrophobe de la LHS et ainsi la liaison à ses substrats lipidiques (Egan et al. 1992; Krintel et al. 2009; Stralfors and Belfrage 1983; Stralfors, Bjorgell, and Belfrage 1984). De par la différence de taille des séquences de la LHS chez l'humain et le rongeur, la nomenclature des sites de phosphorylation s'avère délicate et confondante, étant régulièrement mal utilisée dans la littérature. La figure 11 permet le comparatif de la localisation des sérines phosphorylées entre les espèces. Chez l'Homme, les Ser-649 et Ser-650 sont les principaux sites de phosphorylation ciblés par la PKA (Anthonsen et al. 1998; Krintel et al. 2008; Su et al. 2003). Il est également important de noter que la sérine dite catalytique Ser-424 a été décrite comme essentielle à la translocation de la LHS à la GL, bien

que non phosphorylée (Su et al. 2003). D'autres sites de phosphorylation ont été décrits. La Ser-522 est également ciblée par la PKA, et la Ser-589 par la kinase ERK. Cependant, la mutagenèse de ces deux sites n'a pas d'effet majeur sur la capacité lipolytique, suggérant des rôles mineurs dans l'activation lipolytique de la LHS (Greenberg et al. 2001; Krintel et al. 2008). Il est également connu que les peptides natriurétiques vont être activateurs de la lipolyse en augmentant les taux intracellulaires de GMPc, activant la protéine kinase G (PKG), phosphorylant la LHS sur les mêmes sites que la PKA (Sengenès et al. 2000; Sengenès et al. 2003).

Critical residues	Localization in Rat/Mouse sequence	Localization in Human sequence
Catalytic triad	Ser-423, Asp-703, His-733	Ser-424, Asp-693, His-723
GDSAG motif	421-425	422-426
HGGG motif	349-352	350 – 353
Regulatory Domain*	494-666	495-665
PKA phosphorylation sites	Ser-659, Ser-660, Ser-563	Ser649, Ser-650, Ser-552
ERK phosphorylation site	Ser-600	Ser-589
AMPK phosphorylation site	Ser-565	Ser-554

AMPK, AMP-activated protein kinase. ERK, extracellular signal-regulated kinases. PKA, protein kinase A. PKG, protein kinase G.

\* Approximate boundaries

**Figure 11 : Localisation des résidus critiques de la LHS.** *Issu de (Reczens, Mouisel, and Langin 2021)*  
Localisation comparative des principaux résidus critiques à la régulation de l'activité de la LHS dans les séquences chez le rongeur (rat et souris) et l'humain.

De façon opposée, la phosphorylation de la Ser-554 par l'AMPK est inhibitrice de l'activité de la LHS (Garton and Yeaman 1990). Lors d'une stimulation lipolytique, la PKA va inhiber l'AMPK par phosphorylation, diminuant la phosphorylation de la LHS sur la Ser-554 par l'AMPK et levant ainsi l'inhibition (Djouder et al. 2010). De façon intéressante, la déficience en sous-unité catalytique de l'AMPK chez la souris affecte la phosphorylation de plusieurs sérines, diminuant la phosphorylation de la Ser-565 ciblée par l'AMPK, et augmentant celle des Ser-563 et Ser-660 ciblées par la PKA, indiquant une forme de compétition modulant l'activité de la LHS (Kim et al. 2016). Une autre étude met cependant en avant qu'une activation pharmacologique de l'AMPK dans des adipocytes humains et murins n'affecte pas la phosphorylation de la Ser-660, mais réduit celle de la Ser-563, ciblées par la PKA lors d'une stimulation adrénergique (Kopietz et al. 2018). L'inhibition de l'activité de la LHS peut également être entraînée à la suite de sa déphosphorylation par les phosphatases 2A et 2C (Wood et al. 1993). Une récente étude met

en évidence que la phosphatase PHLPP2 est également capable de dé-phosphoryler la LHS et réduire sa translocation à la GL et son activité lipolytique (Kim et al. 2021). Il est également montré dans cette étude que la PHLPP2 est également responsable de la dé-phosphorylation de l'AMPK, ce qui permet d'imaginer un effet indirect de la phosphatase dans l'inhibition de l'activité de la LHS en réduisant l'action inhibitrice de l'AMPK activée.

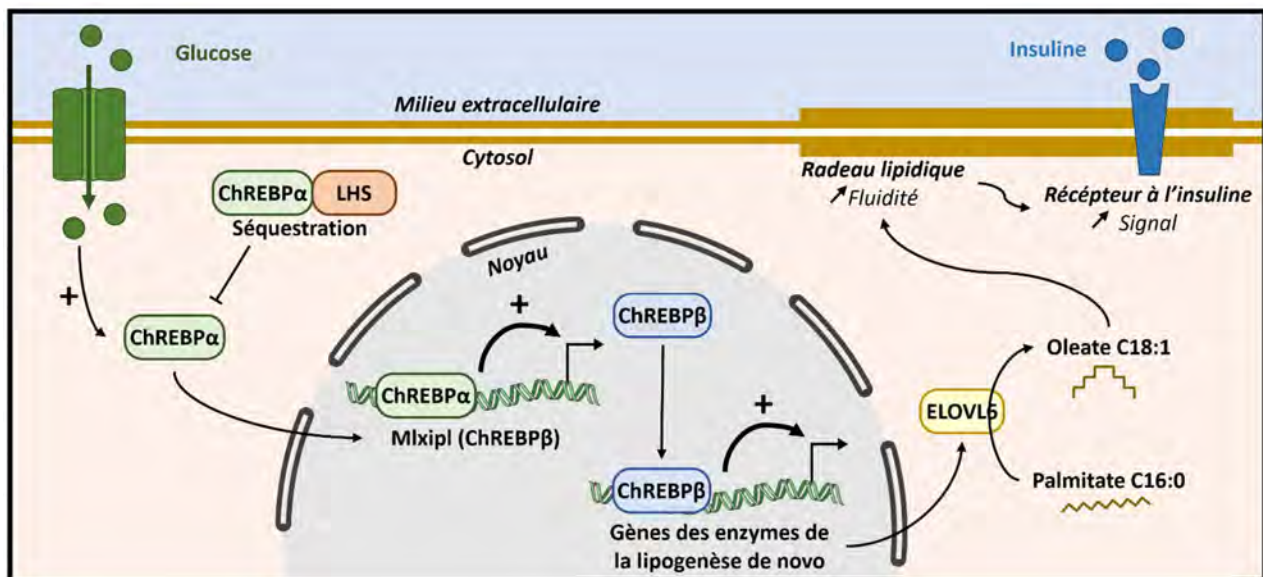
En plus des précédemment décrites modifications post-traductionnelles, l'activité de la LHS adipocytaire peut également être modulée par des interactions protéine-protéine. Outre l'homo-dimérisation de la LHS qui augmente son activité enzymatique (Shen et al. 2000), elle peut également interagir avec des protéines associées à la GL, notamment les périlipines. A l'état basal, la périlipine 1 recouvre la GL, empêchant l'accès de cette dernière aux lipases. Suite à une stimulation lipolytique, la périlipine 1 est phosphorylée par la PKA et la PKG, entraînant l'interaction de cette dernière avec la LHS qui peut ainsi transloquer à la GL (Wang et al. 2009). La vimentine est le troisième partenaire nécessaire à ce mécanisme (Shen et al. 2010; Sztalryd et al. 2003). Lorsque la LHS est activée à la surface de la GL, elle hydrolyse les DG en MG et AG, deux produits qui sont inhibiteurs de son activité, jouant comme un rétrocontrôle négatif. Cependant, lorsque la LHS est porteuse d'AG, elle va interagir avec la protéine de transport FABP4 qui va séquestrer les AG et lever cette inhibition (Jenkins-Kruchten et al. 2003; Shen et al. 2001). Enfin, il a été montré que la LHS interagit avec PTRF, un acteur de la formation des cavéoles au niveau de la membrane plasmique dont la localisation est modulée par l'insuline (Aboulaich et al. 2006). Il a été mis en évidence plus tardivement que l'acétylation de PTRF va favoriser son interaction avec la LHS au niveau des cavéoles et ainsi favoriser son activité lipolytique (Zhou et al. 2017).

Ainsi, l'activité enzymatique de la LHS est régulée par une combinaison de modifications post-traductionnelles et d'interactions protéine-protéine.

### **III. Rôle non enzymatique**

Il a récemment été montré au laboratoire que la LHS interagit avec le facteur de transcription ChREBP (carbohydrate-responsive element-binding protein) dans l'adipocyte (Morigny et al. 2019). En réponse au glucose, l'isoforme ChREBP $\alpha$  transloque du cytosol vers le noyau où il va induire l'expression de l'isoforme ChREBP $\beta$ . Les deux isoformes vont alors agir de concert pour induire la transcription des enzymes de la lipogenèse *de novo* qui permet de produire des AG

à partir des atomes de carbone du glucose. Cette voie métabolique permet de ce fait le stockage du glucose sous forme de lipides, mais n'est que peu active chez l'Homme chez qui ses effets sont qualitatifs plus que quantitatifs. En effet, elle participe également à la production des phospholipides servant de composants de base pour la membrane plasmique de la cellule (Collins et al. 2010; Pietilainen et al. 2011). La nature des AG contenus dans les phospholipides module la fluidité de la membrane plasmique, agissant ainsi sur les niveaux de transduction du signal de différentes voies de signalisation (Antonny et al. 2015; Holzer et al. 2011; Iburguren et al. 2013). Dans l'adipocyte, la LHS interagit avec l'isoforme ChREBP $\alpha$  et le retient dans le cytosol. Une déplétion en LHS permet la libération de ChREBP $\alpha$  qui va davantage transloquer au noyau, induisant le programme génique qui lui est associé. Va notamment être induite l'expression de l'élongase ELOVL6, favorisant la production d'oléate par la lipogenèse *de novo*. L'oléate produit, une fois intégré aux phospholipides membranaires, augmente la fluidité membranaire et ainsi la sensibilité à l'action de l'insuline dans l'adipocyte. Ceci fut la première découverte d'un rôle non enzymatique de la LHS, ici dans la modulation du facteur de transcription ChREBP et de la sensibilité à l'action de l'insuline (Figure 12). Il est à noter qu'une forme mutante de la LHS catalytiquement inactive produit les mêmes effets. Cette découverte a ouvert un nouveau champ de recherche sur la LHS qui n'apparaît plus comme une simple lipase mais comme un nouvel acteur de la modulation du métabolisme cellulaire via des interactions protéine-protéine.



**Figure 12 : Rôle non enzymatique de la LHS dans le contrôle de l'activité de ChREBP**

En réponse au glucose, le facteur de transcription ChREBP $\alpha$  transloque au noyau pour induire l'expression de l'isoforme ChREBP $\beta$ . En agissant de concert, ils induisent l'expression des gènes codant les enzymes de la lipogenèse de novo, permettant de synthétiser des acides gras à partir des atomes de carbone du glucose. Parmi ces enzymes, l'élongase ELOVL6 convertit le palmitate en oléate qui, une fois intégré dans les radeaux lipidiques de la membrane plasmique, augmente leur fluidité. Cette augmentation de fluidité favorise la transduction du signal du récepteur à l'insuline, augmentant ainsi la sensibilité à l'action de l'insuline de l'adipocyte. La LHS séquestre l'isoforme ChREBP $\alpha$  dans le cytosol par une interaction physique directe, modulant ainsi l'activité transcriptionnelle de ChREBP. Ainsi, par ce rôle non enzymatique, la LHS régule l'expression d'un groupe de gènes en lien avec la sensibilité à l'action de l'insuline dans l'adipocyte.

#### IV. Phénotype de la déficience *in vivo*

De façon intéressante et contre-intuitive, la déficience en LHS *in vivo* est à l'origine de phénotypes complexes qui pourraient laisser entrevoir des liens avec d'autres fonctions encore non découvertes de la LHS, différentes de son rôle de lipase.

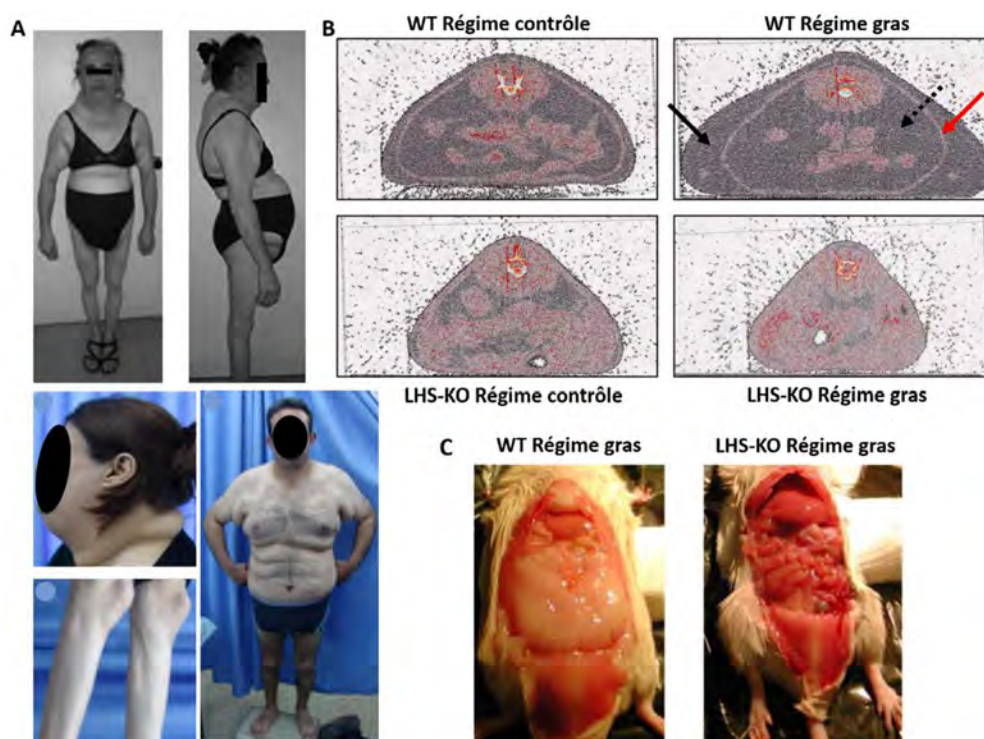
##### IV.1 Lipodystrophie

Les premiers modèles de déficience en LHS chez la souris ont été décrits au début des années 2000 (Osuga et al. 2000; Wang et al. 2001). En accord avec le rôle enzymatique de la LHS, ces animaux présentent des défauts de lipolyse. De la même manière, du fait du rôle limitant de la lipase dans l'hydrolyse des DG en MG et AG lors de la lipolyse, les animaux présentent une accumulation de DG dans le TA (Haemmerle et al. 2002). Cependant, cette accumulation de DG dans l'adipocyte n'est pas associée à une augmentation du volume du TA, les animaux déficients en LHS présentant une masse grasse réduite (Osuga et al. 2000; Wang et al. 2001). Ce phénotype est exacerbé lorsque les animaux sont nourris avec un régime riche en graisses, et a été présenté comme une résistance à l'obésité induite par l'alimentation (Harada et al. 2003). Bien qu'en apparence bénéfique, cette diminution de masse grasse lors de la déficience en LHS s'accompagne chez la souris d'une résistance à l'action de l'insuline systémique, d'une importante inflammation du TA, de dyslipidémies et de dépôts ectopiques de lipides, notamment une stéatose hépatique (Cinti et al. 2005; Hansson et al. 2006; Mulder et al. 2003; Pajed et al. 2021; Xia et al. 2017). Ainsi, ces animaux présentent un phénotype de lipodystrophie (Figure 13), ensemble de pathologies complexes associées à un défaut quantitatif et/ou qualitatif du TA qui, incapable d'assurer sa fonction de stockage, entraîne



l'apparition de dépôts ectopiques de graisses dans les organes périphériques (Lim et al. 2021; Vigouroux et al. 2011). Ces dépôts ectopiques, communs à l'obésité, auront les mêmes conséquences délétères dans les deux pathologies. Ainsi, bien qu'en apparence complètement opposées, lipodystrophies et obésités entraînent les mêmes complications métaboliques. Les lipodystrophies sont pour la grande majorité congénitales, issues de mutations de gènes codant des protéines ayant une fonction cruciale pour les bons développement et fonctionnement de l'adipocyte. Cependant, les phénotypes associés ne sont pas égaux, pouvant être globaux en affectant tous les dépôts adipeux, ou partiels et donc réduits à certains dépôts. Dans ce dernier cas, la masse grasse peut simplement être répartie de manière aberrante entre les dépôts sans toutefois être réduite au niveau global. Il en va de même pour la sévérité des complications associées, pouvant se traduire par des phénotypes de résistance sévère à l'action de l'insuline en cas de lipodystrophie généralisée, ou des complications plus modérées pouvant passer inaperçues pendant des années (Lim et al. 2021). Que ce soit par des mutations créées chez la souris ou observées chez l'Homme, les lipodystrophies renseignent ainsi sur les rôles importants que possèdent certaines protéines dans le fonctionnement de l'adipocyte, en lien ici avec une importance insoupçonnée des rôles de la LHS (Asterholm, Halberg, and Scherer 2007; Lim et al. 2021). Il est intéressant de noter que chez la souris déficiente en LHS, on observe une lipodystrophie généralisée, qui apparaît cependant tardivement et qui s'aggrave avec l'âge (Xia et al. 2017), ce qui a conduit à une certaine disparité dans la description du phénotype des souris déficientes en LHS (Park et al. 2005; Voshol et al. 2003). D'un point de vue mécanistique, il a été proposé que la LHS, par son activité enzymatique, fournirait des ligands pour le facteur de transcription majoritaire de l'adipogenèse PPAR $\gamma$ . En effet, ce dernier est activé par des espèces lipidiques variées, bien que les ligands endogènes restent inconnus à ce jour, et une supplémentation en agoniste pharmacologique de PPAR $\gamma$  contrebalance en partie la lipodystrophie de la souris déficiente en LHS (Shen et al. 2011). Cependant, au vu du puissant rôle de PPAR $\gamma$  dans l'acquisition et le maintien du phénotype adipocytaire, son activation pharmacologique pourrait atténuer la lipodystrophie due à la déficience en LHS par un mécanisme indépendant. Chez l'Homme, il existe quelques familles dans lesquelles ont été rapportées des déficiences congénitales en LHS (Albert et al. 2014; Carboni et al. 2014; Farhan et al. 2014; Zolotov et al. 2017). De façon intéressante, ces personnes présentent une lipodystrophie partielle, contrairement au modèle murin KO, avec une modification de la répartition de la masse grasse, absente de façon

quasi-totale au niveau du bas du corps, et accumulée de façon importante au niveau du tronc et du cou (Figure 13). Très peu d'informations sont disponibles quant au développement du phénotype avec l'âge, mais il est cependant intéressant de noter que ces cas cliniques humains décrits déclarent un diabète de type 2 à des âges peu avancés. Chez l'Homme, l'haploinsuffisance en LHS est également un facteur de risque quant au développement de pathologies métaboliques (Albert et al. 2014). Chez la souris en revanche, il a été montré au laboratoire que l'hétérozygotie est bénéfique, entraînant un ralentissement des flux d'AG au niveau de l'organisme, ce qui s'associe à une amélioration du profil métabolique, y compris dans un contexte d'obésité induite par un régime riche en graisse (Girousse et al. 2013).



**Figure 13 : Phénotype lipodystrophique de la déficience en LHS chez l'Homme et la souris**

**A** Photos de personnes déficientes en LHS atteintes de lipodystrophie. La masse grasse est presque absente dans le bas du corps et dans les extrémités des membres supérieurs, et s'accumule en partie haute du corps et dans le cou. Ce phénotype délétère est associé à des complications métaboliques. Panels du haut issus de (Carboni et al. 2014), panels du bas issus de (Zolotov et al. 2017). **B** Image de CT scan de souris déficientes en LHS et WT sous régime contrôlé ou riche en graisses. Les flèches noires indiquent les dépôts adipeux sous-cutanés et viscéraux, la flèche rouge indique la couche musculaire séparant les deux dépôts. **C** Photos des dépôts adipeux viscéraux chez des souris déficientes en LHS et WT sous régime gras. La forte réduction de la masse grasse chez la souris déficiente en LHS est ainsi observée sous régime contrôlé et exacerbée sous régime gras par rapport aux souris WT. Les panels B et C sont issus de (Strom et al. 2008).

## IV.2 Beigissement

Comme évoqué précédemment, le beigissement correspond à l'apparition d'adipocytes beiges à haut potentiel thermogénique dans les dépôts de TA blancs. Il s'agit d'un processus physiologique apparaissant lors d'expositions prolongées au froid afin que l'organisme acclimate sa température corporelle. Outre l'apparition d'un phénotype lipodystrophique, un phénomène pouvant s'apparenter à du beigissement a été décrit chez les souris déficientes en LHS placées sous régime riche en graisses (Strom et al. 2008). Bien que l'on observe dans le TA blanc de ces animaux l'apparition d'adipocytes d'apparence beige, le profil d'expression génique et, notamment, de marqueurs mitochondriaux et thermogéniques n'a pas été étudié. Au niveau métabolique, ce beigissement s'accompagne d'une consommation d'oxygène accrue localement au niveau du TA, et d'une respiration accrue au niveau systémique, témoignant d'une augmentation de la dépense énergétique de ces animaux. De façon intéressante, le beigissement est observé au niveau du TA blanc viscéral péri-ovarien, alors que ce phénomène est connu pour être prépondérant dans les TA sous-cutanés. Au niveau mécanistique, il a été proposé qu'une diminution d'expression du facteur RIP140, connu pour être un marqueur de la détermination du phénotype blanc versus brun de l'adipocyte, serait à l'origine du beigissement (Leonardsson et al. 2004). L'expression de RIP140 est stimulée par les niveaux intracellulaires d'acide rétinoïque, un métabolite du rétinol dont la forme de stockage est un substrat de la LHS (Kerley et al. 2001; Strom et al. 2009). Il a donc été spéculé qu'une déficience de cette fonction hydrolase d'esters de rétinol de la LHS orienterait l'adipocyte vers un phénotype beige. Cependant, aucune étude mécanistique n'a été rapportée à ce jour pour vérifier cette hypothèse. De plus, le beigissement n'a pas été observé dans le modèle murin d'haploinsuffisance en LHS décrit par le laboratoire, laissant suggérer que la diminution de fonction enzymatique de la LHS n'en était pas à l'origine, bien qu'un résiduel d'activité hydrolase d'esters de rétinol puisse être suffisant pour empêcher l'apparition de ce phénomène (Girousse et al. 2013). Une étude récente montre que l'augmentation d'expression d'UCP1 est retrouvée dans les dépôts adipeux sous-cutanés et périgonadiques chez des souris mâles déficientes en LHS spécifiquement dans l'adipocyte (Pajed et al. 2021). Néanmoins, d'autres marqueurs d'adipocytes thermogéniques semblent être diminués de manière concomitante, révélant encore une fois la complexité phénotypique

de ces animaux. Il est important de préciser qu'aucune donnée n'a été collectée sur un potentiel phénomène similaire de beigissement lors de déficience en LHS chez l'Homme.

Alors que les premiers modèles murins ont été décrits il y a plus de 20 ans, et bien que différentes mutations humaines aient été identifiées, il n'existe à l'heure actuelle que trop peu de données mécanistiques convaincantes permettant d'expliquer les complexes phénotypes associés à la déficience en LHS *in vivo*. La découverte récente d'un rôle non enzymatique a ouvert un nouveau champ de recherche quant aux rôles encore inconnus de la lipase et qui pourraient expliquer ces phénotypes.

## **Chapitre 3 : Les voies de la superfamille du TGF $\beta$ dans le tissu adipeux**

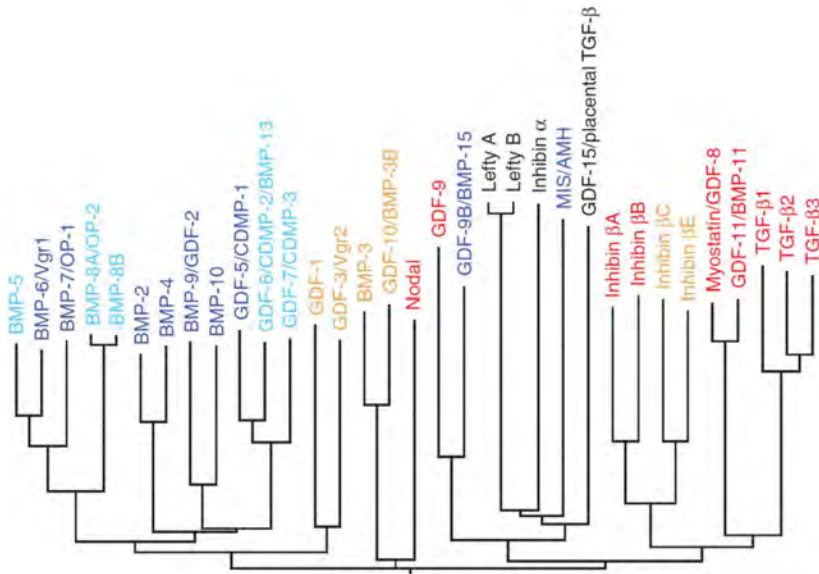
Bien que systématiquement décrite au singulier, la voie de signalisation TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ) se décompose en réalité en plusieurs voies dépendantes de l'engagement des différents ligands, récepteurs et acteurs intracellulaires lors de sa stimulation (Morikawa, Derynck, and Miyazono 2016). Pour plus de clarté, nous différencierons la superfamille TGF $\beta$ , regroupant un ensemble de voies, dont la voie TGF $\beta$  (habituellement décrite « TGF $\beta$ -like » en anglais). La superfamille de ligands TGF $\beta$  contrôle une grande variété d'événements cellulaires majeurs, notamment prolifération et différenciation, de la quasi-totalité des types cellulaires, pour ne pas dire tous, et ce, de façon pléiotrope et versatile. En effet, de par leur grande variété, l'activation des voies de la superfamille TGF $\beta$  peut avoir des conséquences variées sur un même type cellulaire. De plus, pour une stimulation identique, les types cellulaires répondront de façon différente en fonction de leur état physiologique et de leur équipement en acteurs de la transduction du signal (Derynck and Budi 2019; Massague 2012; Morikawa, Derynck, and Miyazono 2016). Les voies de la superfamille TGF $\beta$  restent à ce jour des voies de transduction complexes, recelant encore de nombreux mystères et inconnues, malgré un nombre conséquent d'articles publiés. Après avoir posé des bases quant à l'ensemble des composants des différentes voies de la superfamille TGF $\beta$  et leurs associations, ce chapitre s'intéressera aux rôles sur le TA, notamment ceux de la voie TGF $\beta$ -like.

### **I. Les voies de la superfamille TGF $\beta$**

#### **I.1 Ligands**

A l'heure actuelle, 33 ligands de la superfamille TGF $\beta$  ont été identifiés (Figure 14) selon leurs similarités de séquences (Morikawa, Derynck, and Miyazono 2016). Ils peuvent être séparés en deux grands groupes en fonction de leur capacité à activer les voies de la superfamille TGF $\beta$ . Historiquement, le TGF $\beta$ 1 a été le premier ligand découvert, et a donné son nom à la première voie de transduction identifiée (Roberts et al. 1981; Roberts et al. 1980). Il active les récepteurs aux TGF $\beta$ s et entraîne une transduction du signal médiée par les protéines SMADs (Small Mothers Against Decapentaplegic) ; SMAD2 et SMAD3, sur lesquelles nous reviendrons dans les parties suivantes. Par la suite, les Activines/Inhibines, le facteur Nodal et la

myostatine ont été montrés comme ligands de cette même voie (Morikawa, Derynck, and Miyazono 2016; Schmierer and Hill 2007). A l'inverse, les facteurs Bone Morphogenic Protein (BMP) activent la deuxième voie de la superfamille TGF $\beta$ , la voie « BMP », en se fixant aux récepteurs aux BMPs, ce qui active les protéines SMAD1, SMAD5 et SMAD8. Cette voie est également stimulée par les ligands Growth and Differentiation Factor (GDF). Cependant, la réalité est bien moins tranchée puisque certains de ces ligands peuvent parfois activer les deux voies de transduction, bien que les récepteurs et SMADs engagés ne soient pas forcément déterminés (Morikawa, Derynck, and Miyazono 2016). Par ailleurs, il existe une certaine complexité de nomenclature, le GDF8 étant couramment nommé myostatine, et le facteur GDF11 nommé BMP11, alors que ces ligands sont pourtant bien plus proches structurellement du TGF $\beta$  que des GDFs et BMPs et activent ainsi la voie TGF $\beta$ -like. Cette grande variété de ligands, y compris pour une même voie, représente le premier niveau d'explication quant à l'importante variabilité de réponses induites par des stimulations des voies de la superfamille TGF $\beta$ . De plus, en fonction des tissus, les rapports de concentration entre ces différents ligands vont changer du fait de leur sécrétion respective par différents types cellulaires plus ou moins abondants. L'équilibre entre les stimulations induites par les différents ligands joue un rôle important dans le niveau d'activation de chaque voie (Massague 2012). Pour exemple, le rôle crucial de l'équilibre des gradients des ligands Nodal et BMPs au cours de l'embryogenèse et du développement de l'axe droite/gauche sont largement décrits (Wu and Hill 2009). En accord, les processus régulés par la superfamille TGF $\beta$  sont souvent sensibles à la fois à la voie TGF $\beta$ -like et à la voie BMP, et ce de manière identique, comme en atteste l'action similaire du TGF $\beta$  et du BMP4 sur la prolifération des progéniteurs adipocytaires, ou opposée, à l'image de l'effet de ces mêmes ligands sur la différenciation adipocytaire (Lee 2018). L'équilibre des stimulations par les ligands de la superfamille TGF $\beta$  s'illustre également par le rôle des inhibines, qui vont être capables d'antagoniser la liaison des activines à leurs récepteurs, un mécanisme modulé par leur liaison au betaglycan (Lewis et al. 2000), alors que ces deux types de ligands sont produits à partir des mêmes sous-unités protéiques. Enfin, il est à noter qu'en fonction des modèles cellulaires, les effets que nous venons d'évoquer peuvent varier. L'équilibre de tonus et stimulation entre les deux voies joue donc un rôle important dans la directionnalité de la réponse aux stimulations.

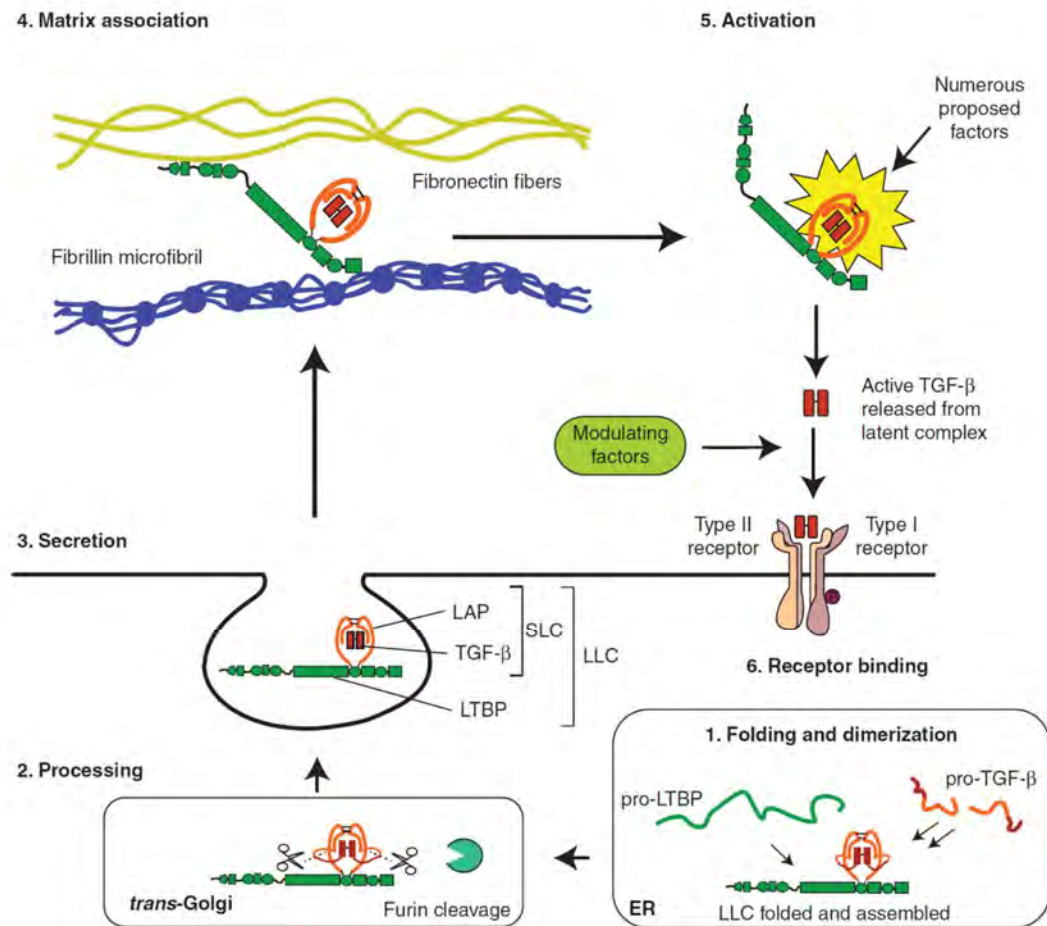


**Figure 14 : Arbre phylogénique des 33 ligands de la superfamille TGFβ.** Issu de (Morikawa, Derynck, and Miyazono 2016)

Classification basée sur la séquence d'acides aminés des polypeptides. En bleu les ligands signalisant par la voie BMP et en rouge ceux signalisant par la voie TGFβ. En bleu clair les ligands de la voie BMP susceptibles d'activer la voie TGFβ, et en orange ceux de la voie TGFβ susceptibles d'activer la voie BMP, mais dont les récepteurs et/ou les mécanismes de signalisation ne sont pas complètement déterminés. BMP, Bone Morphogenic Protein. OP, Osteogenic protein. GDF, Growth and Differentiation Factor. CDMP, Cartilage-Derived Morphogenic Protein. MIS/AMH, Müllerian-Inhibiting Substance/Anti-Müllerian Hormone. TGF-β, Transforming Growth Factor β.

De façon intéressante, la biodisponibilité de ces ligands est également modulée par des mécanismes extracellulaires impliquant notamment la formation de complexes latents. Bien que n'étant pas rapporté pour tous les types de ligands, ce système est extrêmement bien décrit pour les ligands de type TGFβ (Robertson and Rifkin 2016) (Figure 15). La production de TGFβ débute par la dimérisation du pro-TGFβ qui contient le Latency-Associated Peptide (LAP) et le facteur de croissance, formant le Small Latent Complex (SLC). Dans le réticulum endoplasmique (RE), ce dimère de pro-TGFβ s'associe à une Latent TGFβ-Binding Protein (LTBP), dont il existe plusieurs isoformes, via la formation de ponts disulfure avec le LAP, formant ainsi le Large Latent Complex (LLC) (Gleizes et al. 1996; Miyazono et al. 1991; Saharinen, Taipale, and Keski-Oja 1996). Dans le Golgi, le pro-peptide est clivé, terminant la maturation du LLC (Dubois et al. 1995; Hyytiainen, Penttinen, and Keski-Oja 2004). Une fois sécrété, ce complexe permet de garder latente la forme bioactive du TGFβ en l'ancrant dans la matrice extracellulaire (MEC) via l'interaction avec divers composants tels que la fibronectine et la fibrilline pour le LTBP1. Il est intéressant de noter que l'affinité des ligands

TGFβ pour le LAP est telle que la totalité du TGFβ est sécrétée sous forme latente. La libération de la forme bioactive va ensuite être induite par différents mécanismes, principalement des protéines. Les intégrines, protéases, déglycosidases sont les plus connues. Il a de plus été montré qu'une exposition aux UV, à des espèces réactives de l'oxygène, ou encore à des pH extrêmes, induisait l'activation du TGFβ (Robertson and Rifkin 2016).



**Figure 15 : Sécrétion et activation du complexe latent du TGFβ.** Adapté de (Robertson and Rifkin 2016)

1. Assemblage des pro-peptides TGFβ/LAP et LTBP formant le LLC dans le réticulum endoplasmique.  
 2. Maturation du LLC dans le Golgi par clivage du pro-peptide LAP. 3. Sécrétion du LLC dans le milieu extracellulaire. 4. Association du LLC dans la matrice extracellulaire, emprisonnant le TGFβ. 5. Activation du LLC, libérant le TGFβ actif qui va pouvoir lier et activer ses récepteurs, mécanisme régulé par différents modulateurs. LAP, Latency-Associated Peptide. LTBP, Latent TGFβ-binding protein. SLC, Small Latent Complex. LLC, Large Latent Complex.

En outre, une fois libéré de son complexe de latence, l'activité du TGFβ peut être modulée par interaction avec différentes protéines. Comme introduit précédemment, le betglycan peut lier les inhibines pour moduler l'activité des activines par antagonisme (Lewis et al. 2000). Le



betaglycan peut également lier le TGF $\beta$  au niveau d'un site différent de celui des activines (Wiater et al. 2006). Le TGF $\beta$  ainsi lié au betaglycan va activer son récepteur avec une affinité plus forte, modulant ainsi le niveau d'activation de la cascade de transduction du signal (Lopez-Casillas, Wrana, and Massague 1993). A l'inverse, la decorin va interagir avec le TGF $\beta$  bioactif pour inhiber son activité en induisant une phosphorylation particulière de SMAD2 à la suite de la liaison au récepteur (Abdel-Wahab et al. 2002). Un autre exemple est l' $\alpha_2$ -macroglobuline, qui lie le TGF $\beta$  actif pour favoriser son endocytose et ainsi limiter l'activation des voies de transduction dans le temps (LaMarre et al. 1991; LaMarre et al. 1990). Néanmoins, la déficience en cette protéine chez la souris n'induit pas de phénotype clair (Umans et al. 1995), laissant inexplicables les mécanismes de clairance du TGF $\beta$  dans la MEC. Bien qu'il existe d'autres exemples de protéines interagissant avec le TGF $\beta$  actif pour moduler son activité, peu de connaissances sont à ce jour disponibles quant à la diversité de ces protéines et à leurs effets précis en physiologie et physiopathologie. Bien que ce paragraphe se focalise sur le TGF $\beta$ , il existe des partenaires régulant l'activité de divers ligands de la superfamille TGF $\beta$ , comme c'est le cas de la follistatine, qui peut lier les activines, la myostatine et certains BMPs pour réduire leurs activités (Amthor et al. 2002; Glistler, Kemp, and Knight 2004; Harrington et al. 2006; Iemura et al. 1998).

Ainsi, à l'importante diversité de ligands s'associe également une grande complexité de régulations de leur biodisponibilité.

## 1.2 Récepteurs

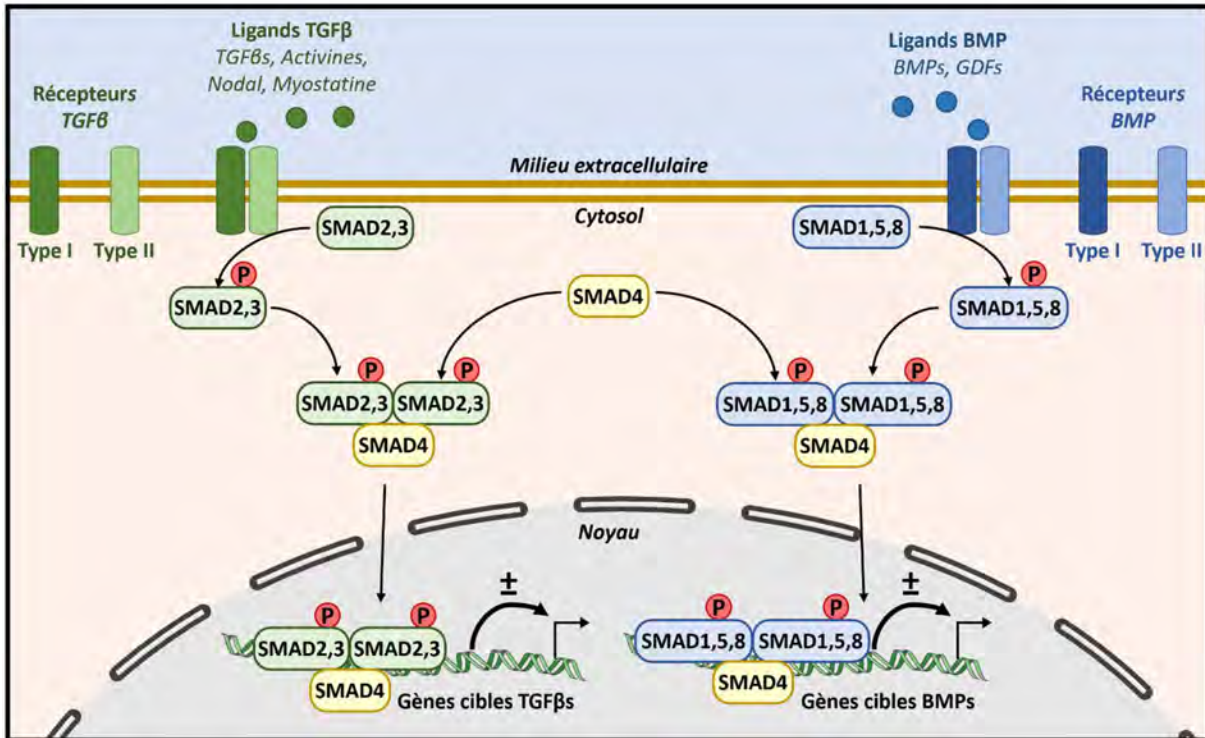
La liaison des ligands entraîne la formation d'un complexe de quatre récepteurs transmembranaires, deux récepteurs de type I et deux récepteurs de type II (Morikawa, Derynck, and Miyazono 2016). Ces deux types de récepteurs sont de type sérine/thréonine kinase et sont les seuls récepteurs transmembranaires de ce type connus chez l'Homme. Les récepteurs de type II, dits activateurs, phosphorylent les récepteurs de type I, dit propagateurs du signal, qui vont phosphoryler et activer les acteurs de la transduction que sont les SMADs. En plus de la variabilité de ligands de la superfamille TGF $\beta$ , il existe aussi divers récepteurs, sept de type I et cinq de type II. Ces divers récepteurs s'hétéro-dimérisent en fonction des ligands liés, et le choix du récepteur de type I, qui activera les protéines SMADs, est à l'origine de la ségrégation des voies TGF $\beta$  et BMP. Brièvement, les TGF $\beta$ s lient spécifiquement le récepteur de type I TGFBR1 (aussi appelé ALK5 ou T $\beta$ R1) et le récepteur de type II TGFBR2. Les

activines, Nodal et les BMPs partagent les récepteurs aux activines de type II ACVR2A et ACVR2B. Activines et Nodal partagent les récepteurs de type I AVCR1 (ALK2), ACVR1B (ALK4) et ACVR1C (ALK7), alors que les BMPs et l'Anti-Müllerian Hormone (AMH) utilisent les récepteurs de type I BMPR1A (ALK3) et BMPR1B (ALK6). Cependant, les BMPs peuvent aussi utiliser le récepteur de type II BMPR2, alors que le signal venant de l'AMH est transduit par l'AMHR2. Bien que ces indications soient générales, il est important de noter que chaque ligand lie ces complexes de récepteurs avec des affinités différentes et peuvent également lier plusieurs combinaisons de récepteurs, non décrites ici, comme c'est souvent le cas pour les GDFs, là aussi avec des affinités différentes. Aussi, un même ligand, en fonction du couple de récepteurs qu'il stimule, pourra induire des effets variés. De même, des ligands de la même voie, s'ils n'utilisent pas les mêmes récepteurs, pourront engendrer des réponses différentes. Enfin, certains récepteurs étant communs aux voies TGF $\beta$ -like et BMP-like, l'équipement cellulaire en récepteurs, et leurs possibles combinaisons, jouera un rôle important dans la versatilité des réponses cellulaires aux stimulations (Derynck and Budi 2019; Massague 2012; Morikawa, Derynck, and Miyazono 2016).

### I.3 Les protéines SMADs

A la suite de l'activation des récepteurs, la transduction du signal va être assurée par les protéines de la famille des SMADs (Figure 16). Il existe plusieurs isoformes de SMADs, impliqués dans la ségrégation des voies TGF $\beta$  et BMP. Les protéines SMAD2 et SMAD3 sont associées à la voie TGF $\beta$  alors que les SMAD1, SMAD5 et SMAD8 sont impliquées dans la voie BMP (Morikawa, Derynck, and Miyazono 2016). Ces SMADs vont être phosphorylés et activés par les récepteurs de type I de chacune de ces voies, et sont habituellement appelés R-SMADs pour « receptor-regulated ». A la suite de leurs phosphorylations, les R-SMADs vont interagir avec SMAD4, qui sert de partenaire commun à l'ensemble des R-SMADs et permet leur translocation nucléaire et la médiation de leurs effets géniques (Kawabata et al. 1998; Lagna et al. 1996; Zhang et al. 1996). Dans les voies canoniques, deux R-SMADs interagissent avec un SMAD4, formant des trimères comme SMAD2/SMAD3/SMAD4 ou SMAD3/SMAD3/SMAD4 pour la voie TGF $\beta$ -like, régulant chacun des groupes de gènes spécifiques, parfois communs. Parmi les gènes cibles, sera induite la troisième catégorie de SMAD que sont les I-SMADs pour « inhibitor » SMAD6 et SMAD7, qui vont assurer un rétrocontrôle négatif sur l'activation des

R-SMADs, limitant ainsi le signal des voies TGFβ et BMP dans la durée (Yan, Xiong, and Chen 2018).



**Figure 16 : Voies canoniques de la superfamille TGFβ.**

Les ligands TGFβ-like lient les récepteurs aux TGFβs de type I et II, ce qui va induire l'activation des R-SMADs SMAD2 et SMAD3, alors que les ligands BMP-like, en liant les récepteurs aux BMPs de type I et II, activent les R-SMADs SMAD1, SMAD5 et SMAD8. Une fois activés, ces R-SMADs s'associent au cofacteur commun SMAD4, qui permet leur translocation nucléaire, leur liaison à l'ADN et leurs effets transcriptionnels. Chaque complexe R-SMADs/SMAD4 régule des groupes de gènes différents, bien qu'il existe des cibles communes.

Bien qu'il existe un fort consensus autour de cette cascade de transduction canonique, de plus en plus d'études mettent en avant une réalité bien plus complexe.

Tout d'abord, il est important de noter qu'il est maintenant admis que les R-SMADs et SMAD4 transloquent et naviguent en permanence entre le noyau et le cytosol sous forme monomérique, notamment lors d'absence de stimulation (Hill 2009). Cependant le rôle, notamment transcriptionnel, de ces SMADs monomériques et non activés présents dans le noyau demeure un mystère en comparaison des complexes formés à la suite d'une stimulation.

Concernant le cofacteur SMAD4, il a très souvent été décrit comme indispensable à la translocation nucléaire et à la médiation des effets géniques des R-SMADs activées. Il a

toutefois été montré dans plusieurs types cellulaires que l'absence de SMAD4 n'affectait pas les réponses transcriptionnelles induites par le TGF $\beta$  sur des groupes de gènes particuliers, remettant en cause son statut de cofacteur indispensable (Bardeesy et al. 2006; Levy and Hill 2005). Par ailleurs, la diversité des complexes SMADs est plus importante que celle anticipée et il a, par exemple, été observé que des trimères composés uniquement de R-SMADs étaient formés en réponse au TGF $\beta$ , ou encore des trimères contenant un R-SMAD et deux SMAD4, régulant des groupes de gènes spécifiques (Kawabata et al. 1998; Lucarelli et al. 2018). Un fort intérêt est ainsi porté depuis quelques années à définir les différents complexes de R-SMADs et les groupes de gènes qu'ils régulent spécifiquement, ceci en fonction des types cellulaires. Enfin, il est important de préciser que la séquence des sites de fixation à l'ADN des SMADs est mal définie, et qu'il semblerait que les différents complexes puissent lier des zones communes sur l'ADN, mais avec des affinités différentes, mettant en avant des systèmes de régulation de l'expression génique par compétition entre ces complexes. Ainsi, la diversité et versatilité de réponse cellulaire aux ligands de la superfamille TGF $\beta$  est également en lien avec l'équipement en R-SMADs des types cellulaires.

A cela s'ajoutent diverses régulations de l'activité des SMADs par des modifications post-traductionnelles diverses, mais également par des interactions protéine-protéine, parfois avec des protéines plus ou moins spécifiques de certains types cellulaires, expliquant la diversité de réponses propres à chaque type cellulaire. De plus, les R-SMADs peuvent être activées par d'autres voies de signalisation comme les MAPK, que nous ne détaillerons pas ici (Xu, Lin, and Feng 2016).

De ce fait, les thématiques de recherche impliquant des régulations des voies TGF $\beta$  se heurtent souvent à ces mécanismes qu'il est parfois complexe de déchiffrer. Cependant, la grande variété des effets observés en réponse aux stimulations par des ligands de la superfamille TGF $\beta$  fait sens avec la complexité mécanistique de ses voies de transduction. La recherche sur les voies TGF $\beta$  reste ainsi d'actualité et offre un réel potentiel quant à la compréhension de phénomènes physiologiques et pathologiques dans lesquels elles jouent un rôle.

## II. Les voies de la superfamille du TGF $\beta$ dans l'adipocyte

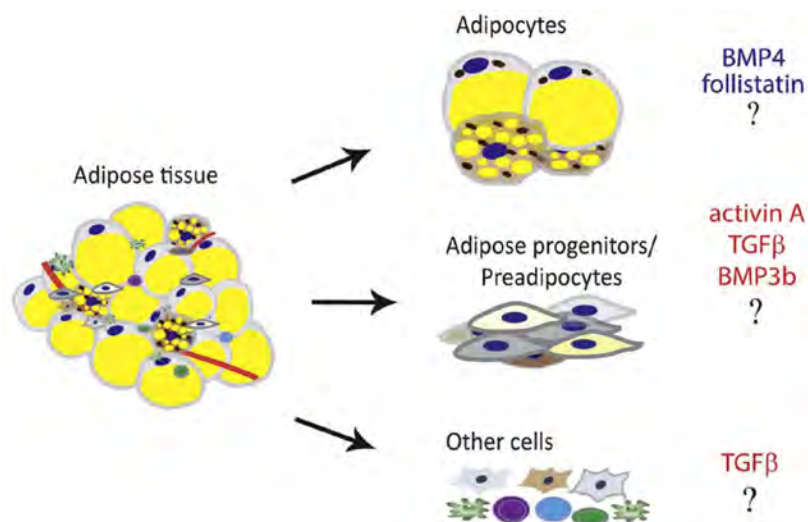
### II.1 Production de ligands dans le tissu adipeux

Dans le TA, des ligands de la superfamille du TGF $\beta$  sont produits par divers types cellulaires, dont l'adipocyte (Figure 17).

Il semblerait que la grande majorité de la production des ligands TGF $\beta$ -like soit assurée par les cellules de la FSV. Une étude récente montre que le TGF $\beta$ 1 est principalement produit par les lymphocytes T, le TGF $\beta$ 2 par les macrophages polarisés M2 et les progéniteurs adipocytaires, et le TGF $\beta$ 3 par les progéniteurs adipocytaires (Petrus et al. 2018). Cependant, la majorité des cellules de la FSV sécrètent une multitude de ligands de la superfamille du TGF $\beta$ . Ainsi, les progéniteurs adipocytaires, en plus de produire du TGF $\beta$ 2 et TGF $\beta$ 3, sécrètent également du TGF $\beta$ 1 et de l'activine A (Klar et al. 2017; Zaragosi et al. 2010). Les macrophages sécrètent également du TGF $\beta$ 1 et possiblement de l'activine A (Bourlier et al. 2012; Vila et al. 2014). Bien que l'étude des différentes sous-populations tissulaires soit en plein essor, il n'existe pas d'information quant au profil de sécrétion des ligands de la superfamille TGF $\beta$  en fonction des sous-populations cellulaires. Néanmoins, il a été montré récemment que la production de TGF $\beta$ 1 et activine A par les progéniteurs adipocytaires retrouvés dans le TA viscéral était plus importante que dans ceux du TA sous-cutané, en lien avec la capacité de différenciation différente entre ces progéniteurs d'origines différentes (Lee et al. 2019) (cf. page 10). De plus, les ligands TGF $\beta$ s sont principalement stockés sous forme latente dans la MEC, et seront libérés lors de remodelage de la matrice ou de stress mécaniques (Fain et al 2005). L'ensemble des ligands ainsi produits pourra agir sur une grande majorité des cellules du TA qui sont équipées de récepteurs adaptés. Au cours de l'obésité, il est largement admis que la quantité de ligands TGF $\beta$ -like produits localement dans le TA est augmentée, notamment en lien avec le recrutement de cellules pro-inflammatoires, et est à l'origine de nombreux désordres dont la fibrose du TA (Alessi et al. 2000; Fain, Tichansky, and Madan 2005; Henegar et al. 2008; Klimcakova et al. 2011; Roh et al. 2020; Yadav et al. 2011).

Moins de données sont disponibles concernant la production de ligands BMP-like car l'étude de leurs rôles biologiques dans le TA est plus récente. Il a cependant été montré que les BMP2, BMP3 et BMP4 étaient fortement retrouvés au niveau du TA, et que leur production est en général augmentée au cours de l'obésité (Bowers et al. 2006; Guiu-Jurado et al. 2016; Koza et

al. 2006). Ces études décrivent cette augmentation de sécrétion comme un mécanisme de protection en réponse à l'obésité, puisque stimulant la formation de nouveaux adipocytes (cf. partie suivante). De façon intéressante, il a été montré que l'adipocyte était responsable de la majorité de la production de BMP4 (Gustafson et al. 2015; Qian et al. 2013). *A contrario* des données sur les ligands TGF $\beta$ -like, davantage d'informations sont disponibles sur la présence et le rôle des ligands BMP-like au niveau du TA brun du fait de l'intérêt porté à leurs effets positifs sur les adipocytes thermogéniques (cf. page 72). Ainsi, les BMP4, BMP6, BMP8b et BMP14 sont retrouvés au niveau du TA brun et leur production est augmentée en réponse au froid (Grefhorst et al. 2015; Hinoi et al. 2014).



**Figure 17 : Production des ligands de la superfamille TGF $\beta$  dans le TA.** Adapté de (Lee 2018)  
Schéma global de la production majeure des ligands de la superfamille du TGF $\beta$  par les populations cellulaires composant le TA.

## II.2 Prolifération des progéniteurs adipocytaires

Les voies de la superfamille TGF $\beta$  contrôlent la vitesse de prolifération de nombreux types cellulaires, tels que les progéniteurs adipocytaires. La littérature à ce sujet est abondante et a fait l'objet de plusieurs revues (Lee 2018; Zamani and Brown 2011). Aussi, ce manuscrit se concentrant sur l'adipocyte, nous n'aborderons que brièvement ce sujet.

Il a globalement été démontré que les ligands TGF $\beta$ -like stimulaient la prolifération de divers modèles de préadipocytes murins et humains *in vitro*. Un traitement au TGF $\beta$ 1 induit ainsi la prolifération des préadipocytes murins 3T3F442A (Choy, Skillington, and Derynck 2000). Un traitement à l'activine A stimule également la prolifération du modèle de préadipocytes

humains que sont les hMADS (Zaragosi et al. 2010), à la différence des progéniteurs murins 3T3-L1 (Hirai et al. 2005). Il est ainsi possible de spéculer que l'augmentation de la stimulation par les ligands TGF $\beta$ -like au cours de l'obésité permettrait d'augmenter la quantité de progéniteurs adipocytaires, un phénomène nécessaire au mécanisme d'hyperplasie permettant d'augmenter le volume du TA. Il a été démontré que le TGF $\beta$ 3 était particulièrement important dans ce phénomène et permettait le recrutement de progéniteurs nécessaires à l'expansion du TA lors de l'obésité (Petrus et al. 2018). Cependant, il est important de noter que les progéniteurs adipocytaires sont des cellules de type fibroblastique. Ainsi, une stimulation chronique par des ligands TGF $\beta$ -like va entraîner leur conversion en myofibroblastes, spécialisés dans la déposition de MEC. Des milieux conditionnés par des macrophages issus de TA d'individus obèses entraînent ainsi la conversion de progéniteurs adipocytaires humains en myofibroblastes, un phénomène inhibé par l'utilisation d'anticorps anti-TGF $\beta$ 1 et anti-activine A (Bourlier et al. 2012). Cette conversion en myofibroblastes favorise la mise en place d'une fibrose, un phénomène délétère important dans l'obésité. Un exemple concret est imagé par le modèle de souris C3H, dont la souche C3H/HeO $\mu$ J est profibrotique et récapitule la fibrose observée chez l'humain au cours de l'obésité, alors que la souche C3H/HeJ, mutée pour le TLR4, est protégée de cette fibrose (Vila et al. 2014). Dans cette étude, il est montré que l'activation du TLR4 des macrophages par l'inflammation en réponse à l'obésité, va induire la production de TGF $\beta$ 1 par ces derniers et ainsi entraîner la fibrose du TA, contribuant à la physiopathologie de l'obésité. Une récente étude met en évidence l'existence d'une population particulière de précurseurs myofibroblastiques dans le TA dont le recrutement et la différenciation sont provoqués par le TGF $\beta$ 1 (Esteve et al. 2019).

A nouveau, peu d'informations sont disponibles concernant l'impact des ligands BMP-likes sur la prolifération des progéniteurs adipocytaires. Il a, toutefois, été rapporté que le BMP2 augmentait la prolifération des préadipocytes murins 3T3F442A (Skillington, Choy, and Derynck 2002), mais diminuait celle de préadipocytes humains (Vanhatupa et al. 2015). Il faut noter que les BMP3 et BMP3b ont été montrés comme pouvant stimuler la prolifération de différents modèles de préadipocytes murins *in vitro* (Hino et al. 2012; Stewart, Guan, and Yang 2010), cependant, bien qu'étant des ligands BMP-likes, ils semblent signaler majoritairement via la voie TGF $\beta$ -like, et les SMAD2/3 (Stewart, Guan, and Yang 2010).

### II.3 Adipogenèse et métabolisme de l'adipocyte blanc

Il existe un fort lien entre la capacité proliférative des cellules et leur capacité à se différencier. En effet, plus les cellules s'engagent dans un processus de différenciation, moins elles prolifèrent, et vice versa. En adéquation, alors qu'une stimulation par les ligands TGF $\beta$ -like favorise la prolifération des progéniteurs adipocytaires, elle s'oppose cependant à leur différenciation en adipocytes (Figure 18). Le TGF $\beta$ 1 inhibe la différenciation des 3T3F442A (Choy, Skillington, and Derynck 2000). Les TGF $\beta$ 1 et TGF $\beta$ 3 inhibent également l'adipogenèse dans des progéniteurs adipocytaires humains (Lee 2018). L'activine A induit un effet similaire sur les 3T3-L1 (Hirai et al. 2005) et les hMADS (Zaragosi et al. 2010). De nouveau, dans certains types cellulaires, des divergences existent. C'est, notamment, le cas du modèle de cellules embryonnaires mésenchymateuses murines, pour lequel un traitement à l'activine A n'a pas d'effet sur la différenciation, alors que l'activine B est inhibitrice ; ces ligands empruntant pourtant la même voie de transduction (Guo et al. 2014). La myostatine semble avoir un effet délétère sur l'adipogenèse de progéniteurs murins (Li et al. 2016) et humains (Guo et al. 2008), mais bénéfique sur celle des cellules murines 10T1/2 (Feldman et al. 2006).

D'un point de vue mécanistique, une fois activé, SMAD3 va interagir avec plusieurs membres de la famille des facteurs de transcription C/EBP, et inhiber leur activité, cruciale pour l'adipogenèse (Choy and Derynck 2003). Par ailleurs, il a été montré que SMAD3 pouvait lier le promoteur du gène codant le facteur de transcription PPAR $\gamma$ , lui aussi essentiel dans la différenciation adipocytaire, et inhiber son expression dans des fibroblastes cardiaques murins (Gong et al. 2016). De façon intéressante, alors que les ligands TGF $\beta$  exercent leurs effets négatifs sur la différenciation par l'engagement de SMAD3 (Choy, Skillington, and Derynck 2000), les effets des activines passeraient par SMAD2 (Hirai et al. 2005; Zaragosi et al. 2010).

Bien que le rôle anti-adipogénique des ligands TGF $\beta$ -like soit relativement bien décrit *in vitro*, leur relevance reste peu établie *in vivo*. La déficience en SMAD3 chez la souris, bien qu'améliorant le statut métabolique des animaux, entraîne une diminution de l'expression de PPAR $\gamma$  et des C/EBPs, réduisant les niveaux de différenciation des adipocytes blancs et les fonctions métaboliques qui leur sont associées (Tan et al. 2011). Cependant, une étude récente montre que la transition, bien documentée, du phénotype adipocytaire en faveur de cellules de type myofibroblastique au cours de l'obésité est liée à l'augmentation du signal

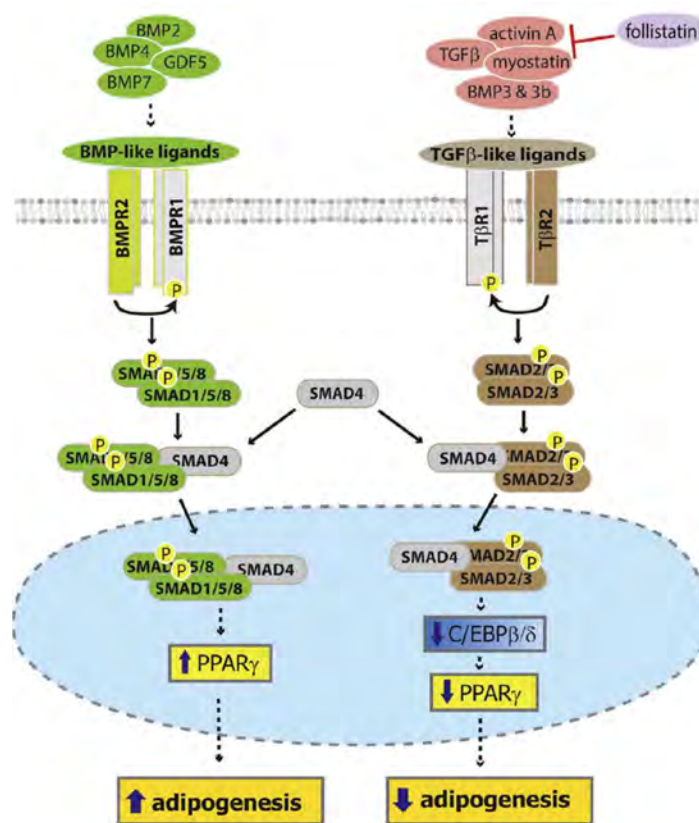


TGF $\beta$  et à une perte d'activité de PPAR $\gamma$  (Roh et al. 2020). Très peu d'études sont réalisées sur SMAD2, notamment du fait de la létalité embryonnaire constatée par sa déficience *in vivo* (Das, Randall, and Hill 2009). De façon similaire, comme c'est le cas pour d'autres ligands de la superfamille du TGF $\beta$  cités ci-dessous, la déficience en TGF $\beta$ 1 entraîne une létalité précoce chez la souris (Shull et al. 1992). De ce fait, les mécanismes impliqués dans l'effet anti-adipogénique des ligands TGF $\beta$ -like restent peu décrits *in vivo*. Un autre exemple est la déficience en myostatine chez la souris qui, bien qu'entraînant une augmentation de différenciation adipocytaire des progéniteurs *in vitro*, se traduit *in vivo* par une quantité réduite de TA (Li et al. 2016). Ainsi, la compréhension du rôle physiologique de la voie TGF $\beta$ -like dans l'adipogenèse reste très limitée.

Par ailleurs, le rôle des ligands TGF $\beta$ -like sur le métabolisme adipocytaire reste très peu documenté. En désaccord avec les notions introduites précédemment, une récente étude met en avant un rôle bénéfique du TGF $\beta$ 2 au niveau du TA, réduisant l'inflammation et les complications métaboliques liées à l'obésité, en partie via un rôle direct sur l'adipocyte en augmentant l'utilisation du glucose et des AG (Takahashi et al. 2019). Ce rôle sur l'adipocyte n'est pas retrouvé en réponse au TGF $\beta$ 1 et semble modéré en réponse au TGF $\beta$ 3. Ainsi, la majorité des informations disponibles quant aux rôles des ligands TGF $\beta$ -likes au niveau du TA concerne la prolifération et différenciation des progéniteurs. Leurs effets sur le métabolisme nécessitent donc d'être définis.

En ce qui concerne les ligands BMP-likes, il est relativement admis que le BMP4 va favoriser l'adipogenèse dans différents modèles de préadipocytes *in vitro*, incluant les cellules murines 10T1/2 (Bowers and Lane 2007) et 3T3L1 (Yoshida et al. 2013), les progéniteurs murins provenant de TA viscéral (Macotela et al. 2012), et les progéniteurs humains issus de personnes obèses dont le potentiel de différenciation est réduit (Gustafson and Smith 2012). Les effets du BMP2 sont moins tranchés. Il va être stimulateur de l'adipogenèse dans les cellules 10T1/2 (Huang et al. 2009). Il ne semble pas avoir d'effet seul sur la différenciation des cellules 3T3L1, mais agit de façon synergique en présence de rosiglitazone (Sottile and Seuwen 2000). De façon similaire, l'effet du BMP2 sur les cellules 3T3F442A dépend du contexte, ayant peu d'effet seul, alors qu'inhibant la différenciation en présence d'insuline ou d'acide rétinoïque (Skillington, Choy, and Derynck 2002). Dans les cellules humaines, une étude rapporte un effet stimulateur uniquement en présence de dexaméthasone (Lee et al.

2014), alors qu'une autre décrit des effets donneur-dépendants (Vanhatupa et al. 2015). Ainsi, le rôle des ligands BMP-like dans l'adipogenèse reste flou. A cause de leur importance dans le développement, la déficience globale entraîne souvent une létalité embryonnaire *in vivo*, comme c'est le cas pour BMP2 et BMP4 (Lawson et al. 1999; Zhang and Bradley 1996), et davantage d'études seront ainsi nécessaires pour établir leur relevance *in vivo*.



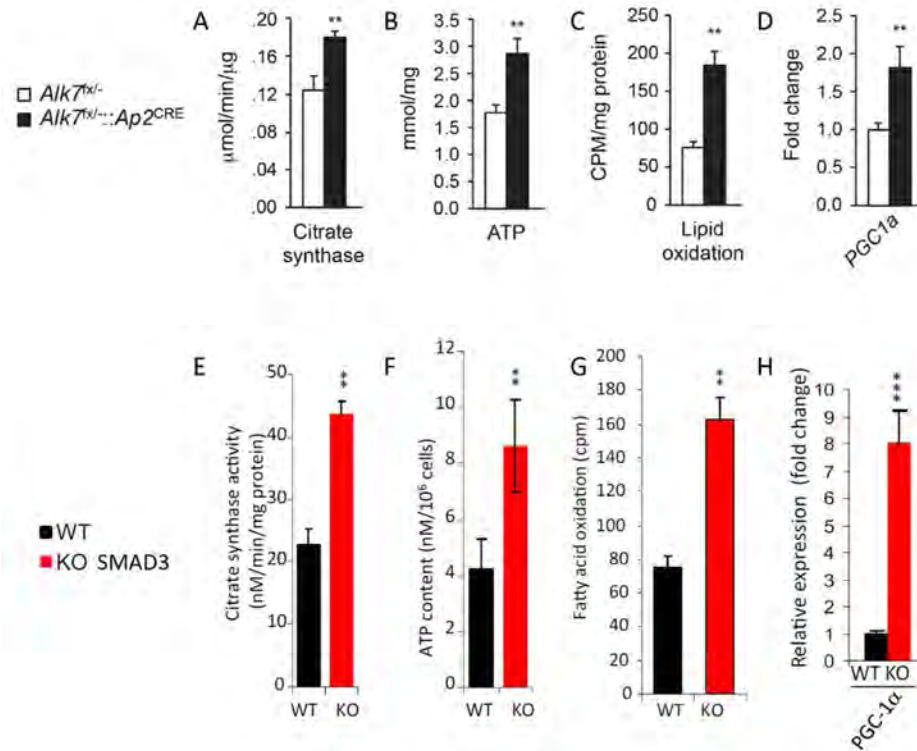
**Figure 18 : Effet des voies de signalisation de la superfamille TGFβ sur l'adipogenèse. Adapté de (Lee 2018)**

Globalement, l'engagement des SMAD2/3 via la voie TGFβ-like va être inhibitrice de la différenciation adipocytaire. A l'inverse l'engagement des SMAD1/5/8 par la voie BMP-like en sera plutôt stimulatrice.

#### II.4 Formation d'adipocytes thermogéniques

L'amélioration du phénotype métabolique et la résistance aux effets délétères d'un régime riche en graisses chez les souris déficientes en SMAD3 résulteraient d'un beigissement du TA blanc (Figure 18). En effet, a été observée chez ces souris une augmentation d'expression de PGC-1α, le principal régulateur de la mitochondriogenèse, et de la protéine découplante UCP1 (Yadav et al. 2011). En résulte une augmentation de la quantité de mitochondries, de la température corporelle, de la capacité à oxyder des lipides et de la consommation d'oxygène,

indiquant un beigissement fonctionnel par inhibition de la voie TGF $\beta$ -like. Ces résultats ont été reproduits chez des souris invalidées spécifiquement dans l'adipocyte pour le récepteur de la voie TGF $\beta$ -like ALK7 (Figure 19), indiquant, d'une part, un mécanisme propre à l'adipocyte mais, également, l'importance d'un tonus d'inhibition dans ce mécanisme (Guo et al. 2014). D'un point de vue mécanistique, il a été proposé que SMAD3 s'opposait à l'acquisition d'un phénotype beige en liant dans l'adipocyte le promoteur du gène codant PGC-1 $\alpha$ , inhibant sa transcription (Yadav et al. 2011), ce qui serait également le cas dans le muscle squelettique (Tiano, Springer, and Rane 2015). Ainsi, un traitement au TGF $\beta$ 1 et à l'activine A réduit l'adipogenèse dans un modèle de préadipocytes bruns murins (Yoshida et al. 2013). La myostatine va, quant à elle, inhiber l'adipogenèse brune *in vitro* (Kim et al. 2012). *In vivo*, sa déficience chez la souris ne semble pas altérer le développement du TA brun, mais entraîne le beigissement du TA blanc (Zhang et al. 2012). En accord avec le rôle de la follistatine dans l'inhibition de l'activité des activines et de la myostatine, cette dernière favorise la différenciation de préadipocytes bruns et l'acquisition d'un phénotype thermogénique de cellules embryonnaires mésenchymateuses murines (Braga et al. 2014). *In vivo*, la surexpression de la follistatine s'accompagne ainsi d'une augmentation de la masse du TA brun et du beigissement du TA blanc (Singh et al. 2017). La déficience en follistatine chez la souris s'accompagne elle aussi d'une létalité post-natale précoce (Matzuk et al. 1995). Cependant, il a été montré dans une étude récente, qu'une population de lymphocytes T appelés  $\gamma\delta$ , favorisait la production de TGF $\beta$ 1 par les adipocytes bruns via leurs récepteurs pour l'IL17 (Hu et al. 2020). Dans cette étude, il est montré qu'une sécrétion de TGF $\beta$ 1 par les adipocytes bruns est nécessaire à l'innervation du TA brun, via ses propriétés neurotrophiques, et à la thermogénèse adaptative. Ainsi, dans ce contexte, la production de TGF $\beta$ 1 favorise le brunissement et l'activité thermogénique des adipocytes bruns via un rôle indirect passant par les neurones du système nerveux sympathique.



**Figure 19 : Beigissement du TA blanc lors de déficiences en acteurs de la voie TGFβ-like**

A-D : modèle murin déficient en ALK7 spécifiquement dans l'adipocyte, adapté de (Guo et al. 2014).  
E-H : souris déficientes en SMAD3, adapté de (Yadav et al. 2011).

Mesures dans le tissu adipeux blanc de l'activité citrate synthase (A,E), de la quantité cellulaire d'ATP (B,F), des taux d'oxydations d'acides gras (C,G) et de l'expression génique de PGC1α (D,H). La déficience en ALK7 et SMAD3 est associée à un phénomène de beigissement du TA blanc.

Le BMP4 stimule une adipogenèse beige dans des préadipocytes blancs, mais inversement une adipogenèse blanche dans des préadipocytes bruns *in vitro* (Elsen et al. 2014; Gustafson et al. 2015; Modica et al. 2016). En accord, sa surexpression *in vivo* entraîne un beigissement du TA blanc et un blanchiment du TA brun, alors que sa déficience altère le recrutement de progéniteurs adipocytaires au niveau du TA blanc et entraîne l'apparition d'adipocytes plus gros dont le phénotype est délétère (Modica et al. 2016; Qian et al. 2013; Tang et al. 2016). Le BMP7 a été montré comme augmentant la différenciation en adipocytes bruns de modèles de préadipocytes murins et humains (Elsen et al. 2014; Xue et al. 2014). *In vivo*, une étude montre que, bien qu'entraînant une létalité rapidement après la naissance, les jeunes souris déficientes en BMP7 présentent une masse de TA brun réduite (Tseng et al. 2008). Cette même étude montre, en accord, qu'un traitement au BMP7 va entraîner une augmentation de la masse du TA brun et de la dépense énergétique chez la souris. Les BMP14 et BMP8b vont eux aussi être stimulateurs de l'adipogenèse brune (Hinoi et al. 2014; Whittle et al. 2012).

Bien que ces découvertes semblent intéressantes dans un contexte d'activation du beigissement pour lutter contre les désordres métaboliques, il faut garder à l'esprit que les voies de la superfamille TGF $\beta$  sont des systèmes de transduction ubiquitaires, et qu'il est ainsi complexe de cibler des tissus ou des types cellulaires en particulier. Cependant, comme introduit précédemment, la grande variabilité de réponses aux stimulations par des ligands de la superfamille TGF $\beta$  en fonction des types cellulaires, laisse à penser qu'il existe des systèmes de régulation et/ou des acteurs spécifiques de certains types cellulaires. Si des modes de régulation type cellulaire spécifique sont identifiés, ils pourraient permettre un ciblage pharmacologique précis des voies de la superfamille TGF $\beta$  à l'échelle d'une cellule, voire d'un tissu.

Pour conclure, les données disponibles quant aux effets des ligands de la superfamille du TGF $\beta$  sur le développement et la biologie des différents TA se basent fortement sur des observations *in vitro* et regorgent de contradictions. Les nombreuses mutations létales des acteurs de ces voies de transduction au niveau systémique se sont opposées à une caractérisation approfondie de leur relevance *in vivo*. Le développement de modèles nouveaux de déficiences spécifiques de l'adipocyte est à mettre en place pour répondre à ces questions.

## Objectifs de thèse

### **Objectif 1 : Développement d'un modèle de sphéroïdes de préadipocytes murins**

Un premier objectif de mes deux premières années de thèse a été de développer un modèle de sphéroïdes de préadipocytes primaires murins dans le cadre d'un projet européen visant à comprendre les mécanismes permettant la plasticité de la GL. En effet, les modèles d'études de l'adipocyte *in vitro* se heurtent à des limitations dans la capacité de différenciation de ces cellules et, donc plus globalement, de relevance vis-à-vis d'adipocytes matures. C'est notamment le cas pour la GL qui reste multiloculaire *in vitro*, alors qu'uniloculaire *in vivo*, ce qui limite l'étude de sa plasticité. Or, la compréhension des mécanismes d'hypertrophie adipocytaire est d'un intérêt majeur du fait de sa forte association avec la résistance à l'action de l'insuline et diverses pathologies cardio-métaboliques. L'avènement de la culture en 3D a permis des avancées dans la compréhension du fonctionnement de divers organes, comme le foie ou l'intestin. L'objectif a donc été de développer un système de culture 3D pour permettre l'acquisition d'adipocytes avec une GL uniloculaire *in vitro* à partir de progéniteurs.

### **Objectif 2 : Caractérisation du rôle de la LHS nucléaire dans la voie TGF $\beta$ de l'adipocyte**

Au cours de ma première année de thèse, j'ai rapidement mis en évidence que la déplétion en LHS dans un modèle *in vitro* d'adipocytes humains entraînait différents changements phénotypiques de ces cellules, notamment un beigissement, mais également une amélioration de leur différenciation et des modifications de composantes de la matrice extracellulaire. Le principal objectif de cette thèse a été de définir les mécanismes moléculaires à l'origine de ce changement de phénotype et les conséquences biologiques qui en découlent. Au cours de ma première année, j'ai testé l'implication de différents mécanismes et voies de signalisation pouvant expliquer un ou plusieurs de ces changements. En parallèle, Emeline Reczens, étudiante en seconde année de thèse dans l'équipe, mettait en évidence la présence de LHS dans le noyau de l'adipocyte. Nous nous sommes alors demandé si cette nouvelle localisation subcellulaire de notre protéine d'intérêt pouvait expliquer certains changements phénotypiques observés lors de sa déplétion. Les résultats de cet important travail synergique ont permis de démontrer que la LHS participe dans le noyau de l'adipocyte au contrôle transcriptionnel médié par la voie TGF $\beta$ , en faisant un acteur clé de l'architecture et l'homéostasie métabolique de l'adipocyte.

## Objectif 1

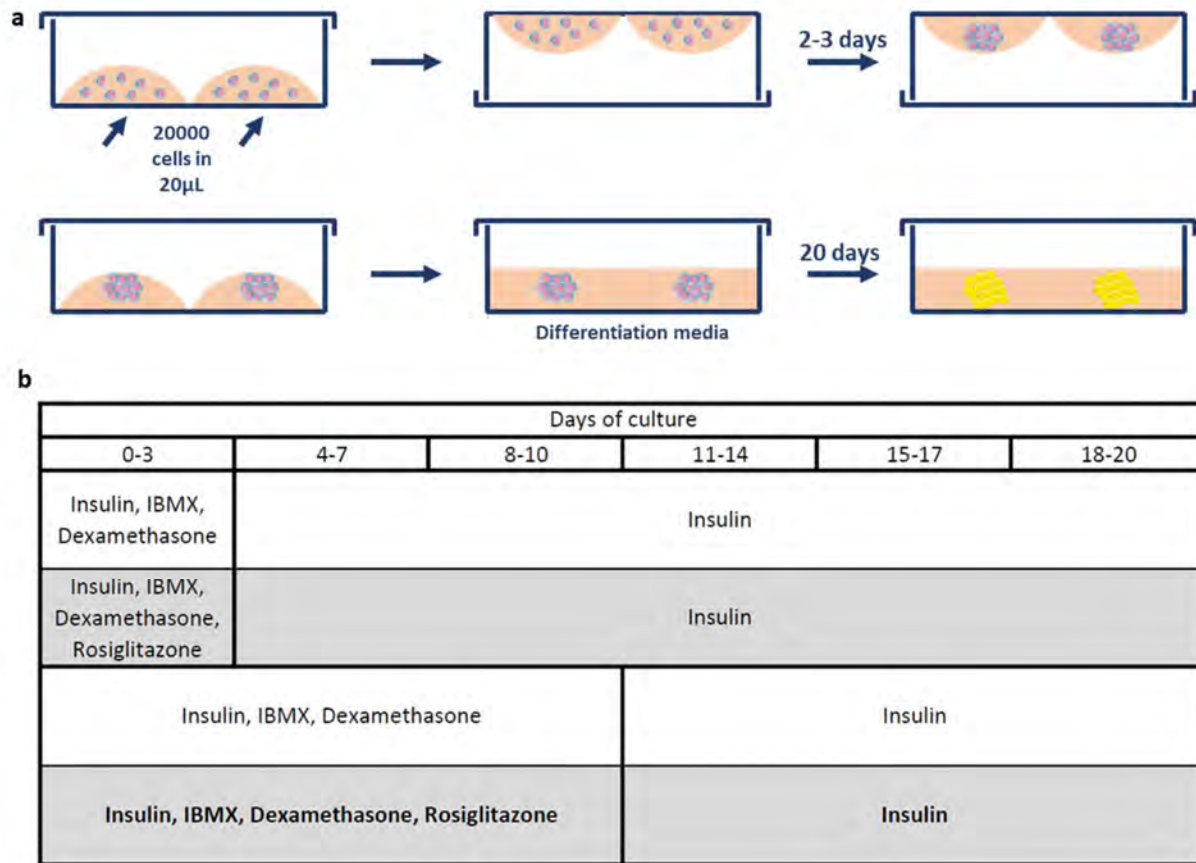
Comme discuté dans la revue en introduction (Dufau et al. 2021) (cf. page 24), les modèles de culture *in vitro* d'adipocytes issus de la différenciation de progéniteurs ne répondent que partiellement aux besoins de la recherche. Un aspect important de ces lacunes se trouve notamment dans les profils et niveaux d'expression génique des marqueurs adipocytaires qui ne récapitulent pas ceux retrouvés *in vivo*, mais également dans la structure des GL qui restent multiloculaires et n'atteignent pas le stade uniloculaire. Le laboratoire a récemment obtenu un financement du conseil européen de la recherche (ERC Synergy Grant) pour mener d'importants travaux sur la plasticité de la GL, en partenariat avec une équipe suédoise (Mikael Rydén & Niklas Mejhert) et une équipe niçoise (Bruno Anthony). La mise en place d'un modèle d'étude *in vitro* permettant, notamment, la formation d'une GL uniloculaire était indispensable et a constitué un objectif technique prioritaire. Le développement d'un modèle de culture de sphéroïdes de progéniteurs murins semblait une approche intéressante au vu de données préliminaires disponibles dans la littérature. Ce développement technique a fait l'objet d'une partie conséquente de mes travaux de thèse dont une partie des résultats a été publiée (Shen et al. 2021). Nos collaborateurs du Karolinska Institute, de par leur grande maîtrise de la culture d'organoïdes de foie et l'importante bio-banque à disposition, ont pu mettre au point la culture de sphéroïdes de progéniteurs adipocytaires humains. Au laboratoire, notre expertise dans la construction de modèles de souris transgéniques et de leur exploitation à des fins de phénotypage métabolique *in vivo* et *in vitro*, nous a permis de générer des sphéroïdes à partir de progéniteurs murins. L'article qui suivra contient le « Matériels et Méthodes » associé à cette partie.

### I. Résultats

Après quelques essais non concluants basés sur l'utilisation d'un support matriciel, nous avons opté pour un système de goutte suspendue (hanging drop) dont un schéma est représenté Figure 20a. Dans ce système, des gouttes de milieu contenant les cellules sont mises en suspension pour favoriser par gravité l'assemblage des sphéroïdes. Au bout de 2-3 jours, les sphéroïdes ainsi formés sont remis en suspension dans le milieu de différenciation adipocytaire. Plusieurs protocoles de différenciation ont été testés, selon le temps d'induction de la différenciation et la présence ou non de rosiglitazone durant cette période (Fig. 20b).

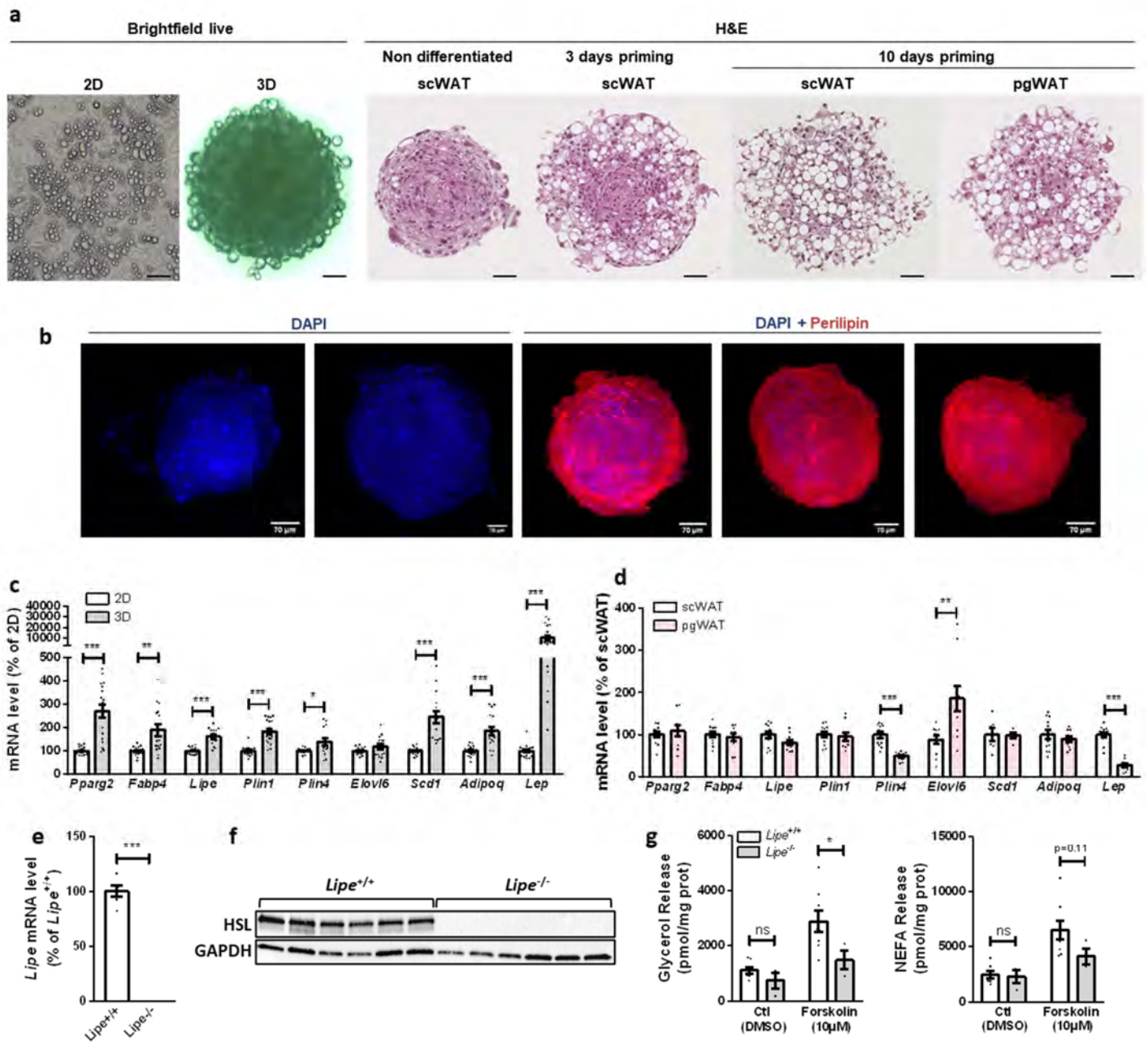
Nous avons retenu le protocole utilisant la rosiglitazone pendant 10 jours d'induction du fait de sa capacité à permettre une différenciation en profondeur du sphéroïde (Fig. 21a). Les images en lumière blanche montrent la formation d'adipocytes possédant une GL uniloculaire en 3D, ce qui n'est pas le cas en culture conventionnelle en 2D (Fig. 21a). De plus, les coupes de ces sphéroïdes suivis d'une coloration H&E révèlent la formation d'adipocytes aux larges GL aussi bien en périphérie qu'en profondeur, et à la fois dans des sphéroïdes de progéniteurs provenant du TA sous-cutané (scWAT) que viscéral (pgWAT) (Fig. 21a). Nous avons en parallèle travaillé avec l'ITAV à Toulouse sur le développement et l'application à nos sphéroïdes entiers de l'imagerie à feuille de lumière pour permettre de réaliser et d'améliorer l'observation de certains marquages visant à mieux étudier leur structure en 3D. Un marquage de la périlipine a ainsi révélé une différenciation homogène tout autour de ces structures (Fig. 21b). L'expression génique de marqueurs de maturité adipocytaire est augmentée dans les cultures en 3D par rapport aux mêmes cellules cultivées en 2D (Fig. 21c). En outre, les niveaux d'expression de ces gènes sont similaires dans les sphéroïdes de progéniteurs issus de scWAT et pgWAT (Fig. 21d). Une démonstration de faisabilité a été réalisée à partir de progéniteurs issus de souris déficientes ou non pour la LHS (Fig. 21e,f). Dans les sphéroïdes issus d'animaux contrôles, un traitement à la forskoline induit la libération des produits lipolytiques que sont le glycérol et les AG libres, montrant une réponse fonctionnelle de ces sphéroïdes (Fig 21g). Dans les sphéroïdes issus des animaux déficients en LHS les niveaux de lipolyse stimulée sont réduits par rapports aux sphéroïdes issus de souris contrôles, récapitulant le phénotype observé *in vivo* chez ces animaux (Fig 21g).





**Figure 20 : Setup for mouse adipose progenitors spheroid culture.**

**a** Schematic overview of the hanging drop spheroid setup. Spheroids of 20000 cells are formed through 2-3 days hanging in a 20µL drop of medium. Once formed, spheroids are resuspended in the differentiation media for 20 days. **b** Overall table of the spheroids adipogenic differentiation protocols tested. Media was changed every 3-4 days. Two differentiation priming timings have been tested, 3 or 10 days, with two differentiation cocktails, containing or not rosiglitazone. The protocol of 10 days priming with rosiglitazone (in bold) has been selected as the standard condition.



**Figure 21 : Functional adipose spheroids reveal increased differentiation and adipocyte maturity.**

**a** Brightfield live and H&E images of mouse primary preadipocyte from subcutaneous (scWAT) and perigonadal (pgWAT) differentiated in 2D or 3D for 20 days. Scale bars 50µm. **b** Light sheet microscopy of Perilipin 1 immunofluorescence staining. Scale bars 70µm. **c-d** mRNA expression level in (c) conventional 2D vs 3D cultures of scWAT progenitors and in (d) 3D cultures of scWAT vs pgWAT progenitors (n=6 replicates from 3 cell cultures). **e-g** scWAT progenitors of *Lipe*<sup>+/+</sup> and *Lipe*<sup>-/-</sup> mice were differentiated in 3D cultures. **e-f** *Lipe* mRNA (e) and HSL protein (f) expression level (n=6 replicates from 1 cell culture). **g** Glycerol and NEFA release in basal (Ctl, DMSO) and stimulated (Forskolin) lipolysis assessment (n=3-8 replicates from 1 cell culture). Data are mean ± SEM. Statistical analysis was performed using Unpaired t-test (c-e) and 2-Way ANOVA with Sidak's post-hoc test (g). \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

## II. Article

### **3D Adipose Tissue Culture Links the Organotypic Microenvironment to Improved Adipogenesis**

Joanne X. Shen, Morgane Couchet, Jérémy Dufau, Thais de Castro Barbosa, Maximilian H. Ulbrich, Martin Helmstädter, Aurino M. Kemas, Reza Zandi Shafagh, Marie-Adeline Marques, Jacob B. Hansen, Niklas Mejhert, Dominique Langin, Mikael Rydén, and Volker M. Lauschke

*Advanced Science* 2021

# 3D Adipose Tissue Culture Links the Organotypic Microenvironment to Improved Adipogenesis

Joanne X. Shen, Morgane Couchet, Jérémy Dufau, Thais de Castro Barbosa, Maximilian H. Ulbrich, Martin Helmstädter, Aurino M. Kemas, Reza Zandi Shafagh, Marie-Adeline Marques, Jacob B. Hansen, Niklas Mejhert, Dominique Langin, Mikael Rydén, and Volker M. Lauschke\*

Obesity and type 2 diabetes are strongly associated with adipose tissue dysfunction and impaired adipogenesis. Understanding the molecular underpinnings that control adipogenesis is thus of fundamental importance for the development of novel therapeutics against metabolic disorders. However, translational approaches are hampered as current models do not accurately recapitulate adipogenesis. Here, a scaffold-free versatile 3D adipocyte culture platform with chemically defined conditions is presented in which primary human preadipocytes accurately recapitulate adipogenesis. Following differentiation, multi-omics profiling and functional tests demonstrate that 3D adipocyte cultures feature mature molecular and cellular phenotypes similar to freshly isolated mature adipocytes. Spheroids exhibit physiologically relevant gene expression signatures with 4704 differentially expressed genes compared to conventional 2D cultures (false discovery rate < 0.05), including the concerted expression of factors shaping the adipogenic niche. Furthermore, lipid profiles of >1000 lipid species closely resemble patterns of the corresponding isogenic mature adipocytes *in vivo* ( $R^2 = 0.97$ ). Integration of multi-omics signatures with analyses of the activity profiles of 503 transcription factors using global promoter motif inference reveals a complex signaling network, involving YAP, Hedgehog, and TGF $\beta$  signaling, that links the organotypic microenvironment in 3D culture to the activation and reinforcement of PPAR $\gamma$  and CEBP activity resulting in improved adipogenesis.

## 1. Introduction

In recent years it has become clear that white adipose tissue (WAT) has a multitude of functions in human health and disease. Adipocytes are critical for lipid storage and release, and WAT constitutes the largest endocrine organ.<sup>[1]</sup> Besides adipokines and cytokines, adipocytes secrete extracellular vesicles with important effector functions across a variety of target tissues.<sup>[2]</sup> The importance of healthy adipose tissue is evident from syndromes and diseases linked to its dysregulation but also from epidemiological studies demonstrating that the prevalence of obesity closely parallels the increasing incidence of cardiovascular diseases, type 2 diabetes mellitus, and non-alcoholic fatty liver disease.<sup>[3,4]</sup> In metabolically unhealthy obesity, the storage capacity of WAT is exceeded and fat “spills over” into ectopic depots, such as into liver, skeletal muscle, and heart, where it can entail insulin resistance, inflammation, and tissue injury.

The lack of adequate WAT models that allow the stable culture of fat cells, with physiologically relevant phenotypes *in vivo*, hampers further insights into adipose

J. X. Shen, A. M. Kemas, Dr. R. Zandi Shafagh, Dr. V. M. Lauschke  
Department of Physiology and Pharmacology  
Karolinska Institutet  
Stockholm 171 77, Sweden  
E-mail: volker.lauschke@ki.se

Dr. M. Couchet, Dr. T. de Castro Barbosa, Dr. N. Mejhert, Prof. M. Rydén  
Department of Medicine  
Huddinge  
Karolinska Institutet  
Karolinska University Hospital  
Stockholm 141 86, Sweden

J. Dufau, Dr. M.-A. Marques, Prof. D. Langin  
InsERM  
Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases (I2MC)  
UMR1297, Toulouse 31432, France

J. Dufau, Dr. M.-A. Marques, Prof. D. Langin  
Université de Toulouse  
Université Paul Sabatier  
Faculté de Médecine, I2MC  
UMR1297, Toulouse 31432, France

 The ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under <https://doi.org/10.1002/advs.202100106>

© 2021 The Authors. Advanced Science published by Wiley-VCH GmbH. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

DOI: 10.1002/advs.202100106

biology and the molecular networks underlying adipocyte differentiation, primarily because no model system can fully recapitulate *in vivo* adipogenesis. The most commonly used adipocyte models are based on the *in vitro* differentiation of progenitor cells, such as the murine cell line 3T3-L1, or the human PAZ6<sup>[5]</sup> or Chub-S7 cell lines.<sup>[6]</sup> While these and other immortalized cell lines are widely available, can be expanded indefinitely, and are easy to use, they differ significantly from their *in vivo* counterparts in both molecular and cellular phenotypes.<sup>[7]</sup> Primary adipocyte progenitors can be obtained from the stromal vascular fraction (SVF) of human WAT. These cells can be efficiently differentiated into cells with features of mature adipocytes and have been successfully used for mechanistic studies of adipocyte biology.<sup>[8,9]</sup> Furthermore, immortalized human adipose-derived stem cells (hASCs) constitute additional alternatives that can retain depot-specific features<sup>[10]</sup> and the ability to acquire beige or brown adipocyte phenotypes.<sup>[11]</sup> However, in conventional 2D monolayer cultures, none of these models exhibit cellular phenotypes, such as large unilocular lipid droplets or physiological gene expression profiles similar to those of mature adipocytes *in vivo*. As an alternative to differentiation based methods, membrane mature adipocyte aggregate cultures (MAAC) allow for the culture of mature adipocytes under permeable membranes.<sup>[12]</sup> While these cultures exhibit mature adipocyte gene signatures for several days, this method requires freshly prepared material and molecular phenotypes deteriorate considerably after 1 week in culture.

To more closely recapitulate the *in vivo* microenvironment, cells can be cultured in 3D, allowing for organotypic cell-cell and cell-matrix interactions. Compared to 2D cultures, both 3T3-L1 and hASCs differentiated in 3D acquire phenotypes closer to mature adipocytes.<sup>[13–15]</sup> Yet, their resemblance to *in vivo* counterparts remains distant, with cells displaying considerable multilocularity, low adipokine secretion, and limited lipid accumulation.<sup>[16–20]</sup> While the scaffold-free culture of murine SVF-derived adipocyte spheroids using hanging-drops has shown a modest increase of key adipocyte markers compared to conventional 2D culture for mouse SVF,<sup>[21]</sup> human SVF

**Table 1.** Donor information. BMI = body mass index.

Donor	Sex	Age	BMI	Surgery type	Fresh/cryopreserved
1	F	46	23.3	Liposuction, cosmetic	Fresh
2	F	56	24.2	Cosmetic	Cryopreserved
3	F	52	24.5	Cosmetic	Fresh
4	F	41	20.2	Cosmetic	Fresh
5	M	48	26.2	Cosmetic	Fresh
6	F	41	30.9	Liposuction, cosmetic	Fresh
7	F	33	22.2	Liposuction, cosmetic	Fresh
8	F	37	25.6	Cosmetic	Cryopreserved
9	F	46	26.4	Liposuction, cosmetic	Fresh
10	F	35	24.0	Cosmetic	Cryopreserved
11	F	45	24.6	Cosmetic	Cryopreserved
12	F	28	20.4	Cosmetic	Cryopreserved
13	F	34	23.7	Cosmetic	Cryopreserved
14	F	43	28.3	Cosmetic	Cryopreserved
15	F	54	21.0	Cosmetic	Cryopreserved
16	F	40	27.3	Liposuction, cosmetic	Cryopreserved

adipocyte spheroids have so far only been formed in matrigel with serum-containing media and lack comprehensive phenotypic characterization.<sup>[22]</sup>

Here, we addressed the lack of appropriate models and tools for the study of white adipocyte biology. Specifically, we developed a 3D culture platform optimized for scaffold-free spheroid culture of human and murine adipocyte cell models from various sources. We comprehensively benchmarked the model by integrating systems biology multi-omics profiling with a battery of functional assessments and demonstrate that molecular and cellular phenotypes closely resemble isogenic freshly isolated mature adipocytes and remained stable for at least 6 weeks in culture whereas conventional 2D cultures, tissue explants, and MAAC deteriorated rapidly. Global activity profiling of >500 transcription factors based on promoter motif activities revealed a critical role of the organotypic microenvironment in 3D culture, comprising fine-tuned expression of fibronectin, collagens, laminins, and extracellular remodelers, for the activation and reinforcement of key pro-adipogenic factors, including PPAR $\gamma$  and CEBP.

## 2. Experimental Section

### 2.1. Primary Human White Adipocyte Progenitor Cells

Primary human adipocyte progenitors from the SVF obtained from abdominal subcutaneous WAT (scWAT) of 16 donors undergoing cosmetic surgery (**Table 1**) were isolated as previously described.<sup>[23]</sup> In brief, the SVF containing adipocyte progenitors were isolated by type 1 collagenase digestion, cells were resuspended in fetal bovine serum (FBS; Hyclone, SV30160.03), and then either cryopreserved for later use or seeded as 2D monolayer or 3D spheroid cultures. As previously reported, SVF consisted of adipocyte progenitors (CD45-/CD34+/CD31-; 70–75%), macrophages (CD45+/CD14+; 10%) and leukocytes (CD45+/CD14-; 7%), while endothelial cells (CD45-/CD34+) constitute less than 2%.<sup>[24]</sup> Notably, the composition and

Dr. M. H. Ulbrich, Dr. M. Helmstädter  
Renal Division  
Department of Medicine  
University Hospital Freiburg and Faculty of Medicine  
University of Freiburg  
Freiburg 79106, Germany  
Dr. M. H. Ulbrich  
BIOSS Centre for Biological Signalling Studies  
University of Freiburg  
Freiburg 79104, Germany  
Dr. R. Zandi Shafagh  
Division of Micro- and Nanosystems  
KTH Royal Institute of Technology  
Stockholm 100 44, Sweden  
Dr. J. B. Hansen  
Department of Biology  
University of Copenhagen  
Copenhagen 2100, Denmark  
Prof. D. Langin  
Toulouse University Hospitals  
Department of Biochemistry  
Toulouse 31079, France

stoichiometry of SVF were not affected by cryopreservation. All donors gave informed written consent to donate the tissue and the study was approved by the regional board of ethics (permit numbers 2009/764-32, 2009/1881-31/1, and 2010/0009-32). All donors were healthy and had no cardiometabolic or malignant disease.

## 2.2. Primary Mouse White Adipocyte Progenitor Cells

Mice were housed and manipulated according to Inserm guidelines and European Directive 2010/63/UE in the local animal care facilities (agreements A 31 555 008, A 31 555 04, and C 31 555 10). Protocols were approved by the French Ministry of Research after review by local ethical committee (CEEA122). Primary adipocyte progenitors from the SVF of wild type and Lipe knockout mice were isolated as previously described.<sup>[25]</sup> In brief, freshly isolated WAT was digested with type II collagenase (Sigma) and SVF was seeded in DMEM containing 10% FBS and 0.5% gentamycin.

## 2.3. Spheroid Culture

Fresh or cryopreserved human primary SVF cells were seeded in culture flasks containing DMEM/F-12 GlutaMAX (10% FBS, 1% penicillin-streptomycin). After 48 h, the medium was changed and cells were grown to  $\approx 70\%$  confluence. Subsequently, cells were trypsinized, seeded into 96-well round bottom ultra-low attachment microplates (Corning) with 5000 cells per well, and centrifuged at 150 g for 2 min. 4 days after spheroid seeding, cultures were changed to serum-free differentiation medium consisting of maintenance medium (William's E supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 units mL<sup>-1</sup> penicillin, 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> streptomycin, 10  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> insulin, 10  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> transferrin, 6.7 ng mL<sup>-1</sup> sodium selenite, and 100 nM dexamethasone) with the addition of a differentiation cocktail consisting of 500  $\mu$ M 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), 10 nM hydrocortisone, 2 nM 3,3',5-Triiodo-L-thyronine, 10  $\mu$ M rosiglitazone, 33  $\mu$ M biotin and 17  $\mu$ M pantothenic acid. Half of the medium was changed after 48 h and subsequently every 3–4 days. After 17 days of differentiation, the medium was changed to serum-free maintenance medium without differentiation additives. For supplementation with free fatty acids (FFAs), 160  $\mu$ M oleic acid and 160  $\mu$ M palmitic acid conjugated to 10% bovine serum albumin (BSA) at a molar ratio of 1:5 for 2 h at 40 °C before were added to the medium as indicated.

Human preadipocytes from WAT immortalized by telomerase reverse transcriptase (TERT-hWA) were cultured as previously described.<sup>[11]</sup> Spheroids were formed and differentiated as described above, with some modifications of the differentiation medium: 0.5  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> insulin, 45.5  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> transferrin, 0.5 ng mL<sup>-1</sup> sodium selenite, 5 mM IBMX, and 100 nM hydrocortisone.

Mouse preadipocytes were trypsinized when at  $\approx 70\%$  confluence and cells were resuspended at 1 million cells per mL in basic medium. Hanging drops of 20  $\mu$ L containing 20 000 cells were generated and spheroid formation occurred within 3–4 days. Spheroids were then differentiated in basic medium supplemented with 17 nM insulin, 100 nM dexamethasone, 125  $\mu$ M IBMX, 1  $\mu$ M rosiglitazone during 10 days with medium change

every 3–4 days. After the differentiation period, basic medium supplemented with only 17 nM insulin was used for maintenance and spheroids were cultured until day 20.

## 2.4. 2D Monolayer Culture

Primary and immortalized human white adipocyte progenitor cells were expanded and cultured as above. However, instead of transfer to ultra-low attachment plates, preadipocytes were differentiated in monolayer culture using the same differentiation cocktail for 17 days (or for 13 days in the case of TERT-hWA cultures). As cells in 2D culture progressively detach, monolayer cultures could not be maintained for longer.

Primary mouse white adipocyte progenitor cells were expanded and cultured as described for the respective murine 3D cultures. However, instead of trypsinization and spheroid formation, preadipocytes were differentiated in monolayer culture for 20 days using the same differentiation cocktail.

## 2.5. Viability and Functional Assays

Cell viability was measured using CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay reagent (Promega). Intracellular lipids were quantified through spheroid trypsinization and subsequent mechanical dissociation in the presence of AdipoRed Assay reagent (Lonza). Conditioned media were collected 4 days after each medium change for determination of adiponectin concentrations by ELISA (R&D Systems). For lipolysis assays, human differentiated cells (13 days in 2D culture or 17 days in 3D culture) or preadipocytes were incubated in lipolysis medium (DMEM/F12 supplemented with 2% BSA) without (basal) or with 1 or 10  $\mu$ M isoprenaline for 3 h at 37 °C. Mouse spheroids were incubated in Krebs-Ringer Buffer supplemented with 2% BSA and 2 mM glucose without (basal) or with 10  $\mu$ M forskolin. Glycerol content in the media was quantified using Free Glycerol Reagent (Sigma Aldrich) and Amplex UltraRed (Invitrogen), according to the manufacturers' instructions. Glycerol content was calculated based on a standard curve using Glycerol Standard Solution (Sigma Aldrich). For assessment of insulin sensitivity, insulin in media was phased out over 24 h, followed by 48 h insulin starvation. Spheroids were then stimulated with 100 nM insulin for 10 min before being harvested for protein extraction. For Western blotting, 5  $\mu$ g of protein per sample were loaded and membranes were probed with antibodies against pAKT (Ser473, #4060, Cell Signaling Technology) and vinculin (ab129002, Abcam). Bands were detected using the SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific). For cytokine stimulation, spheroids were exposed to IL-1 $\beta$  (10 ng mL<sup>-1</sup> in maintenance medium) for 48 h. Glucose uptake was quantified as previously described.<sup>[26]</sup>

## 2.6. qRT-PCR

Total RNA was isolated using QIAzol Lysis Reagent and RNA was reverse transcribed into cDNA using SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) or High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) for

human and mouse samples, respectively. qPCRs were performed using TaqMan or SYBR Green Assays utilizing the primers and probes provided in Table S1, Supporting Information.

## 2.7. Brightfield and Fluorescence Imaging

Spheroids were fixed in 10% formalin. For haematoxylin and eosin (H&E) imaging, fixed spheroids were paraffin embedded, sectioned, and processed for H&E staining by the Unit for Morphological Phenotype Analysis (FENO), Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden. For confocal imaging, fixed spheroids were stained with 2  $\mu$ M Nile Red for 24 h at room temperature. Stained spheroids or AAV-GFP-transduced spheroids (AAV; adeno-associated virus) were imaged using a Zeiss LSM 880 confocal microscope. TERT-hWA 2D cultures were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) and stained for 5 min with BODIPY (lipid stain) and Hoechst33342 (nuclei) in the dark.

## 2.8. Spinning Disk Confocal Microscopy

Spheroids were fixed in 4% PFA under gentle agitation for 1 h and washed 3 $\times$  in PBS. The fixed spheroids were stained for 10 min with BODIPY (lipid stain) and DRAQ5 (nuclei) dyes in the dark, with gentle agitation. Subsequently, spheroids were transferred into a 24-well glass-bottom plate, fixed to the bottom of the plate with a drop of 1.2% low melting agarose (BioRad), and partially cleared using the SeeBD protocol.<sup>[27]</sup> Spheroids were imaged with a dual spinning disk confocal microscope. Laser power was adjusted to prevent image saturation. Image deconvolution was performed using the Lucy–Richardson method.

## 2.9. Electron Microscopy

Spheroids were fixed in 10% formalin, 2% glutaraldehyde in DPBS overnight at 4 °C. Transmission electron microscopy and scanning electron microscopy (SEM) were performed as previously described.<sup>[28]</sup>

## 2.10. AAV Transduction

AAV infections were performed in adipocyte spheroids using serotypes 1, 2, 5, 6, and 8, encoding the CMV:eGFP gene. All serotypes were used at multiplicity of infection (MOI) ranging between 10<sup>4</sup> and 10<sup>6</sup> viral genomes/cell. On day 13 of differentiation, spheroids were incubated in 100  $\mu$ L of differentiation medium containing the indicated MOI of the respective AAV serotype. After 24 h, the spheroids were washed twice in pre-warmed DPBS to remove excess virus and spheroids were kept in differentiation medium until day 17 when spheroids were harvested for imaging or the evaluation of GFP expression by qPCR.

## 2.11. Lipidomics

Spheroids (30–40 per sample) were washed in DPBS and snap-frozen at the time of sampling. At the time of analysis, samples were subjected to Lipidomic Mass Spectrometry as previously described.<sup>[29]</sup>

## 2.12. RNA-Seq

Total RNA was isolated from 8–16 spheroids (3D culture) or one confluent well of a 6-well plate (2D culture), corresponding to 40 000–80 000 cells. RNA sequencing by poly-A capture was performed for seven donors by the National Genomics Infrastructure facility at Science for Life Laboratory, Stockholm, Sweden, using a minimum of 100 ng RNA input material. The results were integrated with available RNA-Seq data from additional preadipocytes, 2D differentiated adipocytes, MAAC, fresh adipose tissue, and explant samples.<sup>[12]</sup> Genes with an average number of fragments per kilo base per million mapped reads >1 across all samples were analyzed using Qlucore (Lund, Sweden). Differential gene expression analysis was conducted using DESeq2<sup>[30]</sup> and results were corrected for multiple tests using the Benjamini–Hochberg method with false discovery rates (FDRs)  $\leq$  5%. Significantly enriched pathways were identified based on the KEGG Pathway Database using the WebGestalt tool box.<sup>[31]</sup>

## 2.13. Transcription Factor Activity Analyses

The activity profiles of 503 transcription factors were analyzed during adipocyte differentiation in 2D monolayer and 3D spheroid culture using the ISMARA algorithm by inferring motif activities based on a linear model with a Bayesian procedure where a Gaussian prior on motif activities was used to avoid overfitting.<sup>[32]</sup> The parameters of the prior distribution of the Gaussian likelihood model were estimated using cross-validations in which activities were inferred on a randomly selected subset of 80% of promoters and the parameters corresponding to the optimal fit were validated using the remaining 20% of promoters. Transcription factor binding motifs were validated using human ChIP-Seq data in JASPAR.<sup>[33]</sup>

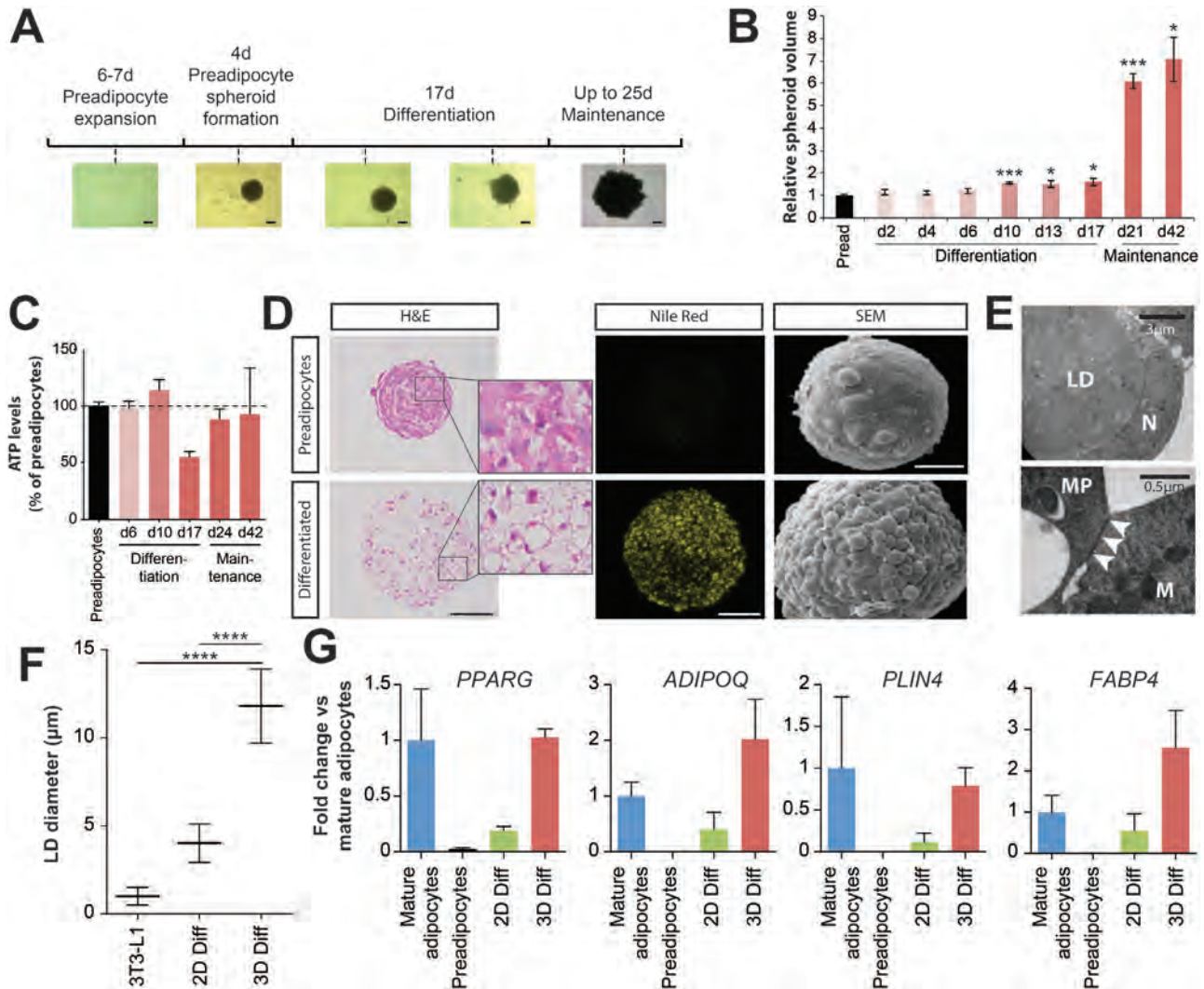
## 2.14. Statistical Analysis

Results are presented as mean  $\pm$  SEM unless stated otherwise. For determining statistical significance, unpaired two-tailed heteroscedastic *t*-tests were performed using GraphPad Prism (version 9.0.0) with  $n \geq 3$  samples per group unless indicated otherwise. All data are shown and no outlier removal was performed. For all data, significance was defined as  $p \leq 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Primary Human ASC-Derived Adipocytes Acquire Mature Adipocyte Characteristics in 3D Culture

Stromal vascular cells were isolated from human scWAT. Following an initial in vitro expansion of 1–2 cell divisions (6–7 days) in monolayer culture, preadipocytes were trypsinized and seeded onto ultra-low attachment surfaces in 96-well plates at 5000 cells per well, where they readily aggregated into spheroids with diameters of 150–200  $\mu$ m over the course of 4 days (Figure 1A). Following aggregation, cells were differentiated in chemically defined media for 17 days in 3D culture and maintained for up to 25 days



**Figure 1.** Adipocyte spheroids exhibit long-term viability and mature adipocyte characteristics. A) Schematic depiction of the spheroid aggregation process. Primary human preadipocytes from SVF are expanded for 6–7 days before the cells are seeded for spheroid formation (<4 days). Cells are differentiated in spheroid conformation for 17 days, after which they are phenotypically stable in maintenance medium without differentiation factors for a further 25 days. Representative brightfield images are shown. All scale bars = 100 µm. B) Spheroid volumes increase significantly starting at day 10 of differentiation.  $n = 6–14$  except for day 42 where  $n = 3$ . \* and \*\*\* indicates  $p < 0.05$  and  $p < 0.001$ , respectively, of a two-tailed  $t$ -test compared to preadipocyte spheroids. C) Adipocyte spheroids remain viable for at least 42 days of culture after the start of differentiation.  $n = 13–30$  except for day 42 where  $n = 3$ . D) Haematoxylin and eosin (H&E) staining of preadipocyte and adipocyte spheroids showed an increase in lipid droplets in adipocyte spheroids (left; scale bar = 100 µm). Lipid accumulation is furthermore shown using Nile Red staining (middle; scale bar = 100 µm). Scanning electron microscopy (SEM) visualizes spheroid hypertrophy and increased roughness with looser cellular packing in differentiated spheroids (right; scale bar = 50 µm). E) Transmission electron microscopy images showing the characteristic cellular morphology with a large droplet (LD) that pushes the nucleus (N) against the plasma membrane. Adipocytes form gap junctions (indicated by arrows) and display turnover of mitochondria, termed mitophagy (MP), in which an autolysosomal membrane is enclosing a mitochondrion (M). F) Adipocyte spheroids displayed lipid droplets with diameters that surpass conventional adipocyte culture systems.  $n = 50$  for 3T3-L1 cells,  $n = 38$  for 2D culture and  $n = 15$  for spheroids. \*\*\*\* $p < 0.0001$  two-tailed heteroscedastic  $t$ -tests. G) Transcriptional profiling of the key mature adipocyte markers PPARG, ADIPOQ, PLIN4, and FABP4 by qPCR.  $n = 2–4$  biological replicates per group. Note that expression levels in cells differentiated in 3D are substantially higher than in 2D cultures and closely resemble expression in mature adipocytes from the same individual. All data are shown as mean ± SEM.

in medium without differentiation factors thereafter (42 days in total after the start of differentiation). During differentiation, the adipocyte spheroids increased substantially in volume with significant changes ( $p < 0.05$  compared to preadipocyte spheroids) being apparent as early as day 10 of differentiation (Figure 1B). Interestingly, spheroids of some donors further substantially increased in size to diameters up to 800 µm upon change from

differentiation to the maintenance medium. While volumes increased, ATP levels as a proxy for the number of viable cells, remained overall stable during the entire culture period (Figure 1C), suggesting that cell hypertrophy rather than hyperplasia caused the increase in spheroid volume. Furthermore, sectioning of tens of spheroids did not show any evidence for the formation of necrotic cores.



Notably, after differentiation, spheroids consisted of loosely packed uni- or paucilocular cells, in which the lipid droplet filled almost the entire cell and squeezed the nucleus against the plasma membrane (Figure 1D,E). Furthermore, adipocytes in spheroid conformation exhibited mitophagy (Figure 1E), reminiscent of adipose tissue whitening *in vivo*.<sup>[34]</sup> Some but not all cells featured unilocular lipid droplets with diameters of  $11.8 \mu\text{m} \pm 2.1 \mu\text{m}$  SD, which was substantially larger than droplets in 2D monolayer culture ( $4 \mu\text{m} \pm 1.1 \mu\text{m}$  SD;  $p < 0.0001$ ) or in conventional cell culture models, such as 3T3-L1 cells ( $\varnothing = 1 \mu\text{m} \pm 0.5 \mu\text{m}$ ; Figure 1F). Droplets in spheroids were furthermore larger than in brown (average  $\varnothing = 3 \mu\text{m}$ ) or beige (average  $\varnothing = 6 \mu\text{m}$ ) adipocytes but remained smaller than in human WAT *in vivo* ( $\varnothing = 20\text{--}150 \mu\text{m}$ ; ref. [35]) or in silk-scaffolded adipose tissue explant cultures ( $\varnothing \approx 50 \mu\text{m}$ ; ref. [36]).

We then evaluated the expression of the white adipocyte marker genes PPARG, ADIPOQ, PLIN4, and FABP4 in conventional 2D monolayers and 3D spheroid culture and compared levels to those found in freshly isolated mature adipocytes from the same individuals (Figure 1G). Importantly, expression levels in 3D cultures for all four genes resembled levels found in mature isogenic adipocytes, whereas expression in conventional 2D monolayer cultures was substantially lower. Combined, these results suggest that 3D spheroid culture significantly improves differentiation and results in cells with molecular and cellular features of mature adipocytes.

### 3.2. Adipocyte Spheroids Closely Resemble Mature Adipocytes at the Transcriptomic Level

To investigate the impact of 3D culture on expression patterns in more detail, we comprehensively benchmarked human adipocyte spheroids using RNA-Seq and compared transcriptomic signatures with preadipocytes, conventional 2D monolayer cultures, and freshly isolated primary mature adipocytes. Overall, compared to preadipocytes, differentiation in 3D spheroids resulted in the up- and downregulation of 2760 genes and 3022 genes ( $p < 0.05$ ; fold-change  $> 2$ ; Figure 2A), respectively, indicating massive transcriptomic alterations during adipocyte differentiation, as was reported previously in 2D culture.<sup>[37]</sup> Among the most significantly upregulated genes in 3D culture were the mitochondrial NAD<sup>+</sup> transporter SLC25A51, the metalloprotease ADAMTS15, and the small GTPase SAR1B. Strikingly however, expression signatures differed drastically between cells differentiated in 2D monolayers compared to 3D cultures with a total of 4704 genes being identified as differentially expressed (Figure 2A). SRSF11, MAP1LC3B2, and EIF5AL1 were most significantly upregulated in spheroids, whereas CYBRD1, the mechanotransducer AKAP13 and DPYSL2, encoding a collapsin shown to reduce lipid contents by inhibiting PPAR $\gamma$  and CEBP,<sup>[38]</sup> were most upregulated in 2D culture.

To parse the data in more detail, we performed differential gene expression analyses followed by hierarchical clustering (Figure 2B). In preadipocytes we detected a total of 5817 enriched genes ( $\text{FDR} \leq 5\%$ ; cluster 1) irrespective of culture method, which were significantly associated with focal adhesions ( $\text{FDR} = 0.00002$ ), actin cytoskeleton ( $\text{FDR} = 0.00002$ ) and extracellular matrix (ECM) receptor interactions ( $\text{FDR} = 0.003$ ; Table 2). In

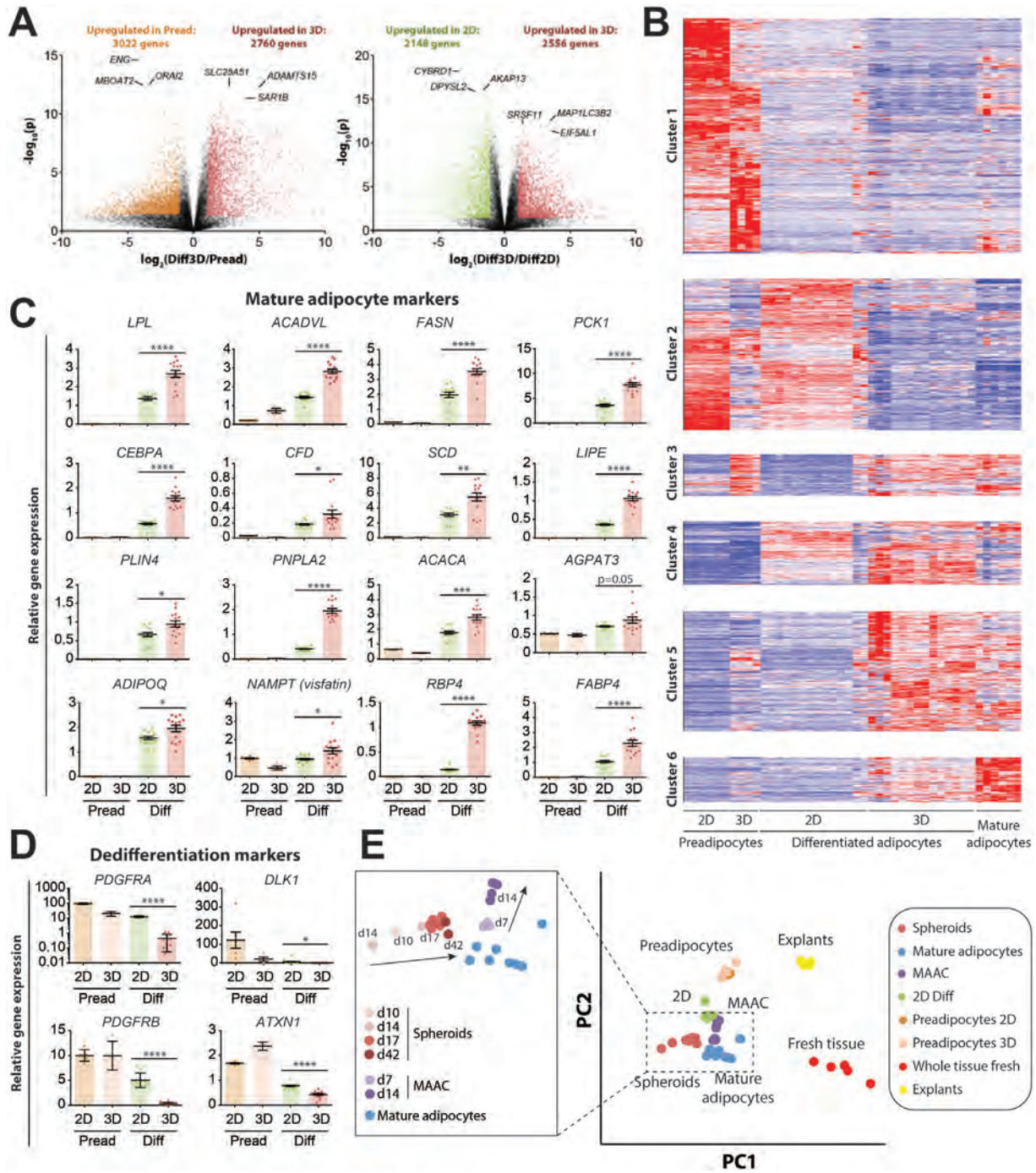
addition, we identified 3296 genes that were highly expressed in 2D culture of both preadipocytes and differentiated adipocytes but not in 3D spheroids or mature adipocytes (cluster 2) with this cluster being enriched in cell cycle-associated genes ( $\text{FDR} = 5 \times 10^{-8}$ ), proteolysis ( $\text{FDR} = 0.00001$ ) and TGF $\beta$  signaling ( $\text{FDR} = 0.011$ ). Interestingly, 688 genes were induced solely by culturing cells in 3D spheroids as compared to 2D monolayer cultures (cluster 3). These genes were significantly enriched in splicing ( $\text{FDR} = 2.5 \times 10^{-11}$ ) and RNA transport ( $\text{FDR} = 0.003$ ).

Upon differentiation, pathways involved in fatty acid metabolism ( $\text{FDR} = 0.00003$ ), as well as branched-chain amino acid degradation ( $\text{FDR} = 0.00003$ ) were significantly upregulated in both 2D and 3D culture (cluster 4). Furthermore, genes associated with TCA cycle ( $\text{FDR} = 1.7 \times 10^{-11}$ ) and fatty acid elongation ( $\text{FDR} = 0.004$ ) were upregulated in differentiated cells exclusively in 3D culture and mature adipocytes but not in 2D culture (cluster 5). A subset of genes associated with PPAR signaling was activated in both 2D and 3D culture (cluster 4;  $n = 11$ ;  $\text{FDR} = 0.019$ ), whereas others were found exclusively in 3D culture (cluster 5;  $n = 15$ ;  $\text{FDR} = 0.042$ ). In addition to bona fide markers, such as PPARG and ADIPOQ (compare Figure 1G), genes with significantly elevated expression in differentiated cells in 3D culture included lipases (lipoprotein lipase (LPL), PNPLA2, and LIPE), fatty acid synthase (FASN), various enzymes involved in fatty acid handling and metabolism (FABP4, ACACA, SCD, PCK1, ACADVL, and AGPAT3), adipokines (ADIPOQ, NAMPT, RBP4, and CFD), perilipins (PLIN4) and transcription factors required for terminal adipocyte differentiation (CEBPA; Figure 2C). Conversely, expression of preadipocyte markers, PDGFRA, PDGFRB, DLK1, and ATXN1 was significantly reduced in spheroids (Figure 2D). While markers of endothelial cells (CD31, CD105, and CD144; ref. [39]) and adipose tissue macrophages (CD45, CD11b, CD11c, ARG1, CD301, CD206; ref. [40]) were expressed during preadipocyte aggregation at levels similar to fresh tissue, expression was lost upon adipocyte differentiation in both 2D and 3D culture (Figure S1, Supporting Information).

Overall, 3D spheroids from preadipocyte derived adipocytes resembled mature adipocytes much more closely than conventional 2D cultures and were comparable in molecular phenotype to MAACs after 7 days in culture (Figure 2E). Importantly however, while MAAC expression patterns deteriorated thereafter, the expression signatures of spheroid cultures resembled mature adipocytes more and more closely with prolonged culture time (Figure 2D, inset). These results thus demonstrate that the presented 3D culture method substantially enhances terminal adipogenesis and improves the long-term maintenance of physiologically relevant adipocyte phenotypes compared to conventional paradigms.

### 3.3. The Cellular Microenvironment in Spheroids Closely Resembles Adipose Tissue *In Vivo*

We speculated that the molecular differences between 2D and 3D culture might, at least in part, be caused by differences in the cellular microenvironment, as the abnormal accumulation of ECM components and remodelers is associated with adipocyte dysfunction.<sup>[41,42]</sup> Levels of fibronectin (encoded by FN1), one of



**Figure 2.** Transcriptomic signatures show that adipocyte spheroids closely resemble mature in vivo adipocytes. A) Volcano plots depict the extent of transcriptomic remodeling during adipocyte differentiation. Differential gene expression is shown for 3D adipocyte spheroids versus preadipocytes (left panel) and 3D spheroids versus 2D adipocytes (right panel). Genes with  $p < 0.05$  and fold change  $> 2$  in the respective condition are colored. The top differentially expressed genes are indicated. Note that more than 4500 genes are differentially expressed between cells differentiated in 2D and 3D culture. B) Heatmap representation of hierarchically clustered differentially expressed genes ( $F$ -test;  $q < 0.05$ ) resulted in the formation of six distinct clusters. Compare Table 2 for corresponding pathway analyses. C) Note that expression of mature adipocyte markers was significantly increased in adipocyte spheroids (3D Diff) compared to cells differentiated in 2D (2D Diff), as well as to preadipocytes regardless of culture format. D) Expression of dedifferentiation markers was significantly reduced, corroborating increased maturation in 3D culture. Data are shown as mean  $\pm$  SEM;  $n = 4-14$ . \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$  using two-tailed heteroscedastic  $t$ -tests. E) Principal component analysis of gene expression profiles across different in vitro and ex vivo culture methods. To this end, we integrated our RNA-Seq data with available data by Harms et al.<sup>[12]</sup> Note that transcriptomic signatures of spheroids closely resemble mature human adipocytes. While membrane mature adipocyte aggregate cultures (MAAC) of mature adipocytes rapidly deteriorate, the molecular phenotypes of adipocyte spheroids resemble mature adipocytes more closely with increasing culture time for up to 42 days (insert).

**Table 2.** Differentially regulated pathways in preadipocytes, mature adipocytes, as well as 2D and 3D differentiated adipocytes. Only selected differentially regulated pathways are shown. Cluster designations refer to Figure 2B. FDR = false discovery rate.

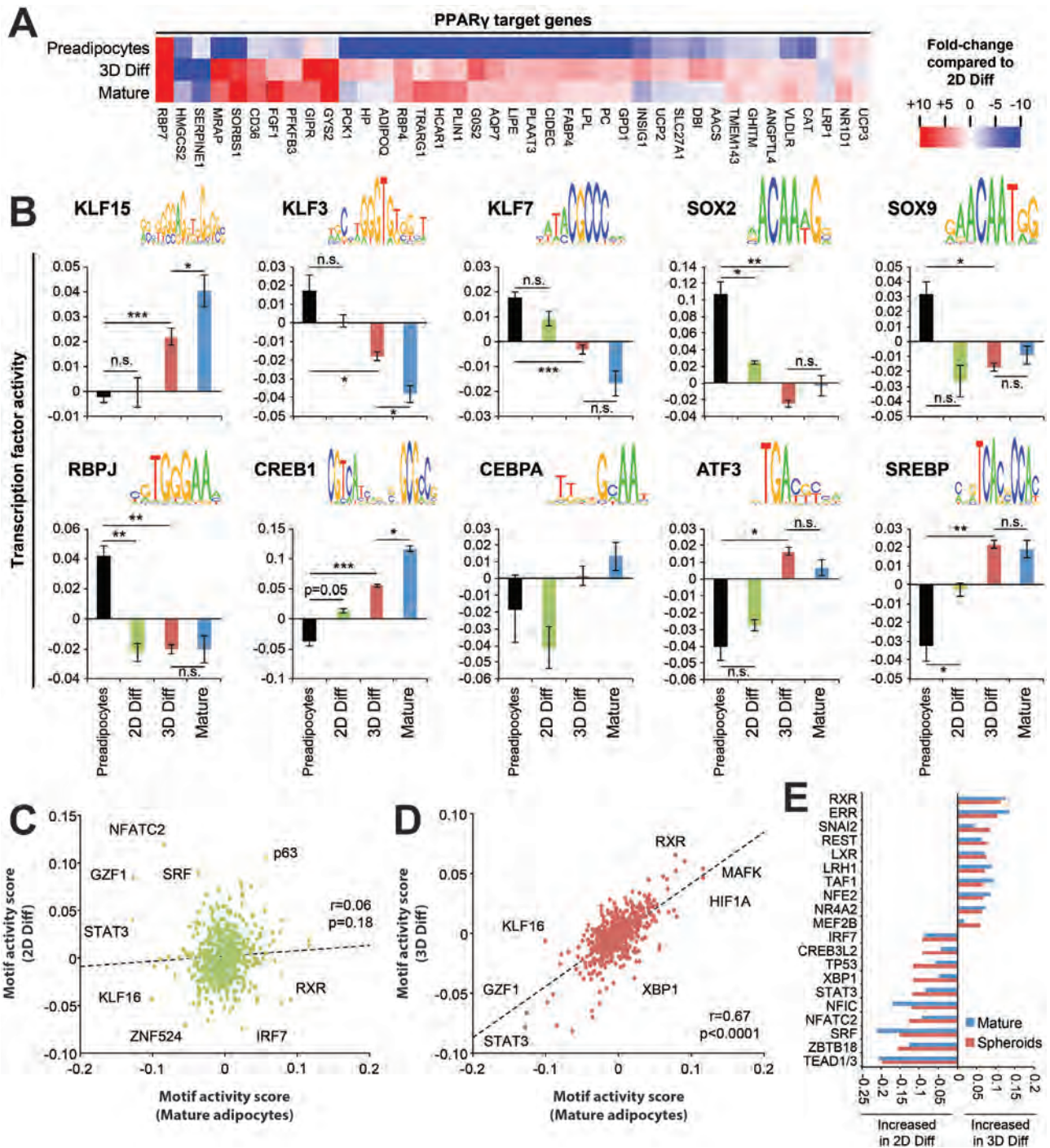
Cluster	Pathway	Number of genes	Enrichment ratio	<i>p</i> -value	FDR
<b>Cluster 1</b> (Specific for preadipocytes)	Glycosaminoglycan biosynthesis	10	2.8	0.001	0.016
	Hippo signaling	12	2.3	0.003	0.029
	ECM receptor interaction	29	2.0	0.0001	0.003
	NFκB signaling	32	1.9	0.0001	0.004
	Focal adhesion	66	1.9	$9.9 \times 10^{-8}$	0.000 02
	Regulation of actin cytoskeleton	70	1.8	$6.1 \times 10^{-8}$	0.000 02
	JAK/STAT signaling	44	1.5	0.002	0.023
	MAPK signaling	71	1.3	0.004	0.036
<b>Cluster 2</b> (Specific for preadipocytes and 2D cultures)	Cell cycle	44	2.7	$1.5 \times 10^{-10}$	$5 \times 10^{-8}$
	Hedgehog signaling	15	2.4	0.0007	0.019
	p53 signaling	22	2.3	0.000 09	0.003
	Ubiquitin mediated proteolysis	41	2.3	$1.7 \times 10^{-7}$	0.000 01
	TGFβ signaling	23	2.1	0.0004	0.011
<b>Cluster 3</b> (Specific for 3D cultures)	Spliceosome	22	7.5	$7.7 \times 10^{-14}$	$2.5 \times 10^{-11}$
	RNA transport	14	3.8	0.000 02	0.003
<b>Cluster 4</b> (Specific for differentiated cells)	2-oxocarboxylic acid metabolism	6	6.8	0.0002	0.004
	Fatty acid biosynthesis	4	6.2	0.003	0.038
	Propanoate metabolism	9	5.7	0.000 02	0.0008
	Branched-chain amino acid degradation	13	5.5	$3.3 \times 10^{-7}$	0.000 03
	Fatty acid metabolism	13	5.5	$3.3 \times 10^{-7}$	0.000 03
	PPAR signaling	11	3.0	0.0009	0.019
	Steroid biosynthesis	5	5.3	0.002	0.027
<b>Cluster 5</b> (Specific for differentiated spheroids)	TCA cycle	19	6.8	$4.2 \times 10^{-13}$	$1.7 \times 10^{-11}$
	Oxidative phosphorylation	61	4.9	$<1 \times 10^{-15}$	$<1 \times 10^{-15}$
	Pyruvate metabolism	16	4.4	$1.3 \times 10^{-7}$	0.000 004
	Fatty acid elongation	10	3.6	0.0002	0.004
	PPAR signaling	15	2.2	0.003	0.042
<b>Cluster 6</b> (Specific for mature adipocytes)	Lipolysis	9	5.2	0.000 04	0.014
	Mitophagy	8	3.9	0.0009	0.055
	FoxO signaling	13	3.1	0.0003	0.041

the most abundant structural components in the adipose ECM and a well-established inhibitor of adipocyte differentiation,<sup>[43]</sup> were strongly elevated in preadipocytes (288-fold increase;  $p = 0.008$  compared to mature adipocytes) and 2D cultures (33-fold increase;  $p = 3 \times 10^{-6}$  compared to mature adipocytes), whereas FN1 expression was not significantly different between 3D spheroids and mature adipocytes ( $p = 0.44$ ; Figure S2A, Supporting Information). The collagen microarchitecture modulates tissue stiffness, impacts adipose tissue gene expression and cause adipocyte dysfunction.<sup>[44]</sup> In 3D culture, we observed an overall decrease in collagens and a reorganization of its isoforms from collagen I, III, and VI toward collagen IV (Figure S2B, Supporting Information), which aligns well with previous longitudinal proteomic studies that identified these alterations to underlie lipid droplet accumulation and adipogenesis.<sup>[45]</sup> Similarly, expression of members of the laminin family was more similar between adipocyte spheroids and mature adipocytes compared to 2D cultures (Figure S2C, Supporting Information). In addition to these structural ECM components, 3D spheroids showed physiological expression patterns of matrix metallopro-

teases and metallopeptidase inhibitors of the TIMP family (Figure S2D,E, Supporting Information). Combined, these findings thus demonstrate that 3D spheroids, in contrast to conventional 2D cultures, reorganize their extracellular microenvironment to closely mimic the organotypic niche in adipose tissue in vivo.

### 3.4. Global Activity Analysis of Transcriptional Motifs Reveals the Regulatory Network Underlying Human Adipocyte Terminal Differentiation

To explore the drivers behind the observed transcriptomic differences, we analyzed transcription factor activity. Due to the essential role of PPARγ in adipogenesis, we first focused on the expression of all experimentally validated direct PPARγ target genes ( $n = 44$ ).<sup>[46]</sup> After exclusion of noncoding genes and genes not expressed in human adipocytes, 39 genes (89%) were analyzed. Notably, expression of 27 of these 39 genes was increased at least twofold in 3D spheroids compared to 2D culture (Figure 3A). Among the PPARγ target genes with the highest



**Figure 3.** Global activity analysis of transcriptional regulatory motifs demonstrates high concordance between mature human adipocytes and 3D spheroids. A) Heatmap representation of the expression of experimentally validated PPAR $\gamma$  target genes. Expression is shown as normalized to conventional 2D monolayer culture. B) Activity of candidate transcription factors with known importance in adipogenesis. Note that activity signatures in 3D spheroids (3D Diff) resemble mature adipocytes much more closely than 2D cultures (2D Diff) from the same donors. Sequence logos show the binding motif of the respective transcription factor. Data are shown as mean  $\pm$  SEM;  $n = 4$ –10 replicates per condition. \*, \*\*, and \*\*\* indicate  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , using two-tailed heteroscedastic  $t$ -tests, respectively. n.s. = not significant. Scatter plots showing the correlation between motif activities in mature human adipocytes compared to C) 2D adipocyte cultures or D) 3D adipocyte spheroids. E) The top 10 transcription factors with increased and decreased activities in 2D compared to 3D culture are shown. Activities in mature adipocytes (blue bars) are shown for reference.

upregulation were the adipogenic genes GIPR (47-fold),<sup>[47]</sup> RBP7 (31-fold),<sup>[48]</sup> GOS2 (sixfold),<sup>[49]</sup> and the fatty acid transporter CD36 (sixfold).<sup>[50]</sup> In contrast, only HMGCS2 (4- to 12-fold), one of the most highly enriched transcripts in human brown adipose tissue,<sup>[51]</sup> and SERPINE1 (six to 16-fold), an indicator of adipocyte stress<sup>[52]</sup> repressed by thiazolidinedione-mediated PPAR $\gamma$  activation in vivo,<sup>[53]</sup> were strongly upregulated in 2D culture compared to both mature adipocytes and 3D cultures. These data suggest that both activation and repression of PPAR $\gamma$  targets are amplified in 3D culture.

We then inferred the control of transcriptionally relevant promoter motifs to analyze the activities of other transcription factors with well-characterized roles in preadipocyte differentiation (Figure 3B). Adipogenesis is controlled by a complex network of transcription factors. Members of the family of Kruppel-like factors (KLF) have indispensable roles in preadipocyte maintenance and differentiation.<sup>[54]</sup> During differentiation in spheroid culture, the activity of the proadipogenic factor KLF15 was markedly increased, whereas the activity of the antiadipogenic factors KLF3 and KLF7 decreased. Notably, these effects were substantially more pronounced in 3D culture compared to differentiation in conventional 2D monolayers. Similarly, SOX2 and SOX9, which are required for the maintenance of proliferative, PDGFR $\alpha$ -positive adipose precursors,<sup>[55,56]</sup> and the Notch signaling effector RBPJ $\kappa$ , a key factor in adipocyte dedifferentiation,<sup>[57]</sup> were strongly reduced in both 2D and 3D differentiated cells compared to preadipocytes. Pref-1 (encoded by DLK1; compare Figure 2C) and its direct interaction with fibronectin activates SOX9, jointly acting as a central gatekeeper for adipocyte differentiation,<sup>[56,58]</sup> thus molecularly linking the low-fibronectin microenvironment in 3D culture to improved adipogenesis. Activities of the important key proadipogenic transcription factors CEBP $\alpha$ , CREB, and its target the transcriptional repressor ATF3<sup>[59]</sup> were strongly increased in 3D culture and mature adipocytes, whereas their activation was much less pronounced in 2D culture. Furthermore, we found that the increase of SREBP activity upon differentiation was considerably higher in 3D than in 2D culture.

Next, we performed a comparative global analysis of the activities of 503 transcription factors during differentiation in 2D and 3D culture (Figure 3C,D). Overall, transcription factor activities correlated very poorly between mature adipocytes and preadipocytes differentiated in 2D culture ( $r = 0.06$ ;  $p = 0.18$ ). In contrast, using preadipocytes from the same donors and the identical differentiation protocol, our 3D spheroid model substantially improved the alignment of the regulatory circuitry ( $r = 0.67$ ;  $p < 0.0001$ ). We subsequently investigated which transcription factors might best explain these differences between culture paradigms. The most downregulated transcription factor activities in 2D culture were RXR ( $\Delta$ activity =  $-0.11$ ) and its heterodimerization partner LXR ( $\Delta$ activity =  $-0.07$ ; Figure 3E), which constitutes a critical promoter of adipogenesis by inducing PPAR $\gamma$ .<sup>[60]</sup> Conversely, 2D cultures lack repression of the activity of transcription factors of the TEAD family ( $\Delta$ activity =  $+0.2$ ), which are mediators of Hippo signaling that inhibit adipogenesis by direct binding to the promoters of PPAR $\gamma$ .<sup>[61]</sup> Similarly, 2D cultures featured increased activity of ZBTB18, a repressor of SREBP,<sup>[62]</sup> leading to lower levels of lipid and sterol species compared to spheroids due to attenuated de novo lipogenesis. Combined, these results argue for the presence of a pos-

itive feedback loop in which the organotypic microenvironment of the spheroids alleviates inhibition of SREBP, resulting in increased intracellular lipid and sterol levels, which in turn activate LXR signaling, jointly reinforcing PPAR $\gamma$  and CEBP expression and differentiation.

### 3.5. Adipocyte Spheroids Display Relevant Functionality and Are Amenable to AAV Transduction

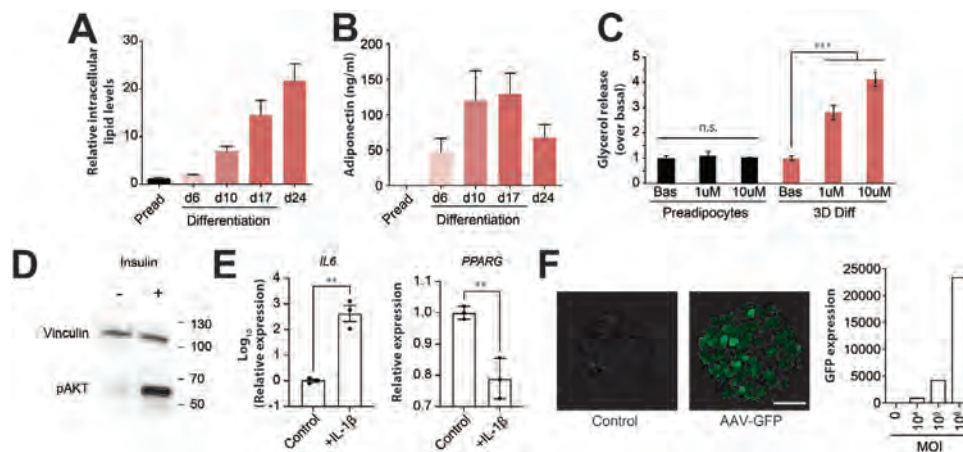
The functionality of adipocyte spheroids was evaluated using a battery of functional endpoints. Spheroids stored intracellular lipids, and lipid accumulation further increased even after withdrawal of the differentiation cocktail (Figure 4A). Similarly, spheroids produced physiologically relevant levels of the adipokine adiponectin (Figure 4B). Lipolysis constitutes a key function of WAT in which triacylglycerols (TAGs) are hydrolyzed into fatty acids and glycerol. Isoprenaline dose-dependently stimulated lipolysis-mediated glycerol release in 3D spheroid culture but not in preadipocytes (Figure 4C). Furthermore, spheroids remained sensitive to insulin stimulation as evidenced by phosphorylation of the downstream signaling protein AKT (Figure 4D). Notably, adipocyte spheroids strongly responded to the inflammatory factor IL-1 $\beta$  by increased expression of IL-6 (652-fold;  $p = 0.001$ ) and downregulation of PPARG (0.78-fold;  $p = 0.006$ ; Figure 4E), as was reported in vivo.<sup>[63,64]</sup>

Additionally, we investigated whether adipocyte spheroids may be amenable to AAV transductions to provide a tool kit for gene expression manipulations that would allow for future functional studies. To this end, cells were infected with several different AAV serotypes among which type 6 (AAV6)-GFP displayed the strongest GFP signal. GFP expression increased dose-dependently with increasing MOI and GFP signal was detected using fluorescence microscopy, demonstrating that adipocyte spheroids are amenable to viral transductions (Figure 4F).

### 3.6. Adipocyte Spheroids Respond to Nutritional Perturbations

To evaluate whether spheroids might provide a suitable model for the study of nutritional perturbations in vitro, we studied their response to FFA supplementation. FFAs did not affect spheroid viability but significantly increased the extent of intracellular lipid accumulation and the size of unilocular lipid droplets (Figure 5A–C). Furthermore, FFA loading slightly increased LPL and perilipin (PLIN1) expression, whereas levels of adiponectin and expression of other genes with importance for mature adipocyte function were, if at all, only marginally increased (Figure 5D,E). Interestingly, FFA-treated adipocytes consumed substantially less glucose compared to control spheroids (Figure 5F), suggesting a further whitening of the adipocyte phenotypes.<sup>[65]</sup>

To study the effect of FFAs in more detail, we performed lipidomic analyses of FFA-treated spheroids and controls. As expected, TAGs were by far the most prevalent lipid class followed by FFAs, phosphatidylcholines (PCs), phosphatidylethanolamines, and diacylglycerols (DAGs) with overall lipid signatures closely resembling their relative abundance in mature adipocytes (Spearman  $\rho = 0.956$ ; Figure 5G). FFA supplementation further increased levels of TAGs, consistent with



**Figure 4.** Adipocyte spheroids are functional and amenable to adeno-associated virus-mediated gene expression manipulation. A) Intracellular lipids levels continuously increase during differentiation and maintenance.  $n = 12\text{--}40$ . B) Spheroids secrete relevant amounts of adiponectin starting from day 6 of differentiation.  $n = 3$ . C) Isoprenaline-induced lipolysis resulted in dose-dependent increase of glycerol release by adipocyte spheroids but not in preadipocyte spheroids.  $n = 3$ . D) Western blot images for the insulin signal transducer pAKT shows that adipocyte spheroids remain sensitive to insulin stimulation. E) Stimulation with the inflammatory cytokine IL-1 $\beta$  induced expression of IL6 and downregulated PPARG, demonstrating that phenotypic deterioration during adipose tissue inflammation can be recapitulated ex vivo.  $n = 3$ . F) Cells can be transduced with adeno-associated virus (AAV) carrying a GFP expression construct during spheroid formation and GFP fluorescence was detected at day 17 of differentiation. GFP expression was multiplicity of infection (MOI)-dependent, allowing for quantitative tuning of transgenic expression. All data are shown as mean  $\pm$  SEM. \*\* and \*\*\* indicates  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , using two-tailed heteroscedastic  $t$ -tests. n.s. = not significant, respectively.

the increasing size of lipid droplets, and slightly improved correlations with mature adipocyte lipidomic signatures (Spearman  $\rho = 0.972$ ; Figure 5H,I). In contrast, FFA supplementation reduced levels of intracellular FFAs and PCs.

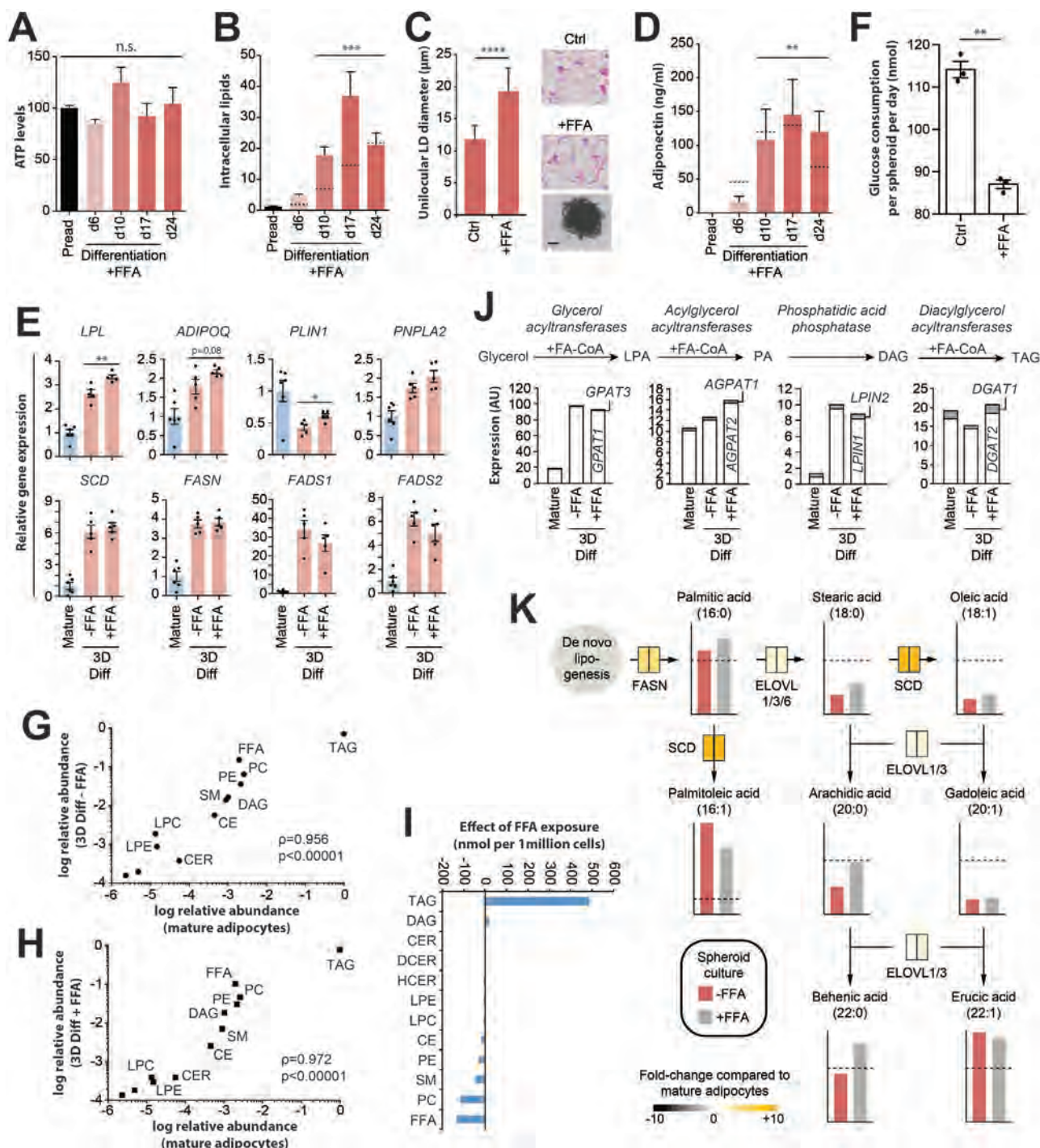
Next, we evaluated whether spheroids could provide tools to study lipid fluxes. To this end, we analyzed fatty acid abundance and associated specific fluxes with expression levels of the respective enzymes. Expression of glycerol acyltransferases and phosphatidic acid phosphatase was increased in 3D culture compared to mature adipocytes, whereas expression of mono- and DAG acyltransferases remained unaffected by ex vivo culture (Figure 5J). We compared the intracellular fatty acid profiles in spheroids with and without FFA supplementation to the corresponding patterns in mature adipocytes from the same donors (Figure 5K). Notably, while palmitic acid concentrations were similar, palmitoleic acid (16:1) levels were increased in adipocyte spheroids compared to mature adipocytes, likely at least in part due to overexpression of the responsible enzyme, SCD. Palmitoleate constitutes an FFA of considerable interest because it is secreted and impacts metabolism and insulin resistance in distant tissues.<sup>[66]</sup> Due to high SCD expression, levels of stearic acid (18:0) were lower in spheroids, which mirrors the result from clinical studies showing that levels of stearic acid in WAT correlate inversely with increased fat mass and adipocyte hypertrophy.<sup>[67]</sup> Notably, overall FFA compositions were retained and also substantially less abundant species, such as arachidic acid (20:0), behenic acid (22:0), gadoleic acid (20:1), and erucic acid (22:1) remained detectable in culture at physiological levels. We thus conclude that 3D adipocyte spheroids from human SVF constitute a physiologically relevant organotypic model system that accurately recapitulates the molecular phenotypes of human WAT at the transcriptomic, lipidomic, and functional level.

### 3.7. The Established 3D Spheroid Culture Paradigm Also Improves the Phenotypes of Immortalized Human Adipocyte Models

To test the potential of 3D cultures for improving the adipose phenotype of other cell sources, we used TERT-hWA, a recently described polyclonal cell model of immortalized human white adipose progenitors.<sup>[11]</sup> Notably, using the spheroid culture method presented above, these cells rapidly aggregated and altered their morphology and lipid droplet characteristics compared to 2D culture (Figure S3A, Supporting Information). Additionally, 3D spheroid cultures from TERT-hWA displayed an increased concentration-dependent glycerol release in response to isoprenaline, whereas adiponectin secretion was not significantly affected (Figure S3B,C, Supporting Information). Combined, these results suggest that spheroid culture can also contribute to limited but significant improvements in the functionality of immortalized adipocyte cell lines.

### 3.8. Murine Adipocyte Spheroids Allow for Mechanistic Studies Using Genetic Knock-Out Models

As transgenic mice are widely used to investigate the role of proteins in adipocyte biology, we utilized the established spheroid model to differentiate mouse white preadipocytes. Notably, in contrast to human adipocyte models, murine stromal vascular cells are known to require serum for differentiation in 2D culture<sup>[68]</sup> and we observed similar serum-dependency in 3D spheroids. When differentiated in 3D, preadipocytes from inguinal subcutaneous adipose tissue displayed high lipid loading associated with unilocular and paucilocular lipid droplet



**Figure 5.** Adipocyte spheroids as a physiologically relevant model to study nutritional perturbations. A) Supplementation of culture medium with free fatty acids (FFAs) did not affect cell viability.  $n = 15\text{--}24$ . B) FFA treatment facilitates lipid loading and adipocyte hypertrophy.  $n = 13\text{--}40$  spheroids per time point.  $p$ -values refer to the comparison of lipid levels for each time point to preadipocytes. Dashed lines indicate intracellular lipid levels in spheroids without FFA supplementation. C) FFA supplementation results in the formation of larger lipid droplets (LD).  $n = 7\text{--}11$ . Scale bar = 100  $\mu\text{m}$ . D) Adiponectin secretion remains unaffected by FFA supplementation.  $n = 3$ . Dashed lines indicate adiponectin secretion from spheroids without FFA supplementation.  $p$ -values refer to the comparison of adiponectin levels for each time point to preadipocytes. E) FFA loading significantly increases expression of LPL and PLIN1, whereas other adipocyte markers (ADIPOQ and PNPLA2) and genes involved in fatty acid handling (SCD, FASN, FADS1, and FADS2) were not affected.  $n = 5\text{--}6$ .  $p$ -values refer to the comparison of gene expression levels between spheroids with and without FFA supplementation. F) Glucose consumption decreased upon FFA supplementation, potentially due to insulin resistance caused by lipid overloading.<sup>[97]</sup>  $n = 3$ . G) Lipidomic analyses revealed that the overall lipid class composition of adipocyte spheroids closely mimics the corresponding signature of isogenic mature adipocytes in vivo (Spearman  $\rho = 0.956$ ). H) Correlations are further improved by FFA supplementation (Spearman  $\rho = 0.972$ ). I) Specifically, FFA exposure increased

formation (Figure 6A). In contrast, cells from the same animals differentiated in 2D culture remained multilocular. Consistent with these observations, gene expression profiling of adipogenic markers showed significantly higher expression in spheroids compared to 2D cultures (Figure 6B). Differences were most pronounced for leptin where 3D culture resulted in 99-fold higher expression in spheroid culture ( $p < 0.001$ ). The higher expression of leptin is in line with the increased fat cell size in 3D culture.

Next, we evaluated whether the spheroid model allowed for studies into differences in expression signatures between WAT depots. While subcutaneous inguinal preadipocytes differentiated well in 2D culture with multilocular lipid droplets being evident in  $\approx 70\%$  of cells, 2D differentiation of perigonadal preadipocytes was poor and only  $< 5\%$  of all cells featured small droplets after 20 days of culture (Figure S4, Supporting Information). In contrast, preadipocytes from both depots differentiated well in 3D culture and most cells featured uni- or paucilocular droplets after the same period of differentiation. While the expression of most markers was similar between perigonadal and scWAT, significantly reduced expression in the former was observed for Plin4 (0.5-fold;  $p = 1.3 \times 10^{-5}$ ) and Lep (0.27-fold;  $p = 5.2 \times 10^{-9}$ ), whereas Elovl6 was significantly increased (2.1-fold;  $p = 0.01$ ; Figure 6C), suggesting that fat depot-specific patterns are recapitulated in 3D culture.

Last, we evaluated whether the model could be used for mechanistic studies into adipocyte biology by making use of the extensive repertoire of genetic tools. Specifically, we generated 3D cultures of adipocytes from inguinal adipose tissue of mice homozygous for a null mutation in Lipe, which encodes the lipolytic enzyme hormone-sensitive lipase (Hsl). We first validated the lack of Lipe expression and absence of Hsl protein in spheroids from Lipe-KO mice (Figure 6D,E). Next, we evaluated adipocyte lipolytic activity in response to the adenylate cyclase activator forskolin. In 3D adipocyte cultures of WT mice, we observed significant increases in the release of glycerol ( $p = 0.004$ ) and non-esterified fatty acids (NEFA;  $p = 0.004$ ) upon induction (Figure 6F). However, these responses were blunted by 49% and 37%, respectively in adipose spheroids from Hsl deficient mice. These results align well with previous reports suggesting reduced but not absent lipolytic activities of Lipe-KO mice.<sup>[69]</sup> We conclude that the established spheroid model provides a versatile, physiologically relevant culture paradigm across cell sources, species, and fat depots that facilitates comparative long-term studies of adipocyte function and biology.

#### 4. Discussion

Physiologically relevant models of WAT are essential for studies of lipogenesis, fat tissue biology, as well as for discovery and

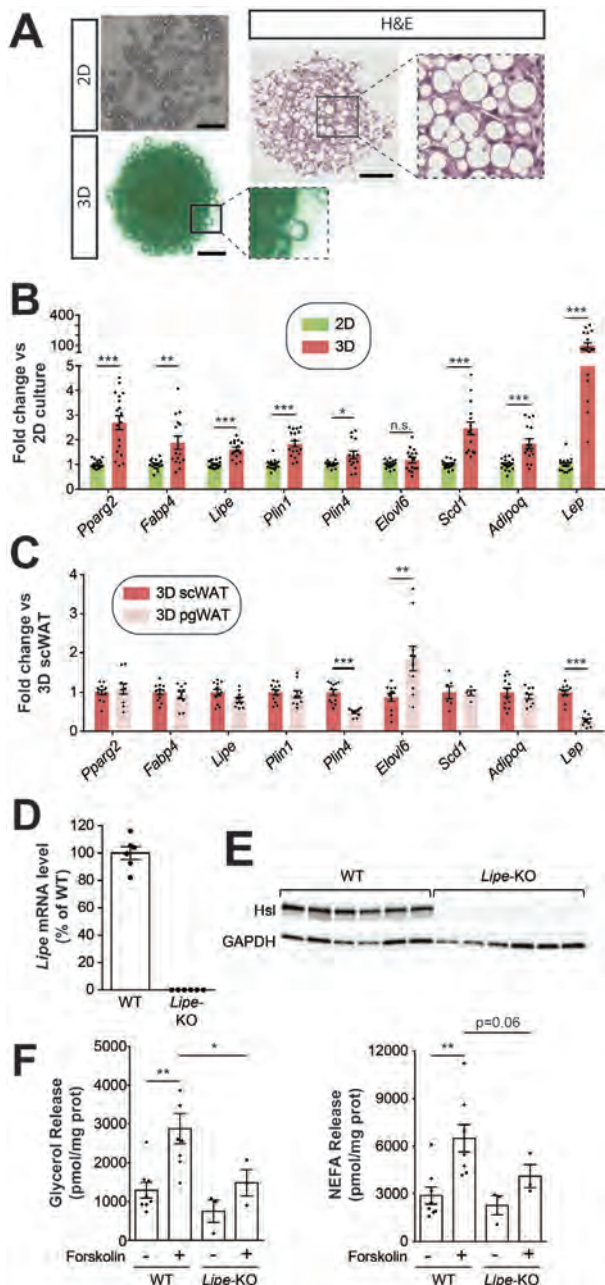
development of candidate drugs that target white adipocytes. Previous studies indicated that 3D culture facilitated the formation of unilocular lipid droplets, improved cellular phenotypes compared to conventional monolayer culture, and allowed the long-term maintenance of SVF-derived adipocytes for many weeks.<sup>[70–73]</sup> Furthermore, 3D adipose models have facilitated the study of adipose tissue being<sup>[74,75]</sup> and effects of interstitial flow.<sup>[76]</sup> Importantly however, multiple limitations remain, including immature molecular and cellular phenotypes, the need for freshly prepared tissue samples, dependency on serum-containing media that complicates result interpretation, need for the addition of various scaffolds, as well as the lack of scalability. Here, we developed a scaffold-free spheroid culture platform in chemically defined conditions for differentiation and maintenance of adipocytes derived from a multitude of different human and murine cell sources. Spheroids showed improved phenotypes compared to conventional 2D and 3D culture paradigms and allow for the facile parallel culture of hundreds of microtissues from a single donor. Furthermore, we established conditions for AAV-mediated gene expression manipulations, providing a tool kit for future functional tests, for instance by introduction of reporter constructs or gene knock-downs, in primary human cells. Notably, the maintenance media composition of adipocyte spheroids established here is identical to culture conditions for other primary human tissue models, such as 3D liver cultures,<sup>[77–79]</sup> thus opening possibilities for the design of future tissue co-culture systems to study metabolic disease.

Using primary human adipocyte progenitors from the SVF, we demonstrate with a multitude of orthogonal imaging and molecular biology techniques that adipocytes in spheroids obtain molecular phenotypes closely resembling mature adipocytes from the same donor. Furthermore, lack of induction of SLC2A1, VEGFA, ANGPTL4, and SERPINE1, known markers of hypoxia in human adipocytes,<sup>[80]</sup> suggests normoxic culture conditions, which aligns well with the absence of necrotic core formation as evident from sections. Spheroids could be generated from both fresh and cryopreserved cells, thus allowing to replicate experiments using material from the same donor, and reducing reliability on fresh tissue supply, which is particularly important in times of altered clinical routines and reduced numbers of elective surgeries, as seen for example during the COVID-19 pandemic. Notably, we did not observe differences in spheroid morphology, viability, or intracellular lipid levels between fresh or cryopreserved adipocytes ( $p > 0.2$  for all time points and conditions;  $n = 3$  donors per group), suggesting that effects of cryopreservation are, if at all, minor.

Adipocyte sizes in spheroids (20  $\mu\text{m}$ ) remain smaller than those of average white adipocytes in vivo. Notably however, in a sex-, age- and BMI-matched cohort, the fraction of small

triacylglycerol (TAG) and diacylglycerol (DAG) levels but decreased intracellular levels of FFA and phosphatidylcholines (PC). J) The molecular machinery involved in TAG synthesis is upregulated compared to mature adipocytes in vivo, facilitating lipid loading, whereas effects of FFA supplementation are overall small. K) Schematic FFA flux analysis in control and FFA treated adipocyte spheroids. Abundances of FFA species are shown as column plots relative to mature adipocytes (dashed lines). Red and grey columns indicate levels of the respective FFA in spheroids without and with FFA supplementation, respectively. Expression of key enzymes is shown in boxes shaded from grey (expression level lower than in mature adipocytes) to yellow (higher). The left and right sections of each box correspond to expression in control and FFA-supplemented spheroids. All data are shown as mean  $\pm$  SEM. \*, \*\*, \*\*\* and \*\*\*\* indicate  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$  and  $p < 0.0001$ , using two-tailed heteroscedastic *t*-tests, respectively. n.s. = not significant. PE = phosphatidylethanolamines; SM = sphingomyelins; CER = ceramides; LPC = lysophosphatidylcholines; LPE = lysophosphatidylethanolamines; DCER = dihydroceramides; HCER = hexosylceramides; LCER = lactosylceramides; CE = cholesterol esters.





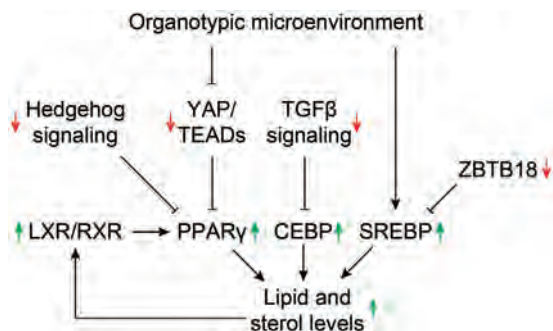
**Figure 6.** The established spheroid platform improves differentiation of mouse preadipocytes from different depots. A) Brightfield live cell and H&E images of mouse adipocytes differentiated for 20 days in 2D or in 3D spheroid culture. Note the formation of large unilocular cells in 3D culture whereas cells in monolayers remain multilocular. B) Relative RNA expression level of adipocyte markers is shown in conventional 2D and 3D spheroid culture. C) Differences in gene expression are shown between murine adipocyte spheroids differentiated for 20 days from preadipocytes isolated from inguinal subcutaneous (sc) or perigonadal (pg) fat. D) Lipe mRNA and E) hormone-sensitive lipase (Hsl; encoded by Lipe) protein are not detectable in adipocytes from Lipe-KO mice. F) Forskolin significantly induced the release of glycerol (left panel) and non-esterified fatty acids (NEFA; right panel) by adipocyte spheroids from wild type (WT) mice. Notably, lipolysis was significantly reduced in spheroids generated from Lipe-KO mice. All data are shown as mean  $\pm$  SEM. \*, \*\* and \*\*\* indicate  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$  using two-tailed heteroscedastic *t*-tests, respectively.

adipocytes with diameter of 20–40  $\mu\text{m}$  was found to correlate with insulin resistance.<sup>[81,82]</sup> While we show that insulin response is maintained in adipocyte spheroids, the high levels of insulin during adipocyte differentiation might reduce insulin sensitivity compared to cells in vivo, which might entail reduced cell sizes. It will also be interesting to determine in future work whether severe obesity and metabolic disease may impact adipocyte hypertrophy and spheroid functionality. Furthermore, intracellular triglycerides in spheroids are generated mainly by de novo lipogenesis with additional contributions from oleic and palmitic acid uptake upon media supplementation with FFAs. While these constitute the two most abundant fatty acids in human plasma,<sup>[83]</sup> other fatty acids, such as linoleic acid and stearic acid, can also reach considerable quantities. Additionally, as cholesterol constitutes a major determinant of adipocyte size, exposure to low density lipoprotein (LDL) could further increase lipid droplet size, stimulate hypertrophy and increase the fraction of unilocular cells in spheroids.<sup>[84]</sup>

Spheroid culture resulted in the increased expression of genes involved in spliceosome and RNA transport, which act as enablers for the massive recalibration of transcriptomic signatures compared to conventional 2D culture. These findings align with previous studies that found these pathways to also be significantly upregulated in other organotypic human 3D culture models compared to their 2D equivalents.<sup>[85]</sup> NAD<sup>+</sup> constitutes a central cellular energy sensor and reduced NAD<sup>+</sup> levels in WAT result in inactivation of PPAR $\gamma$ , reduced adiponectin production, and impaired adipocyte hypertrophy.<sup>[86,87]</sup> Notably, the recently identified NAD<sup>+</sup> transporter SLC25A51<sup>[88]</sup> was among the most strongly upregulated genes in 3D culture, suggesting the establishment of an energetically permissive environment to support adipocyte function. Furthermore, spheroid culture reduced TGF $\beta$  activity, thereby relieving PPAR $\gamma$  repression<sup>[89]</sup> and inducing CEBP $\beta$  transactivation,<sup>[90]</sup> which allows PPAR $\gamma$  and CEBP $\beta$  to jointly orchestrate the expression of its key adipogenic targets, such as SREBP and various KLFs.<sup>[91,92]</sup>

Mechanistically, integrative analyses of transcription factor activity profiles and functional data suggest a model in which the organotypic microenvironment of the spheroid enables activity of SREBP, whose biological function is inhibited by increases of extracellular stiffness,<sup>[93]</sup> and fine-tunes mechanosensitive TEAD signaling.<sup>[94]</sup> Combined with reduced activity of Hedgehog and TGF $\beta$  signaling, these factors generate a gene regulatory environment permissive for the activation of the key adipogenic factors PPAR $\gamma$  and CEBP $\beta$ , as well as the downstream induction of genes involved in lipid handling. Furthermore, inhibition of ZBTB18, a key repressor of SREBP-mediated transcriptional activation,<sup>[62]</sup> results in augmented de novo lipogenesis. Intracellular sterol levels, which are considerably higher in 3D adipocytes, in turn activate LXR, and reinforce expression of its targets, including PPAR $\gamma$ , thus providing a positive feedback loop for adipocytic maturation (Figure 7). Combined, our data provide comprehensive molecular evidence for a link between the organotypic microenvironment in 3D culture and terminal adipocyte differentiation during adipogenesis in primary human cells.

We demonstrate that the presented 3D culture paradigm provides a versatile platform to improve the molecular and cellular phenotypes of a variety of adipocyte cell models from diverse origins. However, while cellular phenotypes are highly stable



**Figure 7.** Schematic depiction of the key molecular mediators that link the 3D spheroid microenvironment to phenotypic improvements. Green and red arrows indicate activity of the respective factor or signaling pathway in 3D spheroids compared to 2D culture.

in long-term culture, the generation of terminally differentiated spheroids takes longer than differentiation using conventional 2D culture protocols ( $\approx 30$  days in 3D culture including spheroid formation compared to 2 weeks in 2D). We demonstrate functional improvements in adipocyte spheroids differentiated from immortalized preadipocytes compared to conventional 2D culture. Similarly, the setup is compatible with the long-term culture of murine adipocytes from different fat depots and allows the recapitulation of depot-specific expression differences in an accessible ex vivo system. This is particularly relevant for the translation of murine studies, which enable the studies of various fat pads.<sup>[95,96]</sup> Additionally, the established spheroid culture provides a platform that combines the accessibility and scalability of an ex vivo model with the extensive genetic tool kit available for mouse research, thus opening new possibilities for functional and translational studies on adipose tissue biology.

In conclusion, we present a versatile scaffold-free 3D adipocyte culture platform in chemically defined conditions. Using this system, we demonstrate that adipocyte spheroids closely resemble mature adipocytes in vivo and remain phenotypically stable for at least 6 weeks in culture. Using time-series multidimensional omics profiling, we reveal a complex signaling network, involving YAP, Hedgehog, and TGF $\beta$  signaling, that links the organotypic microenvironment in 3D culture to improved differentiation during human adipogenesis.

## Supporting Information

Supporting Information is available from the Wiley Online Library or from the author.

## Acknowledgements

The work was supported by the European Research Council (ERC) Synergy Grant SPHERES (agreement No. 856404) under the European Union's Horizon 2020 research and innovation program (erc-spheres.univ-tlse3.fr), the Swedish Research Council [grant agreement numbers: 2016-01153, 2016-01154, 2018-02488 and 2019-01837], the EU/EFPIA/OICR/McGill/KTH/Diamond Innovative Medicines Initiative 2 Joint Undertaking (EUBOPEN grant number 875510) and by the Strategic Research Programmes in Diabetes (SFO Diabetes) and Stem Cells and Regenerative Medicine (SFO StratRegen). Furthermore, the authors were supported by grants from the Margareta af Uggle's Founda-

tion, the Novo Nordisk Foundation (including the Tripartite Immunometabolism Consortium Grant NNF15CC0018486, the MeRIAD consortium grant number 0064142, the MSAM Consortium NNF15SA0018346 and NNF20OC0061149), Knut and Alice Wallenberg Foundation, CIMED, the Swedish Diabetes Foundation, the Stockholm County Council, Fondation pour la Recherche Médicale (DEQ20170336720), Agence Nationale de la Recherche ANR-17-CE14-0015Hepadiologie and AstraZeneca France. The authors gratefully acknowledge support from the Bioinformatics and Expression Analysis Core Facility and the VirusTech Core Facility at Karolinska Institutet for integrating RNA-Seq datasets from different sources and provision of AAV-GFP serotypes, respectively. SVF spheroid and TERT-hWA imaging were performed at the Biomedicum Imaging Core (BIC) facility and the LCI facility/Nikon Center of Excellence, Karolinska Institutet. The authors also acknowledge the assistance of Dr. Sonia Youhanna with spheroid culture.

## Conflict of Interest

V.M.L. is co-founder, CEO, and shareholder of HepaPredict AB. In addition, V.M.L. discloses consultancy work for Enginzyme AB. The other authors declare no conflict of interest.

## Author Contributions

J.X.S. developed the 3D spheroid model from human SVF and analyzed the data. M.C. and T.d.C.B. conducted experiments with TERT-hWA cells and performed lipolysis and AAV transduction assays. J.D. established the mouse adipocyte 3D spheroid model. M.H.U. and M.H. performed electron microscopy. A.M.K. performed glucose consumption quantifications. J.B.H. provided the TERT-hWA cells. N.M., D.L., and M.R. supervised the research. V.M.L. designed and supervised the research, and analyzed the data. J.X.S. and V.M.L. wrote the manuscript. All authors revised and approved the final version of the manuscript.

## Data Availability Statement

Data is shared by the corresponding author upon reasonable request.

## Keywords

adipose stem cells, fat cells, lipidomics, organotypic cell culture, preadipocytes, stromal vascular fraction, transcriptomics

Received: January 11, 2021

Revised: April 6, 2021

Published online:

- [1] L. Scheja, J. Heeren, *Nat. Rev. Endocrinol.* **2019**, *15*, 507
- [2] J.-B. Funcke, P. E. Scherer, *J. Lipid Res.* **2019**, *60*, 1648
- [3] G. R. Hajer, T. W. van Haeften, F. L. J. Visseren, *Eur. Heart J.* **2008**, *29*, 2959.
- [4] V. Azzu, M. Vacca, S. Virtue, M. Allison, A. Vidal-Puig, *Gastroenterology* **2020**, *158*, 1899.
- [5] V. Zilberfarb, F. Piétri-Rouxel, R. Jockers, S. Krief, C. Delouis, T. Issad, A. D. Strosberg, *J. Cell Sci.* **1997**, *110*, 801.
- [6] C. Darimont, I. Zbinden, O. Avanti, P. Leone-Vautravets, V. Giusti, P. Burckhardt, A. M. A. Pfeifer, K. Macé, *Cell Death Differ.* **2003**, *10*, 1025.
- [7] J. Dufau, J. X. Shen, M. Couchet, T. Castro de Barbosa, N. Mejhert, L. Massier, B. Antonny, E. Griseti, E. Mouisel, E. Amri, V. M. Lauschke, M. Ryden, D. Langin, *Am. J. Physiol.: Cell Physiol.* **2021**, DOI: 10.1152/ajpcell.00519.2020.

- [8] A. Balwierz, U. Czech, A. Polus, R. K. Filipkowski, B. Mioduszewska, T. Proszynski, P. Kolodziejczyk, J. Skrzeczynska-Moncznik, W. Dudek, L. Kaczmarek, J. Kulig, J. Pryjma, A. Dembinska-Kiec, *Cell Proliferation* **2008**, *41*, 441.
- [9] C. Ribet, E. Montastier, C. Valle, V. r. Bezaire, A. Mazzucotelli, A. Mairal, N. Viguerie, D. Langin, *Endocrinology* **2010**, *151*, 123.
- [10] T. Tchkonina, N. Giorgadze, T. Pirtskhalava, T. Thomou, M. DePonte, A. Koo, R. A. Forse, D. Chinnappan, C. Martin-Ruiz, T. von Zglinicki, J. L. Kirkland, *Diabetes* **2006**, *55*, 2571.
- [11] L. K. Markussen, M. S. Isidor, P. Breining, E. S. Andersen, N. E. Rasmussen, L. I. Petersen, S. B. Pedersen, B. Richelsen, J. B. Hansen, *PLoS One* **2017**, *12*, e0185624.
- [12] M. J. Harms, Q. Li, S. Lee, C. Zhang, B. Kull, S. Hallen, A. Thorell, I. Alexandersson, C. E. Hagberg, X.-R. Peng, A. Mardinoglu, K. L. Spalding, J. Boucher, *Cell Rep.* **2019**, *27*, 213.e5.
- [13] P. A. Turner, Y. Tang, S. J. Weiss, A. V. Janorkar, *Tissue Eng., Part A* **2015**, *21*, 1837.
- [14] P. A. Turner, B. Gurumurthy, J. L. Bailey, C. M. Elks, A. V. Janorkar, *Process Biochem.* **2017**, *59*, 312.
- [15] P. A. Turner, M. R. Garrett, S. P. Didion, A. V. Janorkar, *Ann. Biomed. Eng.* **2018**, *46*, 772.
- [16] A. D. Graham, R. Pandey, V. S. Tsancheva, A. Candeo, S. W. Botchway, A. J. Allan, L. Teboul, K. Madi, T. S. Babra, L. A. K. Zolkiewski, X. Xue, L. Bentley, J. Gannon, S. N. Olof, R. D. Cox, *Biofabrication* **2019**, *12*, 015018.
- [17] F. Verseijden, S. J. Posthumus-van Sluijs, E. Farrell, J. W. Van Neck, S. E. R. Hovius, S. O. P. Hofer, G. J. V. M. Van Osch, *Cell Transplant.* **2010**, *19*, 1007.
- [18] M. Vermette, V. Trottier, V. Ménard, L. Saint-Pierre, A. Roy, J. Fradette, *Biomaterials* **2007**, *28*, 2850.
- [19] C. Hoefner, K. Muhr, H. Horder, M. Wiesner, K. Wittmann, D. Lukaszyk, K. Radeloff, M. Winnefeld, M. Becker, T. Blunk, P. Bauer-Kreisel, *Tissue Eng., Part A* **2020**, *26*, 915.
- [20] Y.-H. Wang, J.-Y. Wu, P.-J. Chou, C.-H. Chen, C.-Z. Wang, M.-L. Ho, J.-K. Chang, M.-L. Yeh, C.-H. Chen, *Cytotherapy* **2014**, *16*, 485.
- [21] A. J. Klingelutz, F. A. Gourronc, A. Chaly, D. A. Wadkins, A. J. Burand, K. R. Markan, S. O. Idiga, M. Wu, M. J. Potthoff, J. A. Ankrum, *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 523.
- [22] S. Muller, I. Ader, J. Creff, H. Leménager, P. Achard, L. Casteilla, L. Sensebé, A. Carrière, F. Deschaseaux, *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 31.
- [23] P. Petrus, S. Lecoutre, L. Dollet, C. Wiel, A. Sulen, H. Gao, B. Tavira, J. Laurencikienė, O. Rooyackers, A. Checa, I. Douagi, C. E. Wheelock, P. Arner, M. McCarthy, M. O. Bergo, L. Edgar, R. P. Choudhury, M. Aouadi, A. Krook, M. Rydén, *Cell Metab.* **2020**, *31*, 375.
- [24] J. R. Acosta, I. Douagi, D. P. Andersson, J. Bäckdahl, M. Rydén, P. Arner, J. Laurencikienė, *Diabetologia* **2016**, *59*, 560.
- [25] A. Gironde, G. Tavernier, C. Valle, C. Moro, N. Mejhert, A.-L. Diné, M. Houssier, B. Roussel, A. Besse-Patin, M. Combes, L. Mir, L. Monbrun, V. r. Bezaire, B. Prunet-Marcassus, A. Waget, I. Vila, S. Caspar-Bauguil, K. Louche, M.-A. Marques, A. Mairal, M.-L. Renou, J. Galitzky, C. Holm, E. Mouisel, C. Thalamas, N. Viguerie, T. Sulpice, R. Burcelin, P. Arner, D. Langin, *PLoS Biol.* **2013**, *11*, e1001485.
- [26] A. M. Kemas, S. Youhanna, R. Z. Shafagh, V. M. Lauschke, *FASEB J.* **2021**, *35*, e21305.
- [27] M. Muntifering, D. Castranova, G. A. Gibson, E. Meyer, M. Kofron, A. M. Watson, *Curr. Protoc. Cytom.* **2018**, *86*, e38.
- [28] L. Butt, D. Unnersjö-Jess, M. Höhne, A. Edwards, J. Binz-Lotter, D. Reilly, R. Hahnfeldt, V. Ziegler, K. Fremter, M. M. Rinschen, M. Helmstädter, L. K. Ebert, H. Castrop, M. J. Hackl, G. Walz, P. T. Brinkkoetter, M. C. Liebau, K. Tory, P. F. Hoyer, B. B. Beck, H. Brismar, H. Blom, B. Schermer, T. Benzing, *Nat. Metab.* **2020**, *2*, 461.
- [29] N. Martínez-Sánchez, P. Seoane-Collazo, C. Contreras, L. Varela, J. Villarroya, E. Rial-Pensado, X. Buqué, I. Aurrekoetxea, T. C. Delgado, R. Vázquez-Martínez, I. González-García, J. Roa, A. J. Whittle, B. Gomez-Santos, V. Velagapudi, Y. C. L. Tung, D. A. Morgan, P. J. Voshol, P. B. Martínez de Morentin, T. López-González, L. Liñares-Pose, F. Gonzalez, K. Chatterjee, T. Sobrino, G. Medina-Gómez, R. J. Davis, N. Casals, M. Orešič, A. P. Coll, A. Vidal-Puig, J. Mittag, M. Tena-Sempere, M. M. Malagón, C. Diéguez, M. L. Martínez-Chantar, et al., *Cell Metab.* **2017**, *26*, 212.
- [30] M. I. Love, W. Huber, S. Anders, *Genome Biol.* **2014**, *15*, 550.
- [31] Y. Liao, J. Wang, E. J. Jaehnig, Z. Shi, B. Zhang, *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, W199.
- [32] P. J. Balwierz, M. Pachkov, P. Arnold, A. J. Gruber, M. Zavolan, E. van Nimwegen, *Genome Res.* **2014**, *24*, 869.
- [33] O. Fornes, J. A. Castro-Mondragon, A. Khan, R. van der Lee, X. Zhang, P. A. Richmond, B. P. Modi, S. Correard, M. Gheorghe, D. Baranasic, W. Santana-Garcia, G. Tan, J. Chèneby, B. Ballester, F. Parcy, A. Sandelin, B. Lenhard, W. W. Wasserman, A. Mathelier, *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, D87.
- [34] S. Altshuler-Keylin, S. Kajimura, *Sci. Signaling* **2017**, *10*, eaai9248.
- [35] K. G. Stenkula, C. Erlanson-Albertsson, *Am. J. Physiol.: Regul., Integr. Comp. Physiol.* **2018**, *315*, R284.
- [36] R. D. Abbott, R. Y. Wang, M. R. Reagan, Y. Chen, F. E. Borowsky, A. Zieba, K. G. Marra, J. P. Rubin, I. M. Ghobrial, D. L. Kaplan, *Adv. Healthcare Mater.* **2016**, *5*, 1667.
- [37] M. A. Ambele, C. Dessels, C. Durandt, M. S. Pepper, *Stem Cell Res.* **2016**, *16*, 725.
- [38] Y.-H. Chang, J.-N. Tsai, S.-W. Chang, W.-T. Hsu, C.-P. Yang, C.-W. Hsiao, M.-Y. Shiau, *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2172.
- [39] H. N. Monsuur, E. M. Weijers, F. B. Niessen, A. Gefen, P. Koolwijk, S. Gibbs, L. J. van den Broek, *PLoS One* **2016**, *11*, e0167056.
- [40] A. Weinstock, H. Moura Silva, K. J. Moore, A. M. Schmidt, E. A. Fisher, *Circ. Res.* **2020**, *126*, 1590.
- [41] D. Lin, T.-H. Chun, L. Kang, *Biochem. Pharmacol.* **2016**, *119*, 8.
- [42] F. J. Ruiz-Ojeda, A. Méndez-Gutiérrez, C. M. Aguilera, J. Plaza-Díaz, *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4888.
- [43] B. M. Spiegelman, C. A. Ginty, *Cell* **1983**, *35*, 657.
- [44] N. Di Caprio, E. Bellas, *Adv. Biosyst.* **2020**, *4*, 1900286.
- [45] L. Mor-Yossef Moldovan, M. Lustig, A. Naftaly, M. Mardamshina, T. Geiger, A. Gefen, D. Benayahu, *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 3850.
- [46] L. Fang, M. Zhang, Y. Li, Y. Liu, Q. Cui, N. Wang, *PPAR Res.* **2016**, *2016*, 6042162.
- [47] S.-J. Kim, C. Nian, C. H. S. McIntosh, *J. Lipid Res.* **2011**, *52*, 759.
- [48] C. F. Zizola, G. J. Schwartz, S. Vogel, *Am. J. Physiol.: Endocrinol. Metab.* **2008**, *295*, E1358.
- [49] F. Zandbergen, S. Mandard, P. Escher, N. S. Tan, D. Patsouris, T. Jatkoa, S. Rojas-Caro, S. Madore, W. Wahli, S. Tafuri, M. Müller, S. Kersten, *Biochem. J.* **2005**, *392*, 313.
- [50] K. Motojima, P. Passilly, J. M. Peters, F. J. Gonzalez, N. Latruffe, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 16710.
- [51] M. Balaz, A. S. Becker, L. Balazova, L. Straub, J. Müller, G. Gashi, C. I. Maushart, W. Sun, H. Dong, C. Moser, C. Horvath, V. Efthymiou, Y. Rachamin, S. Modica, C. Zellweger, S. Bacanovic, P. Stefanicka, L. Varga, B. Ukropcova, M. Profant, L. Opitz, E.-Z. Amri, M. K. Akula, M. Bergo, J. Ukropec, C. Falk, N. Zamboni, M. J. Betz, I. A. Burger, C. Wolftrum, *Cell Metab.* **2019**, *29*, 901.
- [52] H. Kaji, *Compr. Physiol.* **2016**, *6*, 1873.
- [53] A. L. Harte, P. G. McTernan, C. L. McTernan, S. A. Smith, A. H. Barnett, S. Kumar, *Diabetes, Obes. Metab.* **2003**, *5*, 302.
- [54] Z. Wu, S. Wang, *Dev. Biol.* **2013**, *373*, 235.
- [55] V. Schönitzer, R. Wirtz, V. Ulrich, T. Berger, A. Karl, W. Mutschler, M. Schieker, W. Böcker, *Cell. Reprogram.* **2014**, *16*, 355.
- [56] O. Gulyaeva, H. Nguyen, A. Sambeat, K. Heydari, H. S. Sul, *Cell Rep.* **2018**, *25*, 1002.
- [57] J.-E. Liu, B. Ren, L. Tang, Q.-J. Tang, X.-Y. Liu, X. Li, X. Bai, W.-P. Zhong, J.-X. Meng, H.-M. Lin, H. Wu, J.-Y. Chen, S.-L. Zhong, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 26544.

- [58] Y. Wang, L. Zhao, C. Smas, H. S. Sul, *Mol. Cell. Biol.* **2010**, *30*, 3480.
- [59] L. Qi, M. Saberi, E. Zmuda, Y. Wang, J. Altarejos, X. Zhang, R. Dentin, S. Hedrick, G. Bandyopadhyay, T. Hai, J. Olefsky, M. Montminy, *Cell Metab.* **2009**, *9*, 277
- [60] J. B. Seo, H. M. Moon, W. S. Kim, Y. S. Lee, H. W. Jeong, E. J. Yoo, J. Ham, H. Kang, M.-G. Park, K. R. Steffensen, T. M. Stulnig, J.-A. Gustafsson, S. D. Park, J. B. Kim, *Mol. Cell. Biol.* **2004**, *24*, 3430.
- [61] W. Zhang, J. Xu, J. Li, T. Guo, D. Jiang, X. Feng, X. Ma, L. He, W. Wu, M. Yin, L. Ge, Z. Wang, M. S. Ho, Y. Zhao, Z. Fei, L. Zhang, *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 17119.
- [62] R. Ferrarese, A. Izzo, G. Andrieux, S. Lagies, A. P. Masilamani, R. Schulzki, Y. Shuai, E. Kling, V. Ribecco, A. Wasilenko, D. H. Heiland, M. Prinz, B. Kammerer, M. Bórries, M. S. Carro, *bioRxiv: 2020.04.17.046268* **2020**.
- [63] C. J. Tack, R. Stienstra, L. A. B. Joosten, M. G. Netea, *Immunol. Rev.* **2012**, *249*, 239.
- [64] C. Caër, C. Rouault, T. L. Roy, C. Poitou, J. Aron-Wisniewsky, A. Torcivia, J.-C. Bichet, K. Clément, M. Guerre-Millo, S. André, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 3000
- [65] M. P. Czech, *Mol. Metab.* **2020**, *34*, 27.
- [66] M. E. Frigolet, R. Gutiérrez-Aguilar, *Adv Nutr* **2017**, *8*, 173S.
- [67] M. Caron-Jobin, D. Mauvoisin, A. Michaud, A. Veilleux, S. Noël, M. P. Fortier, P. Julien, A. Tchernof, C. Mounier, *Nutr. Diabetes* **2012**, *2*, e23.
- [68] D. B. Hausman, H. J. Park, G. J. Hausman, *Methods Mol. Biol.* **2008**, *456*, 201.
- [69] G. Haemmerle, R. Zimmermann, M. Hayn, C. Theussl, G. Waeg, E. Wagner, W. Sattler, T. M. Magin, E. F. Wagner, R. Zechner, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 4806
- [70] E. Bellas, K. G. Marra, D. L. Kaplan, *Tissue Eng., Part C* **2013**, *19*, 745.
- [71] A. Y. Hsiao, T. Okitsu, H. Teramae, S. Takeuchi, *Adv. Healthcare Mater.* **2016**, *5*, 548.
- [72] C.-C. Tsai, Y.-J. Hong, R. J. Lee, N.-C. Cheng, J. Yu, *J. Mater. Chem. B* **2019**, *7*, 1064.
- [73] R. Bender, M. McCarthy, T. Brown, J. Bukowska, S. Smith, R. D. Abbott, D. L. Kaplan, C. Williams, J. W. Wade, A. Alarcon, X. Wu, F. Lau, J. M. Gimble, T. Frazier, *Stem Cells Int.* **2020**, *2020*, 4242130.
- [74] M. K. Vaicik, M. Morse, A. Blagajcevic, J. Rios, J. Larson, F. Yang, R. N. Cohen, G. Papavasiliou, E. M. Brey, *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3*, 7903.
- [75] J. P. Yang, A. E. Anderson, A. McCartney, X. Ory, G. Ma, E. Pappalardo, J. Bader, J. H. Elisseff, *Tissue Eng., Part A* **2017**, *23*, 253.
- [76] F. Yang, A. Carmona, K. Stojkova, E. I. Garcia Huitron, A. Goddi, A. Bhushan, R. N. Cohen, E. M. Brey, *Lab Chip* **2021**, *21*, 435.
- [77] C. C. Bell, D. F. G. Hendriks, S. M. L. Moro, E. Ellis, J. Walsh, A. Renblom, L. Fredriksson Puigvert, A. C. A. Dankers, F. Jacobs, J. Snoeys, R. L. Sison-Young, R. E. Jenkins, Å. Nordling, S. Mkrtchian, B. K. Park, N. R. Kitteringham, C. E. P. Goldring, V. M. Lauschke, M. Ingelman-Sundberg, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 25187.
- [78] S. U. Vorrink, S. Ullah, S. Schmidt, J. Nandania, V. Velagapudi, O. Beck, M. Ingelman-Sundberg, V. M. Lauschke, *FASEB J.* **2017**, *31*, 2696.
- [79] C. Morgantini, J. Jager, X. Li, L. Levi, V. Azzimato, A. Sulen, E. Barreby, C. Xu, M. Tencerova, E. Näslund, C. Kumar, F. Verdeguer, S. Straniero, K. Hulthenby, N. K. Björkström, E. Ellis, M. Rydén, C. Kutter, T. Hurrell, V. M. Lauschke, J. Boucher, A. Tomčala, G. Krejčová, A. Bajgar, M. Aouadi, *Nat. Metab.* **2019**, *1*, 445.
- [80] B. Wang, I. S. Wood, P. Trayhurn, *Pfluegers Arch.* **2007**, *455*, 479.
- [81] T. McLaughlin, A. Sherman, P. Tsao, O. Gonzalez, G. Yee, C. Lamendola, G. M. Reaven, S. W. Cushman, *Diabetologia* **2007**, *50*, 1707.
- [82] L. Fang, F. Guo, L. Zhou, R. Stahl, J. Grams, *Adipocyte* **2015**, *4*, 273.
- [83] K. a. i. Ichihara, C. Kohsaka, N. Tomari, Y. Yamamoto, T. Masumura, *Anal. Biochem.* **2020**, *603*, 113810.
- [84] S. Chung, J. S. Parks, *Curr. Opin. Lipidol.* **2016**, *27*, 19
- [85] N. Oliva-Vilarnau, S. U. Vorrink, M. Ingelman-Sundberg, V. M. Lauschke, *Adv. Sci.* **2020**, *7*, 2000248.
- [86] K. L. Stromsdorfer, S. Yamaguchi, M. J. Yoon, A. C. Moseley, M. P. Franczyk, S. C. Kelly, N. Qi, S.-i. Imai, J. Yoshino, *Cell Rep.* **2016**, *16*, 1851.
- [87] K. N. Nielsen, J. Peics, T. Ma, I. Karavaeva, M. Dall, S. Chubanava, A. L. Basse, O. Dmytriyeva, J. T. Treebak, Z. Gerhart-Hines, *Mol. Metab.* **2018**, *11*, 178
- [88] T. S. Luongo, J. M. Eller, M.-J. Lu, M. Niere, F. Raith, C. Perry, M. R. Bornstein, P. Oliphint, L. Wang, M. R. McReynolds, M. E. Migaud, J. D. Rabinowitz, F. B. Johnson, K. Johnsson, M. Ziegler, X. A. Cambronne, J. A. Baur, *Nature* **2020**, *588*, 174.
- [89] S. P. Lakshmi, A. T. Reddy, R. C. Reddy, *Biochem. J.* **2017**, *474*, 1531.
- [90] L. Choy, R. Derynck, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 9609
- [91] M. I. Lefterova, Y. Zhang, D. J. Steger, M. Schupp, J. Schug, A. Cristancho, D. Feng, D. Zhuo, C. J. Stoeckert, X. S. Liu, M. A. Lazar, *Genes Dev.* **2008**, *22*, 2941.
- [92] L. Guo, X. Li, Q.-Q. Tang, *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 755.
- [93] R. Bertolio, F. Napoletano, M. Mano, S. Maurer-Stroh, M. Fantuz, A. Zannini, S. Bicchato, G. Sorrentino, G. Del Sal, *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1326.
- [94] V. Pellegrinelli, J. Heuvingh, O. du Roure, C. Rouault, A. Devulder, C. Klein, M. Lacasa, E. Clément, D. Lacasa, K. Clément, *J. Pathol.* **2014**, *233*, 183
- [95] A. Neuhofer, M. Zeyda, D. Mascher, B. K. Itariu, I. Murano, L. Leitner, E. E. Hochbrugger, P. Fraisl, S. Cinti, C. N. Serhan, T. M. Stulnig, *Diabetes* **2013**, *62*, 1945
- [96] Y.-C. Chang, Y.-H. Yu, J.-Y. Shew, W.-J. Lee, J.-J. Hwang, Y.-H. Chen, Y.-R. Chen, P.-C. Wei, L.-M. Chuang, W.-H. Lee, *EMBO Mol. Med.* **2013**, *5*, 1165
- [97] J. I. Kim, J. Y. Huh, J. H. Sohn, S. S. Choe, Y. S. Lee, C. Y. Lim, A. Jo, S. B. Park, W. Han, J. B. Kim, *Mol. Cell. Biol.* **2015**, *35*, 1686.



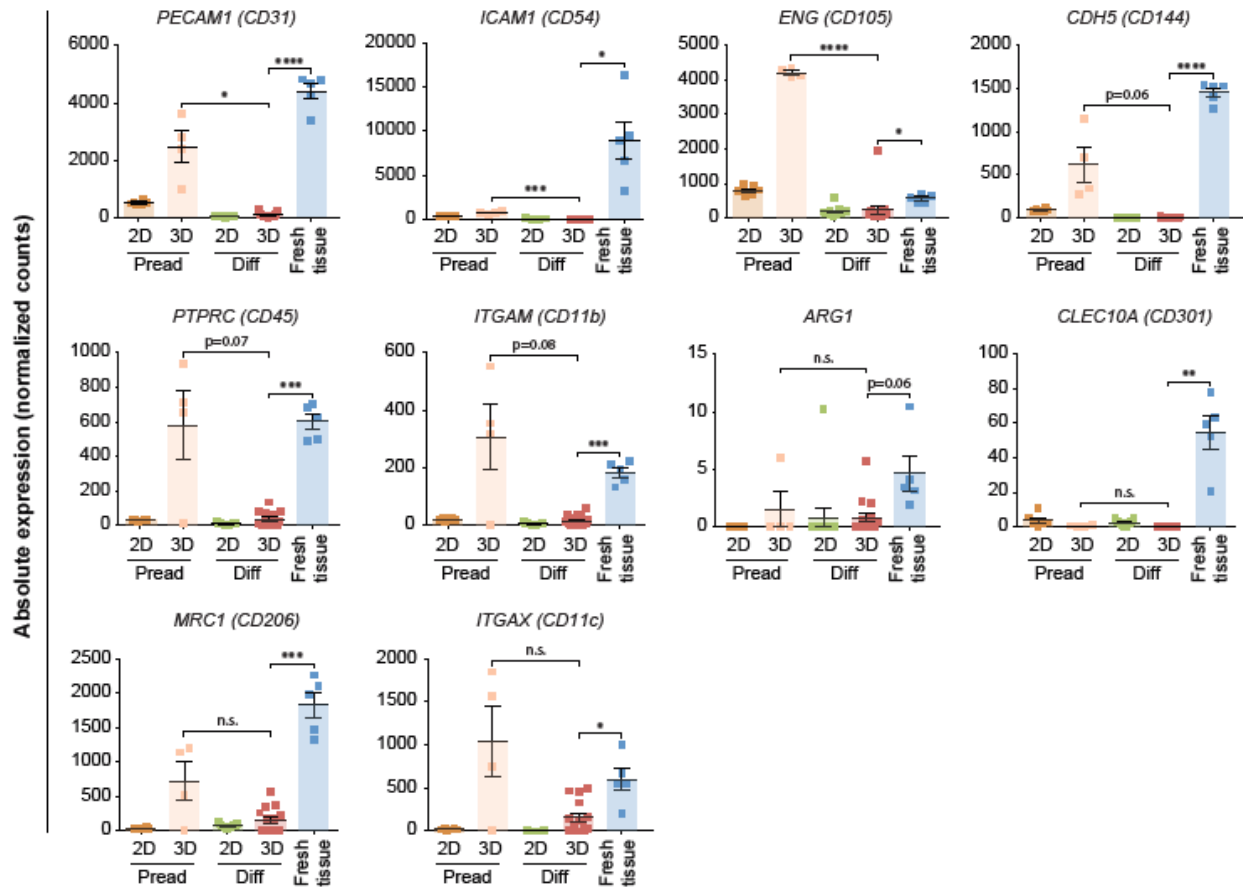
## Supporting Information

for *Adv. Sci.*, DOI: 10.1002/adv.202100106

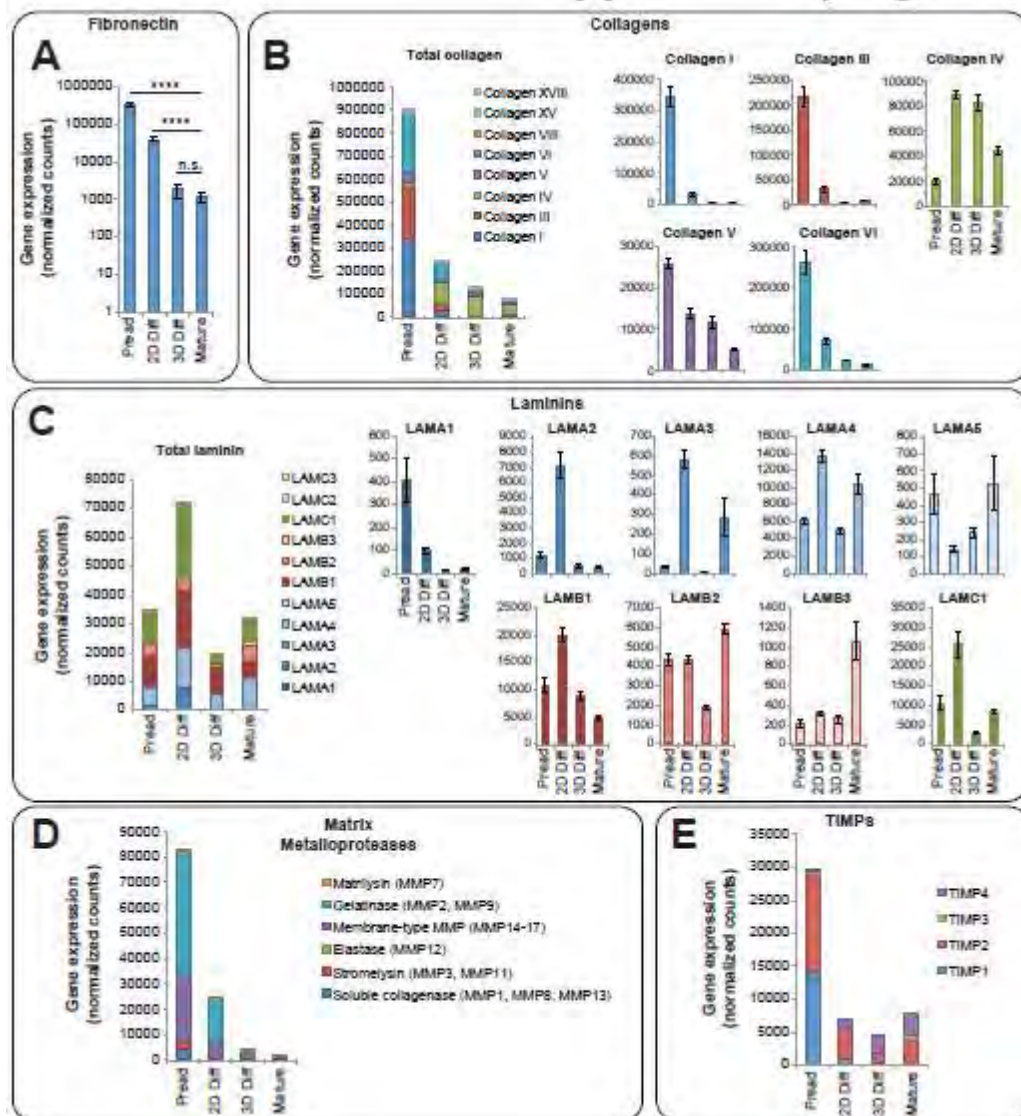
3D adipose tissue culture links the organotypic  
microenvironment to improved adipogenesis

*Joanne X. Shen, Morgane Couchet, Jérémy Dufau, Thais de Castro Barbosa, Maximilian H. Ulbrich, Martin Helmstädter, Aurino M. Kemas, Reza Zandi Shafagh, Marie-Adeline Marques, Jacob B. Hansen, Niklas Mejhert, Dominique Langin, Mikael Rydén, Volker M. Lauschke,\**

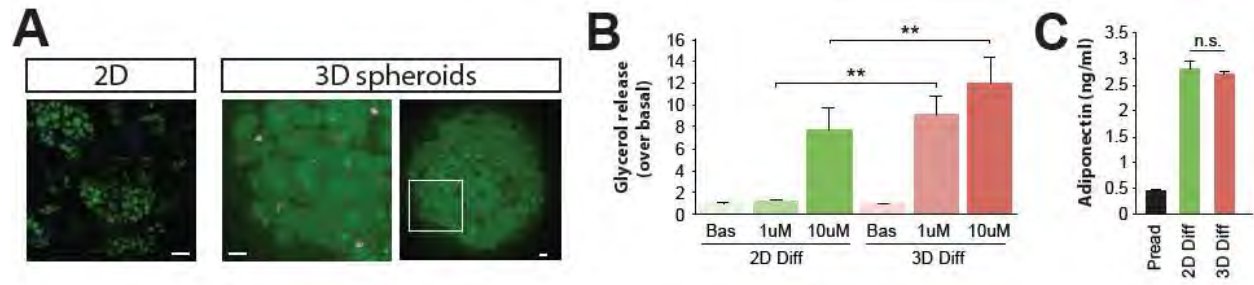
## Supplementary Material



**Supplementary Figure 1: Expression of endothelial and macrophage markers.** CD31, CD54, CD105 and CD144 constitute markers for adipose endothelial cells, CD45 and CD11b label adipose tissue macrophages, ARG1, CD301 and CD206 label subpopulations of M2 and CD11c of M1 macrophages, respectively. n=6 for 2D preadipocytes, n=4 for 3D preadipocytes, n=15 for adipocyte spheroids (3D Diff), n=13 for 2D adipocytes and n=5 for fresh whole tissue samples. All data are shown as mean  $\pm$  SEM. \*, \*\*, \*\*\*, \*\*\*\* indicate  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$  and  $p < 0.0001$  using two-tailed heteroscedastic t-tests, respectively. n.s. = not significant.

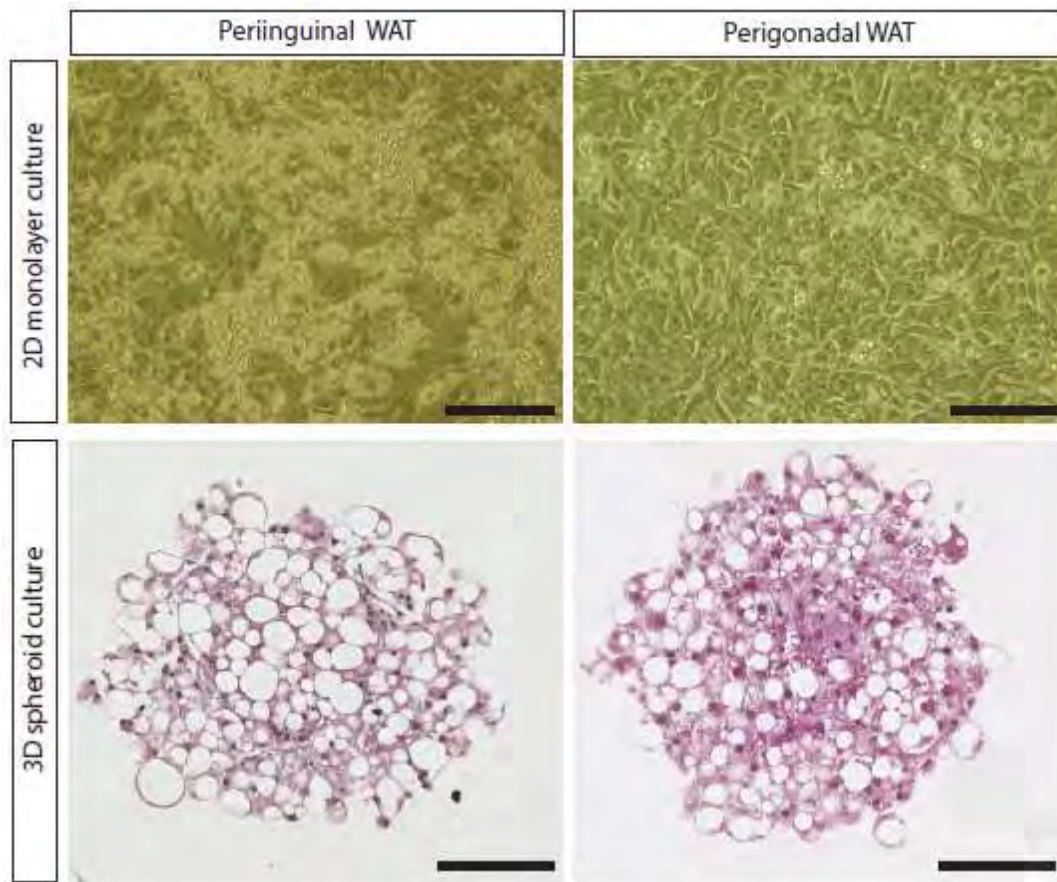


**Supplementary Figure 2: Expression profiling of extracellular matrix (ECM) components and remodelers.** Expression levels of the structural ECM proteins fibronectin (A), collagens (B) and laminins (C), as well as the major ECM remodeler families of matrix metalloproteases (MMPs; D) and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs; E) are shown in preadipocytes, differentiated adipocytes in 2D and 3D spheroid culture and in mature adipocytes *in vivo*. Expression levels are expressed as normalized gene counts (DeSeq2). n=6 for 2D preadipocytes, n=4 for 3D preadipocytes, n=15 for adipocyte spheroids (3D Diff), n=13 for 2D adipocytes and n=5 for mature adipocytes. All data are shown as mean  $\pm$  SEM. \*\*\*\* indicate  $p < 0.0001$  using two-tailed heteroscedastic t-tests.



**Supplementary Figure 3: Spheroid culture improves phenotypes of immortalized human white adipose tissue cells.** **A)** BODIPY images of TERT-hWA cells in 2D monolayer (left) and 3D spheroid culture (right). **B)** TERT-hWA cells are significantly more susceptible to isoprenaline-induced lipolysis in 3D spheroids compared to 2D monolayer culture.  $n=5$  per condition. **C)** Spheroid culture does not affect TERT-hWA adiponectin secretion compared to 2D monolayer culture.  $n=4$  per condition. Data are shown as mean  $\pm$  SEM. \*\* indicate  $p<0.01$  using two-tailed heteroscedastic t-tests. n.s. = not significant.





**Supplementary Figure 4: Differentiation of inguinal and perigonadal in 2D culture.** Note that while a considerable fraction of inguinal subcutaneous adipocytes differentiate into multilocular cells with small lipid droplets in 2D culture, differentiation and lipid accumulation cannot be observed in 2D cultures from perigonadal preadipocytes. In contrast, preadipocytes from both depots differentiate well in 3D culture. Scale bars = 100 $\mu$ m.

**Supplementary Table 1: Probes and primer sequences used for gene expression analysis.**

<b>Gene</b>	<b>Species</b>	<b>Taqman Probe ID</b>	<b>SYBR Green Primer Sequences</b>
<i>ADIPOQ</i>	Human	hs00605917_m1	-
<i>B2M</i>	Human		for: AAGGACTGGTCTTTCTATCTC rev: GATCCCACTTAACTATCTTGG
<i>FABP4</i>	Human	hs01086177_m1	-
<i>PLIN4</i>	Human	hs00287411_m1	-
<i>PPARG</i>	Human	hs00234592_m1	-
<i>Adipoq</i>	Mouse	-	for: CAACCAACAGAATCATTATGA rev: ACACCGTGATGTGGTAAGAGA
<i>Elovl6</i>	Mouse	-	for: TGCAGGAAAAGTGGAAAGTCT rev: ATGCCGACCACCAAAGATAAA
<i>Fabp4</i>	Mouse	-	for: TTCGATGAAATCACCGCAGA rev: GGTCGACTTCCATCCCACTT
<i>Hprt</i>	Mouse	-	for: TGGCCATCTGCCTAGTAAAGC rev: GGACGCAGCAACTGACATTC
<i>Lep</i>	Mouse	-	for: AAGACCATTGTCACCAGGATCAA rev: ACCCTCTGCTTGGCGGATA
<i>Lipe</i>	Mouse	-	for: ACTTCTGGAAAGCCTTCTGGAACA rev: GATGCCATGTTGGCCAGAGAC
<i>Plin1</i>	Mouse	-	for: AACAGCATCAGTGTGCCCACTT rev: CCATCCCCAAGGCAAGCT
<i>Plin4</i>	Mouse	Mm00491061_m1	-
<i>Pparg2</i>	Mouse	-	for: AGTGTGAATTACAGCAAATCT rev: CGAGTGGTCTTCCATCACGG
<i>Scd1</i>	Mouse	Mm01197142_m1	-
<i>GFP</i>	N/A	-	for: AGCAAAGACCCCAACGAGAAG rev: GTCCATGCCGAGAGTGATCC

### III. Discussion et perspectives

Nous avons ainsi établi un système de culture en 3D de progéniteurs adipocytaires issus de souris similaire à un modèle précédemment publié (Klingelhutz et al. 2018). Ces sphéroïdes présentent une différenciation adipocytaire homogène dans leur structure, avec formation d'adipocytes uniloculaires, révélant une plus grande maturité que dans les cultures conventionnelles en 2D. En accord, nous mettons en évidence une augmentation de l'expression génique de différents marqueurs adipocytaires. Les adipocytes obtenus sont également fonctionnels, répondant de façon concordante à un stimulus lipolytique. Un point intéressant est la possibilité de pouvoir différencier de façon similaire des progéniteurs adipocytaires issus de TA sous-cutané et périgonadique, ce qui n'est que très peu à non réalisable en culture 2D. La culture en 3D offre ainsi la possibilité d'étudier les différences entre les dépôts adipeux *in vitro*, une étude antérieure indiquant une rétention des caractéristiques propres à ces dépôts en termes d'expression génique, de sécrétions, ou encore de capacité lipolytique, dans ce type de culture (Emont et al. 2015). Des études de transcriptomique à grande échelle pourront ainsi révéler des profils d'expression récapitulant les différences observées *in vivo*, et il sera intéressant d'étudier plus en détail les profils sécrétoires et de réponses métaboliques entre les sphéroïdes issus des différents dépôts. De plus, il est possible d'imaginer la culture de progéniteurs provenant d'autres dépôts adipeux, habituellement moins étudiés, et qui permettront un approfondissement des connaissances via ce système de culture en 3D.

L'intérêt premier dans la mise au point de ce système de culture était d'obtenir des adipocytes à GL uniloculaire : un objectif atteint. La possibilité de cultures de sphéroïdes produits à partir de souris génétiquement modifiées pourrait permettre des avancées importantes dans la compréhension des mécanismes régulant la formation de la GL uniloculaire et de son importante plasticité. En effet, des cultures pourront être réalisées à partir de souris déficientes pour différentes protéines entourant et jouant des rôles importants dans la plasticité de la GL telles que des périlipines, dont des modèles de souris knock-out et knock-in pour des formes inactives sont en cours de création au laboratoire, des protéines de la famille CIDE, et des lipases, comme nous le montrons avec des animaux déficients pour la LHS. Un point intéressant mais non abouti aurait été la possibilité d'imager en temps réel pour étudier la formation de la GL, ce en taguant une ou plusieurs des protéines précédemment

mentionnées avec des marqueurs fluorescents. Cependant, il n'est pas possible d'immobiliser suffisamment ces structures dans notre système de culture actuel. Des inclusions de ces sphéroïdes dans des structures matricielles pourraient répondre à ce problème. Un point important à souligner est la taille de ces GL, qui bien que semblant uniloculaires, restent de petite taille, n'atteignant jamais des tailles similaires à celles retrouvées *in vivo*, à la fois dans les modèles murins et humains. Un aspect limitant important semble être lié aux contraintes mécaniques présentes à l'intérieur et en surface du sphéroïde. Des GL de petite taille sont retrouvées à l'intérieur du sphéroïde, dont la taille ne semble pas pouvoir augmenter du fait des contraintes physiques associées à la MEC. En effet, il semble que cette matrice soit relativement importante, les sphéroïdes étant difficiles à démanteler, posant, entre autres, des problèmes de rendement lors d'extractions d'ARN et de protéines. A l'inverse, en surface, les adipocytes semblent atteindre des tailles plus importantes, mais vont avoir une forte tendance à bourgeonner et se dissocier de la structure, et à casser du fait d'une fragilité cellulaire et/ou de l'absence de MEC environnante. Des améliorations du support de culture semblent ainsi nécessaires pour permettre à ces adipocytes d'atteindre des tailles plus importantes. Une approche intéressante a été décrite dans une étude récente, consistant à inclure les sphéroïdes formés à partir de la FSV entière, et non pas uniquement les progéniteurs, dans du Matrigel®. Ceci semble, notamment, permettre aux cellules de s'espacer les unes des autres, favorisant la formation d'adipocytes, mais également de structures vasculaires par les cellules endothéliales, formant ainsi des structures plus proches d'organoïdes que de sphéroïdes (Muller et al. 2019).

Bien que nos résultats puissent être attrayants, notamment, en lien avec les améliorations techniques développées et à développer, plusieurs points négatifs doivent être rapportés. Un premier point est le nombre important d'animaux nécessaires à ces cultures. En effet, les progéniteurs ne prolifèrent pas, une fois en structure 3D, limitant ainsi la disponibilité de matériel biologique, bien que quelques cycles de division puissent être réalisés en 2D avant de former les sphéroïdes en 3D. Cependant, cette expansion reste très limitée et rapidement associée à une perte du potentiel de différenciation (Dufau et al. 2021). Cette limitation quantitative de matériel se répercute sur les rendements d'extractions d'ARN et de protéines, qui restent faibles, comme indiqué précédemment, nécessitant ainsi un grand nombre de sphéroïdes pour conduire des mesures de routine. Pour exemple, dans nos mains, 60

sphéroïdes de 20 000 cellules chacun, soit un total de plus d'un million de cellules, donnent une quantité d'ARN habituellement obtenue pour à peine un quart de cette quantité en 2D. Un autre point important est le prix de ce type de cultures, qui nécessite souvent du matériel spécifique, notamment des plaques de culture spécialement traitées pour empêcher l'adhérence du sphéroïde au plastique, ce qui entraînerait la « fuite » des cellules qui s'étaleraient en 2D, ou encore des structures de supports matriciels lorsque utilisées. Enfin, dernière limitation mais non des moindres, ce type de culture demande beaucoup plus de temps de manipulation que les cultures conventionnelles en 2D, notamment les changements de milieux, les sphéroïdes étant libres dans le milieu et relativement fragiles en surface, ce qui nécessite beaucoup de patience et de méticulosité pour changer une quantité importante et optimale de milieu sans aspirer les sphéroïdes.

## Objectif 2

### I. Article

#### **Nuclear HSL links TGF $\beta$ signalling to mitochondrial metabolism in adipocytes**

Emeline Recazens\*, Jérémy Dufau\*, Aline Mairal, Etienne Mouisel, Tongtong Wang, Michaela Siklova, Henrik Laurell, Genevieve Tavernier, Jason S. Iacovoni, Karima Chaoui, Odile Burlet-Schiltz, Marie-Adeline Marques, Pierre-Damien Denechaud, Cedric Moro, Matthew J. Harms, Ez-Zoubir Amri, Catherine Postic, Lenka Rossmeislova, Niklas Mejhert, Mikael Ryden, Christian Wolfrum, Dominique Langin

En considération au journal *Nature*

## **Nuclear HSL links TGF $\beta$ signalling to mitochondrial metabolism in adipocytes**

Emeline Recazens<sup>1,\*</sup>, Jérémy Dufau<sup>1,\*</sup>, Aline Mairal<sup>1</sup>, Etienne Mouisel<sup>1</sup>, Tongtong Wang<sup>2</sup>,  
Michaela Siklova<sup>3,4</sup>, Henrik Laurell<sup>1</sup>, Genevieve Tavernier<sup>1</sup>, Jason S. Iacovoni<sup>1</sup>, Karima  
Chaoui<sup>5</sup>, Odile Burlet-Schiltz<sup>5</sup>, Marie-Adeline Marques<sup>1</sup>, Pierre-Damien Denechaud<sup>1</sup>, Cedric  
Moro<sup>1,4</sup>, Matthew J. Harms<sup>6</sup>, Ez-Zoubir Amri<sup>7</sup>, Catherine Postic<sup>8</sup>, Lenka Rossmeislova<sup>3,4</sup>,  
Niklas Mejhert<sup>9</sup>, Mikael Ryden<sup>9</sup>, Christian Wolfrum<sup>2</sup>, Dominique Langin<sup>1,4,10,11,✉</sup>

<sup>1</sup>Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, I2MC, Equipe MetaDiab,  
Université de Toulouse, Inserm, Université Toulouse III - Paul Sabatier (UPS), Toulouse,  
France

<sup>2</sup>Institute of Food, Nutrition and Health, ETH Zürich, Schwerzenbach, Switzerland

<sup>3</sup>Department of Pathophysiology, Third Faculty of Medicine, Charles University, Prague,  
Czech Republic

<sup>4</sup>Franco-Czech Laboratory for Clinical Research on Obesity, Third Faculty of Medicine,  
Charles University, Prague and Université Toulouse III - Paul Sabatier (UPS), Toulouse,  
France

<sup>5</sup>Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, IPBS, Université de Toulouse, CNRS,  
Université Toulouse III - Paul Sabatier (UPS), Toulouse, France

<sup>6</sup>Bioscience Metabolism, Research and Early Development, Cardiovascular, Renal and  
Metabolism (CVRM), BioPharmaceuticals R&D, AstraZeneca, Gothenburg, Sweden

<sup>7</sup>Institut de Biologie Valrose (iBV), Université Côte d'Azur, CNRS, Inserm, Nice, France

<sup>8</sup>Institut Cochin, Université de Paris, CNRS, Inserm, Paris, France

<sup>9</sup>Department of Medicine (H7), Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

<sup>10</sup>Laboratoire de biochimie, Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, Toulouse, France

<sup>11</sup>Institut Universitaire de France (IUF), Paris, France

\*These authors contributed equally to this work.

✉ email: [dominique.langin@inserm.fr](mailto:dominique.langin@inserm.fr)



**Abstract**

Fine-tuning of mitochondrial activity ensures optimal cellular function. Dysregulation of adipocyte mitochondrial metabolism is associated with obesity-associated comorbidities<sup>1,2</sup>. Whereas  $\beta$ -adrenergic activation is an established mechanism, little is known about the inhibitory regulators. Here we describe a pathway linking TGF $\beta$  signalling to mitochondrial oxidative capacity in adipocytes. A negative association was found between mitochondrial markers and TGF $\beta$  target gene expression. We identify hormone-sensitive lipase (HSL)<sup>3</sup> as a component of a TGF $\beta$  response complex in adipocyte nuclei<sup>4</sup>. HSL depletion results in the induction of mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) whereas the production of TGF $\beta$ -controlled extracellular matrix proteins is decreased. Inhibition of the TGF $\beta$  pathway blunts the induction of PGC1 $\alpha$ , a transcriptional co-activator controlling expression of OXPHOS proteins<sup>5</sup>. Mechanistically, HSL interacts with the TGF $\beta$  receptor-regulated SMAD3 but not with its conventional partner SMAD4. HSL/SMAD3-mediated repression of PGC1 $\alpha$  requires the RNA-binding transcription factor SFPQ. TGF $\beta$  activation of SMAD3 promotes HSL nuclear accumulation whereas cAMP-dependent protein kinase (PKA)-mediated phosphorylation induces HSL nuclear export. In line with mitochondrial OXPHOS down-regulation, HSL nuclear content is increased in obese mouse adipose tissue. These findings reveal that nuclear HSL integrates signals from the TGF $\beta$  and catecholamine signalling pathways and interacts with SMAD3 and SFPQ to control adipocyte mitochondrial oxidative activity.

## Main

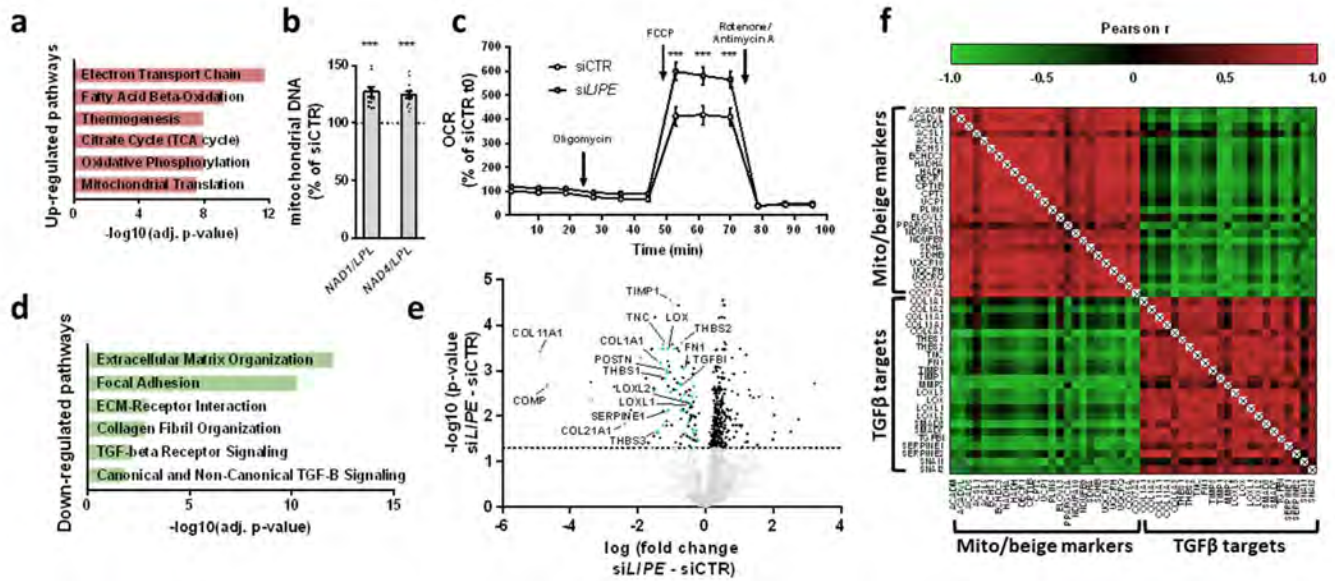
Adipocytes, the parenchymal cells of adipose tissue, play a major role in regulating energy metabolism<sup>1,2,6</sup>. While white adipocytes are responsible for lipid storage and release, brown and beige adipocytes show robust oxidative capacity. The transcriptional co-activator PGC-1 $\alpha$  is an essential thermogenic regulator controlling mitochondrial biogenesis and metabolism<sup>7,8</sup>, which, in adipocytes, are associated with the cardiometabolic status of individuals<sup>9,10</sup>. In response to cold, the  $\beta$ -adrenergic activation of the PKA signalling pathway induces PGC-1 $\alpha$ <sup>5</sup>. PKA also induces phosphorylation of the neutral lipase HSL encoded by *LIPE* and translocation of the enzyme from the cytosol to the lipid droplet, where HSL hydrolyzes triacylglycerols<sup>2,3</sup>, thus providing fatty acids as substrates to sustain thermogenic activity.

In this study, we show that the TGF $\beta$ /SMAD3 signalling cascade constitutes an inhibitory pathway of mitochondrial metabolism, through a HSL pool in the adipocyte nuclei, which participates in SMAD3-mediated transcriptional repression of PGC-1 $\alpha$ . Whereas TGF $\beta$  receptor-activated SMAD3 physically interacts with HSL to promote nuclear translocation of the lipase, nuclear export of HSL is triggered by PKA-mediated phosphorylation. Nuclear HSL therefore constitutes a link between the PKA and TGF $\beta$ /SMAD3 signalling pathways in the control of mitochondrial metabolism.

### HSL, mitochondrial metabolism and TGF $\beta$

Out of all mammalian cells, adipocytes express the highest levels of HSL. To explore the roles of HSL beyond triacylglycerol hydrolysis, we performed transcriptional profiling in a human adipocyte model with siRNA-mediated depletion of HSL<sup>11</sup>. Pathways related to mitochondrial metabolism were induced whereas TGF $\beta$ -regulated extracellular matrix remodeling pathways were reduced (Fig. 1a-e, Extended Data Fig. 1a-c).

**Fig. 1: HSL regulates PGC-1 $\alpha$  and TGF $\beta$  pathways in human adipocytes.**



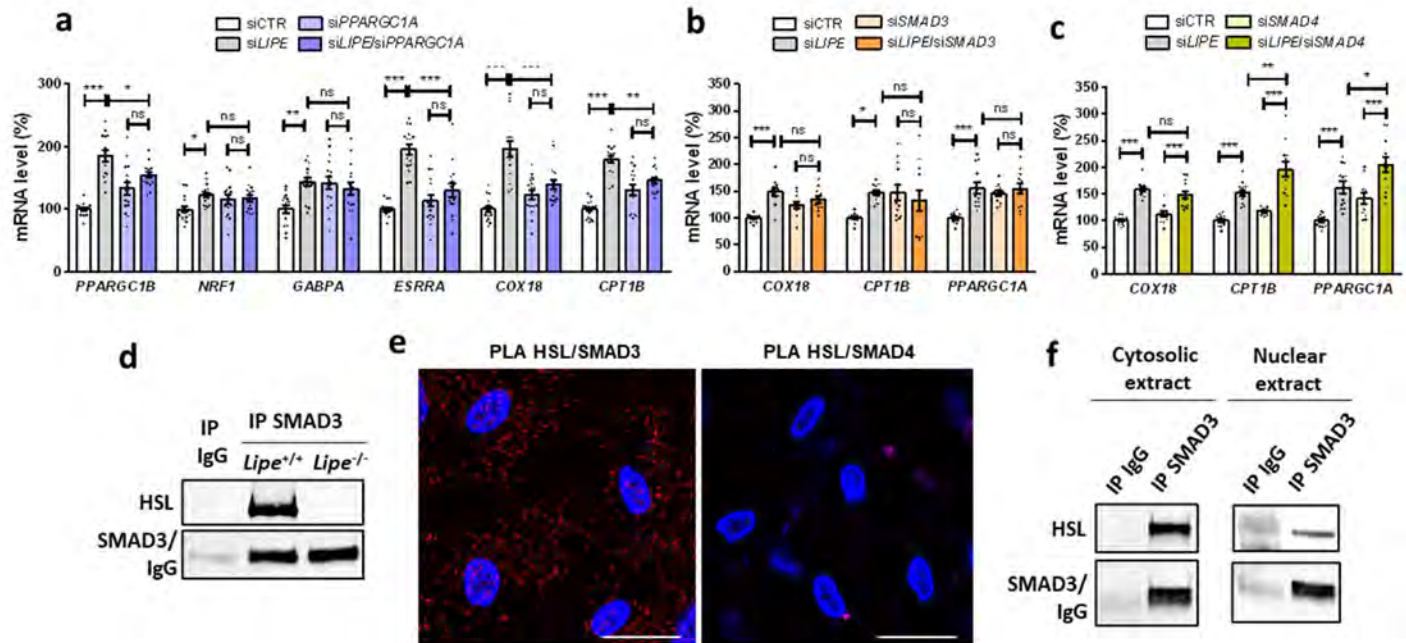
**a-e**, hMADS3 adipocytes were transfected with siRNAs against HSL (siLIPE, grey bars) and green fluorescent protein (siCTR, dotted line). **a**, Pathway analysis of up-regulated genes (n=3). **b**, Ratio of mitochondrial (*NAD1* and *NAD4*) vs nuclear (*LPL*) DNA (n=6 replicates from 2 cell cultures). **c**, Oxygen consumption rate (OCR) (n=5-10 replicates from 3 cell cultures). **d**, Pathway analysis of down-regulated genes (n=3). **e**, Volcano plot of secretome data, green dots show proteins from pathways in (**d**). **f** Correlation matrix of mitochondrial (Mito) and brown/beige adipocyte markers and, TGF $\beta$  signalling target genes (n=11). Data are mean  $\pm$  s.e.m. Statistical analysis was performed using unpaired t-test (**b**) and 2-Way ANOVA with Sidak post-hoc test (**c**). \*\*\*P<0.001.

The results were confirmed by measurements of mRNA levels for mitochondrial OXPHOS, brown/beige adipocyte marker genes, and their transcriptional regulators, as well as for TGF $\beta$  target genes (Fig. 1a,d; Extended Data Fig. 1d,e). Similar data were obtained siRNA treated adipose stem cell-derived adipocytes from a different donor (Extended Data Fig. 1f-i) and primary human adipocytes derived from stromavascular progenitor cells<sup>12,13</sup> (Extended Data Fig. 1j-l), as well as in human adipose stem cells following CRISPR-Cas9 mediated genetic invalidation of the *LIPE* gene (Extended Data Fig. 1m-o). Induction of mitochondrial gene expression resulted in enhanced OXPHOS and UCP1 protein levels as well as mitochondrial DNA content (Fig. 1b; Extended Data Fig. 2a,b). In line with higher mitochondriogenesis, adipocytes displayed increased basal and maximal oxygen consumption rates and, fatty acid

oxidation (Fig. 1c; Extended Data Fig. 2c-e). Analysis of the adipocyte secretome revealed decreased levels of a large number of TGF $\beta$ -regulated peptides (Fig. 1e). The reciprocal regulation between mitochondrial genes and TGF $\beta$  target genes was also observed *in vivo*. Compared to wild-type littermates, *Lipe* deficient mice showed increased adipose expression of *Ppargc1a*, *Ucp1* and *Cpt1b* and decreased expression of *Coll1a1* and *Thsbs1* (Extended Data Fig. 2f). Of note, HSL depletion led to similar adaptations in human beige adipocytes indicating that the regulation is common to white and beige adipocytes which markedly differ in mitochondrial activity<sup>14</sup> (Extended Data Fig. 3). Considering the reciprocal regulation of oxidative genes and TGF $\beta$  pathways in HSL-depleted adipocytes, we analyzed adipocyte gene expression profiles in various *in vitro* and *in vivo* conditions. A marked negative correlation was observed between mitochondrial genes and TGF $\beta$ -regulated genes in human cells differentiated into white and beige adipocytes (Fig. 1f). Similar associations were seen in progenitor cells of human adipose tissue stromavascular fraction differentiated in primary cultures and in isolated mature white adipocytes<sup>15</sup> (Extended Data Fig. 4a). At the single cell level, a subpopulation of human adipocytes showed high gene expression of fatty acid oxidation and mitochondrial genes whereas another cell cluster was enriched in TGF $\beta$  target genes<sup>16</sup> (Extended Data Fig. 4b) in accordance with the profiles of two of the subtypes of human adipocytes identified during *in vitro* differentiation of progenitor cells<sup>17</sup>. High fat diet induction of obesity and insulin resistance resulted in respective up- and down-regulation of TGF $\beta$ - and mitochondriogenesis-related gene expression in mouse adipocytes<sup>18</sup> (Extended Data Fig. 4c). In adipose tissue and primary cultures of differentiated preadipocytes from non obese individuals with a wide range of whole-body insulin resistance, *PPARGCIA* mRNA expression was negatively correlated with adipo-IR, an index of fat cell resistance to insulin<sup>19</sup>, whereas expression of two TGF $\beta$  targets, *LOX* and *BAMBI*, showed a positive correlation (Extended Data Fig. 4d,e). These data indicate that the reciprocal regulation of oxidative and TGF $\beta$  targets

genes is a universal feature of adipocytes and that HSL is involved in the balance between the two pathways.

**Fig. 2: HSL mediates the repression of PGC-1 $\alpha$  expression by TGF $\beta$  signalling.**



**a-c**, hMADS3 adipocytes were transfected with siRNAs against HSL (*siLIPE*, grey bars) and green fluorescent protein (*siCTR*, white bars) ( $n=4$  replicates from 3-4 cell cultures). **(a)** Role of PGC1 $\alpha$  through depletion of PGC1 $\alpha$  and HSL (dark violet bars) and PGC1 $\alpha$  depletion (light violet bars). **(b)** Role of SMAD3 through depletion of SMAD3 and HSL (dark orange bars) and SMAD3 depletion (light orange bars). **(c)** Role of SMAD4 through depletion of SMAD4 and HSL (dark yellow bars) and SMAD4 depletion (light yellow bars). **d**, Immunoprecipitation of SMAD3 in subcutaneous adipose tissue of HSL-deficient (*Lipe*<sup>-/-</sup>) and wild-type (*Lipe*<sup>+/+</sup>) mice followed by HSL and SMAD3 immunodetection ( $n=2$ ). **e,f**, Interaction between HSL and SMAD3 in hMADS3 adipocytes. **(e)** In situ proximity ligation assays (red signals) using anti-HSL and anti-SMAD3 antibodies (PLA HSL/SMAD3) or anti-HSL and anti-SMAD4 antibodies (PLA HSL/SMAD4). Nuclei were labelled in blue using DAPI. Scale bars 10 $\mu$ m. **(f)** Immunoprecipitation of SMAD3 followed by HSL and SMAD3 immunodetection ( $n=2$ ). Data are mean  $\pm$  s.e.m. Statistical analysis was performed using 1-Way ANOVA with Tukey's post hoc-test. \*\*\* $P<0.001$ .

### HSL and SMAD3 control PGC-1 $\alpha$ expression

The increase of the mitochondrial activity in HSL-depleted adipocytes suggested the involvement of PGC-1 $\alpha$ . Supporting this, PGC-1 $\alpha$ , but not PGC-1 $\beta$  protein levels, were increased *in vitro* and *in vivo* in adipocytes deficient in HSL (Extended Data Fig. 5a-c). In HSL-depleted white and beige adipocytes, *PPARGC1A* mRNA and pre-mRNA levels were increased

(Extended Data Fig. 5d,e). Degradation rates of *PPARGC1A* mRNA were similar in control and *LIPE* siRNA-treated adipocytes pointing at modulation of *PPARGC1A* transcription and pre-mRNA elongation (Extended Data Fig. 5f). The direct involvement of PGC-1 $\alpha$  in the up-regulation of mitochondrial genes was shown in adipocytes transfected with combination of various siRNAs. The induction of both mitochondrial genes and their other transcriptional controllers mediated by HSL depletion (*siLIPE* vs. *siCTR*) was markedly blunted when adipocytes were depleted in PGC-1 $\alpha$  (*siPPARGC1A/siLIPE* vs. *siPPARGC1A*) (Fig. 2a, Extended Data Fig. 5g). However, *PPARGC1A* knock-down had no effect on the down-regulation of TGF $\beta$  targets induced by HSL depletion (Extended Data Fig. 5h). These data suggest that induction of *PPARGC1A* pre-mRNA synthesis mediates the effect of HSL depletion on energy metabolism in adipocytes, whereas the down-regulation of TGF $\beta$  target genes is driven through alternative mechanisms.

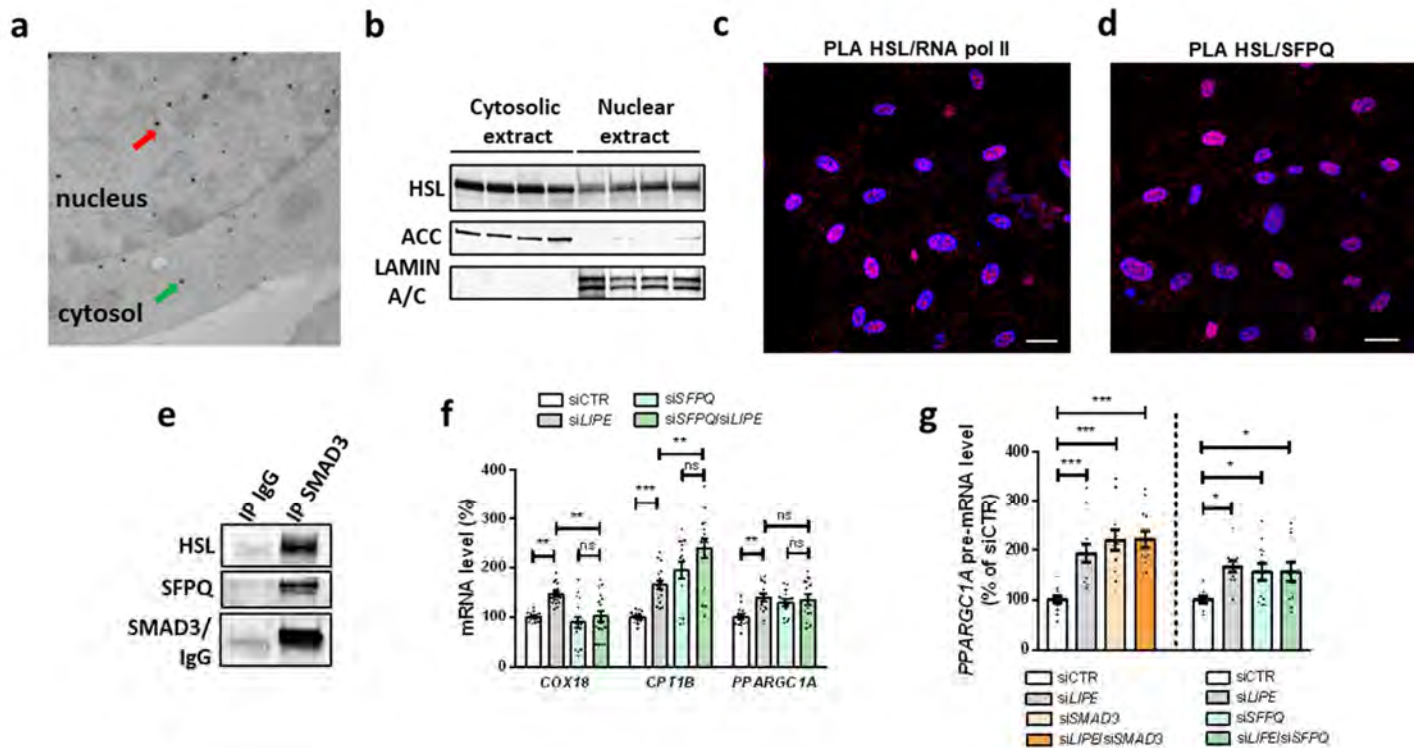
We thus hypothesized that the TGF $\beta$  signalling pathway is involved in the regulation of both extracellular matrix and PGC-1 $\alpha$  target genes. TGF $\beta$ 1 is secreted from human adipocytes (Extended Data Fig. 6a). However, the production is not modified by HSL depletion. Inhibition of type I TGF $\beta$  receptor signalling increased whereas treatment with recombinant TGF $\beta$ 1 repressed *PPARGC1A* mRNA level (Extended Data Fig. 6b). In HSL-depleted adipocytes, the induction of PGC-1 $\alpha$  and mitochondrial genes was attenuated when type I TGF $\beta$  receptor signalling was inhibited (Extended Data Fig. 6c). SMAD3, a major intracellular effector of TGF $\beta$  signalling, could regulate *PPARGC1A* transcription in human adipocytes as it has previously been shown to modulate PGC-1 $\alpha$  expression in mouse adipose tissues<sup>20-22</sup>. In line, chromatin immunoprecipitation experiments showed that SMAD3 binds the proximal minimal promoter region of *PPARGC1A* in human adipocytes (Extended Data Fig. 6d). Similar to *PPARGC1A* gene silencing and TGF $\beta$  receptor inhibition, *SMAD3* gene silencing prevented the induction of mitochondrial genes in HSL-depleted adipocytes, indicating that HSL and SMAD3

work in concert (Fig. 2b, Extended Data Fig. 6e). Unlike *PPARGC1A* knock-down (Extended Data Fig. 5h), inhibition of type I TGF $\beta$  receptor signalling and *SMAD3* knock-down abrogated the down-regulation of TGF $\beta$  target genes mediated by HSL depletion (Extended Data Fig. 6c,f). In the canonical TGF $\beta$  pathway, SMAD4 combines with activated SMAD3 to form a complex which translocates into the nucleus<sup>20,21</sup>. Unlike *SMAD3*, *SMAD4* knock-down had no effect on the induction of mitochondrial genes in HSL-depleted adipocytes (Fig. 2b,c, Extended Data Fig. 6e). As observed in other cell types<sup>4</sup>, single *SMAD3* and *SMAD4* gene silencing reduced extracellular matrix gene expression (Extended Data Fig. 6f,g). As for mitochondrial gene expression SMAD3 but not SMAD4 depletion abrogated the reduction of extracellular matrix gene mediated by HSL depletion (Extended Data Fig. 6f,g). These data suggest that HSL participates, in adipocytes, in non-canonical SMAD3 signaling regulating TGF $\beta$  targets, notably *PPARGC1A* and extracellular matrix genes. TGF $\beta$  treatment in HSL-depleted adipocytes failed to induce maximal genic response compared with control cells, highlighting a crucial role of HSL in adipocyte TGF $\beta$  signaling (Extended Data Fig. 6h)

We next evaluated whether the catalytic activities of HSL and ATGL, which precedes HSL in the sequential breakdown of trigacylglycerol during adipocyte lipolysis<sup>2</sup>, is involved in the regulation of PGC-1 $\alpha$ - and TGF $\beta$ -pathways. Chronic treatment with an inhibitor of HSL and siRNA-mediated depletion of ATGL did not modify *PPARGC1A* and TGF $\beta$  target gene expression in white and beige adipocytes (Extended Data Fig. 6i-l). HEK-293T cells transfected with vectors encoding either full-length human HSL or a catalytically inactive form<sup>23</sup> resulted in decreased levels of OXPHOS proteins (Extended Data Fig. 6m). As HSL catalytic activity is not involved, we envisaged the involvement of HSL in protein–protein interaction with SMAD3. Co-immunoprecipitation experiments showed interaction between HSL and SMAD3 in mouse adipose tissue (Fig. 2d). HSL interaction with SMAD3 but not SMAD4 was observed in human adipocytes (Fig. 2e, Extended Data Fig. 6n,o)<sup>24</sup>. HSL/SMAD3 fluorescence signals

were detected in the cytosol and the nucleus (Fig. 2e, Extended Data Fig. 6p). Subcellular fractionation confirmed the occurrence of HSL/SMAD3 interaction in cytosolic and nuclear extracts (Fig. 2f). These data suggest that HSL and SMAD3 control *PPARGC1A* gene expression in adipocyte nuclei.

**Fig. 3: Nuclear HSL interacts with SMAD3 and SFPQ to control PGC-1 $\alpha$  expression.**



**a**, Immunogold electron microscopy of nuclear (red arrow) and cytosolic HSL (green arrow) in mouse differentiated preadipocytes. **b**, Representative blot of HSL protein in cytosolic and nuclear extracts from mouse subcutaneous adipose tissue (n=8). ACC, acetyl CoA carboxylase. **c,d**, In situ proximity ligation assays (red signals) in hMADS3 adipocytes using anti-HSL and anti-RNA pol II (**c**, PLA HSL/RNA pol II) or anti-HSL and anti-SFPQ (**d**, PLA HSL/SFPQ). Nuclei were labelled in blue using DAPI. Scale bars, 10  $\mu$ m. **e**, Immunoprecipitation of SMAD3 in nuclear extracts followed by immunodetection of HSL, SFPQ and SMAD3 (n=3 biologically independent samples). **f** hMADS3 adipocytes were transfected with siRNAs against green fluorescent protein (siCTR, white bars), HSL (siLIPE, grey bars), SFPQ (siSFPQ, light green bars) or both HSL and SFPQ (siSFPQ/siLIPE, dark green bars) (n=4 replicates from 4 cell cultures) **g**, Pre-mRNA levels of *PPARGC1A* (n=3-4 replicates from 3 cell cultures). Data are mean  $\pm$  s.e.m. Statistical analysis was performed using 1-Way ANOVA with Tukey's post-hoc test. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.



### HSL, SMAD3 and SFPQ nuclear complex

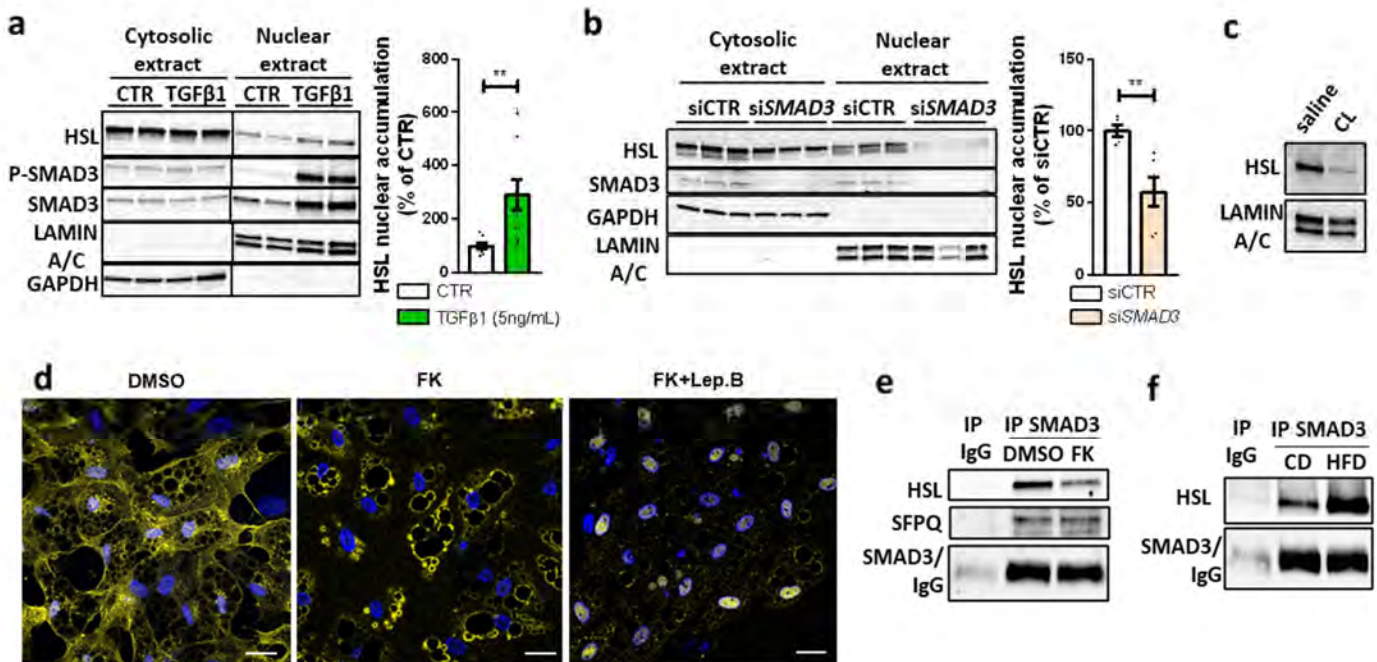
Transmission electron microscopy, subcellular fractionation and confocal microscopy brought direct evidence for the localization of HSL in the nucleus of mouse and human adipocytes (Fig. 3a,b, Extended Data Fig. 7a-e). Furthermore, during adipocyte differentiation, both cytoplasmic and nuclear pools of HSL increased (Extended Data Fig. 7f). In nuclei, HSL was found in the chromatin fraction and associated with the C-terminal domain of RNA polymerase II (Fig. 3c, Extended Data Fig. 7g,h). In accordance with such an interaction, adenovirus-mediated expression of a nuclear-targeted HSL repressed *PPARGCIA* and *OXPPOS* gene expression in preadipocytes (Extended Data Fig. 7i,j). Rapid immunoprecipitation mass spectrometry of endogenous proteins was used to identify chromatin-associated proteins interacting with nuclear HSL in adipocytes<sup>25</sup> (Extended Data Fig. 7k). SFPQ (splicing factor proline and glutamine rich) attracted our attention as it has been shown to be part of the SMAD3 interactome<sup>26</sup>. SFPQ is involved in several steps of gene regulation including transcriptional repression and pre-mRNA processing<sup>27</sup>. In human adipocytes, the interaction between HSL and SFPQ was exclusively nuclear (Fig. 3d). Immunoprecipitation using antibodies against the putative partners suggests the existence of a complex containing HSL, SMAD3 and SFPQ in nuclei of adipocytes (Fig. 3e, Extended Data Fig. 7l) and HEK-293T cells expressing nuclear HSL (Extended Data Fig. 7m). As shown for HSL, SFPQ interacts with the C-terminal domain of RNA polymerase II in adipocytes (Extended Data Fig. 7h,n). Similar to *PPARGCIA* and *SMAD3* knock-down (Fig. 2a,b), *SFPQ* gene silencing reversed HSL depletion-mediated induction of mitochondrial genes (Fig. 3f, Extended Data Fig. 7o). However, no effect was observed on TGF $\beta$  extracellular matrix targets, restricting the role of SFPQ to the SMAD3/HSL-mediated regulation of PGC-1 $\alpha$ -controlled genes (Extended Data Fig. 7p). Individual knock-down of HSL, SMAD3 and SFPQ yielded an increase of similar magnitude in *PPARGCIA* pre-mRNA and mRNA levels (Fig. 2b and 3f,g). Moreover, a double knock-

down did not result in additive induction in line with an interaction between the 3 partners in controlling *PPARGC1A* gene expression. These data demonstrate that, through protein-protein interactions, a HSL/SMAD3/SFPQ nuclear complex represses *PPARGC1A*.

### Regulation of nuclear HSL trafficking

Treatment of human adipocytes with recombinant TGFβ1 induced phosphorylation and nuclear translocation of SMAD3 as well as nuclear accumulation of HSL without change in phosphorylation status of HSL (Fig. 4a, Extended Data Fig. 8a).

**Fig. 4: HSL nuclear shuttling is modulated by TGFβ and catecholamine signalling.**



**a,b**, HSL nuclear accumulation in hMADS3 adipocytes treated with 5 ng/mL TGFβ1 (**a**) or transfected with SMAD3-targeting or control siRNA (**b**) (n=1-4 replicates from 2-3 cell cultures). GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **c**, Immunodetection of HSL in adipocyte nuclear extracts from subcutaneous white adipose tissue of mice treated with saline or CL316,243 (CL) (n=2). **d**, HSL immunostaining (yellow) in hMADS3 adipocytes treated with DMSO, 10 μM forskolin (FK), or 10 μM forskolin in combination with leptomycin B (Lep.B) (n=6). Nuclei were labelled in blue using DAPI. Scale bars, 10 μm. **e**, Immunoprecipitation of SMAD3 followed by immunodetection of HSL, SFPQ and SMAD3 in nuclear extracts of hMADS3 adipocytes treated with vehicle (DMSO) or forskolin (FK) (n=2). **f**, Immunoprecipitation of SMAD3 followed by immunodetection of HSL, SFPQ and SMAD3 in subcutaneous white adipose tissue from mice fed a chow (CD) or a 60% high fat diet (HFD) for 10 weeks (n=2). Data are mean ± s.e.m. Statistical analysis was performed using unpaired t-test (**a, b**). \*\*P<0.01.

Furthermore, it enhanced the formation of the SMAD3/HSL and SMAD3/SMAD4 complexes *in vitro* in human adipocyte nuclei (Extended Data Fig. 8b,c). Recombinant TGF $\beta$ 1 also increased HSL nuclear accumulation *ex vivo* in mouse adipose tissue explants (Extended Data Fig. 8d). Depletion of SMAD3 but not of SMAD4 reduced levels of nuclear HSL in adipocytes (Fig. 4b, Extended Data Fig. 8e). These data reveal that TGF $\beta$ -mediated activation of SMAD3 induces formation of the canonical SMAD3/SMAD4 complex and of the cell-specific SMAD3/HSL complex in adipocyte nuclei.

Treatment of human adipocytes with leptomycin B, an inhibitor of the exportin CRM1 led to nuclear accumulation of HSL (Extended Data Fig. 9a) indicating that HSL, similar to SMAD4<sup>28</sup>, must be continuously shuttling between the nucleus and the cytoplasm, which is in line with a predicted nuclear export signal in the regulatory domain of HSL<sup>3</sup> (Extended Data Fig. 9b). Deletion of the predicted sequence resulted in accumulation of the mutant HSL protein in nuclei of HEK293T cells (Extended Data Fig. 9c). HSL is phosphorylated by the PKA on specific sites in the regulatory domain located close to the nuclear export signal (Extended Data Fig. 9b)<sup>3</sup>. Thus, treatment of human adipocytes with forskolin promoted a decrease in HSL nuclear content and its localization to the lipid droplet surface<sup>29</sup>, a process inhibited by the CRM1 inhibitor (Fig. 4c). Intracellular trafficking of HSL occurred without alterations in total HSL protein content (Extended Data Fig. 9d,e). Of note, the catalytic subunit of PKA is present in human adipocyte nuclei (Extended Data Fig. 9d). Such cAMP-dependent regulation was also shown *in vivo* in mouse adipocytes. Isolated adipocyte nuclei from mice acutely treated with a  $\beta_3$ -adrenergic receptor agonist, CL316,243, showed decreased nuclear HSL content in fat depots (Fig. 4d, Extended Data Fig. 9f)<sup>16</sup>. Similar to forskolin treatment, glucose and insulin deprivation of human adipocytes which mimics a fasting-like condition *in vitro*, induces HSL phosphorylation and nuclear export (Extended Data Fig. 9g-i). HSL nuclear export induced by

forskolin diminished interaction between HSL and, SMAD3 or SFPQ, in adipocyte nuclei without alterations of SMAD3 and SFPQ nuclear content and interaction (Fig. 4e, Extended Data Fig. 10a-d). Because we also observed that SMAD3/SFPQ nuclear interaction is not affected by the presence or absence of HSL (Extended Data Fig. 7m), we propose that HSL modulates the activity of the nuclear SMAD3/SFPQ complex rather than its formation. HSL therefore appears as a bona fide nuclear protein whose subcellular localization is regulated in an opposite manner by PKA and SMAD3. In a pathophysiological context, there is increased formation of the HSL/SMAD3 complex and HSL accumulation in adipocyte nuclei of mice fed a high fat diet (Fig. 4f, Extended Data Fig. 10e). In diet-induced obesity, the increase in adipocyte HSL nuclear content may contribute to the down-regulation of OXPHOS mRNAs and proteins (Extended Data Fig. 4c and 10f).

## Discussion

The role of TGF $\beta$  in metabolism and the mechanisms driving TGF $\beta$  actions in specific cell types remain largely unexplored<sup>4</sup>. Herein we show that the neutral lipase HSL exerts a non enzymatic role in adipocyte nuclei as an essential component of a complex with SMAD3 and the multifunctional mRNA processing protein SFPQ<sup>27</sup>. We propose a model whereby recruitment of this complex to the *PPARGC1A* proximal promoter facilitates interaction of SFPQ and HSL with RNA polymerase II (Extended Data Fig. 10g). The complex represses *PPARGC1A* pre-mRNA synthesis which in turn down-regulates mitochondrial metabolism. The HSL/SMAD3 complex also controls the expression of conventional TGF $\beta$  target genes. These genes encode components of the extracellular matrix, whose secretion and deposition are regulated by HSL. Interactions between SMAD3 and HSL and, between SMAD3 and SMAD4 are mutually exclusive. HSL therefore appears as an adipocyte-specific component of the TGF $\beta$

signalling pathway. Delineation of the respective targets of SMAD3/HSL and SMAD3/SMAD4 in adipocytes, however, requires further investigation.

Upon catecholamine stimulation of white and beige adipocytes, the dynamic inhibition by TGF $\beta$  of mitochondrial metabolism is released. Mechanistically, this is mediated by PKA which upon activation by catecholamines phosphorylates HSL. This phosphorylation event leads to nuclear export of HSL, which decreases its interaction with SMAD3/SFPQ and unleashes transcriptional repression of *PPARGCIA*. Lifting this inhibitory pathway may facilitate the catecholamine-induced transcriptional activation by ATF/CREB<sup>30</sup>. Interdependency between ATF/CREB activation and HSL nuclear export in the induction of mitochondrial metabolism remains to be addressed. Among lipases, HSL regulatory domain which is intrinsically disordered and shares no homology with other proteins<sup>3,31,32</sup>, confers a unique propensity for intracellular trafficking. Shuttling of adipocyte HSL between the nucleus, the cytosol and lipid droplets allows coordinated control of three major triacylglycerol metabolism pathways, lipolysis, de novo lipogenesis and fatty acid oxidation<sup>33,34</sup>. Moreover, HSL emerges as a connecting point of the PKA and TGF $\beta$  pathways in the nucleus.

During the development of obesity, adipose tissue production of TGF $\beta$  increases<sup>22,35</sup> whereas adipocyte sensitivity to catecholamine-induced lipolysis is impaired<sup>36</sup>. The increase in adipocyte nuclear HSL content during diet-induced obesity brings a new mechanism to these pathological adaptations. Excessive accumulation of nuclear HSL may contribute to the obesity-associated adipocyte malfunction illustrated by extracellular matrix deposition and impaired mitochondrial metabolism<sup>9,10,37,38</sup>. As a context-dependent co-activator and co-repressor, HSL emerges as a central integrator of adipocyte metabolic control and adaptation.

**References**

- 1 Chouchani, E. T. & Kajimura, S. Metabolic adaptation and maladaptation in adipose tissue. *Nat Metab* 1, 189-200, doi:10.1038/s42255-018-0021-8 (2019).
- 2 Morigny, P., Boucher, J., Arner, P. & Langin, D. Lipid and glucose metabolism in white adipocytes: pathways, dysfunction and therapeutics. *Nat Rev Endocrinol* 17, 276-295, doi:10.1038/s41574-021-00471-8 (2021).
- 3 Recazens, E., Mouisel, E. & Langin, D. Hormone-sensitive lipase: sixty years later. *Prog Lipid Res* 82, 101084, doi:10.1016/j.plipres.2020.101084 (2020).
- 4 Massague, J. TGFbeta signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 616-630, doi:10.1038/nrm3434 (2012).
- 5 Puigserver, P. & Spiegelman, B. M. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev* 24, 78-90, doi:10.1210/er.2002-0012 (2003).
- 6 Ghaben, A. L. & Scherer, P. E. Adipogenesis and metabolic health. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20, 242-258, doi:10.1038/s41580-018-0093-z (2019).
- 7 Puigserver, P. et al. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92, 829-839, doi:10.1016/s0092-8674(00)81410-5 (1998).
- 8 Tiraby, C. et al. Acquisition of brown fat cell features by human white adipocytes. *J Biol Chem* 278, 33370-33376, doi:10.1074/jbc.M305235200 (2003).
- 9 Bogacka, I., Ukropcova, B., McNeil, M., Gimble, J. M. & Smith, S. R. Structural and functional consequences of mitochondrial biogenesis in human adipocytes in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 6650-6656, doi:10.1210/jc.2005-1024 (2005).
- 10 Klimcakova, E. et al. Worsening of obesity and metabolic status yields similar molecular adaptations in human subcutaneous and visceral adipose tissue: decreased

metabolism and increased immune response. *J Clin Endocrinol Metab* 96, E73-82, doi:10.1210/jc.2010-1575 (2011).

11 Bezaire, V. et al. Contribution of adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase to lipolysis in hMADS adipocytes. *J Biol Chem* 284, 18282-18291, doi:10.1074/jbc.M109.008631 (2009).

12 Rodriguez, A. M. et al. Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J Exp Med* 201, 1397-1405, doi:10.1084/jem.20042224 (2005).

13 Mazzucotelli, A. et al. The transcriptional coactivator peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)gamma coactivator-1 alpha and the nuclear receptor PPAR alpha control the expression of glycerol kinase and metabolism genes independently of PPAR gamma activation in human white adipocytes. *Diabetes* 56, 2467-2475, doi:10.2337/db06-1465 (2007).

14 Barquissau, V. et al. White-to-brite conversion in human adipocytes promotes metabolic reprogramming towards fatty acid anabolic and catabolic pathways. *Mol Metab* 5, 352-365, doi:10.1016/j.molmet.2016.03.002 (2016).

15 Harms, M. J. et al. Mature Human White Adipocytes Cultured under Membranes Maintain Identity, Function, and Can Transdifferentiate into Brown-like Adipocytes. *Cell Rep* 27, 213-225 e215, doi:10.1016/j.celrep.2019.03.026 (2019).

16 Sun, W. et al. snRNA-seq reveals a subpopulation of adipocytes that regulates thermogenesis. *Nature* 587, 98-102, doi:10.1038/s41586-020-2856-x (2020).

17 Min, S. Y. et al. Diverse repertoire of human adipocyte subtypes develops from transcriptionally distinct mesenchymal progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116, 17970-17979, doi:10.1073/pnas.1906512116 (2019).

- 18 Roh, H. C. et al. Adipocytes fail to maintain cellular identity during obesity due to reduced PPARgamma activity and elevated TGFbeta-SMAD signaling. *Mol Metab* 42, 101086, doi:10.1016/j.molmet.2020.101086 (2020).
- 19 Gastaldelli, A., Gaggini, M. & DeFronzo, R. A. Role of Adipose Tissue Insulin Resistance in the Natural History of Type 2 Diabetes: Results From the San Antonio Metabolism Study. *Diabetes* 66, 815-822, doi:10.2337/db16-1167 (2017).
- 20 Derynck, R. & Budi, E. H. Specificity, versatility, and control of TGF-beta family signaling. *Sci Signal* 12, doi:10.1126/scisignal.aav5183 (2019).
- 21 Massague, J., Seoane, J. & Wotton, D. Smad transcription factors. *Genes Dev* 19, 2783-2810, doi:10.1101/gad.1350705 (2005).
- 22 Yadav, H. et al. Protection from obesity and diabetes by blockade of TGF-beta/Smad3 signaling. *Cell Metab* 14, 67-79, doi:10.1016/j.cmet.2011.04.013 (2011).
- 23 Laurell, H. et al. Species-specific alternative splicing generates a catalytically inactive form of human hormone-sensitive lipase. *Biochem J* 328 ( Pt 1), 137-143 (1997).
- 24 Soderberg, O. et al. Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nat Methods* 3, 995-1000, doi:10.1038/nmeth947 (2006).
- 25 Mohammed, H. et al. Endogenous purification reveals GREB1 as a key estrogen receptor regulatory factor. *Cell Rep* 3, 342-349, doi:10.1016/j.celrep.2013.01.010 (2013).
- 26 Bertero, A. et al. The SMAD2/3 interactome reveals that TGFbeta controls m(6)A mRNA methylation in pluripotency. *Nature* 555, 256-259, doi:10.1038/nature25784 (2018).
- 27 Knott, G. J., Bond, C. S. & Fox, A. H. The DBHS proteins SFPQ, NONO and PSPC1: a multipurpose molecular scaffold. *Nucleic Acids Res* 44, 3989-4004, doi:10.1093/nar/gkw271 (2016).



- 28 Pierreux, C. E., Nicolas, F. J. & Hill, C. S. Transforming growth factor beta-independent shuttling of Smad4 between the cytoplasm and nucleus. *Mol Cell Biol* 20, 9041-9054, doi:10.1128/MCB.20.23.9041-9054.2000 (2000).
- 29 Egan, J. J. et al. Mechanism of hormone-stimulated lipolysis in adipocytes: translocation of hormone-sensitive lipase to the lipid storage droplet. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 8537-8541, doi:10.1073/pnas.89.18.8537 (1992).
- 30 Herzig, S. et al. CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature* 413, 179-183, doi:10.1038/35093131 (2001).
- 31 Jumper, J. et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596, 583-589, doi:10.1038/s41586-021-03819-2 (2021).
- 32 Lieutaud, P., Canard, B. & Longhi, S. MeDor: a metasever for predicting protein disorder. *BMC Genomics* 9 Suppl 2, S25, doi:10.1186/1471-2164-9-S2-S25 (2008).
- 33 Morigny, P. et al. Interaction between hormone-sensitive lipase and ChREBP in fat cells controls insulin sensitivity. *Nat Metab* 1, 133-146, doi:10.1038/s42255-018-0007-6 (2019).
- 34 Vaughan, M., Berger, J. E. & Steinberg, D. Hormone-Sensitive Lipase and Monoglyceride Lipase Activities in Adipose Tissue. *J Biol Chem* 239, 401-409 (1964).
- 35 Alessi, M. C. et al. Plasminogen activator inhibitor 1, transforming growth factor-beta1, and BMI are closely associated in human adipose tissue during morbid obesity. *Diabetes* 49, 1374-1380, doi:10.2337/diabetes.49.8.1374 (2000).
- 36 Arner, P. & Langin, D. Lipolysis in lipid turnover, cancer cachexia, and obesity-induced insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab* 25, 255-262, doi:10.1016/j.tem.2014.03.002 (2014).
- 37 Henegar, C. et al. Adipose tissue transcriptomic signature highlights the pathological relevance of extracellular matrix in human obesity. *Genome Biol* 9, R14, doi:10.1186/gb-2008-9-1-r14 (2008).

38 Vila, I. K. et al. Immune cell Toll-like receptor 4 mediates the development of obesity- and endotoxemia-associated adipose tissue fibrosis. *Cell Rep* 7, 1116-1129, doi:10.1016/j.celrep.2014.03.062 (2014).

## Methods

### Human cell culture and associated in vitro measurements.

*Culture of hMADS adipocytes.* hMADS cells were cultured and differentiated into white and beige adipocytes as described in<sup>14</sup>. When indicated, adipocytes were directed towards a beige phenotype by addition of 100 nM of the PPAR $\gamma$  agonist, rosiglitazone between day 14 and day 18.

*Culture of human primary preadipocytes.* Human primary preadipocytes were obtained from subcutaneous adipose tissue of participants in the MONA (NCT02161926), LIMEX (NCT03155412), and EXODIA (NCT03386461) clinical trials<sup>39-41</sup>. MONA, LIMEX and EXODYA included, respectively, 25 obese men, 51 non-obese men, and 48 non-obese women. The studies were, respectively, conducted at the Clinical Investigation Center, Inserm, Toulouse University Hospital, France (MONA) and, at the Third Faculty of Medicine, Charles University and Kralovske Vinohrady University Hospital, Prague, Czech Republic (LIMEX and EXODYA). Studies were, respectively, approved by Comité de Protection des Personnes and Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM), France and, the ethics committee of the Third Faculty of Medicine, Charles University, Czech Republic. Volunteers signed an informed consent before participation in the studies. Isolation, culture and differentiation of preadipocytes has been described previously<sup>41,42</sup>.

*RNA interference.* RNA interference was achieved by siRNA. Briefly, on day 7 of differentiation, hMADS cells were detached from culture dishes with trypsin-EDTA (Invitrogen). Control siRNA against green fluorescent protein and gene specific siRNA for *LIPE*, *SFPQ* (Eurogentec), *PPARGCIA* (Dharmacon), *SMAD3* (Invitrogen) and *SMAD4* (Ambion) were delivered into adipocytes using a microporator (Invitrogen) (1100 V, 20 ms, 1 pulse). For seahorse experiments on hMADS, and gene expression in human primary

adipocytes, siRNA were delivered using Lipofectamine RNAimax (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. siCTR(GFP) GCAGCACGACUUCUUCAAG, siLIPE AGGACAACAUAAGCCUUCUU, siPPARGC1A GAGAAUUCAUGGAGCAAUA - GAAGAGCGCCGUGUGAUUU - ACACUCAGCUAAGUUAUAA - GCAGGUAACAUGUUCUCCUA, siSMAD3 UUGUUGAAGAUCUUCAGGUUGCAUC, siSMAD4 GCCCUAUUGUUACUGUUGA, siSFPQ UGUUCAAGUGGUUCCACAAUGACUG.

*Pharmacological treatments.* Chronic inhibition of HSL activity was achieved between day 7 and 18 of hMADS adipocyte differentiation using 1  $\mu$ M of BAY 59-9435 (NoValix). Inhibition of type I TGF $\beta$  receptor-mediated SMAD3 phosphorylation was achieved using 10  $\mu$ M SB431542 (Sigma) between day 14 and 18 of differentiation. TGF $\beta$ 1 (Peprotech) was used at 5 ng/mL for 3h to assess SMAD3/HSL interaction and nuclear translocation, and 24h to measure mRNA expression level. HSL phosphorylation was induced using 10  $\mu$ M of the adenylyl cyclase activator, forskolin (Sigma). The CRM1 exportin inhibitor, leptomycin (Sigma), was used for 8h at 50 nM to investigate HSL nuclear transport.

*Oxygen consumption rate.* hMADS cells were seeded into 24 multi-well plates (Seahorse Bioscience). Oxygen consumption rate (OCR) of differentiated preadipocytes was determined using an XF24 Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience). Cells were incubated 1h at 37 °C in unbuffered XF assay medium supplemented with 2 mM GlutaMAX, 1 mM sodium pyruvate and 10 mM glucose. Mito stress test was achieved through subsequent addition of oligomycin (1.2  $\mu$ M), FCCP (1  $\mu$ M), and rotenone/antimycin A (2  $\mu$ M each). Basal OCR was calculated by subtraction of rotenone- and antimycin A-induced OCR to the unstimulated OCR value. Maximal respiration was determined using FCCP. Proton leak was calculated by subtraction of FCCP-induced to rotenone- and antimycin A-induced OCR.

*Mitochondrial DNA quantitation.* Cells were scrapped in PBS and total DNA was extracted using DNeasy kit (Qiagen). The following primers were used in real-time quantitative PCR: *NAD1* (F : CCCTAAAACCCGCCACATCT R : GAGCGATGGTGAGAGCTAAGGT) and *NAD4* (F: CCATTCTCCTCCTATCCCTCAAC R : CACAATCTGATGTTTTGGTTAAACTATATTT) for mitochondrial DNA and, *LPL* (F : CGAGTCGTCTTTCTCCTGATGAT R : TTCTGGATTCCAATGCTTCG) for nuclear DNA. Mitochondrial DNA quantitation was calculated as  $2\Delta Ct$  of the two mitochondrial genes *NAD1* and *NAD4* using *LPL* as nuclear housekeeping gene.

*Oleate oxidation assays.* Oleic acid oxidation was assessed in hMADS adipocytes seeded in six-well plates as described<sup>43</sup>.

*Chromatin isolation.* For preparation of cytosolic and chromatin extracts for mRNA and pre-mRNA level quantitation, hMADS adipocytes were fractionated using Protein Subcellular Fractionation Kit for Tissues (Thermo Fisher Scientific) according to manufacturer's instruction.

*In situ proximity ligation assay and immunofluorescence.* Cells were fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma) for 15 min and permeabilized for 10 min at room temperature with 0.2% Triton X-100 (Sigma). The following primary antibodies were incubated overnight at 4°C: anti-HSL (murine antibody sc-74489, Santa Cruz Biotechnology or rabbit antibody, 18381, Cell Signaling Technology), anti-SMAD3 (rabbit antibody ab40854, Abcam), anti-SMAD4 (murine antibody sc-79661, Santa Cruz), anti-SFPQ (murine antibody ab11825, Abcam) and anti-RNAPolIII (rabbit antibody ab26721, Abcam). In situ proximity ligation assay was performed using Duolink In Situ reagents (Sigma). Incubation of antibodies, ligation of oligodeoxynucleotides and amplification were performed according to the manufacturer's instructions. For immunofluorescence assay, anti-mouse (Alexa-fluor 488-conjugated,

A11029) and anti-rabbit (Alexa-fluor 546-conjugated, Invitrogen) secondary antibodies at 1/300 dilution were incubated for 45 min. Nuclei were labelled using DAPI included into the mounting medium (DUO82040, Duolink). Confocal microscopy was performed using Zeiss LSM780. Image processing was similar for all conditions. The same settings were applied to entire images.

*Chromatin immunoprecipitation assays.* hMADS adipocyte cells ( $10^7$  cells per condition) were processed as described<sup>33</sup>. Genomic DNA regions of interest were isolated using an antibody against SMAD3 (25049, ActiveMotif). Quantitative PCR (qPCR) reactions were carried out in triplicate using SYBR Green Supermix (Bio-Rad, 170-8882) on a CFX Connect real-time PCR system. Positive and negative control sites were tested along with the sites of interest. The resulting signals were normalized for primer efficiency by carrying out qPCR for each primer pair using input DNA (pooled unprecipitated genomic DNA from each sample).

*Rapid immunoprecipitation mass spectrometry of endogenous proteins (RIME) Assay following chromatin immunoprecipitation.* hMADS adipocytes were fixed with 1% methanol-free formaldehyde for 8 min and quenched with 0.125 M glycine. Chromatin was isolated by the addition of lysis buffer, followed by disruption with a Dounce homogenizer. RIME-liquid chromatography-tandem mass spectrometry experiment was performed by Active Motif using an anti-HSL antibody (18381, Cell Signaling Technology) or an isotype-matched IgG control following published procedures<sup>44,45</sup>. Biological duplicates were prepared for each immunoprecipitation. Known common contaminants ([www.thegpm.org/crap](http://www.thegpm.org/crap)) were removed from the final nuclear protein list.

*DNA microarray.* Total RNA from white and beige hMADS adipocytes transfected with HSL- (siHSL) and GFP- (as control, siGFP) targeting siRNA was used to prepare Cyanine-3-labelled

cRNA and hybridize SurePrint G3 Human GE v3 microarray (8X60K, Design 072363). Experimental protocol and data analyses were performed as described in<sup>46</sup>.

*DNA constructs and cell transfection.* HEK293T cells (ATCC-CRL-3216) were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum (Invitrogen). HEK293T cells were transfected using lipofectamine 2000 (Invitrogen) with 1µg each of pcDNA3 expressing native human HSL, HA-tagged HSL (HA-HSL), short inactive HSL (HSL(s)), nuclear export signal-deleted HSL (HSLΔNES) or nuclear localization signal-tagged HSL (NLS-HSL) as well as empty plasmids. HSL(s) and HSLΔNES were, respectively, obtained through an isoform with a naturally occurring skipping of exon 6<sup>23</sup> and deletion between residues 566 to 580. Three copies of the SV40 T-antigen NLS were interted at the N-terminus of HSL to produce NLS-HSL. hMADS3 preadipocytes were transduced with adenoviral particles encoding NLS-HSL (VectorBiolabs).

*Protein analyses in human adipocyte culture media.* For each sample, 2 ml of conditioned medium were first cooled on ice. Sodium lauroyl sarcosinate was added to a final concentration of 0.1%. After mixing, TCA was added to a final 7.5% concentration, and the solution was precipitated on ice for 2 h. The mixed protein-detergent precipitate was collected by centrifugation (10,000g, 10 min at 4°C). The supernatant was carefully removed and the pellet was washed four times with 2 ml of tetrahydrofuran (precooled in ice). Finally, the pellet was redissolved in 100 µl of 40 mM Tris pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol with the help of a sonicator bath for 15 min. The protein concentration was determined using the DC™ Protein Assay kit (Bio-Rad). Then, 30 µg of proteins were reduced with 25mM DTT for 5 min at 95°C and alkylated with 90mM iodoacetamide for 30 min at RT in the dark. Protein samples were loaded onto a 1D SDS-PAGE gel (0.15 x 8 cm) and the electrophoretic migration was stopped as soon as the proteins entered the separating gel, in order to isolate all proteins in a single gel band. The corresponding gel slice was excised and washed with 100 mM ammonium bicarbonate buffer. Proteins were in-gel digested using 1 µg of modified sequencing grade trypsin

(Promega) in 50 mM ammonium bicarbonate overnight at 37°C. The resulting peptides were extracted in 50 mM ammonium bicarbonate followed by 10% formic acid/acetonitrile (1/1 v/v). The peptidic fractions were dried under speed-vacuum and resuspended with 5% acetonitrile, 0.05% trifluoroacetic acid for further MS analysis. Peptides were analyzed by nanoLC-MS/MS using an UltiMate 3000 RSLCnano system coupled to a Q-Exactive Plus mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) as previously described<sup>47</sup>, except that peptides were eluted using a 5 to 50% gradient of solvent B over 300 min at a flow rate of 300 nL/min. Raw mass spectrometry files were processed with the MaxQuant software (version 1.5.2.8) for database search with the Andromeda search engine and quantitative analysis. Parameters were set as previously described<sup>48</sup>, except that data were searched against human entries of the Reference proteome database (Proteome ID UP000005640, last modified March 7, 2021). The “LFQ” metric from the MaxQuant “protein group.txt” output was used to quantify proteins. The LFQ values were log<sub>2</sub> transformed using the Perseus toolbox (version 1.6.7.0) and missing values were replaced by random numbers drawn from a normal distribution with a width of 0.3 and down shift of 1.8. For statistical analysis, a two-tailed Welch t-test allowing for unequal variance between groups was performed, followed by the Benjamini–Hochberg false-discovery rate correction for multiple testing. Graphs are plotted as raw p-values and reported as significant only if the adjusted  $p < 0.05$ .

### **Mouse models.**

*Lipe*<sup>-/-</sup> mice on the C57BL/6/J genetic strain have been previously described<sup>33,49</sup>. For assessment of HSL nuclear content following high fat diet feeding, Swiss-CD1 male mice were fed a high fat diet containing 60% of fat during 10 weeks. Mice were housed and manipulated according to Inserm guidelines and European Directive 2010/63/UE in the local animal care facility (agreements A 31 555 04 and C 31 555 07). Protocols were approved by the French Ministry



of Research after review by local ethical committee (comité d'éthique en expérimentation animale de l'UMS006/CREFRE, CEEA122, Toulouse, France).

*Culture of mouse primary preadipocytes.* Isolation, culture and differentiation of preadipocytes has been previously described<sup>42,49</sup>.

*Mouse adipose tissue explants.* Mouse subcutaneous adipose tissue were minced into pieces of around 1-2 mm and rinsed with PBS<sup>42</sup>. Explants were then incubated in Krebs-Ringer Buffer with 2% BSA and 2 mM glucose at 37°C. 10ng/mL of TGFβ1 was added during 4h before harvest and snap freezing. Subcellular fractionation was performed as described for freshly isolated adipose tissue.

*TGFβ and fatty acid oxidation gene signature analysis in mouse adipocyte nuclei.* Adipocyte nuclei were isolated following a modified nuclear isolation protocol<sup>16</sup>. 300-400mg fresh adipose tissues from Nuclear Red mice were minced to 1-3 mm pieces by scissor on ice. The minced tissue was homogenized in Dounce homogenizer on ice with 0.1% CHAPS in CST buffer, lysed for 5 minutes, quenched by 1% BSA in PBS and filtered through a 40-μm cell strainer. The nuclei pellet was obtained following two rounds of centrifugation at 500g for 5 min at 4 °C, washing and suspension in PBS with 1% BSA. The preparation of nuclei was filtered through 35 μm strainers. Nuclei were stained with Hoechst 33342 and loaded to a BD FACSAria III specifications with 130 um nozzle and sorted into a 1.5-ml tube and sorted based on (Nuclear Red) RFP fluorescence and Hoechst. snRNAseq datasets were obtained from human deep neck adipose tissue<sup>16</sup>. Briefly, the snRNAseq data were analyzed by Seurat. Gene signature scores were evaluated by AddModuleScore function. SMAD3, COL1A1, COL1A2, COL6A3, COL7A1, COL11A1, THBS1, THBS2, TNC, FN1, VTN, TIMP1, TIMP3, MMP11, MMP2, MMP16, LOX, LOXL1, LOXL2, LOXL3, SMAD6, SMAD7, SKIL, TGFBI, SERPINE1, SERPINE2, SNAI1, SNAI2 were used for TGFβ gene signature. ACAT1,

ACADM, ACADVL, ACADL, ACADS, ACSL1, ACSL6, ACSL5, ECHS1, ECHDC3, HADHA, HADH, CRAT, DECR1, CPT1B, CPT2, UCP1, PLIN5, ELOVL3, PPARGC1A were used for fatty acid oxidation gene signature.

**In vitro experiments common to mouse and human models.**

*Gene and protein expression analysis.* Reverse transcription-real-time quantitative PCR and Western Blot analyses was performed as described<sup>33</sup>.

*qPCR primers and Assay-on-Demands.* Human primers : hLRP10 F : GGGTAGACCACAGAAGCTCCGGG R : GGGTTAAGCGCTCTGAGCCACAG, hLIPE F : GTGCAAAGACGGAGGACCACTCCA R : GACGTCTCGGAGTTTCCCCTCAG, hPPARGC1A F : CTGTGTCACCACCCAAATCCTTAT R : TGTGTCGAGAAAAGGACCTTGA, hPPARGC1A pre-mRNA : F ACTCAGTTTGAACCCTTGTCTGA, R AGGAGTGGTGGGTGGAGTTA, hUCP1 F : TGCCCAACTGTGCAATGAA R : TCGCAAGAAGGAAGGTACCAA, hCPT1B F : TACAACAGGTGGTTTGACA R : CAGAGGTGCCCAATGATG, hTNC F : CCTTGCTGTAGAGGTCGTCA R : CCAACCTCAGACACGGCTA, hTFAM F : GATTCCAAGAAGCTAAGGGTGATTC R : TCAGAGTCAGACAGATTTTCCAGTT, hNRF1 : AACGGAAACGGCCTCATGTA R : GCTCGAAGTTTCCGAAGCAA, hCOL1A1 F : GTCAGATGGGCCCCCG R : CACCATCATTTCACGAGCA, hTHBS1 F : AGTCGTCTCTGCAACAACCC R : ACAGGCATCCATCAATTGGACA, hSMAD3 F : AACGGGCAGGAGGAGAAATG R : ATCCAGGGACCTGGGGATG, hSMAD4 F : CCAGCTCTGTTAGCCCCATC R : TACTGGCAGGCTGACTTGTG, hNDUFA10 F : TACATCAGTTCAGAGAGCTGCC R : CAGATCCACTTGTCTCCCACC, hSDHC F : CTGCGCTGTTGCTGAGACAC R : TCTGATACAGAGCTGAGGGCT, hUQCRI0 F : ATCATCGTGGGCGTCATGTT R : TTTCCACAGCTTCCCCTCGT, hCOX18 F :

CATCCTGGCCAAGGTGGAAA R : ACCCCAAGTATTGACACGA, hPPARGC1B F :  
 CTATCTCGCTGACACGCAGG R : GAGTTCTCTGGGCACCACTG, hSFPQ F :  
 AGCTAATCCTGGCGTTCCAC R : AAGCGCTCAGTACGCATGTC, hESRRA F :  
 GGCATTGAGCCTCTCTACATCA R : TCTCCGAGGAACCCTTTGG, hGABPA F :  
 CACACTTCTAGTCGCGGGAG R : AAAGGATCAGTCCCCTCCG. Human AOD :  
 hELOVL3 Hs00537016\_m1, hPLIN5 Hs00965990\_m1, hCIDEA Hs00154455\_m1.

Mouse primers : mHprt F : TGGCCATCTGCCTAGTAAAGC R :  
 GGACGCAGCAACTGACATTTTC, mLipe F : ACTCAACAGCCTGGCAAAAT R :  
 AGGTCACAGTGCTTGACAGC, mColla1 F : CGATGGATTCCCGTTTCGAGT R :  
 GAGGCCTCGGTGGACATTAG, mThbs1 F : TGGCCAGCGTTGCCA R :  
 TCTGCAGCACCCCTGAA, mPparg1a F : AAAGGATGCGCTCTCGTTCA R :  
 GGAATATGGTGATCGGGAACA, mUcp1 F : CCTGCCTCTCTCGGAAACAA R :  
 TGTAGGCTGCCCAATGAACA, mCpt1b F : CCGGAAAGGTATGGCCACTT R :  
 GAAGAAAATGCCTGTGCGCC.

*Antibodies for Western Blot.* LAMIN A/C (4777, Cell Signaling Technology), GAPDH (2118, Cell Signaling Technology), PGC1 $\alpha$  (NBP1-04676, Novus), PGC1 $\beta$  (ab176328, Abcam), HSL (18381, Cell Signaling Technology), HSL-P660 corresponding to Ser<sup>650</sup> in human HSL (4126, Cell Signaling Technology), SFPQ (ab11825, Abcam), UCP1 (ab10983, Abcam), OXPHOX (ab110411, Abcam), SMAD3 (ab40854, Abcam), P-SMAD3 (ab52903, Abcam), SMAD4 (sc-79661, Santa Cruz), ACC (3662, Cell Signaling Technology), H3K9me2 (ab32521, Abcam), RNAPolIII (ab26721, Abcam), FABP4 (10004944, Cayman), PKAc (4782, Cell Signaling Technology), H3 (4499, Cell Signaling Technology), ATGL (2138, Cell Signaling Technology). Anti-rabbit IgG, anti-mouse IgG or protein A coupled to horseradish peroxidase were used as secondary antibodies.

*Cellular subfractionation.* Protein nuclear and cytosolic fractions from hMADS adipocytes and mouse adipose tissues were prepared using Nuclear Extract Kit (40010, Active Motif). Cells were rinsed with PBS and immediately scrapped into 1x hypotonic buffer. Adipose tissue pads were ground in liquid nitrogen and lysed using the NE-PER nuclear and cytoplasmic extraction reagent kit (78835, Thermo Fisher Scientific). Subsequent steps followed the manufacturer's protocols. Antibodies to cytosolic and nuclear markers were used as indicated to analyze the purity of cellular fractionation. For nuclear RNA isolation, hMADS adipocytes were prepared using Nuclei EZ Prep (NUC101-1KT, Sigma) according to manufacturer's instruction. Nuclear extracts were resuspended in RLT- $\beta$  mercaptoethanol 1% (Qiagen). Gene expression was assessed as described above.

*Immunoprecipitation.* For endogenous nuclear co-immunoprecipitation in hMADS adipocytes, nuclear extracts were resuspended in lysis buffer q.s.p 500 $\mu$ L (50 mM Tris pH8, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% NP40). Preclearing was performed incubating nuclear extracts with 40  $\mu$ L protein A or G magnetic beads (Invitrogen) at 4 °C for 1h. Beads were discarded and supernatants were incubated with 5  $\mu$ g anti-HSL (4107, Cell Signaling Technology) or 8  $\mu$ g anti-SMAD3 (ab40854, Abcam), 7  $\mu$ g anti-SMAD4 (sc-79661, Santa Cruz), 7  $\mu$ g anti-SFPQ (ab11825, Abcam) overnight at 4°C. As a negative control of immunoprecipitation, respective amount of control rabbit (2729, Cell Signaling Technology), or mouse (sc-2025, Santa Cruz) IgG was used. 25 $\mu$ L protein A or G magnetic beads were added for 20min at 4°C. Beads were washed four times with lysis buffer before elution in 2x Laemmli buffer. For endogenous co-immunoprecipitation in mouse adipose tissue, frozen fat was crushed into powder using a mortar. For whole extract, tissue powder was lysed into lysis buffer 1h at 4°C. Nuclear extracts were resuspended in lysis buffer up to 500 $\mu$ L. Further steps are identical to the ones described above for hMADS adipocytes.

## **Statistics**

All data are mean  $\pm$  s.e.m. Number of experimental replicates and biologically independent experiments are indicated in Figure legends. Statistical analyses and graphical representations were performed using GraphPad Prism 9. Following D'Agostino-Pearson and Shapiro-Wilk normality tests, parametric (unpaired Student's t-test, one-way ANOVA) or non-parametric (Mann-Whitney, Kruskal Wallis) tests were used as indicated. Two-Way ANOVA with Sidak post-hoc test and Person correlation test were used as indicated. All tests were two-tailed. Confidence level was 95%. Statistical tests for large data sets are described in relevant sections (DNA microarray and Protein analyses in human adipocyte culture media). Pathway analysis was performed using the ENRICH web-based tool<sup>50,51</sup>.

### **Data availability**

The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository (<https://www.ebi.ac.uk/pride/>) with the dataset identifier PXD029261. Gene expression data have been deposited at the NCBI's public functional genomics data repository Gene Expression Omnibus (GSE186544). Full scans for all Western blots are provided in the Supplementary Information. All other data are available from the corresponding author on reasonable request. Source data are provided with this paper.

### **References**

- 39 Cizkova, T. et al. Exercise Training Reduces Inflammation of Adipose Tissue in the Elderly: Cross-Sectional and Randomized Interventional Trial. *J Clin Endocrinol Metab* 105, doi:10.1210/clinem/dgaa630 (2020).
- 40 Koc, M. et al. Signs of Deregulated Gene Expression Are Present in Both CD14(+) and CD14(-) PBMC From Non-Obese Men With Family History of T2DM. *Front Endocrinol (Lausanne)* 11, 582732, doi:10.3389/fendo.2020.582732 (2020).

- 41 Vion, J. et al. Metabolic and cardiovascular adaptations to an 8-wk lifestyle weight loss intervention in younger and older obese men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 321, E325-E337, doi:10.1152/ajpendo.00109.2021 (2021).
- 42 Dufau, J. et al. In vitro and ex vivo models of adipocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*, doi:10.1152/ajpcell.00519.2020 (2021).
- 43 Ribet, C. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha control of lipid and glucose metabolism in human white adipocytes. *Endocrinology* 151, 123-133, doi:10.1210/en.2009-0726 (2010).
- 44 Heslop, J. A., Pournasr, B., Liu, J. T. & Duncan, S. A. GATA6 defines endoderm fate by controlling chromatin accessibility during differentiation of human-induced pluripotent stem cells. *Cell Rep* 35, 109145, doi:10.1016/j.celrep.2021.109145 (2021).
- 45 Venturutti, L. et al. TBL1XR1 Mutations Drive Extranodal Lymphoma by Inducing a Pro-tumorigenic Memory Fate. *Cell* 182, 297-316 e227, doi:10.1016/j.cell.2020.05.049 (2020).
- 46 Recazens, E. et al. ChREBPbeta is dispensable for the control of glucose homeostasis and energy balance. *JCI Insight* in press (2021).
- 47 Mori, D. et al. The T cell CD6 receptor operates a multitask signalosome with opposite functions in T cell activation. *J Exp Med* 218, doi:10.1084/jem.20201011 (2021).
- 48 Voisinne, G. et al. Quantitative interactomics in primary T cells unveils TCR signal diversification extent and dynamics. *Nat Immunol* 20, 1530-1541, doi:10.1038/s41590-019-0489-8 (2019).
- 49 Girisso, A. et al. Partial inhibition of adipose tissue lipolysis improves glucose metabolism and insulin sensitivity without alteration of fat mass. *PLoS Biol* 11, e1001485, doi:10.1371/journal.pbio.1001485 (2013).
- 50 Kuleshov, M. V. et al. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res* 44, W90-97, doi:10.1093/nar/gkw377 (2016).

51 Xie, Z. et al. Gene Set Knowledge Discovery with Enrichr. *Curr Protoc* 1, e90, doi:10.1002/cpz1.90 (2021).

**Acknowledgements** We thank Bruno Antony (IPMC, CNRS Université Côte d’Azur) and Gautier Langin (ZMBP, Universität Tübingen) for critical reading on the manuscript and, Sonia Longhi (AFMB, CNRS Aix-Marseille Université) and Frédéric Carrière (BIP, CNRS Aix-Marseille Université) for prediction of HSL regulatory domain structure. Remy Flores-Flores and Alexandre Lucas (I2MC, Inserm, Université Toulouse III) brought expertise in cell imaging and metabolic analyses. This work was supported by Inserm, Université Toulouse III, European Foundation for the Study of Diabetes (EFSD/Novo Nordisk Programme for Diabetes Research in Europe 2019 to DL), Fondation pour la Recherche Médicale (DEQ20170336720 to DL), Agence Nationale de la Recherche (ANR-17-CE14-0015Hepadialogue to CP and DL), Région Occitanie (to DL), AstraZeneca France (to DL) and European Research Council (ERC) under the European Union’s Horizon 2020 research and innovation programme (SPHERES, ERC Synergy Grant agreement No 856404 to MR and DL). Proteomic work was supported in part by Région Occitanie, Fonds Européens de Développement Régional (FEDER), Toulouse Métropole, and by the French Ministry of Research (PIA, “Infrastructures Nationales en Biologie et Santé” program, Proteomics French Infrastructure (ProFI) project, ANR-10-INBS-08 to OBS).

**Author contributions** E.R., J.D. and D.L. conceived and designed the study; E.R., J.D., A.M., E.M., G.T. and M-A.M. performed all the experimental work except for that described below. T.W. and C.W. collected mouse adipocyte nuclei and, analysed snRNAseq data; M.S. and L.R. collected and analysed human adipose tissue samples; J.S.I. mined transcriptome and ChIPSeq data; K.C. and O.B.-S. conducted and analysed proteomics data. E.R., J.D. and D.L. wrote the manuscript, with editing from E.M., M.S., H.L., P.-D.D., C.M., M.H., E.-Z.A., C.P., L.R., N.M., M.R. and C.W. D.L. supervised the project. All authors approved the manuscript.

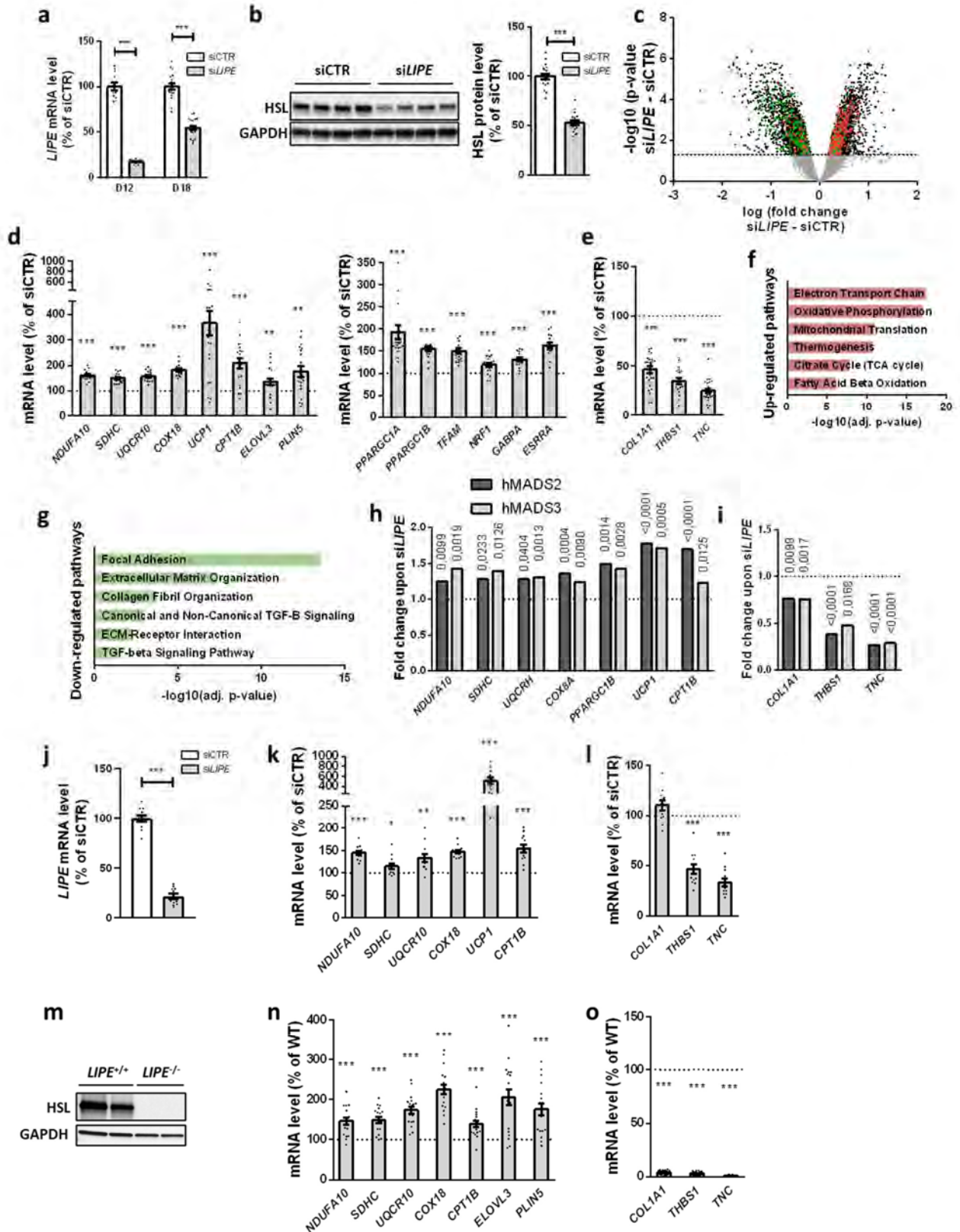


**Competing interests** M.H. was an employee of AstraZeneca. The other authors declare no competing interests.

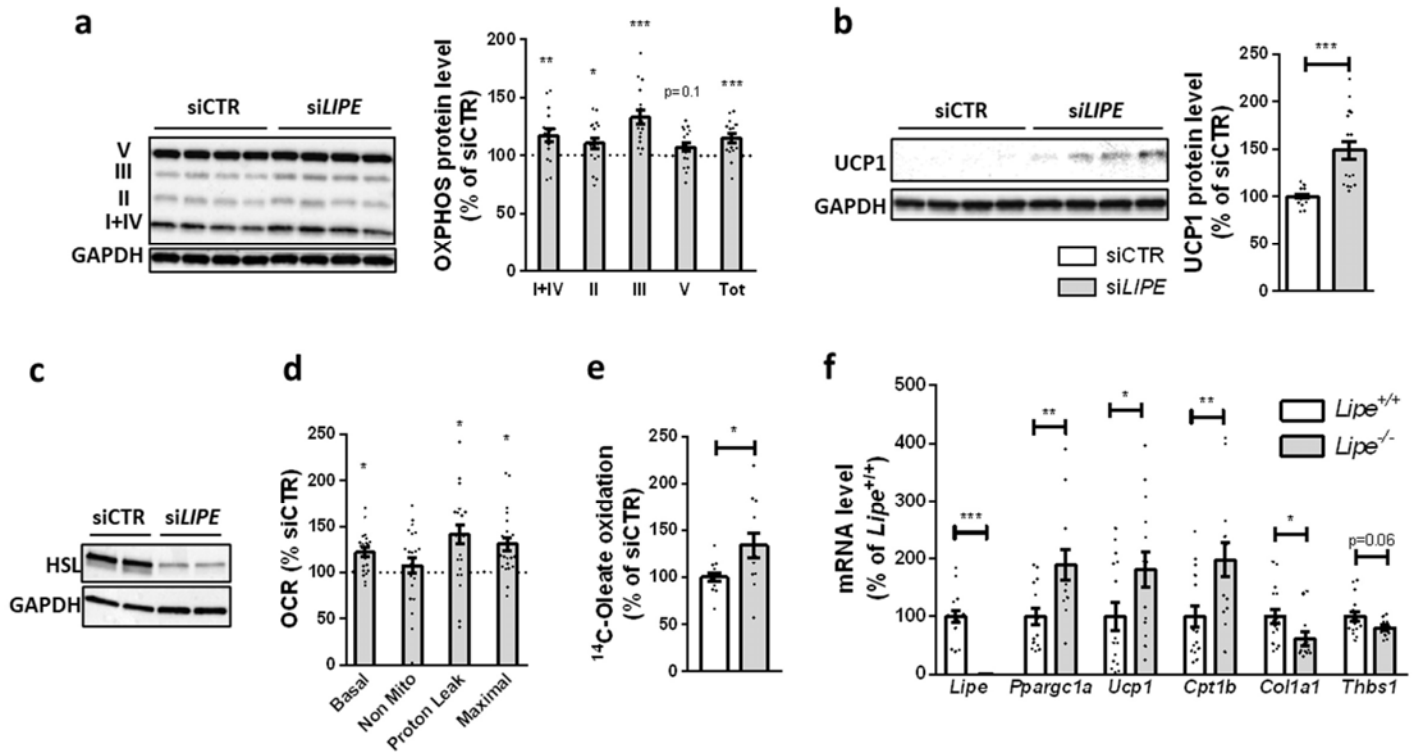
**Supplementary Information** is available for this paper.

Extended Data Figures

Extended Data Fig: 1. HSL regulates PGC-1 $\alpha$  and TGF $\beta$  target gene expression.

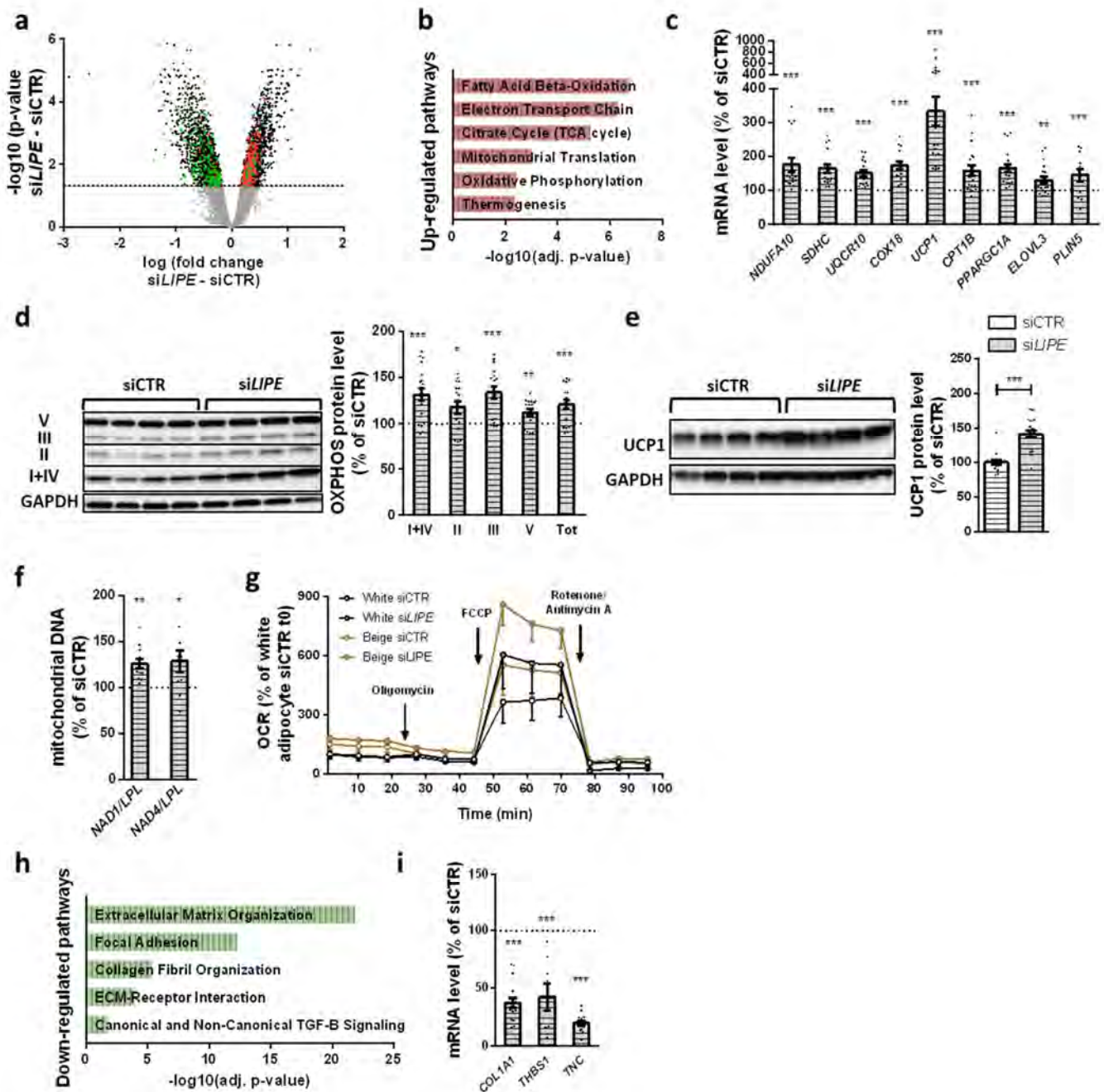


**a-i**, hMADS3 adipocytes were transfected with HSL-targeting (*siLIPE*, grey bars) or control (*siCTR*, white bars) siRNA. **a,b**, HSL mRNA (**a** n=4 replicates from 5 cell cultures) and protein (**b** n=4-6 replicates from 4 cell cultures) levels at day 12 (mRNA) and 18 (mRNA and protein) of white adipocyte differentiation. GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **c**, Volcano plot of transcriptomic changes in HSL-depleted adipocytes, dots in green and red represent genes from down-regulated and up-regulated pathways, respectively (see **Fig. 1a,d**). **d**, mRNA levels of mitochondrial and brown/beige adipocyte markers (n=4 replicates from 5 cell cultures). **e**, mRNA levels of TGF $\beta$  signalling target genes (n=6 replicates from 4 cell cultures). **f-i**, hMADS2 adipocytes at day 7 of differentiation were transfected with HSL-targeting (*siLIPE*) or control (*siCTR*) siRNA. **f,g**, Pathway analysis of up- (**f**) and down- (**g**) regulated genes from transcriptomic data. **h,i** Fold change in mRNA levels of mitochondrial and brown/beige markers (**h**) and TGF $\beta$  signalling target genes (**i**) obtained from transcriptomic analyses of hMADS2 and 3 adipocytes. **j-l**, Human adipocytes in primary culture were transfected with HSL-targeting (*siLIPE*) or control (*siCTR*) siRNA using lipofectamine RNAimax. mRNA levels of LIPE (**j**), mitochondrial and brown/beige markers (**k**) and TGF $\beta$  signalling target genes (**l**) (n=6 replicates from 2 cell cultures). Data are mean  $\pm$  s.e.m. Statistical analysis was performed using unpaired t-test (**a,b,d,e,h-l**). \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

Extended Data Fig. 2: HSL regulates PGC-1 $\alpha$  and TGF $\beta$  pathways in vitro and in vivo.


**a,b,e**, hMADS3 adipocytes were transfected with HSL-targeting (*siLIPE*) or control (*siCTR*) siRNA. **a,b**, Mitochondrial OXPPOS subunit (**a**) and UCP1 protein (**b**) levels (n=4 replicates from 4 cell cultures). GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **c-d**, hMADS3 adipocytes were transfected with HSL-targeting (*siLIPE*) or control (*siCTR*) siRNA using lipofectamine RNAimax. **c**, HSL immunodetection (n=3 cell culture) **d**, Quantitation of oxygen consumption rate (OCR) during Seahorse mitochondrial stress test shown in (**Fig. 1c**) (n=5-10 replicates from 3 cell cultures). **e**, Oleate oxidation (*siCTR*, white bar; *siLIPE*, grey bar; n=2 replicates from 6 cell cultures). **f**, mRNA levels of mitochondrial and brown/beige markers, and of TGF $\beta$  target genes in subcutaneous adipose tissue of C57/BL6 HSL deficient (*Lipe*<sup>-/-</sup>, grey bars) mice and control (*Lipe*<sup>+/+</sup>, white bars) littermates (n=12-16). Data are mean  $\pm$  s.e.m. Statistical analysis was performed using unpaired t-test. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

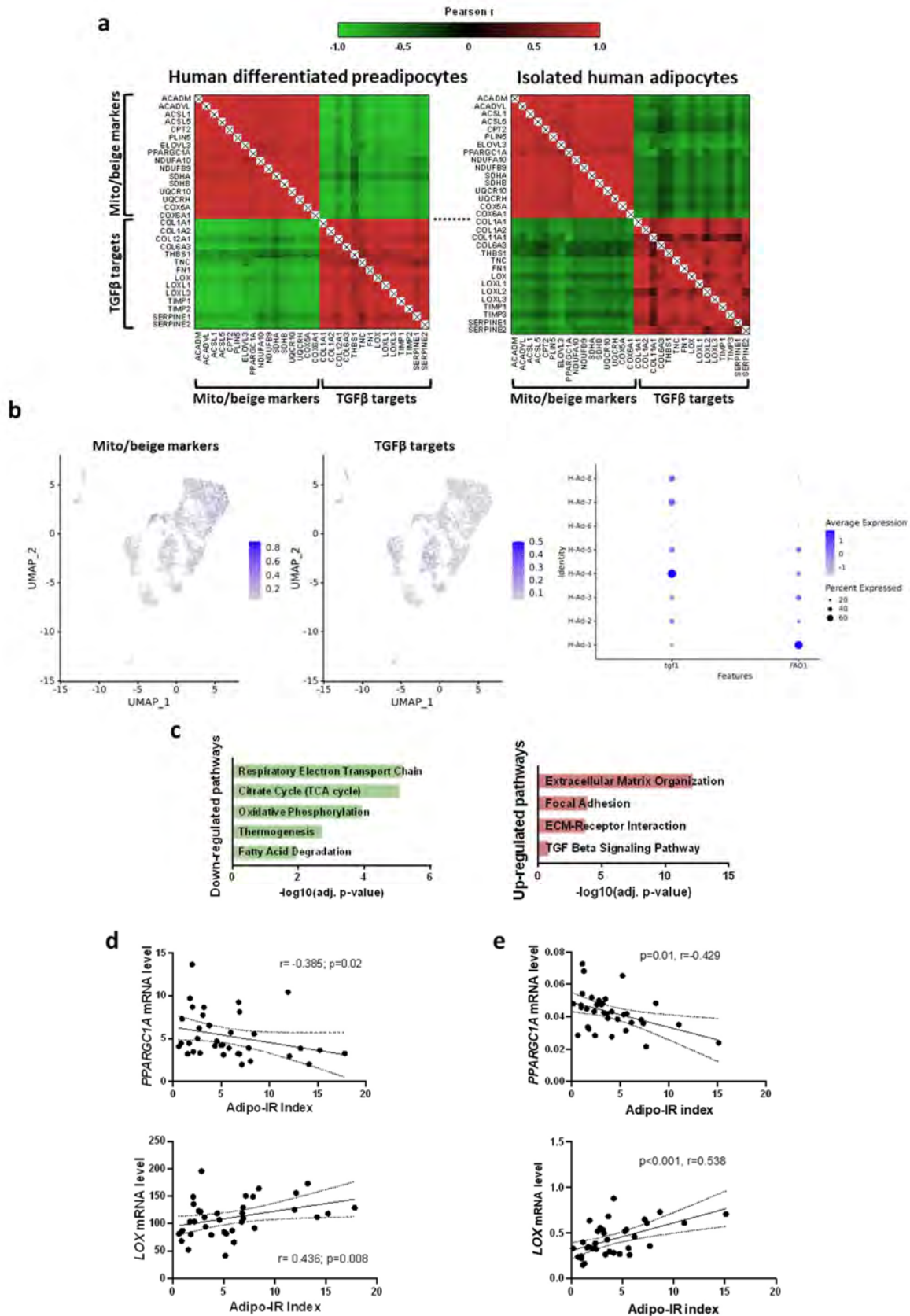
Extended Data Fig. 3: HSL regulates PGC-1 $\alpha$  and TGF $\beta$  pathways in human beige adipocytes.



**a-i**, hMADS3 adipocytes were transfected with HSL (siLIPE) or control (siCTR) siRNA and subsequently directed toward beige adipocyte phenotype (rosiglitazone treatment between day 14 and day 18). **a**, Volcano plot of transcriptomic changes in HSL-depleted adipocytes, dots in green and red represent genes from down-regulated and up-regulated pathways, respectively (**b,h**). **b**, Pathway analysis of up-regulated genes (n=3). **c**, mRNA levels of mitochondrial and brown/beige markers (n=4 replicates from 5 cell cultures). **d**, Mitochondrial OXPHOS subunit protein level (n=4 replicates from 4 cell cultures). **e**, UCP1 protein level (n=4 replicates from 4 cell cultures). **f**, Ratio of mitochondrial (*NAD1* and *NAD4*) vs nuclear (*LPL*) DNA (n=6 replicates from 2 cell cultures). **g**, Oxygen consumption rate (OCR) during mitochondrial stress

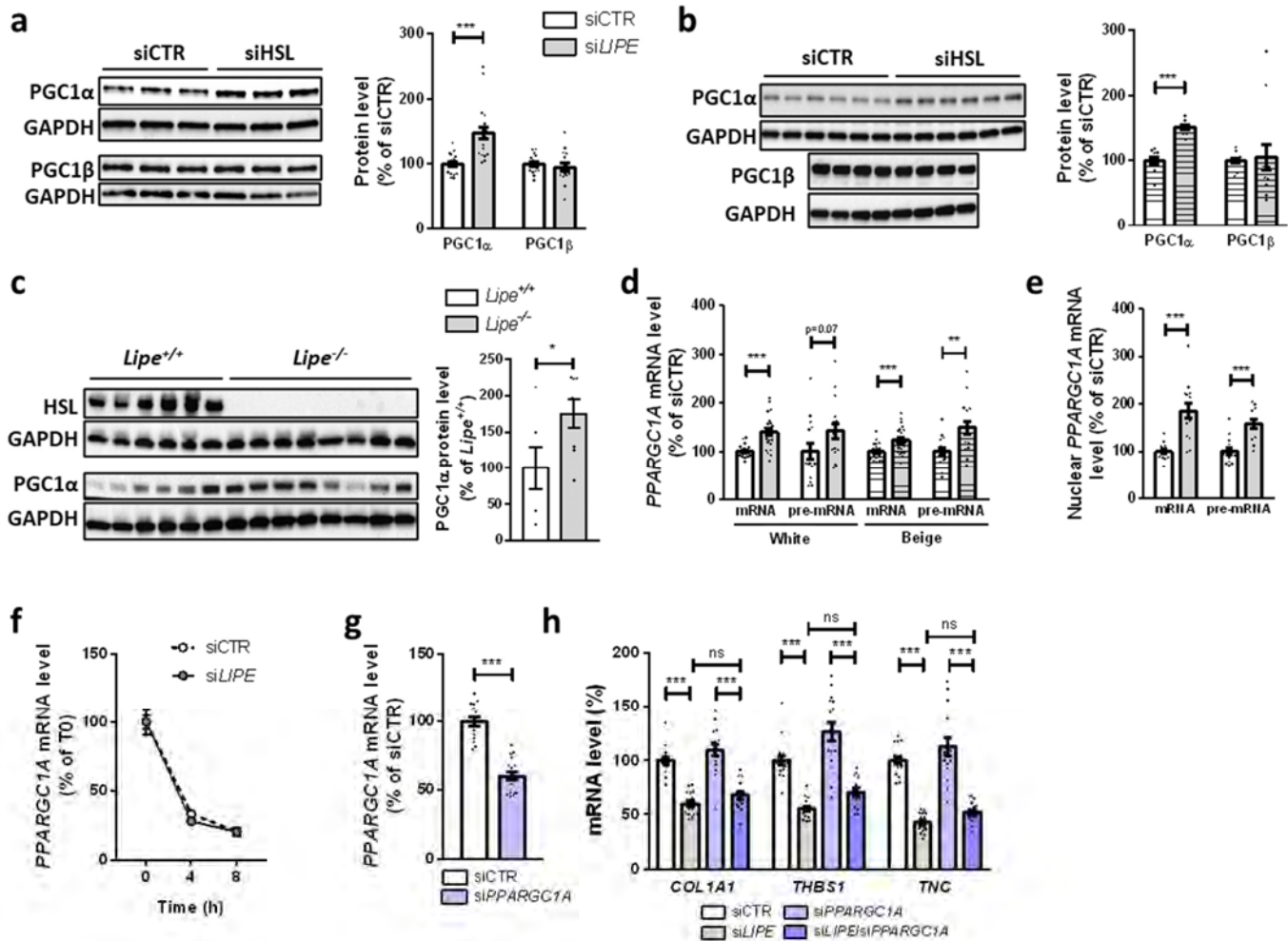
test (n=5). **h**, Pathway analysis of down-regulated genes (n=3). **i** mRNA levels of TGF $\beta$  target genes (n=6 replicates from 4 cell cultures). Data are mean  $\pm$  s.e.m. Statistical analysis was performed using unpaired t-test (**c-f,i**). \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

Extended Data Fig. 4: Opposite regulation of PGC-1 $\alpha$  and TGF $\beta$  pathways.



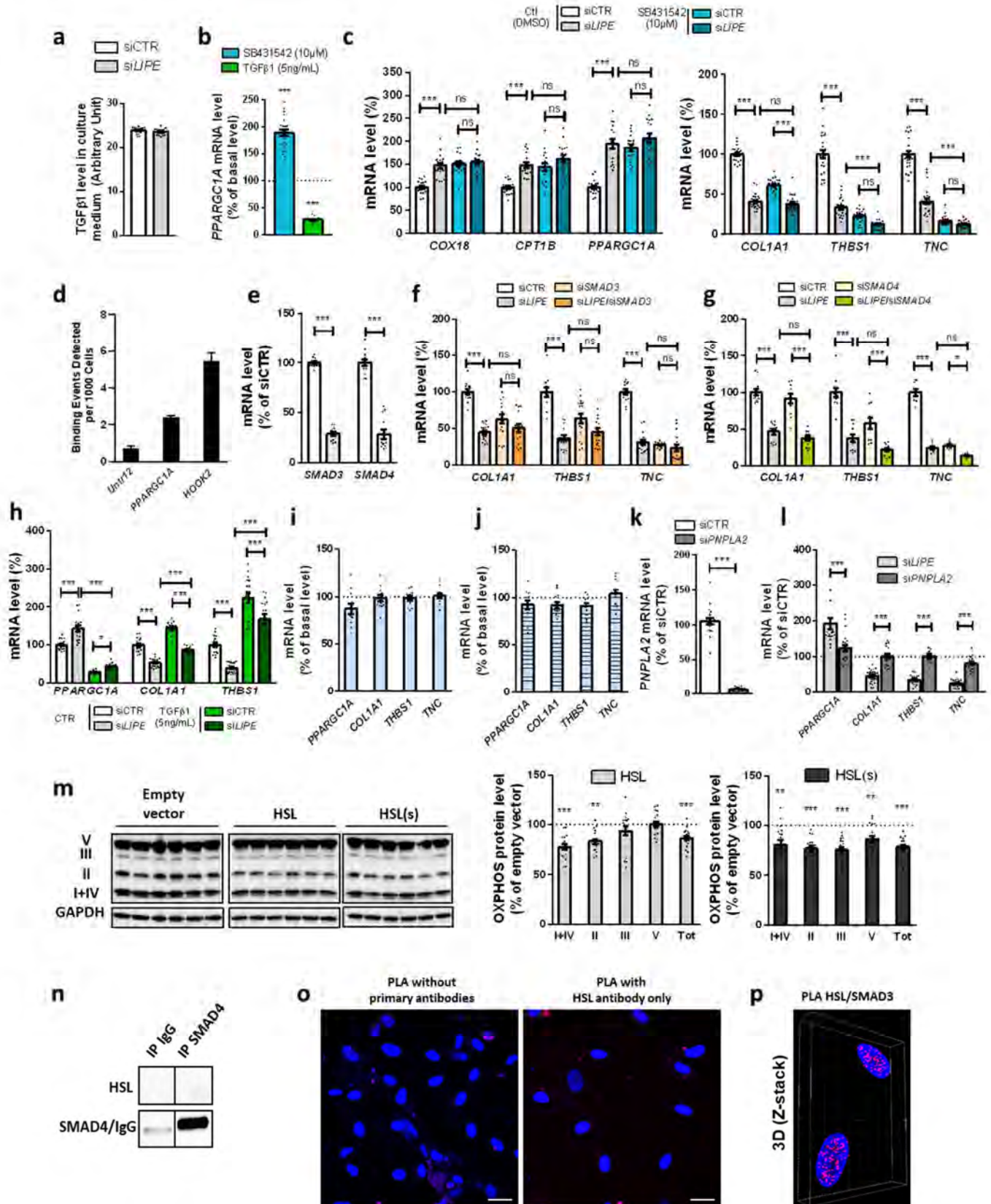
**a**, Correlation matrix of mitochondrial (Mito) and brown/beige adipocyte markers vs TGF $\beta$  signalling target genes in human primary differentiated preadipocytes (n=10) and isolated human mature adipocytes from aggregate culture system<sup>15</sup> (n=8). **b**, Feature plot and dot plot for TGF $\beta$  (TGF1) and fatty acid oxidation (FAO1) gene signature<sup>16</sup>. **c**, Pathway analysis of adipocyte RNA-seq data in chow and high fat diet (HFD)-fed mice<sup>18</sup>. **d,e** Pearson correlation between adipose tissue insulin resistance (Adipo-IR) index and, *PPARGC1A* and *LOX* mRNA levels in human primary differentiated preadipocytes (d) or adipose tissue (e).



Extended Data Fig. 5. PGC-1 $\alpha$  mediates the effects of HSL depletion on mitochondria.

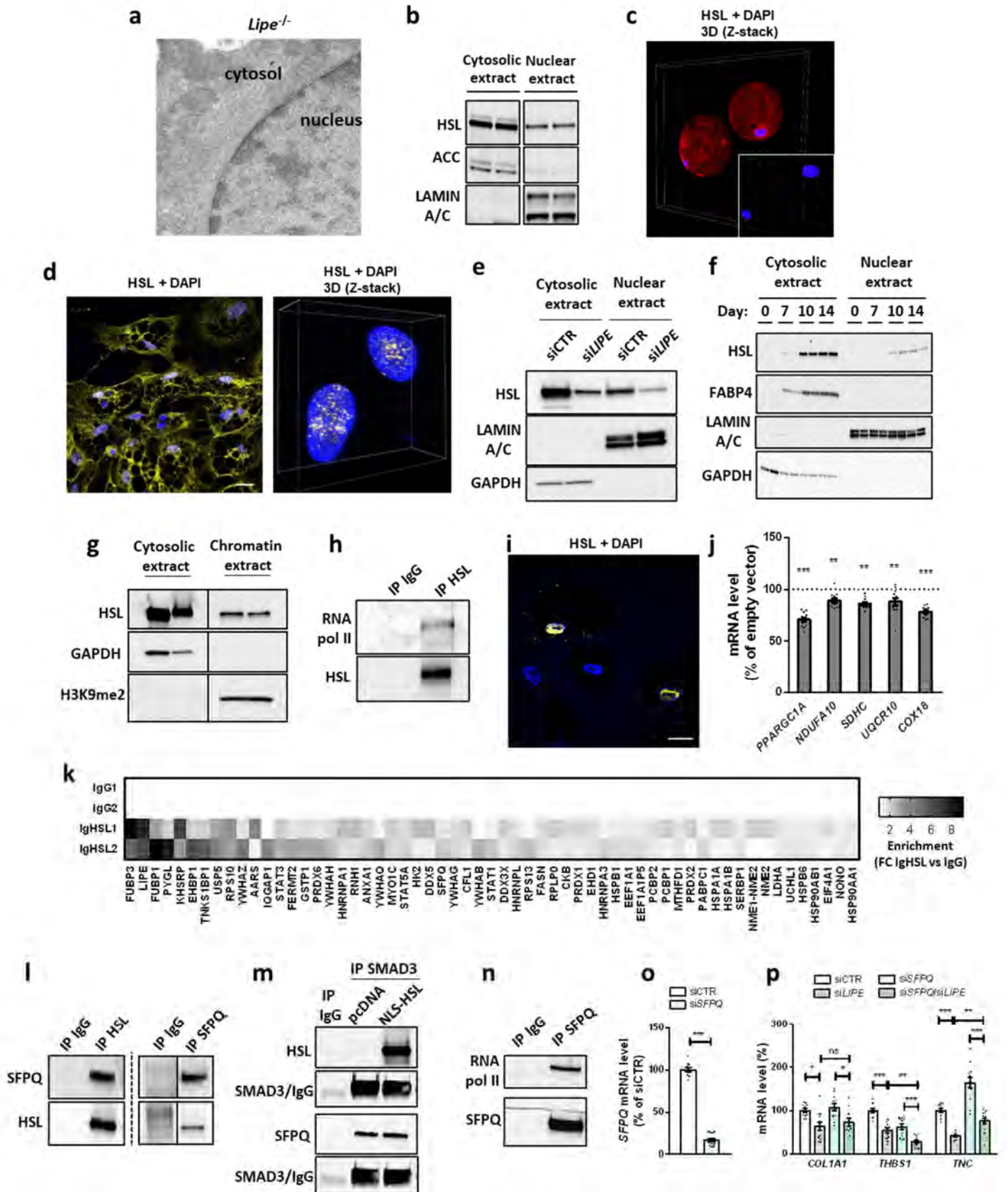
**a,b,d-f**, hMADS3 adipocytes were transfected with HSL-targeting (siLIPE, grey bars) or control (siCTR, white bars) siRNA, and subsequently directed toward white (no rosiglitazone treatment, empty bars) or beige (rosiglitazone treatment, hatched bars) adipocyte phenotypes. PGC1 $\alpha$  and PGC1 $\beta$  protein levels in white (**a**) and beige (**b**) adipocytes (n= 4-6 replicates from 4 cell cultures). GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **c**, PGC1 $\alpha$  protein level in subcutaneous adipose tissue of HSL-deficient (*Lipe*<sup>-/-</sup>) mice and control (*Lipe*<sup>+/+</sup>) littermates (n=6-8). GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **d-e**, *PPARGC1A* mRNA and pre-mRNA levels in whole cell (**d**) or nuclear (**e**) extracts (n=4-14 replicates from 1-6 cell cultures). **f**, *PPARGC1A* mRNA levels in adipocytes treated with actinomycin D (n=3-4 replicates from 3 cell cultures). **g**, *PPARGC1A* mRNA level in hMADS3 adipocytes transfected with PGC1 $\alpha$ -targeting (siPPARGC1A, violet bars) or control siRNA (siCTR, white bars) (n=4 replicates from 4 cell cultures). **h**, Effects of HSL and PGC1 $\alpha$  depletion on TGF $\beta$  target genes. hMADS3 adipocytes were transfected with siCTR (control siRNA, white bars), siLIPE (grey bars), siPPARGC1A (light violet bars) or siLIPE/siPPARGC1A (dark violet bars) (n= 4 replicates from 4 cell cultures). Data are mean  $\pm$  s.e.m. Statistical analysis was performed using unpaired t-test (**a-e,g**), 2-way ANOVA (**f**) or 1-way ANOVA with Tukey's post-hoc test (**h**). \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

**Extended Data Fig. 6: The effects of HSL depletion involve SMAD3 and are independent of lipolysis and HSL catalytic activity.**



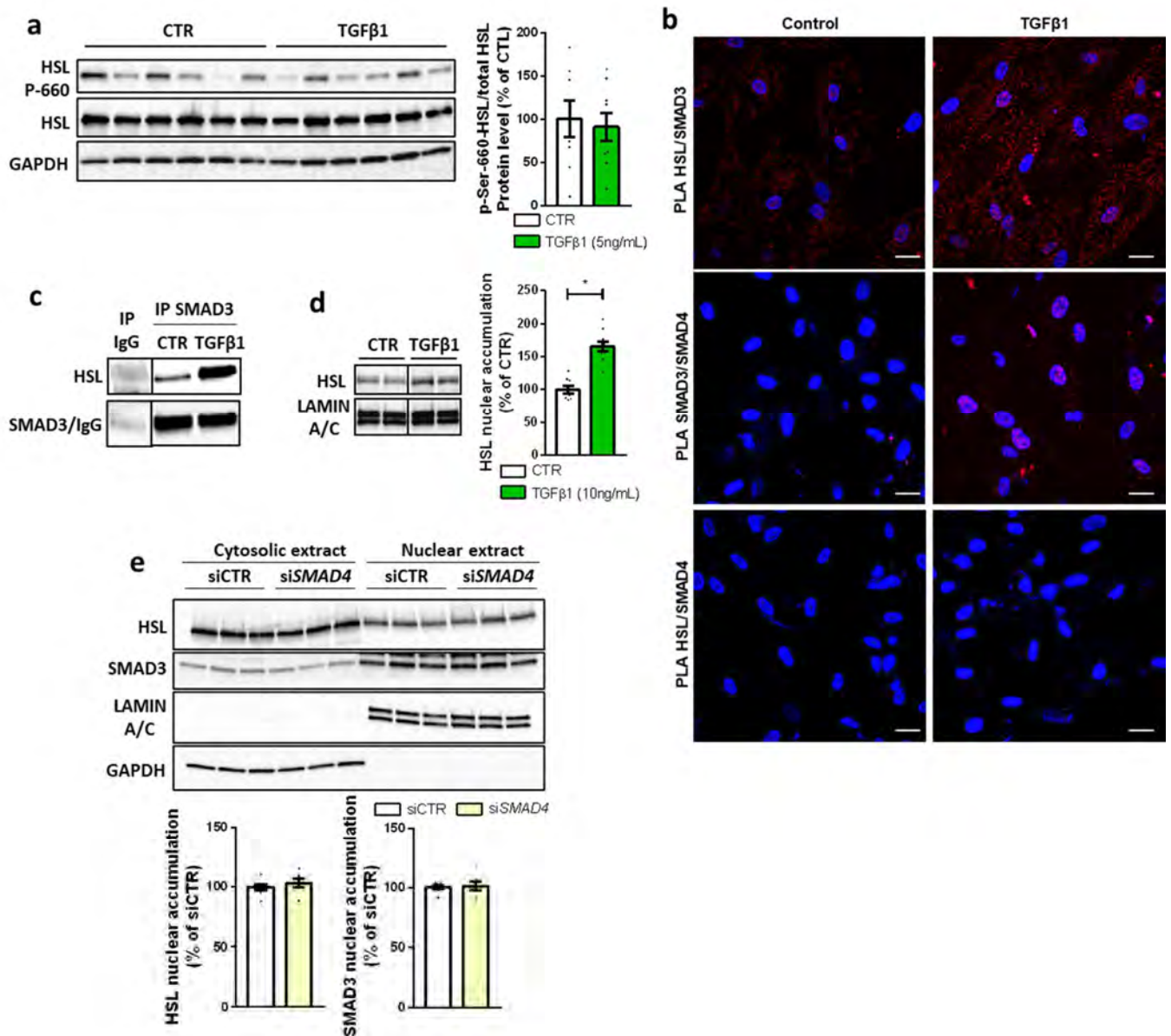
**a**, TGF $\beta$ 1 protein level in culture medium of hMADS3 adipocytes transfected with HSL-targeting (siLIPE, grey bar) or control (siCTR, white bar) siRNA (n=6-8 replicates from 2 cell cultures). **b**, *PPARGC1A* mRNA levels in hMADS adipocytes treated with vehicle (DMSO, dotted line), type I TGF $\beta$  receptor inhibitor SB431542 (blue bar) or TGF $\beta$ 1 (green bar) (n=6 replicates from 3-4 cell cultures). **c**, Role of TGF $\beta$  signalling in the effect of HSL depletion on gene expression. mRNA levels in DMSO (siLIPE and siCTR, grey bars and white bars) and in SB431542 (siLIPE and siCTR (SB431542), dark blue bars and light blue bars) conditions (n=6 replicates from 4 cell cultures). **d**, Chromatin immunoprecipitation assay using SMAD3 antibody. SMAD3 binding on negative (*Untr12*) and positive control DNA (*HOOK2*), and on the proximal promoter region of *PPARGC1A* in hMADS3 adipocytes (n=3). **e**, validation of *SMAD3* and *SMAD4* mRNA level depletion in hMADS transfected with siCTR (white bars), siSMAD3 (light orange bars) or siSMAD4 (light yellow bar) (n=3 replicates from 4 cell cultures). **f-g**, hMADS3 adipocytes were transfected with siRNAs against HSL (siLIPE, grey bars) and green fluorescent protein (siCTR, white bars) (n=4 replicates from 3 cell cultures). **(f)** Role of SMAD3 through depletion of SMAD3 and HSL (dark orange bars) and SMAD3 depletion (light orange bars). **(g)** Role of SMAD4 through depletion of SMAD4 and HSL (dark yellow bars) and SMAD4 depletion (light yellow bars). **h**, Role of HSL in TGF $\beta$  signalling. mRNA levels in DMSO (siLIPE and siCTR, grey bars and white bars) and in TGF $\beta$ 1 (siLIPE and siCTR (TGF $\beta$ 1), dark green bars and light green bars) conditions (n=6 replicates from 3 cell cultures). **i,j** mRNA levels in white (**i**, empty bars) and beige (**j**, hatched bars) hMADS3 adipocytes treated for 10 days with the specific HSL inhibitor Bay59-9435 (1 $\mu$ M, blue bars) or vehicle (DMSO, dotted lines) (n=6 replicates from 2 cell cultures). **k,l**, hMADS3 adipocytes were transfected with HSL-targeting (siLIPE), ATGL-targeting (siPNPLA2) or control (siCTR) siRNA. **(k)** mRNA levels of *PNPLA2* (siPNPLA2, dark grey bar; siCTR, white bar). **(l)** mRNA levels expressed as fold change of siLIPE vs siCTR (light grey bars vs dotted line) or siPNPLA2 vs siCTR (dark grey bars vs dotted line) (n=4 replicates from 4-5 cell cultures). **m**, Mitochondrial OXPHOS protein levels in HEK293T cells transfected with empty vector (dotted line), native HSL (grey bars) or catalytically inactive HSL, HSL(s), expressing vectors (black bars) (n=4-6 replicates from 3 cell cultures). GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **n**, Negative controls of proximity ligation assay in hMADS adipocytes. **o**, Immunoprecipitation of SMAD4 in hMADS3 adipocyte extracts followed by immunodetection of HSL and SMAD4 (n=2). **p**, In situ proximity ligation assays (red signals) using anti-HSL and anti-SMAD3 antibodies (PLA HSL/SMAD3). Z-stack and IMARIS software were used for 3D reconstitution. Data are mean  $\pm$  s.e.m. Statistical analysis was performed using unpaired t-test (**a,b,e,i-l**) 1-Way ANOVA with Tukey's post-hoc test (**b,f,g,h**). \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

Extended Data Fig. 7. HSL is a bona fide nuclear protein.



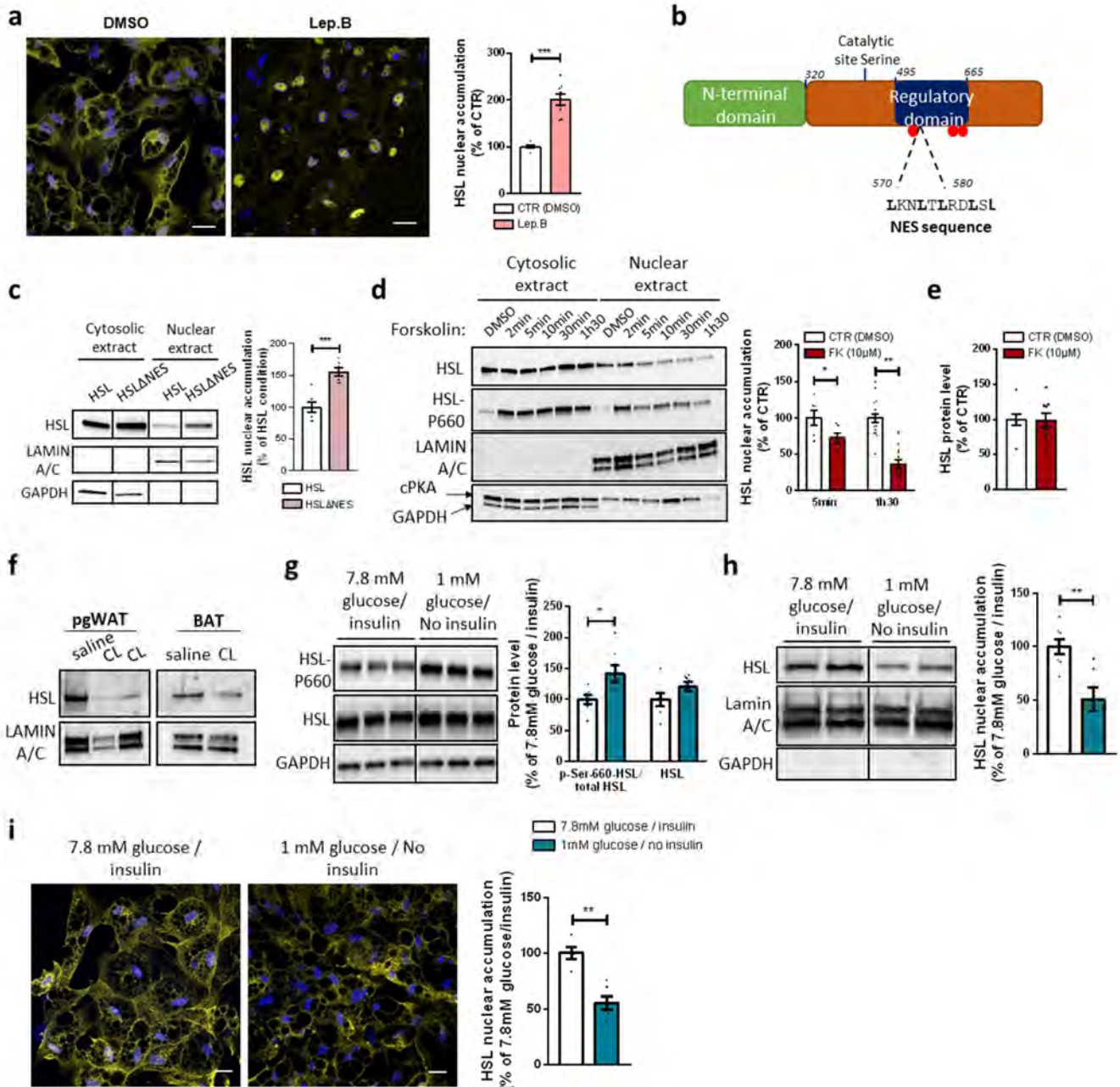
**a**, Immunogold electron microscopy labeling of HSL in differentiated preadipocytes from *Lipe*<sup>-/-</sup> mice. **b**, HSL protein levels in cytosolic and nuclear extracts from mouse perigonadal white adipose tissue. ACC, acetyl CoA carboxylase. **c**, HSL immunostaining (red) in murine isolated adipocytes. Nuclei were labelled in blue using DAPI. Z-stack and IMARIS software were used for 3D reconstitution. **d**, Representative image of HSL immunostaining (yellow) in hMADS3 adipocytes (n= 10). Nuclei were labelled in blue using DAPI. Scale bars, 10  $\mu$ m. Z-stack and IMARIS software were used for 3D reconstitution. **e**, Representative blot of HSL protein in cytosolic and nuclear extracts from control (siCTR) and HSL depleted (si*LIPe*) hMADS3 white adipocytes (n=4). GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **f**, HSL protein levels in cytosolic and nuclear extracts from hMADS3 preadipocytes during differentiation (n=2 replicates from 2 cell cultures). FABP4, fatty acid binding protein 4; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **g** Representative blot of HSL protein in cytosolic and chromatin extracts (n=2 replicates from 2 cell cultures). GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **h**, Immunoprecipitation of HSL in nuclear extracts followed by RNA polymerase II (RNA pol II) C-terminal domain and HSL immunodetection (n=2). **i-j**, Experiments were carried out in hMADS3 fibroblasts infected with adenovirus expressing green fluorescent protein (AdGFP) or HSL with N-terminal addition of a nuclear localization signal (AdNLS-HSL). **(i)** Representative image of HSL immunostaining (yellow dots). Nuclei were labelled in blue using DAPI. Scale bars, 10  $\mu$ m. **(j)** mRNA levels of *PPARGC1A* and mitochondrial OXPHOS complex genes (n=6 replicates from 2 cell cultures). **k**, Identification of HSL nuclear partners in hMADS3 adipocytes using Rapid Immunoprecipitation Mass spectrometry of Endogenous proteins. Fold change (FC) enrichment is shown (n=2). **l**, Immunoprecipitation of HSL and SFPQ in nuclear extracts of hMADS3 adipocytes followed by immunodetection of HSL and SFPQ (n=3). **m**, Immunoprecipitation of SMAD3 followed by immunodetection of HSL, SFPQ and SMAD3 in nuclear extracts of HEK293T cells transfected with control (pcDNA) or HSL with N-terminal addition of a nuclear localization signal (NLS-HSL) (n=2). **n**, Immunoprecipitation of SFPQ in hMADS3 adipocyte nuclear extracts followed by RNA polymerase II (RNA pol II) C-terminal domain and SFPQ immunodetection (n=2). **o,p**, hMADS3 adipocytes were transfected with SFPQ-targeting (si*SFPQ*) or control (siCTR) siRNA. **(o)** mRNA levels of *SFPQ* (si*SFPQ*, light green bar; siCTR, white bar). **(p)** hMADS3 adipocytes were transfected with siRNAs against green fluorescent protein (siCTR, white bars), HSL (si*LIPe*, grey bars), SFPQ (si*SFPQ*, light green bars) or both HSL and SFPQ (si*SFPQ*/si*LIPe*, dark green bars) (n=4 replicates from 4 cell cultures). Data are mean  $\pm$  s.e.m. Statistical analysis was performed using unpaired t-test (**j,o**) and 1-Way ANOVA with Tukey's post-hoc test (**p**). \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

**Extended Data Fig. 8: HSL nuclear localization is independent of SMAD4.**



**a**, Phospho-HSL (HSL-P660) protein levels in hMADS adipocytes treated with TGFβ1 (n=2-6 replicates from 2 cell cultures) **b**, In situ proximity ligation assays (red signals) using anti-HSL and anti-SMAD3 antibodies (PLA HSL/SMAD3, upper panels), anti-SMAD3 and anti-SMAD4 antibodies (PLA SMAD3/SMAD4, middle panel), or anti-HSL and anti-SMAD4 antibodies (PLA HSL/SMAD4, lower panels), in untreated (control, left panels) or TGFβ1-treated (right panels) conditions. Nuclei were labelled in blue using DAPI. Scale bars 10µm. **c**, Immunoprecipitation of SMAD3 in whole cell extracts from hMADS3 adipocytes upon basal condition (CTR) or TGFβ1 stimulation, followed by immunodetection of HSL and SMAD3 (n=2). **d**, Quantitation of HSL protein level in cytosolic and nuclear extracts of mouse adipose tissue explant treated for 4h with TGFβ1 (n=9-10). **e**, HSL and SMAD3 protein levels in cytosolic and nuclear extracts of hMADS3 adipocytes transfected with SMAD4-targeting (siSMAD4, yellow bars) or control (siCTR, white bars) siRNA (n=3-6 replicates from 2 cell cultures). GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Data are mean ± s.e.m. Statistical analysis was performed using unpaired t-test. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

Extended Data Fig. 9. Regulation of HSL nuclear localization.

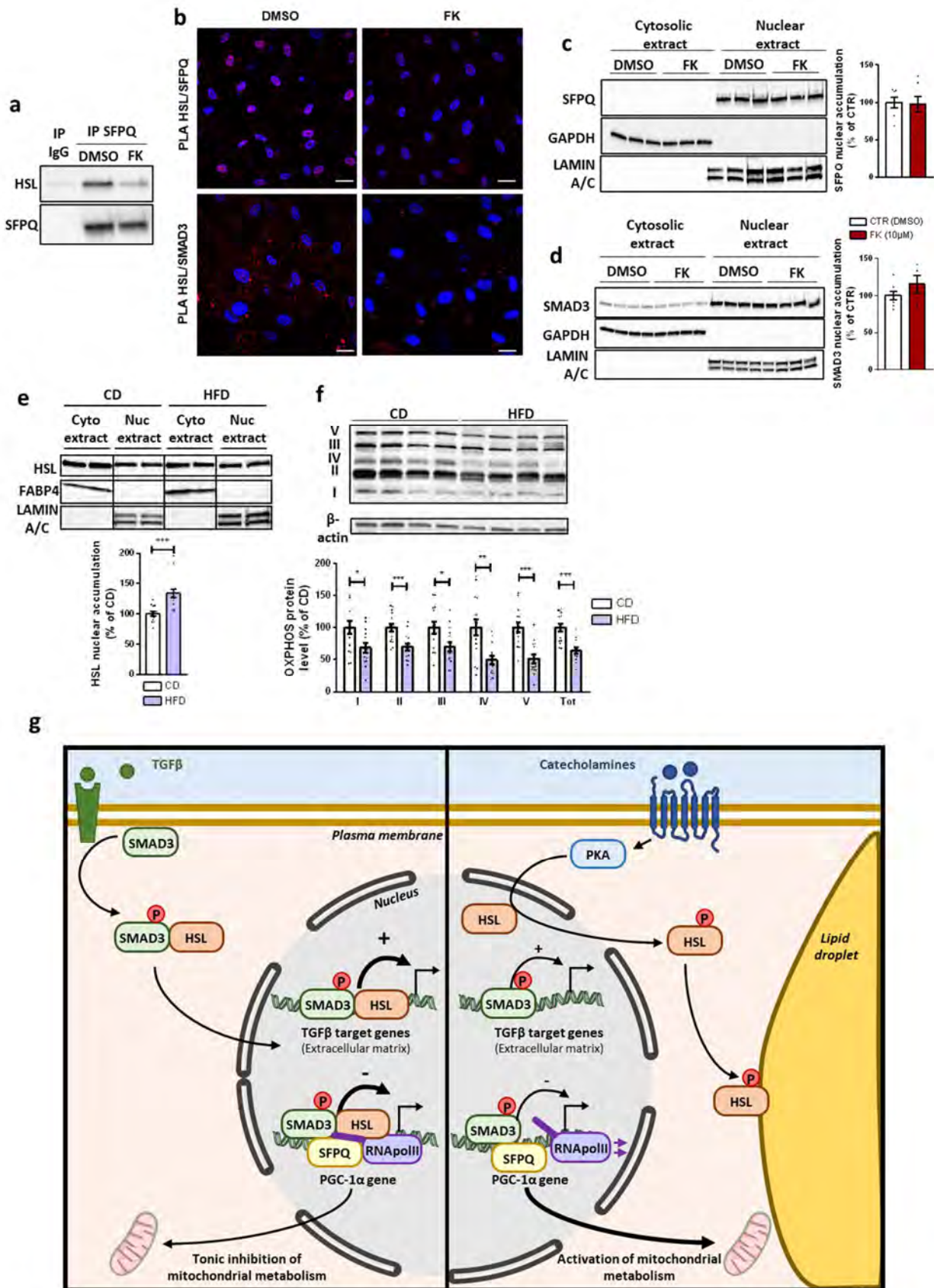


**a**, Representative image of HSL immunostaining (yellow) in hMADS3 adipocytes treated for 8h with vehicle (DMSO) or 50 nM leptomyacin B, a CRM1 inhibitor (CRM1i) (n=2 replicates from 4 cell cultures). Nuclei were labelled in blue using DAPI. Scale bars, 10  $\mu$ m. **b**, Schematic representation of HSL protein domains. Green, N-terminal domain with unknown function; orange, catalytic domain with predicted  $\alpha/\beta$  fold architecture; dark blue, regulatory domain containing PKA phosphorylation sites (red dots). A putative nuclear export signal (NES) sequence was predicted using LocNES software. **c**, HSL protein level in cytosolic and nuclear extracts from HEK293T cells transfected with native (HSL) or HSL isoform deleted for the putative nuclear export signal (HSL $\Delta$ NES) (n=2-4 replicates from 2 cell cultures). GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **d,e**, Experiments were carried out in hMADS3 adipocytes treated with vehicle (DMSO) or 10  $\mu$ M forskolin for 90 min. **(d)** Immunodetection

of HSL, phospho-HSL (HSL-P660) and the catalytic subunit of PKA (cPKA) in cytosolic and nuclear extracts (n=3-4 replicates from 2-5 cell cultures). GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **(e)** HSL protein levels in whole cell extracts (n=8-9 replicates from 2 cell cultures). **f**, Immunodetection of HSL protein in adipocyte nuclear extracts from perigonadal white adipose tissue (pgWAT) and, interscapular brown adipose tissue (BAT) of mice treated with saline or the  $\beta_3$ -adrenergic receptor agonist, CL-316,243 (CL, 1h30) (n=2). **g-i**, hMADS3 adipocytes were cultured in medium with 7.8mM glucose and 10 nM insulin (white bars) or submitted overnight to medium with 1 mM glucose and no insulin (steelblue bars). **(g)** HSL and phospho-HSL (HSL-P660) protein levels in whole cell extracts. **(h)** HSL protein levels in nuclear extracts (n=1-5 replicates from 3 cell cultures). GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **(i)** Representative image of HSL immunostaining (yellow) (n=2-4 replicates from 2 cell cultures). Nuclei were labelled in blue using DAPI. Scale bars, 10  $\mu$ m. Data are mean  $\pm$  s.e.m. Statistical analysis was performed using unpaired t-test (**a**, **c-e**, **g-i**). \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.



Extended Data Figure 10: Regulation and role of nuclear HSL.

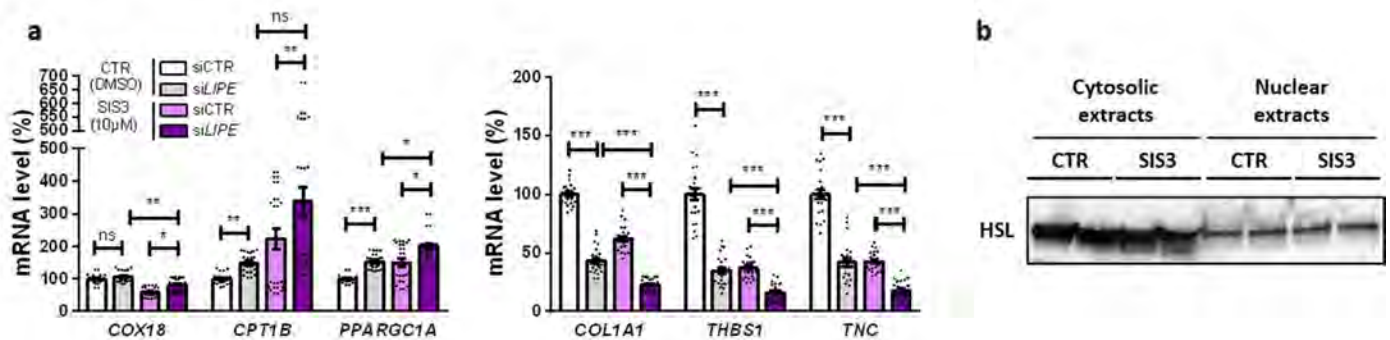


**a-d**, Experiments were carried out in hMADS3 adipocytes treated with vehicle (DMSO) or 10  $\mu$ M forskolin (FK) for 90 min. **(a)** Immunoprecipitation of SFPQ followed by immunodetection of HSL and SFPQ in nuclear extracts (n=2). **(b)** In situ proximity ligation assays (red signals) performed using anti-HSL and anti-SFPQ (PLA HSL/SFPQ) or anti-HSL and anti-SMAD3 antibodies (PLA HSL/SMAD3). Nuclei were labelled in blue using DAPI. Scale bars 10 $\mu$ m. **c,d**, SMAD3 **(c)** and SFPQ **(d)** protein levels in cytosolic and nuclear extracts. GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **e**, HSL nuclear accumulation in subcutaneous white adipose tissue from mice fed a chow (CD) or a 60% high fat diet (HFD) for 10 weeks (n=13,15). FABP4, fatty acid binding protein 4. **f**, Mitochondrial OXPHOS protein levels in subcutaneous white adipose tissue from mice fed a chow (CD) or a 60% high fat diet (HFD) for 10 weeks (n=13,15). **g**, HSL at the crossroad of TGF $\beta$  and catecholamine signalling in adipocyte nucleus. Data are mean  $\pm$  s.e.m. Statistical analysis was performed using unpaired t-test **(c,e)**. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

## II. Données non montrées

### II.1 La phosphorylation de SMAD3 n'est pas indispensable au contrôle transcriptionnel médié par le complexe LHS/SMAD3

Nous montrons que la LHS participe dans le noyau de l'adipocyte aux régulations transcriptionnelles assurées par SMAD3. La formation et la translocation nucléaire du complexe LHS/SMAD3 sont accrues en réponse au TGF $\beta$  qui induit une phosphorylation de SMAD3 (Article, Fig.4a et Extended Data Fig. 8b,c). Nous montrons à l'inverse qu'un antagoniste des récepteurs de type 1 au TGF $\beta$  compense les effets géniques de la délétion de la LHS (Article, Extended Data Fig. 6c). Cependant, cet antagoniste s'oppose à la phosphorylation de SMAD3 ainsi que de SMAD2. L'utilisation d'un inhibiteur spécifique de la phosphorylation de SMAD3 ne semble pas avoir d'effet sur les modifications d'expression de gènes oxydatifs et de la MEC en réponse à la déplétion en LHS (Fig. 22a). De plus, ce même inhibiteur ne semble pas impacter la translocation nucléaire de la LHS (Fig. 22b). Ces résultats préliminaires tendent à montrer que la phosphorylation de SMAD3, bien que favorisant les fonctions nucléaires de la LHS, n'est pas essentielle.



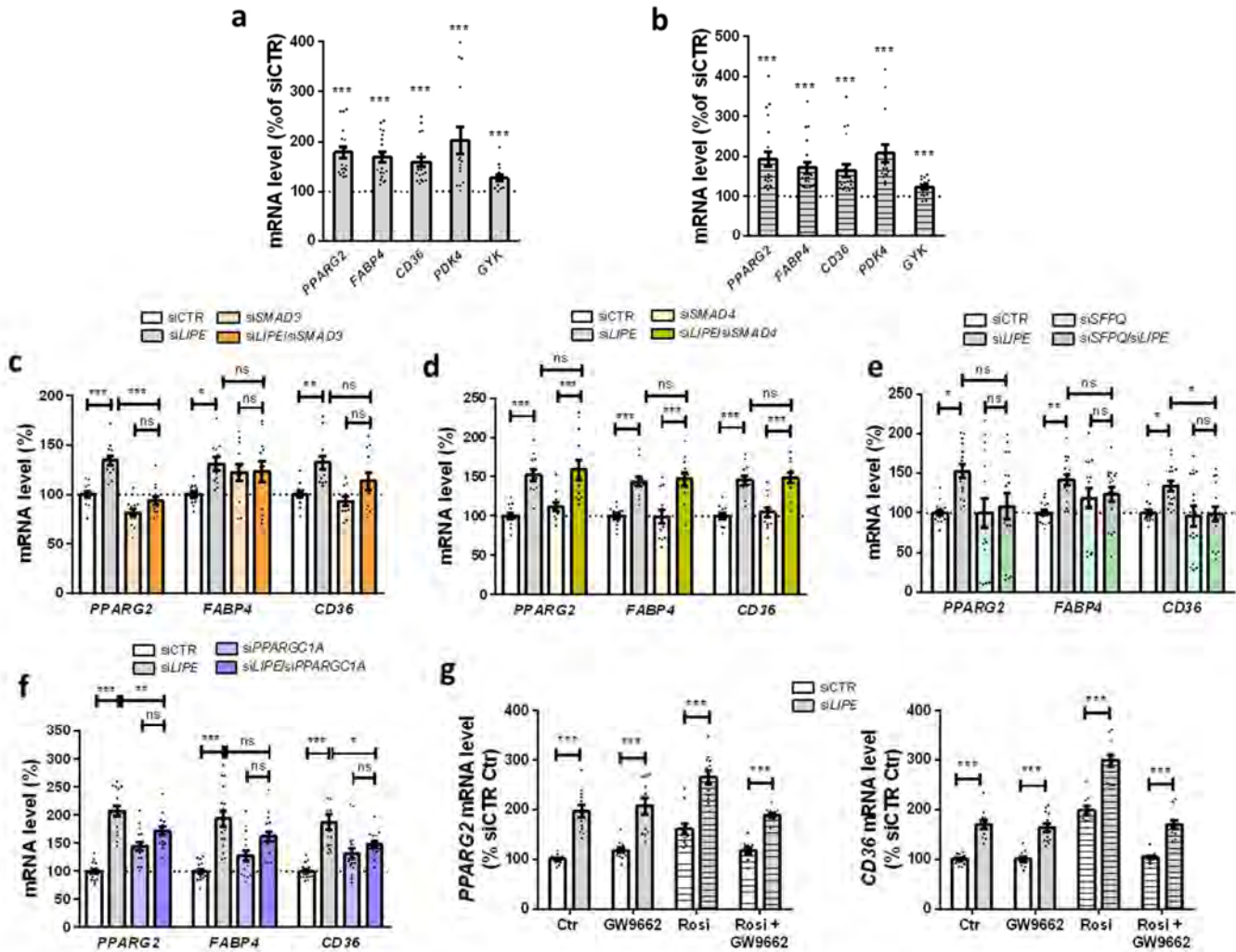
#### Figure 22 : SMAD3 phosphorylation is dispensable for nuclear HSL presence and function.

**a** mRNA level in hMADS white adipocyte transfected at day 7 of differentiation with siRNAs against green fluorescent protein (siCTR) or HSL (siLHPE), and subsequently treated with DMSO (CTR), or the specific inhibitor of SMAD3 phosphorylation SIS3 from day 14 to 18 (n=6 replicates from 4 cell cultures). **b** immunodetection of HSL in cytosolic and nuclear fraction of hMADS white adipocytes treated with DMSO (CTR) or SIS3 during 4h (n=2 replicates from 1 cell culture). Data are mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using 1-Way ANOVA with Tukey's post-hoc test. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

### II.2 Effet de la déficience en LHS sur la différenciation adipocytaire de cellules humaines

Au cours de l'étude des conséquences phénotypiques de la déplétion en LHS, nous avons mis en évidence que l'expression de différents marqueurs de l'adipocyte mature était augmentée dans notre modèle d'adipocytes humains. C'est, notamment, le cas de l'expression du gène codant PPAR $\gamma$ 2, facteur de transcription prépondérant dans l'acquisition du phénotype adipocytaire, et de plusieurs de ces gènes cibles (Fig. 23a,b). Il est ainsi possible de penser que l'augmentation de différenciation adipocytaire observée soit à l'origine, d'une part, de l'induction plus importante de l'expression de différents marqueurs adipocytaires, qu'ils soient blancs ou beiges, mais également de la mitochondriogenèse et des capacités oxydatives des adipocytes et, d'autre part, de la diminution d'expression de composants de la MEC qui sont davantage exprimés par les progéniteurs adipocytaires, pouvant laisser penser que ces adipocytes sont simplement plus matures, la différenciation *in vitro* n'étant jamais complète. Nous montrons, cependant, qu'une déplétion par siRNA de SMAD3 et SFPQ, et non de SMAD4, abolit les effets de la déplétion en LHS sur les niveaux d'expression des marqueurs adipocytaires (Fig. 23c-e). De plus, la déplétion en PGC-1 $\alpha$  exerce un effet similaire à celui des déplétions en SMAD3 et SFPQ (Fig. 23f). Collectivement, ces données suggèrent que l'augmentation d'expression des gènes de la différenciation adipocytaire semble être une conséquence de l'augmentation d'expression de PGC-1 $\alpha$  lorsque le complexe LHS/SMAD3/SFPQ ne peut plus se former, comme c'est le cas pour les gènes mitochondriaux, plutôt que la cause de notre phénotype. Cependant, ces données ne semblent pas forcément en accord avec la littérature, PGC-1 $\alpha$  n'étant pas requis pour la différenciation de l'adipocyte brun (Uldry et al. 2006), et le couple PPAR $\gamma$ /PGC-1 $\alpha$  n'ayant pas été montré comme activant la différenciation de l'adipocyte blanc (Kajimura et al. 2008). D'autre part, il a été montré au laboratoire qu'une surexpression de PGC-1 $\alpha$  suffisait à transactiver PPAR $\alpha$  et induire l'expression génique d'une de ses cibles qu'est la glycérol kinase (Mazzucotelli et al. 2007). Ainsi, bien que la plupart des études concernant PGC-1 $\alpha$  se concentrent sur son rôle dans la modulation de la mitochondriogenèse et du métabolisme oxydatif, il n'est pas exclu qu'il puisse jouer un rôle dans l'activation de PPAR $\gamma$  et la modulation des gènes associés à l'adipogenèse dans certaines conditions. En accord, nous montrons que des modulations pharmacologiques de PPAR $\gamma$ 2 n'ont pas d'influence sur les modulations de son expression et celle de ses gènes cibles lors de la déplétion en LHS, laissant penser à un mécanisme de régulation indépendant des ligands et, donc, en faveur d'interaction protéine-protéine (Fig.

23g). De plus, il a également été proposé que la zone de liaison des ligands de PPAR $\gamma$  n'était pas essentielle à son rôle dans l'adipogenèse (Walkey and Spiegelman 2008).

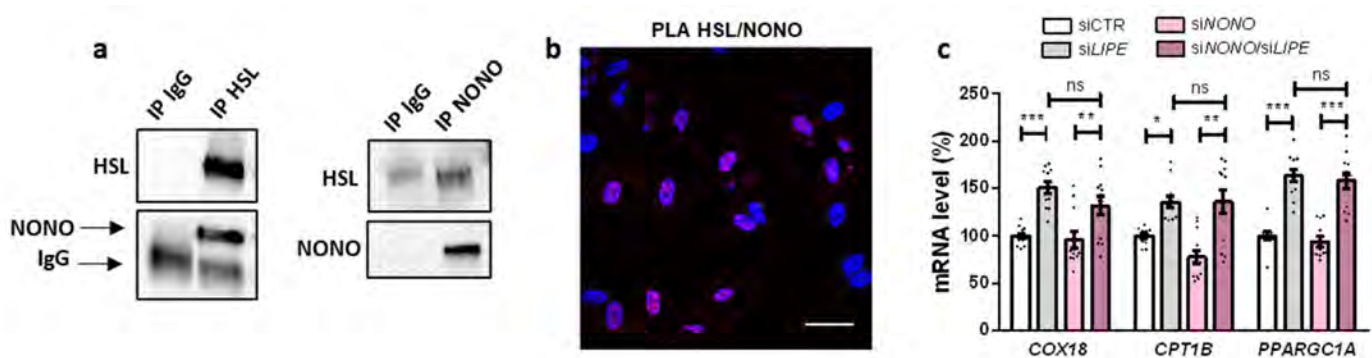


**Figure 23 : Effect of HSL depletion in modulation of human adipocyte differentiation.**

**a-b** hMADS3 adipocytes at day 7 of differentiation were transfected with HSL-targeting (siLIPE, grey bars) or control siRNA (siCTR, dotted line) and subsequently directed toward white (no treatment) or beige (rosiglitazone treatment between day 14 and day 18). mRNA expression levels in white (**a**) and beige (**b**) adipocytes (n=4 replicates from 4-5 cell cultures). **c-f** hMADS3 adipocytes were transfected with siRNAs against HSL (siLIPE, grey bars) and green fluorescent protein (siCTR, white bars) (n=4 replicates from 3-4 cell cultures). (**c**) Role of SMAD3 through depletion of SMAD3 and HSL (siLIPE/siSMAD3 dark orange bars) and SMAD3 depletion (siSMAD3 light orange bars). (**d**) Role of SMAD4 through depletion of SMAD4 and HSL (siLIPE/siSMAD4 dark yellow bars) and SMAD4 depletion (siSMAD4 light yellow bars). (**e**) Role of SFPQ through depletion of SFPQ and HSL (siLIPE/siSFPQ dark green bars) and SFPQ depletion (siSFPQ light green bars). (**f**) Role of PGC1 $\alpha$  through depletion of PGC1 $\alpha$  and HSL (siLIPE/siPPARGC1A dark violet bars) and PGC1 $\alpha$  depletion (siPPARGC1A light violet bars). **g** hMADS3 adipocytes at day 7 of differentiation were transfected with HSL-targeting (siLIPE, grey bars) or control siRNA (siCTR, white bars) and subsequently treated between day 14 and day 18 with the PPAR $\gamma$  antagonist GW9662 (10 $\mu$ M), the PPAR $\gamma$  agonist Rosiglitazone (Rosi 0.1 $\mu$ M, hatched bars), or the two drugs (Rosi + GW9662, hatched bars). mRNA levels of PPARG2 and CD36 (n=6 replicates from 2 cell cultures). Data are mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using unpaired t-test (**a-b**), 1-Way ANOVA with Tukey's post-hoc test (**c-f**), and 2-Way ANOVA with Sidak's post-hoc test (**g**). \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 compared to control condition.

### II.3 Le contrôle transcriptionnel de PGC-1 $\alpha$ par le complexe LHS/SMAD3/SFPQ est indépendant de NONO

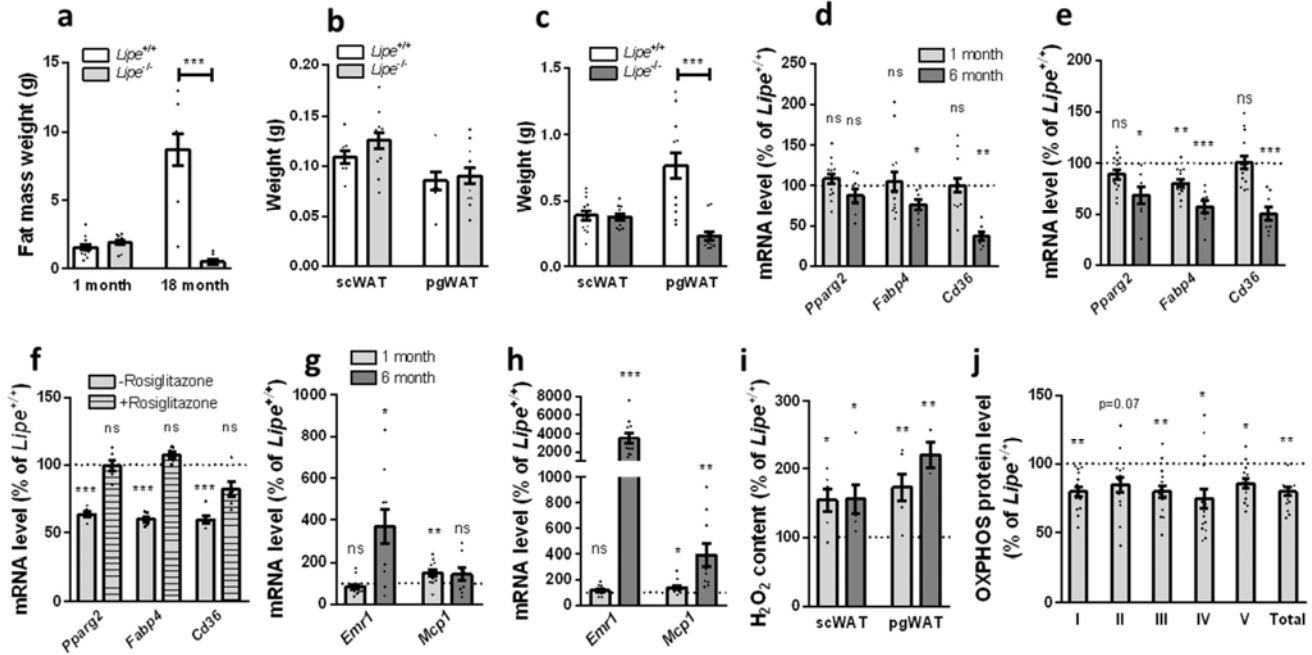
L'étude de l'interactome nucléaire de la LHS a permis de mettre en évidence son interaction avec la RBP (RNA-binding protein) et facteur de transcription SFPQ, dont nous montrons qu'elle joue un rôle dans la répression de l'expression de PGC-1 $\alpha$  par la localisation nucléaire de la lipase. Cependant, d'autres partenaires sont mis en évidence, notamment un grand nombre de RBPs tel que NONO, un partenaire bien connu de SFPQ. Le couple SFPQ/NONO participe à un grand nombre de mécanismes de régulation de la transcription, de réparation de l'ADN, ainsi qu'au métabolisme des ARNs par la formation des structures nucléaires que sont les paraspeckles (Knott, Bond, and Fox 2016). Nos résultats confirment l'interaction entre la LHS et NONO (Fig. 24a,b). Cependant, alors que la déplétion de SFPQ permet d'abolir les effets transcriptionnels observés en l'absence de LHS sur PGC-1 $\alpha$  et ses gènes cibles, ce n'est pas le cas de celle de NONO (Fig. 24c). Ainsi, la régulation du métabolisme oxydatif de l'adipocyte par la LHS nucléaire semble indépendante de NONO. Il n'est, toutefois, pas exclu que la LHS ait d'autres fonctions nucléaires que celle que nous décrivons, et puisse moduler des fonctions du couple SFPQ/NONO.



**Figure 24 : NONO is dispensable for nuclear HSL control of oxidative metabolism.** a-c experiments were carried in hMADS white adipocytes. **a**, Immunoprecipitation in nuclear extracts of HSL and NONO followed by immunodetection of HSL and NONO (n=2 biologically independent samples). **b**, *In situ* proximity ligation assays (red signals) performed with anti-HSL and anti-NONO (PLA HSL/NONO). Nuclei were labelled in blue using DAPI. Scale bars 20 $\mu$ m. **c**, mRNA expression level in hMADS adipocytes transfected with siRNAs against green fluorescent protein (siCTR, white bars), HSL (siLIPE, grey bars), NONO (siNONO, light pink bars) or both HSL and NONO (siNONO/siLIPE, dark pink bars) (n=4 replicates from 3 cell cultures). Data are mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using 1-Way ANOVA with Tukey's post-hoc test. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

#### II.4 Effet de la déficience en LHS *in vivo* chez la souris

Il a été montré dans plusieurs études que la déficience en LHS chez la souris aboutissait au développement relativement précoce d'une lipodystrophie ( $\leq 6$  mois) et s'aggravant avec l'âge. Nous confirmons ces données au laboratoire, des altérations de la masse grasse n'étant à la fois pas visibles chez de très jeunes souris, et également particulièrement exacerbées lors de la sénescence (Fig. 25a-c). Ainsi, des altérations d'expression génique de marqueurs adipocytaires ne sont observées que chez les animaux adultes déficients en LHS, ceci dans différents dépôts adipeux (Fig. 25d,e). Il avait été initialement proposé que la lipodystrophie chez ces animaux provienne d'un défaut d'adipogenèse, en lien avec une diminution de la potentielle fourniture de ligands PPAR $\gamma$  par la LHS (Shen et al. 2011). En accord, nous montrons une diminution d'expression de PPAR $\gamma$ 2 et de ses gènes cibles au cours de la différenciation *in vitro* de progéniteurs adipocytaires issus de ces animaux, observable uniquement si l'induction est réalisée en absence d'agoniste PPAR $\gamma$  (Fig. 25f). Cependant, il ne semble pas y avoir de défaut d'adipogenèse primaire au cours du développement *in vivo*, comme le montrent nos données (Fig. 25a-c). D'autres altérations sont toutefois observables dans les TA à des âges précoces. C'est, notamment, le cas de l'apparition d'un phénomène inflammatoire au niveau des dépôts adipeux qui semble précoce dans l'apparition du phénotype des animaux déficients en LHS. Il est observé à des âges jeunes une augmentation d'expression de *Mcp1*, une chimiokine produite par l'adipocyte et qui va être responsable de l'infiltration de macrophages dans les dépôts adipeux (Fig. 25g,h). Il va s'ensuivre une augmentation d'expression du marqueur de macrophage *Emr1* dans ces tissus avec l'âge. Il semble ainsi qu'il y ait des signaux de stress tissulaire précocement chez la souris déficiente en LHS, avant la mise en place de la lipodystrophie. Chez des animaux jeunes, nous mettons en évidence une augmentation des quantités d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les TA (Fig. 25i). Cette observation ne semble pas en lien avec une infiltration de cellules immunitaires qui n'est pas visible à ces âges précoces et qui, en outre, ne s'aggrave pas avec l'âge. L'accumulation de ROS peut témoigner d'un mauvais fonctionnement mitochondrial et nous montrons, en accord, une diminution de la quantité de protéines OXPHOS dans le TA des souris déficientes en LHS, qui pourrait témoigner d'un stress mitochondrial à l'origine du phénotype lipodystrophique de ces animaux (Fig. 25j).



**Figure 25 : The age-associated lipodystrophic phenotype of HSL deficient mice.**

**a** Fat mass weight in 1 vs 18 month old *Lipe*<sup>-/-</sup> and *Lipe*<sup>+/+</sup> mice (n=7-13). **b-c** subcutaneous (scWAT) and perigonadal (pgWAT) adipose tissue weights in 1 (**b**) and 6 (**c**) month old *Lipe*<sup>-/-</sup> and *Lipe*<sup>+/+</sup> mice (n=8-13). **d-e** mRNA expression level in scWAT (**d**) and pgWAT (**e**) of 1 (light grey bars) and 6 (dark grey bars) month old *Lipe*<sup>-/-</sup> mice vs respective *Lipe*<sup>+/+</sup> mice (dotted line) (n=8-13). **f** mRNA expression level in primary preadipocytes from *Lipe*<sup>-/-</sup> (grey bars) and *Lipe*<sup>+/+</sup> (dotted line) mice, differentiated in absence (empty bars) or presence (hatched bars) of PPAR $\gamma$  agonist rosiglitazone (n=6 replicates from 2 cell cultures). **g-h** mRNA expression level in scWAT (**g**) and pgWAT (**h**) of 1 (light grey bars) and 6 (dark grey bars) month old *Lipe*<sup>-/-</sup> mice vs respective *Lipe*<sup>+/+</sup> mice (dotted line) (n=8-13). **i** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content in scWAT and pgWAT of 1 (light grey bars) and 6 (dark grey bars) month old *Lipe*<sup>-/-</sup> mice vs respective *Lipe*<sup>+/+</sup> mice (dotted line) (n=3-6). **j** OXPHOS protein level in scWAT of 1 month old *Lipe*<sup>-/-</sup> mice (grey bars) vs *Lipe*<sup>+/+</sup> mice (dotted line) (n=11-15). Data are mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using unpaired t-test. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 compared to control condition.

## II.5 Matériels et méthodes associés

La très grande majorité des matériels et méthodes est décrite dans l'article, notamment pour la culture des cellules hMADS et le traitement par les siRNAs. C'est également le cas pour les mesures d'expression génique et protéique réalisées sur l'ensemble des modèles.

*Traitements pharmacologiques* : le traitement des cellules hMADS avec l'inhibiteur de phosphorylation de SMAD3 SIS3 (10 $\mu$ M), l'agoniste PPAR $\gamma$  rosiglitazone (0.1 $\mu$ M) et l'antagoniste PPAR $\gamma$  GW9662 (10 $\mu$ M) est réalisé du jour 14 au jour 18.

*Culture de préadipocytes murins* : des souris *Lipe*<sup>-/-</sup> ou *Lipe*<sup>+/+</sup> ont été sacrifiées à l'âge de 3 mois et les TA sous-cutanés prélevés. Les tissus ont été émincés grossièrement puis



digérés à la collagénase (Sigma C6885) pendant environ 45min. L'action de la collagénase est stoppée par dilution dans du PBS et la suspension cellulaire est passée sur filtre 40µm. La suspension est ensuite centrifugée à 2000rpm pendant 10min pour séparer la FSV des adipocytes. La FSV est ensuite mise en culture dans du DMEM (Sigma D6046) contenant 10% de sérum de veau fœtal. La différenciation adipocytaire est induite lorsque les cellules atteignent 80% de confluence. Deux conditions d'induction sont réalisées :

- Avec rosiglitazone : le milieu de base est complété avec de l'insuline (17nM), de la dexaméthasone (0,1µM), de l'IBMX (125µM) et de la rosiglitazone (1µM).

- Sans rosiglitazone : le milieu est complété avec de l'insuline (340nM), de la dexaméthasone (1µM) et de l'IBMX (500µM).

Au bout de 3 jours, le milieu est changé et ne contient plus que de l'insuline, aux mêmes concentrations que celles précédemment décrites. La culture est arrêtée au jour 7 de différenciation.

*Primers Sybrgreen* : Humains : hPPARG2 : F : CAAACCCCTATTCCATGCTGTT R : ATCAGTGAAGGAATCGCTTTCTG, hCD36 : F : TGATGATGAACAGCAGCAACA R : AGACTGTGTTGTCCTCAGCG, hFABP4 : F : GCATGGCCAAACCTAACATGA R : CCTGGCCCAGTATGAAGGAAA, hPDK4 : F : CTCGCGCTACAGCCCG R : GCATTTTCTGAACCAAAGTCCAG, hGYK : F : CTTCCACCTCTTGCGGAAC R : GCAGATACATGGCCTCTCCT. Murins : mPparg2 : F : AGTGTGAATTACAGCAAATCT R : CGAGTGGTCTTCCATCACGG, mFabp4 : F : TTCGATGAAATCACCGCAGA R : GGTGCGACTTCCATCCCACTT, mCd36 : F : CGCTGTGGAAATGGTGTGTT R : GAAGGCAGCAACTTCTAGAACAG, mMcp1 : F : ACTGAAGCCAGCTCTCTTCTCCTC R : TTCCTTCTGGGGTCAGCACAGAC, mEmr1 : F : TGTGGTCTAACTCAGTCTGC R : CAGACACTCATCAACATCTGCG.

*Anticorps* : hNONO : Abcam Ab70335

mOXPHOS : Abcam Ab110413

*siRNA* : siNONO : CAAAGUGGAUCCAGUUAGA – GUCAAUUCUGUGUGGUAUA – GGAUGGGUCAGAUGGCUAU – AAACAAACGUCGCCGAUAC

### III. Discussion et perspectives

Dans cette étude, nous mettons en évidence un nouveau rôle non enzymatique de la LHS dans le noyau de l'adipocyte. En interagissant dans le noyau avec le cofacteur de transcription SMAD3, la LHS participe aux effets géniques exercés par le TGF $\beta$ . D'une part, ce complexe inhibe la transcription du cofacteur PGC-1 $\alpha$ , permettant un tonus d'inhibition basale de la mitochondriogenèse et des capacités oxydatives de l'adipocyte. Cette régulation nécessite la présence du facteur de transcription et RBP SFPQ. D'autre part, le complexe LHS/SMAD3 assure le maintien d'un niveau basal d'expression des gènes de la MEC, cibles bien connues de la voie TGF $\beta$ . La LHS est connue pour son rôle historique d'enzyme, mais également et depuis peu dans le contrôle non enzymatique de l'activité du facteur de transcription ChREBP en lien avec la sensibilité à l'action de l'insuline de l'adipocyte (Morigny et al. 2019; Reczens, Mouisel, and Langin 2021). Nous révélons ici un nouveau rôle non enzymatique nucléaire de la LHS dans le contrôle de la balance entre capacité oxydative et production de MEC de l'adipocyte.

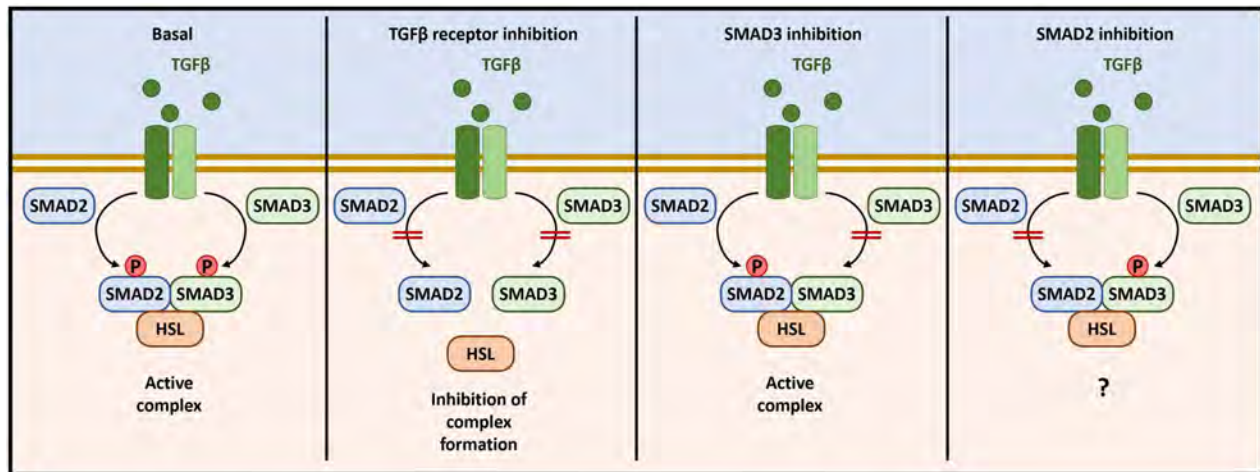
#### III.1 La LHS comme modulateur adipocytaire spécifique de la voie TGF $\beta$

Les voies de transduction de la superfamille du TGF $\beta$  sont des systèmes de signalisation ubiquitaire contrôlant une très grande variété de processus biologiques. Une abondante littérature révèle la complexité mécanistique de ces voies et la versatilité des réponses cellulaires qu'elles induisent (Massague 2012; Morikawa, Derynck, and Miyazono 2016). Cette importante variabilité de réponse, pour un phénomène donné et en fonction des types cellulaires, révèle l'existence de modes de régulations spécifiques de ces derniers. Bien que la LHS ne soit pas une protéine exclusivement adipocytaire, c'est dans ce type cellulaire que le niveau d'expression est le plus élevé (Reczens, Mouisel, and Langin 2021). Le phénotype métabolique de souris déficientes en LHS spécifiquement dans l'adipocyte est identique à celui observé lors d'une déficience globale (Mulder et al. 2003; Pajed et al. 2021; Shen et al. 2011; Xia et al. 2017). De plus, différents isoformes de la LHS sont retrouvés en fonction des types cellulaires. La région protéique de la LHS nécessaire à son interaction avec SMAD3 n'est pas encore définie. Cependant, il y a fort à penser que celle-ci se trouve dans la région N-terminale de la forme adipocytaire de la LHS, qui a été proposée comme région assurant la plupart des interactions protéine-protéine de la lipase. Des expériences sont en cours de

réalisation au laboratoire pour définir la région nécessaire à l'interaction entre la LHS et SMAD3, et pour vérifier l'existence de ce complexe dans d'autres types cellulaires. Des résultats préliminaires semblent cependant peu concluants quant à l'existence d'un complexe LHS/SMAD3 dans des cellules cancéreuses de pancréas exprimant pourtant les deux partenaires. Il est également possible que la formation du complexe LHS/SMAD3 dans l'adipocyte soit dépendant d'un autre facteur spécifiquement exprimé dans ce type cellulaire. A l'heure actuelle, nous n'avons pas d'information quant à la liste exacte de gènes étant modulés par le complexe non canonique LHS/SMAD3 par rapport au canonique SMAD3/SMAD4. Des études de CHIP-seq contre les partenaires d'intérêt permettront de définir plus précisément le rôle de chaque complexe, mais, à l'heure actuelle, il n'existe pas d'anticorps dirigé contre la LHS qui soit efficace en CHIP. Dans cette optique, la construction de formes tagguées de la LHS est en cours au laboratoire pour permettre de réaliser des CHIP avec des anticorps dirigés contre les tags. Ces formes tagguées seront réexprimées dans un modèle *in vitro* d'adipocytes déficients en LHS à la suite d'une édition génomique par CRISPR-Cas9.

Nos données préliminaires semblent montrer une indépendance à la phosphorylation spécifiquement de SMAD3, alors que la déplétion de la protéine affecte la translocation de la LHS et les effets géniques induits par l'absence de la lipase. Ainsi, la présence de SMAD3 semble importante, mais sa phosphorylation non nécessaire. Cependant, l'antagoniste du récepteur de type 1 au TGF $\beta$ , s'opposant à la phosphorylation de SMAD3 mais également à celle de SMAD2, l'autre R-SMAD de la voie TGF $\beta$ -like, reproduit le même effet que la déplétion de SMAD3. Ces données laissent ainsi supposer que la LHS n'interagirait pas uniquement avec SMAD3 mais également avec SMAD2. Le modèle le plus cohérent serait de penser que la LHS s'associerait en trimère avec SMAD3 et SMAD2 et que la phosphorylation d'un seul de ces SMAD soit suffisante pour induire la formation de ce complexe (Fig. 26). L'activité de ce complexe serait ainsi dépendante de la présence physique de SMAD3 mais pas de sa phosphorylation, celle de SMAD2 étant suffisante à l'association des 3 partenaires. De plus, les effets de la stimulation TGF $\beta$  sur la formation du complexe LHS/SMAD3(/SMAD2) et sa translocation nucléaire pourraient être dus à une augmentation de phosphorylation de SMAD2. Enfin, l'étude montrant que SMAD3 interagit avec SFPQ ne se cantonne pas à l'interactome de SMAD3, mais à celui de SMAD2/3, mettant donc en évidence une interaction

SMAD2/SFPQ qui s'accorde avec nos résultats et cette hypothèse (Bertero et al. 2018). Une interaction de la LHS avec à la fois SMAD3 et SMAD2 ferait sens quant aux régulations des translocations subcellulaires et des effets transcriptionnels de la LHS que nous mettons en évidence. Des mesures d'interactions entre la LHS et SMAD2 seront réalisées prochainement par immunoprécipitation et PLA, et le rôle de SMAD2 dans les régulations transcriptionnelles de la LHS évalué par des expériences de double siRNA.



**Figure 26 : Modèle de formation du complexe LHS/SMADs en réponse au TGFβ.**

A la suite d'une stimulation TGFβ, les SMAD2 et SMAD3 sont phosphorylés par les récepteurs au TGFβ, et s'associent dans un complexe contenant la LHS. L'inhibition de l'activité kinase des récepteurs au TGFβ (SB431542) bloque la phosphorylation des SMADs et empêche la formation et l'activité du complexe LHS/SMAD2/SMAD3. A l'inverse, un blocage spécifique de la phosphorylation de SMAD3 n'affecte pas l'activité du complexe, indiquant que la phosphorylation de SMAD3 n'est pas indispensable, et que celle de SMAD2 suffirait à induire la formation et l'activité du complexe LHS/SMAD2/SMAD3. En accord, il est possible d'imaginer que la phosphorylation d'un seul des SMADs est suffisante pour permettre la formation du complexe.

Par ailleurs, nous mettons en évidence que l'activité du complexe LHS/SMAD3, en plus de répondre à une stimulation TGFβ, est modulée par la voie PKA ciblant la phosphorylation de la LHS, plaçant la lipase comme un point de convergence des deux voies. Nous montrons en effet qu'une phosphorylation de la lipase à la suite de l'augmentation des taux d'AMPC, comme lors d'un stimulus lipolytique, va engendrer la relocalisation de la LHS à la GL et diminuer son interaction avec SMAD3. Cependant, la LHS contient de nombreux sites de phosphorylations, dont les rôles respectifs dans la modulation de ses différentes fonctions ne sont que peu définis, et concernent principalement sa fonction d'enzyme (Reczens, Mouisel, and Langin 2021). De manière intéressante, nous mettons en évidence la présence d'une séquence d'export nucléaire (NES) qui semble fonctionnelle, sa délétion entraînant la

réretention nucléaire de la LHS. Cette séquence NES est située à proximité du site de phosphorylation Ser552 dont la fonction n'est pas connue (cf. Article Extended Data Fig. 9b), et il est largement admis que des mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation contrôlent l'accès de la séquence NES aux protéines assurant le transport nucléaire (Nardozzi, Lott, and Cingolani 2010; Xu and Massague 2004). Il est donc possible que ce site de phosphorylation contrôle la localisation nucléaire de la LHS. D'importants travaux de mutagenèse dirigée de ces différents sites de phosphorylation sont en cours au laboratoire dans le but d'identifier leurs rôles respectifs et de pouvoir ainsi dissocier les mécanismes de régulation des fonctions de la LHS. Alors que l'activation des facteurs de transcription de la famille CREB/ATF lors d'une stimulation AMPc/PKA est connue pour induire le beigissement des adipocytes blancs (Shi and Collins 2017), il serait intéressant de pouvoir définir si l'export de la LHS nucléaire et la levée de son tonus inhibiteur favorise leur activité.

Enfin, bien que notre étude démontre un rôle nucléaire de la LHS, nous n'avons que peu d'informations quant à la relevance physiologique et aux conséquences systémiques de cette localisation *in vivo*. Pour répondre à ces questions, des souris déficientes en LHS seront prochainement traitées avec des AAV au niveau des TA pour ré-exprimer des formes de la LHS dont la localisation subcellulaire est altérée. Des mutants de la LHS auxquels seront ajoutées des séquences NLS et NES permettront respectivement d'évaluer les conséquences systémiques d'une présence majoritairement nucléaire ou cytosolique sur le métabolisme énergétique.

### **III.2 La LHS nucléaire en physiopathologie**

Nos données montrent une accumulation de la LHS dans le noyau de l'adipocyte en lien avec une augmentation de son interaction avec SMAD3 chez des souris obèses sous régime riche en graisses. L'augmentation de la production de TGF $\beta$  au niveau du TA au cours de l'obésité, participant à la fibrose, est un phénomène bien décrit (Alessi et al. 2000; Fain, Tichansky, and Madan 2005; Henegar et al. 2008; Klimcakova et al. 2011; Roh et al. 2020; Yadav et al. 2011). Nous proposons ainsi que l'accumulation de la LHS dans le noyau participe activement aux effets délétères du TGF $\beta$  dans la physiopathologie de l'obésité. Des expériences sont en cours au laboratoire pour essayer d'établir un lien entre la quantité de LHS nucléaire dans des cultures de progéniteurs adipocytaires et les niveaux de résistance à l'action de l'insuline au niveau du TA chez des patients plus ou moins diabétiques n'étant pas obèses. D'autre part, il

est possible d’imaginer d’autres conditions pathologiques dans lesquelles une accumulation de LHS nucléaire en réponse à une production accrue de ligands TGF $\beta$  dans le TA serait délétère. L’utilisation d’un régime riche en graisses chez la souris comme dans notre étude n’est pas seulement un modèle d’obésité, mais aussi de vieillissement et de sénescence en lien avec une augmentation du tonus TGF $\beta$  (Pini et al. 2021). Il est largement admis que les niveaux circulants de ligands TGF $\beta$  augmentent avec l’âge et participent au vieillissement chez l’humain (Tominaga and Suzuki 2019). Il est ainsi possible de spéculer qu’une accumulation de LHS nucléaire avec l’âge participe à la mise en place du phénotype sénescence. Un autre exemple pourrait être les cancers induisant des cachexies, dans lesquels a été décrite une production de ligands TGF $\beta$  par la tumeur, dont l’inhibition améliorerait le phénotype et la mortalité des individus (Greco et al. 2015; Guttridge 2015; Lima et al. 2019). De plus, la présence de LHS dans le noyau d’autres types cellulaires, notamment dans des lignées de cancers pancréatiques (données du laboratoire), pourrait laisser entrevoir des rôles importants en cancérologie aux vues des rôles importants des voies TGF $\beta$  dans ces pathologies.

### **III.3 Potentiel thérapeutique de modulation des fonctions nucléaires de la LHS**

Des altérations de signalisation de la voie TGF $\beta$  ont été rapportées dans un grand nombre de phénomènes pathologiques (Gordon and Blobel 2008). De par leur ubiquité et leurs importants rôles dans les régulations cellulaires, des modulations pharmacologiques des voies TGF $\beta$  ne sont que peu envisagées à l’heure actuelle, mis à part dans certaines formes de cancers et dans des maladies de fibrose chronique (Akhurst and Hata 2012; Teicher 2021). Le ciblage de ces voies restreint à certains types cellulaires particuliers est donc un enjeu important.

Ici, nous montrons que la LHS participe dans l’adipocyte à la modulation de la voie TGF $\beta$ . Le ciblage de cette fonction semble d’intérêt thérapeutique à la vue de son rôle tonique dans l’inhibition des capacités oxydatives adipocytaires et dans l’induction de la synthèse de MEC. La littérature rapporte que l’apparition et l’activation d’adipocytes thermogéniques est bénéfique dans des contextes de pathologies métaboliques, tout comme l’est la réduction du dépôt de MEC lors de la fibrose associée (Harms and Seale 2013; Marcelin, Gautier, and Clement 2022). Plusieurs classes d’inhibiteurs pharmacologiques de l’activité enzymatique de la LHS ont été caractérisées (Reczens, Mouisel, and Langin 2021). Une inhibition de la lipolyse est bénéfique dans un contexte de maladies métaboliques, et la LHS, de par sa particularité

de structure vis-à-vis des autres lipases, représente une cible de choix en termes de spécificité. Ici, notre étude met en évidence un nouveau rôle non enzymatique de la LHS via son interaction physique avec SMAD3, dont l'altération par des petites molécules interférentes semble également d'intérêt thérapeutique. Une autre stratégie serait de pouvoir moduler le statut de phosphorylation de la LHS, ce dernier modulant l'interaction de la lipase avec SMAD3 et sa présence nucléaire. Cependant, il faudrait avant tout identifier le rôle des différents sites de phosphorylation dans la modulation des différentes fonctions de la LHS comme évoqué précédemment. Il semble cependant peu probable de pouvoir trouver des modulateurs pharmacologiques permettant de cibler précisément un site de phosphorylation plutôt qu'un autre, puisque modulé par des kinases exprimées de façon ubiquitaire et ayant un très grand nombre d'autres cibles. En revanche, il est possible d'imaginer que des mesures hygiéno-diététiques puissent induire des effets bénéfiques d'un point de vue métabolique, en favorisant la rétention cytosolique de la LHS. Du fait de l'export nucléaire de la LHS vers le cytosol lors d'un stimulus lipolytique, il est possible que la multiplication de ces stimuli et l'allongement de leurs durées permettent des adaptations phénotypiques bénéfiques de l'adipocyte en lien avec l'inhibition du rôle nucléaire de la LHS. Un exemple pourrait être le jeûne intermittent, qui consiste à allonger les périodes de jeûne quotidiennes sans restriction calorique. Les effets bénéfiques du jeûne intermittent dans un contexte de maladie métabolique ont été décrits comme au moins en partie résultant d'un beigissement du TA blanc (Aouichat et al. 2020; Kim et al. 2017; Li et al. 2017). Bien que divers mécanismes aient été décrits comme induisant ce beigissement, il reste envisageable que les périodes prolongées de jeûnes, associées à un stimulus lipolytique plus long dans la durée, favorisent la rétention cytosolique de la LHS, levant l'inhibition tonique qu'elle assure sur le métabolisme mitochondrial et la transition vers un phénotype beige/oxydatif. Un autre exemple pourrait être l'exercice physique régulier, qui va être associé à des mobilisations de substrats plus réguliers. Plusieurs études rapportent des phénomènes de beigissement du TA blanc lors d'entraînement physique chez le rongeur et l'humain, bien que ces résultats soient controversés (Lehning et al. 2019; Otero-Diaz et al. 2018; Stanford, Middelbeek, and Goodyear 2015; Vidal and Stanford 2020). Il pourrait être plausible que le beigissement d'adipocytes résulte en partie de la rétention cytosolique de la LHS favorisée par l'importante et régulière demande de mobilisation des substrats lipidiques.

En lien, à la vue de nos données et des informations disponibles dans la littérature, il semble important de préciser qu'un ciblage de la LHS par l'action de petites molécules ne devrait affecter qu'une seule de ses fonctions. En effet, comme introduit précédemment, la déficience en LHS chez l'humain et le rongeur induit l'apparition d'un phénotype lipodystrophique, montrant qu'une absence de l'ensemble des fonctions assurées par la LHS conduit à un dysfonctionnement du TA aux conséquences systémiques délétères.

#### **III.4 Autres rôles potentiels de la LHS nucléaire**

Outre l'interaction de la LHS avec SMAD3 dans le noyau en lien avec la régulation de l'activité transcriptionnelle de ce dernier, il est possible d'imaginer à la vue de nos résultats d'autres fonctions de la lipase dans le noyau.

L'interactome nucléaire/chromatinien de la LHS révèle une multitude de partenaires dont certains ont été validés par différentes techniques, comme SFPQ pour laquelle nous montrons un rôle important dans la régulation des effets géniques de la LHS sur la biogenèse mitochondriale, mais également son partenaire bien connu qu'est NONO ou encore PSPC1. Ces protéines sont toutes des RBPs appartenant à la famille des DBHS (*Drosophila* Behavior/Human Splicing) connues pour assurer différentes fonctions nucléaires (Knott, Bond, and Fox 2016). Le couple SFPQ/NONO est impliqué dans la régulation de la transcription par divers mécanismes, notamment la séquestration de facteurs de transcription, la co-activation ou co-répression de ces derniers lorsque liés à l'ADN, mais également la séquestration de la RNAPolIII. Bien que notre étude mette en avant un rôle de SFPQ (à la différence de NONO) dans le contrôle transcriptionnel modulé par la LHS, il est possible que la lipase régule ou participe à d'autres fonctions en lien avec ces deux partenaires. En effet, le couple SFPQ/NONO est historiquement connu pour moduler différentes étapes du métabolisme des pré-ARNm via leur fonction de RBP, telles que leur élongation au cours de la transcription, leur épissage, leur export vers le cytosol ou encore leur stockage nucléaire (Knott, Bond, and Fox 2016). Cette dernière fonction est notamment assurée dans des corps nucléaires particuliers que sont les paraspeckles. Le complexe SFPQ/NONO, en association avec PSPC1, est crucial dans la formation et le bon fonctionnement de ces corps nucléaires, dont l'architecture de base est régie par la liaison de ces RBPs sur le long ARN non codant NEAT1 (Clemson et al. 2009). Un autre grand nombre de RBPs viendra ensuite s'organiser autour de cette structure de base pour assurer le fonctionnement de ces corps nucléaires. Plusieurs études mettent en



avant un rôle important des RBPs mais aussi des paraspeckles dans la biogenèse mitochondriale et le bon fonctionnement de ces organelles (Cosker et al. 2016; Hosokawa et al. 2019; Schatton and Rugarli 2018; Takeuchi et al. 2018; Wang et al. 2018). Il est ainsi possible qu'une partie des effets que nous observons résulte d'une modulation des propriétés des paraspeckles et de l'activité des RBPs. Beaucoup de ces RBPs ont été retrouvées dans l'interactome nucléaire de la LHS, laissant imaginer un potentiel rôle de la LHS dans les fonctions assurées par ces protéines et différents corps nucléaires dans le métabolisme des ARNs. De plus, il a été montré que SMAD3 possède lui-même une fonction de RBP, renforçant l'idée que la LHS puisse participer à des fonctions de cette famille de protéine (Derynck and Budi 2019; Dickey and Pyle 2017; Xie et al. 2020). Il est même possible d'imaginer que la LHS soit elle-même une RBP. Des expériences préliminaires ont été conduites à ce sujet au laboratoire et donne des résultats encourageants, la LHS semblant lier des ARNs dans une mesure de enhanced UV crosslinking and immunoprecipitation (eCLIP), une variante du RNA immunoprecipitation (RIP) permettant d'immunoprécipiter des protéines et d'étudier les ARNs qu'elles lient. Cependant, le manque de contrôles rigoureux concernant la spécificité de l'anticorps dans ces expériences laisse planer un doute quant à la véracité des mesures. Ces expériences vont être reconduites dans notre modèle d'adipocytes humains sauvages et délétés pour la LHS via CRISPR-Cas9 pour s'assurer que ces résultats dépendent bien de l'immunoprécipitation de la LHS et non d'une autre cible non spécifique de l'anticorps.

Par ailleurs, l'interactome nucléaire de la LHS semble révéler des interactions avec des facteurs de transcription de la famille STAT, notamment STAT1, STAT3 et STAT5A. Le rôle de ces facteurs de transcription dans l'adipocyte reste cependant mal connu. Bien que des informations soient disponibles quant au rôle pro-adipogénique de STAT3 et STAT5, et anti-adipogénique de STAT1, leurs gènes cibles respectifs sont peu décrits (Burrell, Boudreau, and Stephens 2020). Alors que nous plaçons la LHS comme point de convergence des voies TGF $\beta$  et PKA, des interactions ont été mises en évidence entre des protéines SMAD et STAT, ainsi que des régulations réciproques positives et négatives entre ces deux voies (Itoh, Saitoh, and Miyazawa 2018; Luo 2017). Il est ainsi possible d'imaginer que la LHS s'ancre comme médiateur de l'interaction de ces deux voies de signalisation. A l'heure actuelle, l'interaction de la LHS avec les membres précités de la famille STAT n'a pas été validée par d'autres techniques au laboratoire. Le potentiel rôle de la LHS dans la régulation de l'activité de ces

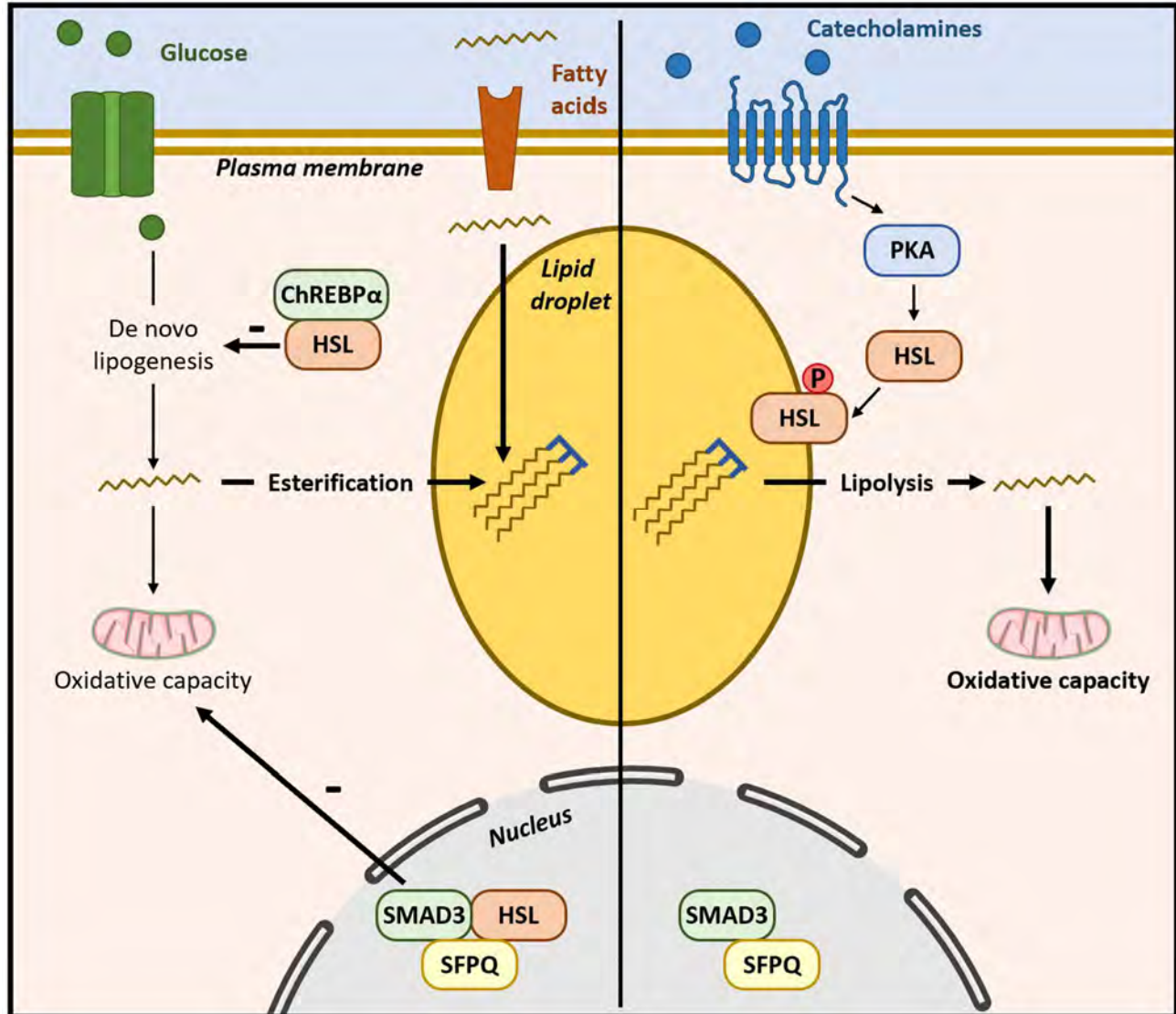
facteurs de transcription et ses conséquences restent totalement inexplorées et pourraient représenter un axe de recherche intéressant.

Bien que nous mettions en évidence un rôle non enzymatique de la LHS dans le noyau de l'adipocyte, il n'est pas exclu qu'elle y joue également une fonction de lipase. Des études récentes faites chez la levure mettent en évidence la présence de GL nucléaire, dont la formation est notamment dépendante de la seipine au niveau de la membrane nucléaire interne, lieu d'un métabolisme lipidique actif (Romanauska and Kohler 2018, 2021). Chez les mammifères, la présence de GL nucléaire a été rapportée dans différents modèles d'hépatocytes bien que leurs rôles biologiques ne soient pas bien définis. Une étude récente met en évidence un rôle de ces corps nucléaires dans la synthèse de phosphatidylcholines (Soltysik et al. 2019). De façon intéressante, il semble que la formation des GL nucléaires dans l'hépatocyte soit fortement liée à la présence de corps nucléaires particuliers que sont les PML (premyelocytic leukemia) (Ohsaki et al. 2016). L'interactome nucléaire de la LHS révèle que cette dernière interagit avec la protéine PML, cruciale dans la formation des corps nucléaires du même nom. Alors que ces informations laisseraient imaginer un potentiel rôle de la LHS à la fois dans la formation de ces structures et des GL nucléaires, à l'heure actuelle, l'existence de GL dans le noyau de l'adipocyte reste hypothétique, n'étant pas documentée.

### III.5 La LHS comme acteur central du métabolisme des lipides de l'adipocyte

L'ensemble des données produites par le laboratoire permet de placer la LHS comme un régulateur de différentes facettes du métabolisme des lipides dans l'adipocyte (Fig. 27). En condition basale, la LHS cytosolique interagit avec le facteur de transcription ChREBP et réduit sa translocation nucléaire. Ce mécanisme inhibe la lipogenèse *de novo*, limitant la synthèse d'AG à partir du glucose. Dans ces mêmes conditions, la LHS se retrouve également dans le noyau, où elle interagit notamment avec SMAD3 et SFPQ pour réduire l'expression de PGC-1 $\alpha$ , limitant ainsi la mitochondriogenèse et la capacité oxydative de l'adipocyte. A l'inverse, en condition lipolytique, la PKA va phosphoryler la LHS, ce qui va influencer sa localisation subcellulaire et ses différentes actions. La phosphorylation est principalement connue pour induire sa translocation à la GL, où elle va jouer son rôle d'enzyme et aider à libérer les AG contenus dans les DG, permettant l'augmentation des flux d'AG. En association avec ce phénomène, les interactions protéine-protéine de la LHS vont être fortement réduites, que ce soit avec ChREBP, SMAD3 et SFPQ. Ces modifications d'interactome vont avoir plusieurs

conséquences sur le métabolisme des lipides. Tout d'abord, des données du laboratoire montrent que la diminution d'interaction avec ChREBP *in vitro* ne favorisera pas pour autant la translocation nucléaire du facteur de transcription. Cependant, ce phénomène a été évalué à court terme et il est possible que, sur le long terme, dans le cadre de stimulations prolongées de jeûne ou de mise au froid, la diminution d'interaction entre la LHS et ChREBP favorise l'import nucléaire de ce dernier, augmentant les taux de lipogenèse *de novo*, un phénomène important dans le soutien de la thermogenèse dans le TA brun. En lien, lors de ces mêmes stimulations, la LHS va être fortement exportée du noyau, réduisant la formation du complexe LHS/SMAD3/SFPQ et l'inhibition de PGC-1 $\alpha$ . S'ensuit ainsi une augmentation de la mitochondriogenèse et de la capacité oxydative de la cellule. Ainsi, la phosphorylation de la LHS va être associée à un couplage entre une augmentation de la libération d'AG, assurée par son activité enzymatique, et de la capacité de l'adipocyte à utiliser ces AG via oxydation/thermogenèse, par inhibition du rôle répresseur de la LHS nucléaire. Ce couplage pourrait permettre la thermorégulation lors d'expositions prolongées au froid, ce qui fait également sens avec le rôle précédemment évoqué sur la régulation de ChREBP. D'autre part, il est possible que sur des laps de temps plus courts, notamment lors de jeûnes restreints, une augmentation à moindre échelle des capacités oxydatives en parallèle d'une activité lipolytique augmentée permette de tamponner la libération d'AG, limitant leur toxicité. En effet, il est largement admis que les AG soient majoritairement réestérifiés à la suite de leur libération par la lipolyse, et que seule une fraction réduite soit libérée dans la circulation sanguine. Ce système d'oxydation permettrait un contrôle fin du devenir des AG pour éviter la lipotoxicité. En résumé vis-à-vis des AG, la LHS contrôle les taux 1) de leur libération par son activité enzymatique dans le cytosol 2) de leur synthèse par la régulation de la lipogenèse *de novo* via son interaction avec ChREBP dans le cytosol, 3) de leur dégradation par contrôle de la capacité oxydative de l'adipocyte via son rôle nucléaire. Ainsi, la LHS se trouve au carrefour du contrôle du métabolisme lipidique dans l'adipocyte.



**Figure 27 : Intégration des rôles de la LHS dans le métabolisme lipidique de l'adipocyte.**

En condition basale, la LHS interagit avec ChREBP dans le cytosol et inhibe son activité, limitant les taux de lipogenèse *de novo*. En parallèle, la présence de LHS nucléaire associée à SMAD3 et SFPQ est responsable d'une inhibition tonique du métabolisme oxydatif de la cellule. Lors d'une stimulation adrénérgique, la phosphorylation de la LHS induit sa translocation à la GL (lipid droplet) où elle va libérer les AG par son activité d'enzyme lipolytique. Elle va en parallèle sortir du noyau et se séparer de ses partenaires, levant l'inhibition tonique de la capacité oxydative, couplant ainsi libération et utilisation des lipides.

### III.6 La boîte noire de la lipodystrophie induite par la déficience en LHS

Plus de 20 ans après la description du premier modèle murin de déficience en LHS, aucune étude mécanistique n'a permis d'expliquer l'apparition du phénotype lipodystrophique (Osuga et al. 2000; Wang et al. 2001). Cependant, à la vue des données de la littérature et des

résultats disponibles au laboratoire, plusieurs hypothèses peuvent être envisagées. Il a d'abord été proposé que l'absence de LHS altérerait l'adipogenèse chez ces animaux (Harada et al. 2003). D'un point de vue mécanistique, il a été supposé que la LHS, par son activité enzymatique, fournirait des ligands endogènes de PPAR $\gamma$  (Shen et al. 2011). Ce facteur de transcription crucial dans l'adipogenèse est connu pour être activé par des lipides bioactifs, bien que la nature de ses ligands endogènes ne soit pas connue (Brust et al. 2018; Capelli et al. 2016). Chez la souris déficiente en LHS, un traitement à la rosiglitazone compense partiellement l'apparition de la lipodystrophie (Shen et al. 2011). En accord, nous montrons *in vitro* que la rosiglitazone compense les défauts de différenciation de préadipocytes murins issus d'animaux déficients en LHS. Cependant, à la vue de l'importance de l'activation de PPAR $\gamma$  dans l'apparition et le maintien du phénotype adipocytaire, il est possible que ce mécanisme soit compensatoire sans pour autant cibler directement le mécanisme premier d'apparition de la lipodystrophie. De plus, l'effet chez la souris n'est que partiel, notamment lorsqu'elles sont soumises à un régime riche en graisses, fragilisant cette hypothèse. D'autre part, il a été montré récemment qu'un long ARN non codant important pour l'adipogenèse était produit à partir du gène codant la LHS, à la fois chez la souris et chez l'humain (Thunen et al. 2022). Ainsi, il est possible que l'effet supposé sur les défauts d'adipogenèse observés chez les souris et humains déficients en LHS résulte de l'absence de production de cet ARN, à la suite de la délétion génique nécessaire à la création du modèle de déficience chez la souris, et des mutations de séquences comme retrouvées chez l'humain.

Par ailleurs, plusieurs arguments tendent à démontrer qu'il n'y a pas de défaut d'adipogenèse primaire lors de la déficience en LHS. En effet, il a été montré chez la souris que la lipodystrophie se développait avec l'âge, avec peu, voire aucune altération ni dans le poids des différents dépôts adipeux ni dans l'expression de marqueurs de maturité adipocytaire chez de jeunes souris (Xia et al. 2017). Des défauts de ces paramètres vont apparaître plus tardivement et s'aggraver avec l'âge. Chez l'humain, de façon similaire, des altérations dans la répartition de la masse grasse et des perturbations métaboliques semblent apparaître chez l'adulte bien que l'effet « âge » reste peu documenté (Zolotov et al. 2017). De plus, nous mettons en évidence au laboratoire, qu'une délétion de la LHS spécifiquement dans l'adipocyte, de façon conditionnelle par un système inductible (Adipo-Cre<sup>ERT2</sup>) chez la souris adulte, va entraîner l'apparition d'une lipodystrophie en quelques semaines seulement. Ainsi,

il semble que l'absence de LHS *in vivo* entraîne l'apparition d'une lipodystrophie en lien avec des défauts de maintien d'une bonne santé du TA seulement chez l'adulte, plutôt qu'avec des défauts de son développement. Cependant, il n'est pas exclu que des défauts d'adipogenèse soient en effet présents plus tardivement, s'opposant au recrutement d'adipocytes sains qui permettraient de maintenir un tissu fonctionnel. Ce phénomène pourrait permettre d'expliquer les hypothèses suivantes.

Il semblerait qu'il existe une cinétique d'évènements dans la mise en place du phénotype délétère observé chez la souris déficiente en LHS. Bien que des altérations du poids du TA et de l'expression génique de marqueurs adipocytaires apparaissent et s'aggravent avec l'âge, il a été montré l'apparition d'un phénomène inflammatoire au niveau du TA à des âges très précoces chez ces animaux, des résultats reproduits au laboratoire (Cinti et al. 2005). Il est bien connu qu'une inflammation chronique du TA dans diverses pathologies comme l'obésité aura des conséquences délétères variées sur le bon fonctionnement de ce tissu. En lien avec la partie précédente, l'inflammation va être associée à des défauts d'adipogenèse, un phénomène largement décrit (Jiang et al. 2019). Il est ainsi possible que l'inflammation chronique observée chez la souris déficiente en LHS soit à l'origine de défauts tardifs d'adipogenèse s'opposant au renouvellement d'adipocytes matures. De plus, il est possible que l'inflammation dans le TA soit à l'origine des défauts de différenciation adipocytaire que nous observons *in vitro*. En effet, les cultures de fractions stroma-vasculaires présentées ont été réalisées à partir de souris dont le TA est suffisamment développé pour ne pas être limitant en fourniture de matériel biologique. Ainsi, lorsque ces cultures sont réalisées à partir de souris déficientes en LHS de 3 mois ou plus, l'inflammation du TA est déjà observable. Il a été montré qu'il existe une certaine mémoire des progéniteurs adipocytaires, correspondant à l'état physiologique des individus dont ils proviennent. Ainsi, des progéniteurs issus d'individus obèses se différencient moins bien que ceux provenant d'individus normopondérés et présentent des défauts d'induction de lipolyse (Langin et al. 2005; Rossmeislova et al. 2013). Il est ainsi possible que la moindre différenciation des progéniteurs adipocytaires provenant de souris déficientes en LHS s'explique par un phénomène épigénétique en lien avec l'environnement inflammatoire. Ces progéniteurs pourraient être moins engagés dans l'adipogenèse, arborant un phénotype plus myofibroblastique. Ceci serait en accord avec nos résultats montrant un sauvetage de la différenciation par un agoniste PPAR $\gamma$ . En effet, si l'on

met de côté l'hypothèse de la fourniture de ligands pour ce dernier par la LHS, une activation de PPAR $\gamma$  par un agoniste pharmacologique va induire un programme transcriptionnel puissant en faveur de l'adipogenèse, qui pourrait contrecarrer les différences d'engagement des progéniteurs entre les génotypes (Imai et al. 2004; Siersbaek, Nielsen, and Mandrup 2010; Zhang et al. 2004). De plus, l'activation de PPAR $\gamma$  est connue pour avoir des propriétés anti-inflammatoires, inhibant notamment l'activité du facteur de transcription crucial dans l'inflammation NF $\kappa$ B, ce qui pourrait également être à l'origine de nos observations (Hou, Moreau, and Chadee 2012; Kaplan et al. 2014; Remels et al. 2009; Scirpo et al. 2015). Ces hypothèses seraient en accord avec le développement primaire du TA chez ces animaux qui ne semble pas être altéré. Il sera intéressant de répéter ces cultures de FSV dans des souris d'âges différents.

Une autre hypothèse serait l'inflammation chronique qui va induire l'apparition d'une fibrose du TA, ceci impliquant le recrutement de cellules pro-inflammatoires dont les sécrétions profibrotiques comme des ligands de la voie TGF $\beta$  vont entraîner l'apparition de myofibroblastes (Bourlier et al. 2012; Esteve et al. 2019; Roh et al. 2020). Cette fibrose va, par la suite, diminuer la plasticité adipocytaire par contraintes mécaniques, s'opposant à l'expansion saine du TA par hypertrophie, et favorisant l'apparition d'altérations cellulaires qui conduiront à des complications métaboliques (Chun et al. 2006; Pellegrinelli et al. 2014; Young et al. 2013). En effet, il existe un fort lien entre la capacité des adipocytes à s'hypertrophier et les tensions mécaniques associées à la MEC. Par exemple, les souris ob/ob sont un modèle bien connu d'obésité induite par hyperphagie, dans lequel l'importante augmentation de la masse grasse est associée à une hypertrophie adipocytaire à l'origine de l'apparition de complications métaboliques (Ingalls, Dickie, and Snell 1950). Cependant, le croisement de ces animaux avec des souris déficientes pour le collagène 6, important composant de la MEC du TA principalement produit par l'adipocyte, induira une hypertrophie adipocytaire encore plus marquée, mais de façon intéressante améliorera le phénotype métabolique de ces animaux (Khan et al. 2009; Kim et al. 2007). De façon similaire, une surexpression de la métalloprotéinase MMP14, qui dégrade le collagène, dans un modèle d'obésité chez la souris améliore le profil métabolique en permettant une expansion plus importante des adipocytes (Li et al. 2020). Il semblerait ainsi que l'hypertrophie adipocytaire ne soit pas un phénomène délétère à lui seul, mais que la limitation de cette expansion par la MEC soit à l'origine de

l'altération de son phénotype. Peu d'informations sont disponibles quant à la mise en place d'une fibrose chez les animaux déficients en LHS dans la littérature. Nous montrons de façon concordante avec nos résultats *in vitro*, une diminution d'expression des composants de la MEC lorsque ces animaux sont jeunes. Cependant, des données préliminaires mettent en évidence une augmentation de l'expression génique de ces mêmes composants avec l'apparition du phénotype lipodystrophique.

Enfin, l'inflammation pourrait également être associée à l'apparition d'un stress oxydant, provenant d'un stress mitochondrial aux conséquences délétères. Des données préliminaires du laboratoire mettent en évidence une présence accrue d'espèces réactives de l'oxygène comme l' $H_2O_2$  en parallèle d'une diminution d'expression des protéines de la chaîne respiratoire dans le TA des animaux déficients en LHS, y compris à des âges très jeunes. Il est intéressant de noter que des modèles de mitochondriopathies, tels que les souris déficientes dans l'adipocyte pour TFAM, un important facteur de transcription mitochondrial, aboutissent à un phénotype lipodystrophique (Vernoche et al. 2014). Toutefois, et de façon redondante à ce qui a été exposé plus haut, ce phénomène pourrait tout aussi bien être une cause de l'inflammation, si d'origine adipocytaire, ou une conséquence, si associée à l'infiltration de cellules immunitaires. La répétition de ces mesures à la suite de la séparation des fractions adipocytaire et stromale nécessite ainsi d'être réalisée. En accord, il a été très tôt rapporté une infiltration de diverses populations de cellules immunitaires dans le TA des animaux déficients en LHS, comme des mastocytes et des macrophages. Ces macrophages vont former des structures en couronne autour d'adipocytes hypertrophiques, appelées « crown-like structures », dont le phénotype est connu pour être délétère (Cinti et al. 2005). Il est ainsi possible que l'hypertrophie adipocytaire soit à l'origine de l'inflammation observée dans le TA dépourvu de LHS. Néanmoins, l'origine de l'hypertrophie adipocytaire reste inconnue. Il semblerait envisageable qu'une absence de LHS, réduisant l'activité lipolytique, induise l'apparition d'adipocytes hypertrophiques, ce qui fut rapporté dans la littérature (Osuga et al. 2000; Xia et al. 2017). Cependant, les animaux déficients en ATGL, une autre enzyme clé de la lipolyse, présentent sous régime standard des adipocytes hypertrophiques, sans pour autant développer d'inflammation (Ahmadian et al. 2011). De plus, il n'existe pas de données dans la littérature montrant qu'une inhibition de la lipolyse entraîne une hypertrophie adipocytaire, les flux d'AG se régulant de manière homéostatique (Girousse et al. 2013). Néanmoins, il est



ainsi possible d'émettre l'hypothèse que l'hypertrophie adipocytaire, bien que non expliquée, et les contraintes physiques générées par la MEC, soient à l'origine du phénomène inflammatoire amenant à des dysfonctions tissulaires et à la lipodystrophie. Un croisement de nos animaux déficients pour la LHS avec des animaux déficients pour des acteurs majeurs de la production de matrice extracellulaire comme le collagène 6 ou la MMP14 pourrait permettre d'évaluer cette hypothèse, dans une approche similaire à ce qui a été réalisé pour les souris déficientes en leptine.

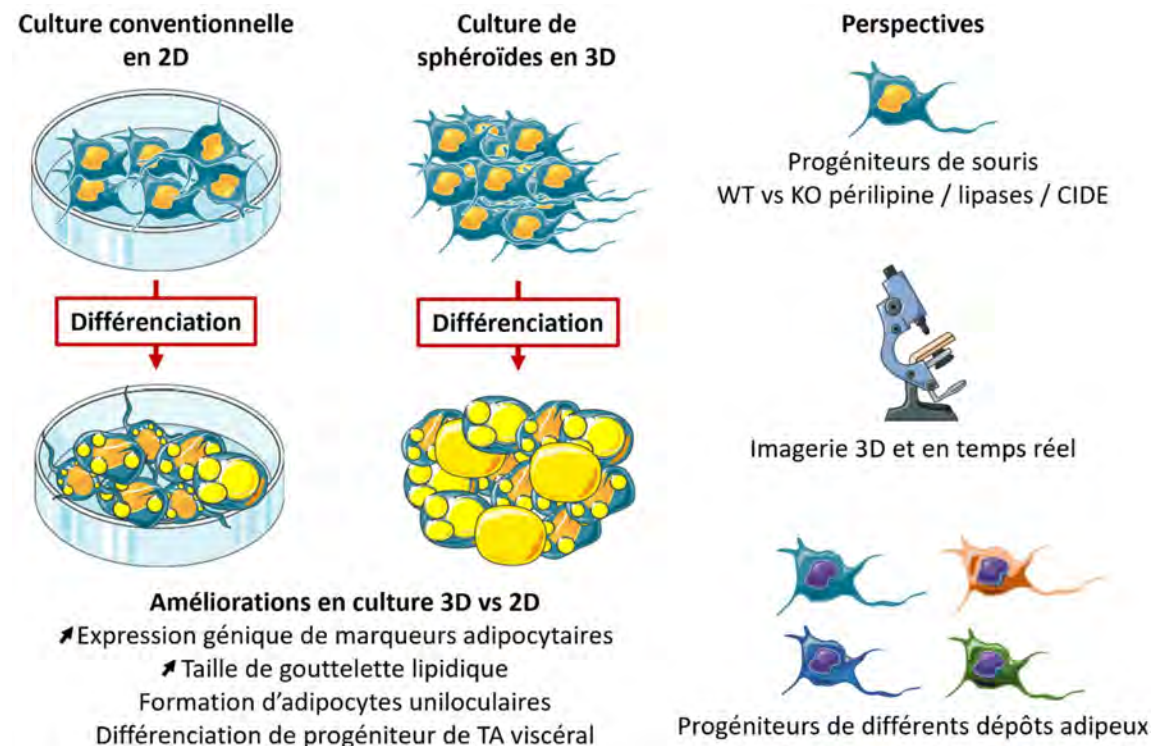
Enfin, dans cette étude, nous mettons en évidence que la LHS participe dans le noyau de l'adipocyte à la modulation des réponses géniques induites par la voie TGF $\beta$ -like. Sa déplétion *in vitro* induit un beigissement de ces cellules et une diminution de leur production de MEC, à la suite de l'inhibition du tonus transcriptionnel assuré par SMAD3. Bien que ces changements phénotypiques apparaissent comme bénéfiques *in vitro*, il se peut que certains changements soient délétères *in vivo*. Pour en revenir à la MEC, et malgré le fait que l'adipocyte ne soit pas son principal producteur au niveau tissulaire, il est possible de penser que des altérations de la contribution adipocytaire entraîne des déséquilibres de composition qui vont altérer la fonction tissulaire. Outre la fonction de support mécanique de la MEC, cette dernière a un rôle très important dans la séquestration de divers ligands dont les ligands TGF $\beta$  (Marcelin et al. 2019). Ainsi, des altérations de production de MEC pourraient induire des modifications de signalisation des voies de la superfamille TGF $\beta$ , mais également d'autres voies de transduction. De plus, il est connu que l'activation de la voie TGF $\beta$ -like module la production de ses propres ligands, mais également d'inhibiteurs de cette signalisation, permettant un contrôle très fin des niveaux d'activation de la voie (Yan, Xiong, and Chen 2018). Il est ainsi possible d'imaginer que des modifications de production de ces modulateurs de la voie TGF $\beta$ -like dans l'environnement du TA aient des conséquences paracrines importantes quant au phénotype des cellules de la FSV. Dans la littérature, il a par exemple été rapporté qu'une surexpression de BMP4 chez la souris, entraîne à la fois un phénomène de beigissement du TA blanc, et un blanchiment du TA brun (Modica et al. 2016; Qian et al. 2013). De façon intéressante, chez la souris déficiente en LHS, un phénomène similaire est observé (Osuga et al. 2000; Strom et al. 2008). Ainsi, il est possible que des altérations de signalisation de la voie TGF $\beta$  localement dans les TA blancs et bruns, en lien avec la déficience en LHS, soient à l'origine des modifications spécifiques de chaque dépôt. Qui plus est, il est également possible

que la lipodystrophie induite par la déficience en LHS provienne non pas de l'absence d'une de ses fonctions enzymatique ou non enzymatique, mais de l'ensemble de ses fonctions, pouvant créer un déséquilibre entre le phénotype adipocytaire, son métabolisme et les propriétés de la MEC qui l'entoure. A l'heure actuelle, des créations d'animaux knock-in pour différents mutants de la LHS sont en cours. Le laboratoire a acquis récemment la maîtrise de la création de modèles génétiquement modifiés par la technologie CRISPR-Cas9. Elle permet de générer rapidement des lignées de souris transgéniques, facilitant ainsi les études sur modèles animaux et ce, en multipliant les fonds génétiques. Au laboratoire, nous avons ainsi créé et caractérisé un modèle de souris déficient pour l'isoforme  $\beta$  de ChREBP, qui est censé exercer la majorité des effets géniques de ChREBP en réponse au glucose. Nous montrons dans cette étude qu'en l'absence de ChREBP $\beta$ , l'isoforme ChREBP $\alpha$  est capable de compenser les effets géniques lors de diverses adaptations métaboliques (Reczens et al. 2022). J'ai été impliqué dans la conception et réalisation de cette étude dont l'article publié se trouve en annexe. Pour en revenir à la LHS, est notamment en cours de création une forme catalytiquement inactive, qui permettra de dissocier l'impact de l'absence des effets uniquement enzymatiques de la lipase dans l'évolution du phénotype des animaux. Les premières cohortes devraient être analysables au cours de l'été ou de l'automne 2022. De plus, comme introduit dans la partie précédente, il sera possible de réaliser des insertions de mutants pour certains sites de phosphorylation, en maintenant ou non l'activité lipolytique, qui pourront favoriser la présence de la LHS dans différents compartiments subcellulaires et ainsi permettre d'évaluer l'impact de sa seule localisation nucléaire ou cytosolique. Enfin, une fois la séquence minimale de la LHS nécessaire à son interaction avec SMAD3 mise en évidence, il sera possible de créer des souris exprimant une forme de la LHS incapable de cette interaction.

## Conclusion Générale

### Objectif 1 : Développement d'un modèle de sphéroïdes de préadipocytes murins

Le premier objectif de cette thèse a consisté en la mise au point d'un modèle de culture en 3D de progéniteurs adipocytaires murins. Le but était d'obtenir des adipocytes plus matures qu'en 2D avec notamment la formation d'adipocytes dont la gouttelette lipidique est uniloculaire. Nous sommes parvenus à atteindre cet objectif. En plus d'atteindre le stade de gouttelette lipidique uniloculaire, ces adipocytes présentent des niveaux d'expression génique de marqueurs adipocytaires augmentés, et répondent à des stimuli lipolytiques. La mise en place de méthodes d'imagerie en 3D de ces sphéroïdes a été initiée et nécessite une continuité de développement. La possibilité de culture de sphéroïdes issus de souris déficientes pour différentes protéines participant à la formation et la plasticité de la gouttelette lipidique permettra d'étudier ces aspects *in vitro* dans un contexte uniloculaire. Les principaux résultats et perspectives sont résumés dans la figure 28.

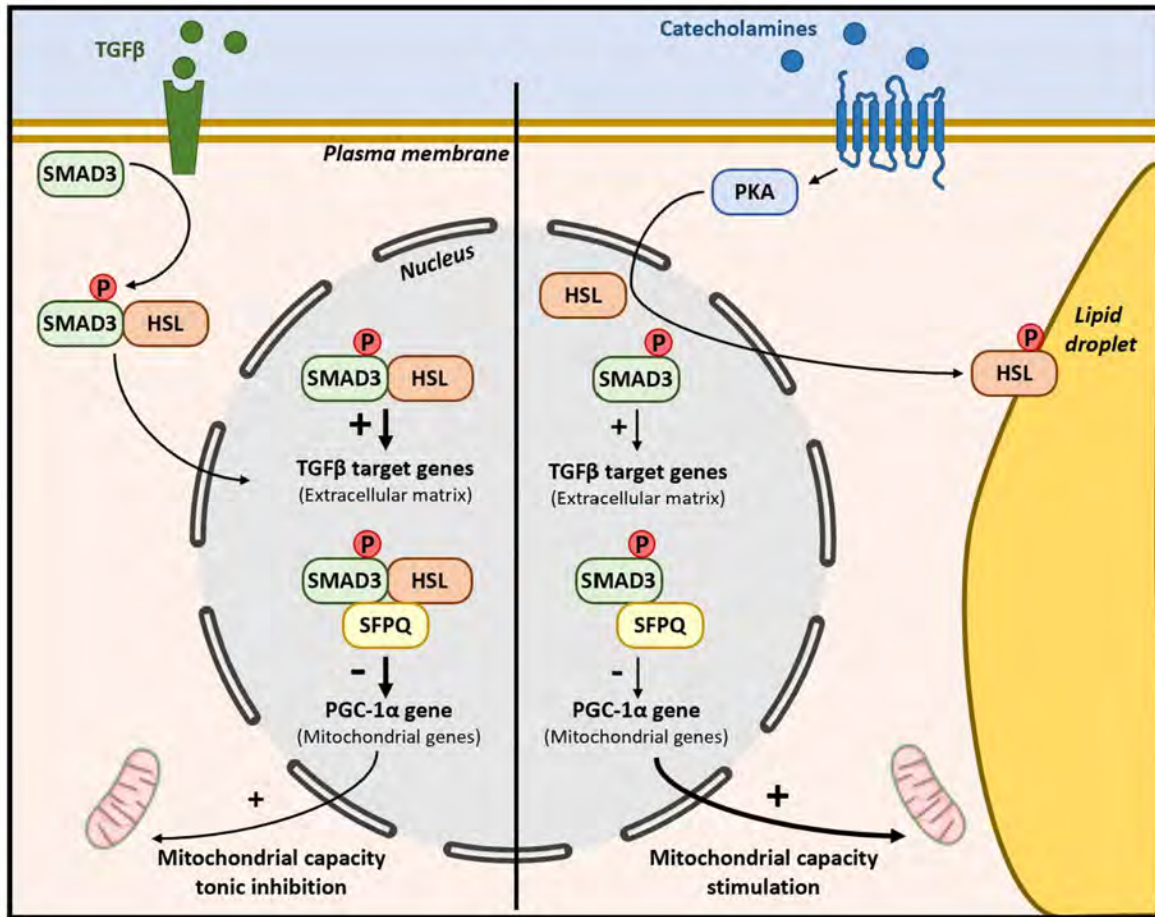


**Figure 28 : Amélioration de l'adipogenèse *in vitro* en 3D et perspectives.**

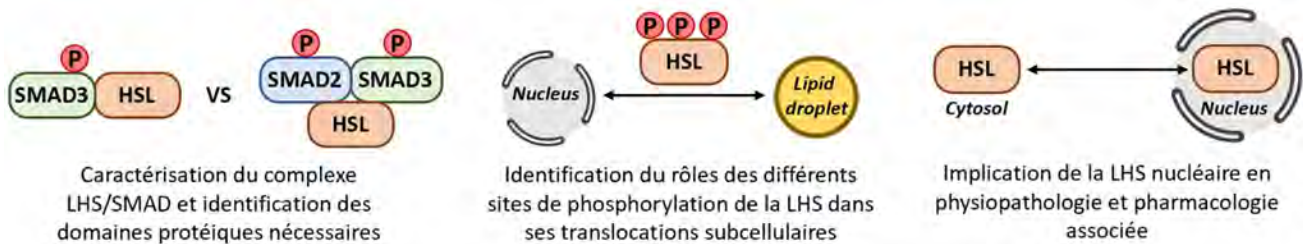
La différenciation de progéniteurs en 3D sous forme de sphéroïdes améliore l'adipogenèse en comparaison de la culture conventionnelle en 2D, induisant notamment la formation d'adipocytes avec une gouttelette lipidique (GL) uniloculaire, et permettant une différenciation équivalente de progéniteurs de TA sous-cutanés et viscéraux. Quelques perspectives intéressantes seraient l'utilisation de progéniteurs provenant de souris déficientes pour des protéines importantes dans la plasticité de la GL (périlipines, protéines CIDE, lipases, ...), en parallèle d'approfondissement des techniques d'imagerie en 3D et en temps réel pour étudier cette plasticité, mais également d'étudier des progéniteurs provenant de différents dépôts adipeux.

## **Objectif 2 : Caractérisation d'un rôle de la LHS nucléaire dans le contrôle du phénotype de l'adipocyte médié par la voie TGF $\beta$**

Mon principal objectif de thèse consistait à expliquer les mécanismes liés aux changements phénotypiques de l'adipocyte lors de la déficience en LHS. Nous observons, notamment, une augmentation de l'expression de gènes associés au métabolisme oxydatif et au beigissement, en parallèle d'une diminution d'expression de gènes de la matrice extracellulaire. Nous mettons en évidence que la LHS interagit physiquement dans le noyau de l'adipocyte avec le facteur de transcription SMAD3, favorisant son activité transcriptionnelle dans la voie de signalisation TGF $\beta$  qui contrôle la balance entre les deux groupes de gènes qui nous intéressent. En effet, alors que la voie TGF $\beta$  est principalement connue pour induire l'expression de gènes de la matrice, elle réprime également l'expression du co-facteur de transcription PGC-1 $\alpha$ , inducteur majeur de la biogenèse mitochondriale et du métabolisme oxydatif adipocytaire. La LHS participe ainsi de façon importante à la régulation de la voie TGF $\beta$  dans l'adipocyte formant un complexe non canonique avec SMAD3, indépendant de SMAD4. La régulation de l'expression de PGC-1 $\alpha$  par le complexe LHS/SMAD3 nécessite également la présence de la protéine RBP et facteur de transcription SFPQ. De plus, nous montrons que la LHS interagit avec d'autres membres de cette famille de protéine, laissant entrevoir d'autres rôles nucléaires potentiels qu'il sera intéressant d'étudier. Il conviendra également d'étudier l'existence et la relevance du complexe LHS/SMAD3 dans d'autres types cellulaires. A l'heure actuelle, nous n'avons pas encore étudié en profondeur les relevances physiologiques et physiopathologiques systémiques des niveaux de présence nucléaire de la LHS adipocytaire. Des expériences sont en cours de réalisation au laboratoire pour répondre à ces questions. Les principaux résultats et perspectives sont résumés dans la figure 29.



Perspectives



**Figure 29 : Caractérisation d'un nouveau rôle nucléaire de la LHS et perspectives.**

La LHS interagit dans le noyau de l'adipocyte avec le facteur de transcription SMAD3 de la signalisation TGFβ, et favorise son activité transcriptionnelle. La formation et translocation nucléaire du complexe LHS/SMAD3 sont induites par une stimulation TGFβ, et régulent l'expression des gènes associés. Dans le noyau, ce complexe stimule l'expression génique des composantes de la matrice extracellulaire, des cibles bien connues de la voie TGFβ. De plus, la formation d'un trimère en association avec SFPQ va être responsable d'une répression de l'expression de PGC-1α, associée à une inhibition tonique du métabolisme oxydatif de l'adipocyte. A l'inverse, une stimulation lipolytique induisant la phosphorylation de la LHS par la PKA réduit ces interactions protéine-protéine et induit la relocalisation de la LHS à la gouttelette lipidique, où elle participe à la lipolyse par son activité enzymatique, défavorisant son rôle dans la voie TGFβ. Les principales perspectives de ce projet consistent en l'étude d'autres potentiels partenaires dans le complexe LHS/SMAD et les domaines protéiques nécessaires à ces interactions, l'identification des rôles respectifs des différents sites de phosphorylations de la LHS dans la régulation de ses multiples fonctions, et le rôle de la translocation nucléaire de la LHS en physiopathologie.

## Bibliographie

- Abdel-Wahab, N., S. J. Wicks, R. M. Mason, and A. Chantry. 2002. 'Decorin suppresses transforming growth factor-beta-induced expression of plasminogen activator inhibitor-1 in human mesangial cells through a mechanism that involves Ca<sup>2+</sup>-dependent phosphorylation of Smad2 at serine-240', *Biochem J*, 362: 643-9.
- Aboulaich, N., U. Ortegren, A. V. Vener, and P. Stralfors. 2006. 'Association and insulin regulated translocation of hormone-sensitive lipase with PTRF', *Biochem Biophys Res Commun*, 350: 657-61.
- Ahmadian, M., M. J. Abbott, T. Tang, C. S. Hudak, Y. Kim, M. Bruss, M. K. Hellerstein, H. Y. Lee, V. T. Samuel, G. I. Shulman, Y. Wang, R. E. Duncan, C. Kang, and H. S. Sul. 2011. 'Desnutrin/ATGL is regulated by AMPK and is required for a brown adipose phenotype', *Cell Metab*, 13: 739-48.
- Akhurst, R. J., and A. Hata. 2012. 'Targeting the TGFbeta signalling pathway in disease', *Nat Rev Drug Discov*, 11: 790-811.
- Albert, J. S., L. M. Yerges-Armstrong, R. B. Horenstein, T. I. Pollin, U. T. Sreenivasan, S. Chai, W. S. Blaner, S. Snitker, J. R. O'Connell, D. W. Gong, R. J. Breyer, 3rd, A. S. Ryan, J. C. McLenithan, A. R. Shuldiner, C. Sztalryd, and C. M. Damcott. 2014. 'Null mutation in hormone-sensitive lipase gene and risk of type 2 diabetes', *N Engl J Med*, 370: 2307-15.
- Alessi, M. C., D. Bastelica, P. Morange, B. Berthet, I. Leduc, M. Verdier, O. Geel, and I. Juhan-Vague. 2000. 'Plasminogen activator inhibitor 1, transforming growth factor-beta1, and BMI are closely associated in human adipose tissue during morbid obesity', *Diabetes*, 49: 1374-80.
- Ali, Y. B., F. Carriere, R. Verger, S. Petry, G. Muller, and A. Abousalham. 2005. 'Continuous monitoring of cholesterol oleate hydrolysis by hormone-sensitive lipase and other cholesterol esterases', *J Lipid Res*, 46: 994-1000.
- Amthor, H., B. Christ, F. Rashid-Doubell, C. F. Kemp, E. Lang, and K. Patel. 2002. 'Follistatin regulates bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) activity to stimulate embryonic muscle growth', *Dev Biol*, 243: 115-27.
- Anthonsen, M. W., L. Ronnstrand, C. Wernstedt, E. Degerman, and C. Holm. 1998. 'Identification of novel phosphorylation sites in hormone-sensitive lipase that are phosphorylated in response to isoproterenol and govern activation properties in vitro', *J Biol Chem*, 273: 215-21.
- Antonny, B., S. Vanni, H. Shindou, and T. Ferreira. 2015. 'From zero to six double bonds: phospholipid unsaturation and organelle function', *Trends Cell Biol*, 25: 427-36.
- Aouichat, S., M. Chayah, S. Bouguerra-Aouichat, and A. Agil. 2020. 'Time-Restricted Feeding Improves Body Weight Gain, Lipid Profiles, and Atherogenic Indices in Cafeteria-Diet-Fed Rats: Role of Browning of Inguinal White Adipose Tissue', *Nutrients*, 12.
- Asterholm, I. W., N. Halberg, and P. E. Scherer. 2007. 'Mouse Models of Lipodystrophy Key reagents for the understanding of the metabolic syndrome', *Drug Discov Today Dis Models*, 4: 17-24.
- Backdahl, J., L. Franzen, L. Massier, Q. Li, J. Jalkanen, H. Gao, A. Andersson, N. Bhalla, A. Thorell, M. Ryden, P. L. Stahl, and N. Mejhert. 2021. 'Spatial mapping reveals human adipocyte subpopulations with distinct sensitivities to insulin', *Cell Metab*, 33: 1869-82 e6.
- Bardeesy, N., K. H. Cheng, J. H. Berger, G. C. Chu, J. Pahler, P. Olson, A. F. Hezel, J. Horner, G. Y. Lauwers, D. Hanahan, and R. A. DePinho. 2006. 'Smad4 is dispensable for normal pancreas development yet critical in progression and tumor biology of pancreas cancer', *Genes Dev*, 20: 3130-46.
- Bartness, T. J., Y. B. Shrestha, C. H. Vaughan, G. J. Schwartz, and C. K. Song. 2010. 'Sensory and sympathetic nervous system control of white adipose tissue lipolysis', *Mol Cell Endocrinol*, 318: 34-43.
- Becher, T., S. Palanisamy, D. J. Kramer, M. Eljalby, S. J. Marx, A. G. Wibmer, S. D. Butler, C. S. Jiang, R. Vaughan, H. Schoder, A. Mark, and P. Cohen. 2021. 'Brown adipose tissue is associated with cardiometabolic health', *Nat Med*, 27: 58-65.
- Bertero, A., S. Brown, P. Madrigal, A. Osnato, D. Ortman, L. Yiangou, J. Kadiwala, N. C. Hubner, I. R. de Los Mozos, C. Sadee, A. S. Lenaerts, S. Nakanoh, R. Grandy, E. Farnell, J. Ule, H. G.

- Stunnenberg, S. Mendjan, and L. Vallier. 2018. 'The SMAD2/3 interactome reveals that TGFbeta controls m(6)A mRNA methylation in pluripotency', *Nature*, 555: 256-59.
- Bertholet, A. M., L. Kazak, E. T. Chouchani, M. G. Bogaczynska, I. Paranjpe, G. L. Wainwright, A. Betourne, S. Kajimura, B. M. Spiegelman, and Y. Kirichok. 2017. 'Mitochondrial Patch Clamp of Beige Adipocytes Reveals UCP1-Positive and UCP1-Negative Cells Both Exhibiting Futile Creatine Cycling', *Cell Metab*, 25: 811-22 e4.
- Bluher, M. 2013. 'Adipose tissue dysfunction contributes to obesity related metabolic diseases', *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 27: 163-77.
- Bourlier, V., C. Sengenès, A. Zakaroff-Girard, P. Decaunes, B. Wdziekonski, J. Galitzky, P. Villageois, D. Esteve, P. Chiotasso, C. Dani, and A. Bouloumie. 2012. 'TGFbeta family members are key mediators in the induction of myofibroblast phenotype of human adipose tissue progenitor cells by macrophages', *PLoS One*, 7: e31274.
- Bowers, R. R., J. W. Kim, T. C. Otto, and M. D. Lane. 2006. 'Stable stem cell commitment to the adipocyte lineage by inhibition of DNA methylation: role of the BMP-4 gene', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 13022-7.
- Bowers, R. R., and M. D. Lane. 2007. 'A role for bone morphogenetic protein-4 in adipocyte development', *Cell Cycle*, 6: 385-9.
- Braga, M., S. T. Reddy, L. Vergnes, S. Pervin, V. Grijalva, D. Stout, J. David, X. Li, V. Tomasian, C. B. Reid, K. C. Norris, S. U. Devaskar, K. Reue, and R. Singh. 2014. 'Follistatin promotes adipocyte differentiation, browning, and energy metabolism', *J Lipid Res*, 55: 375-84.
- Brejchova, K., F. P. W. Radner, L. Balas, V. Paluchova, T. Cajka, H. Chodounska, E. Kudova, M. Schratte, R. Schreiber, T. Durand, R. Zechner, and O. Kuda. 2021. 'Distinct roles of adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase in the catabolism of triacylglycerol estolides', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 118.
- Brust, R., J. Shang, J. Fuhrmann, S. A. Mosure, J. Bass, A. Cano, Z. Heidari, I. M. Chrisman, M. D. Nemetchek, A. L. Blayo, P. R. Griffin, T. M. Kamenecka, T. S. Hughes, and D. J. Kojetin. 2018. 'A structural mechanism for directing corepressor-selective inverse agonism of PPARgamma', *Nat Commun*, 9: 4687.
- Burrell, J. A., A. Boudreau, and J. M. Stephens. 2020. 'Latest advances in STAT signaling and function in adipocytes', *Clin Sci (Lond)*, 134: 629-39.
- Capelli, D., C. Cerchia, R. Montanari, F. Loiodice, P. Tortorella, A. Laghezza, L. Cervoni, G. Pochetti, and A. Lavecchia. 2016. 'Structural basis for PPAR partial or full activation revealed by a novel ligand binding mode', *Sci Rep*, 6: 34792.
- Carboni, N., F. Brancati, E. Cocco, E. Solla, M. R. D'Apice, A. Mateddu, A. McIntyre, E. Fadda, M. Mura, G. Lattanzi, R. Piras, M. A. Maioli, G. Marrosu, G. Novelli, M. G. Marrosu, and R. A. Hegele. 2014. 'Partial lipodystrophy associated with muscular dystrophy of unknown genetic origin', *Muscle Nerve*, 49: 928-30.
- Castan-Laurell, I., C. Dray, C. Attane, T. Duparc, C. Knauf, and P. Valet. 2011. 'Apelin, diabetes, and obesity', *Endocrine*, 40: 1-9.
- Chen, Y., K. Ikeda, T. Yoneshiro, A. Scaramozza, K. Tajima, Q. Wang, K. Kim, K. Shinoda, C. H. Sponton, Z. Brown, A. Brack, and S. Kajimura. 2019. 'Thermal stress induces glycolytic beige fat formation via a myogenic state', *Nature*, 565: 180-85.
- Cho, Y. K., Y. Son, A. Saha, D. Kim, C. Choi, M. Kim, J. H. Park, H. Im, J. Han, K. Kim, Y. S. Jung, J. Yun, E. J. Bae, J. K. Seong, M. O. Lee, S. Lee, J. G. Granneman, and Y. H. Lee. 2021. 'STK3/STK4 signalling in adipocytes regulates mitophagy and energy expenditure', *Nat Metab*, 3: 428-41.
- Chondronikola, M., E. Volpi, E. Borsheim, C. Porter, M. K. Saraf, P. Annamalai, C. Yfanti, T. Chao, D. Wong, K. Shinoda, S. M. Labbe, N. M. Hurren, F. Cesani, S. Kajimura, and L. S. Sidossis. 2016. 'Brown Adipose Tissue Activation Is Linked to Distinct Systemic Effects on Lipid Metabolism in Humans', *Cell Metab*, 23: 1200-06.
- Chouchani, E. T., L. Kazak, and B. M. Spiegelman. 2019. 'New Advances in Adaptive Thermogenesis: UCP1 and Beyond', *Cell Metab*, 29: 27-37.

- Choy, L., and R. Derynck. 2003. 'Transforming growth factor-beta inhibits adipocyte differentiation by Smad3 interacting with CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) and repressing C/EBP transactivation function', *J Biol Chem*, 278: 9609-19.
- Choy, L., J. Skillington, and R. Derynck. 2000. 'Roles of autocrine TGF-beta receptor and Smad signaling in adipocyte differentiation', *J Cell Biol*, 149: 667-82.
- Chun, T. H., K. B. Hotary, F. Sabeh, A. R. Saltiel, E. D. Allen, and S. J. Weiss. 2006. 'A pericellular collagenase directs the 3-dimensional development of white adipose tissue', *Cell*, 125: 577-91.
- Chung, K. J., M. Nati, T. Chavakis, and A. Chatzigeorgiou. 2018. 'Innate immune cells in the adipose tissue', *Rev Endocr Metab Disord*, 19: 283-92.
- Cinti, S., G. Mitchell, G. Barbatelli, I. Murano, E. Ceresi, E. Faloia, S. Wang, M. Fortier, A. S. Greenberg, and M. S. Obin. 2005. 'Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans', *J Lipid Res*, 46: 2347-55.
- Claus, T. H., D. B. Lowe, Y. Liang, A. I. Salhanick, C. K. Lubeski, L. Yang, L. Lemoine, J. Zhu, and K. B. Clairmont. 2005. 'Specific inhibition of hormone-sensitive lipase improves lipid profile while reducing plasma glucose', *J Pharmacol Exp Ther*, 315: 1396-402.
- Clemson, C. M., J. N. Hutchinson, S. A. Sara, A. W. Ensminger, A. H. Fox, A. Chess, and J. B. Lawrence. 2009. 'An architectural role for a nuclear noncoding RNA: NEAT1 RNA is essential for the structure of paraspeckles', *Mol Cell*, 33: 717-26.
- Cohen, P., and S. Kajimura. 2021. 'The cellular and functional complexity of thermogenic fat', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 22: 393-409.
- Collins, J. M., M. J. Neville, M. B. Hoppa, and K. N. Frayn. 2010. 'De novo lipogenesis and stearoyl-CoA desaturase are coordinately regulated in the human adipocyte and protect against palmitate-induced cell injury', *J Biol Chem*, 285: 6044-52.
- Connell, N. J., D. Doligkeit, C. Andriessen, E. Kornips-Moonen, Y. M. H. Bruls, V. B. Schrauwen-Hinderling, T. van de Weijer, W. D. van Marken-Lichtenbelt, B. Havekes, L. Kazak, B. M. Spiegelman, J. Hoeks, and P. Schrauwen. 2021. 'No evidence for brown adipose tissue activation after creatine supplementation in adult vegetarians', *Nat Metab*, 3: 107-17.
- Contreras, J. A., M. Karlsson, T. Osterlund, H. Laurell, A. Svensson, and C. Holm. 1996. 'Hormone-sensitive lipase is structurally related to acetylcholinesterase, bile salt-stimulated lipase, and several fungal lipases. Building of a three-dimensional model for the catalytic domain of hormone-sensitive lipase', *J Biol Chem*, 271: 31426-30.
- Cook, K. G., S. J. Yeaman, P. Stralfors, G. Fredrikson, and P. Belfrage. 1982. 'Direct evidence that cholesterol ester hydrolase from adrenal cortex is the same enzyme as hormone-sensitive lipase from adipose tissue', *Eur J Biochem*, 125: 245-9.
- Cosker, K. E., S. J. Fenstermacher, M. F. Pazyra-Murphy, H. L. Elliott, and R. A. Segal. 2016. 'The RNA-binding protein SFPQ orchestrates an RNA regulon to promote axon viability', *Nat Neurosci*, 19: 690-96.
- Das, D., R. A. Randall, and C. S. Hill. 2009. 'An N-terminally truncated Smad2 protein can partially compensate for loss of full-length Smad2', *Biochem J*, 417: 205-12.
- Derynck, R., and E. H. Budi. 2019. 'Specificity, versatility, and control of TGF-beta family signaling', *Sci Signal*, 12.
- Dickey, T. H., and A. M. Pyle. 2017. 'The SMAD3 transcription factor binds complex RNA structures with high affinity', *Nucleic Acids Res*, 45: 11980-88.
- Djouder, N., R. D. Tuerk, M. Suter, P. Salvioni, R. F. Thali, R. Scholz, K. Vaahtomeri, Y. Auchli, H. Rechsteiner, R. A. Brunisholz, B. Viollet, T. P. Makela, T. Wallimann, D. Neumann, and W. Krek. 2010. 'PKA phosphorylates and inactivates AMPKalpha to promote efficient lipolysis', *EMBO J*, 29: 469-81.
- Dodd, G. T., S. Decherf, K. Loh, S. E. Simonds, F. Wiede, E. Balland, T. L. Merry, H. Munzberg, Z. Y. Zhang, B. B. Kahn, B. G. Neel, K. K. Bence, Z. B. Andrews, M. A. Cowley, and T. Tiganis. 2015. 'Leptin and insulin act on POMC neurons to promote the browning of white fat', *Cell*, 160: 88-104.
- Dubois, C. M., M. H. Laprise, F. Blanchette, L. E. Gentry, and R. Leduc. 1995. 'Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase', *J Biol Chem*, 270: 10618-24.



- Dufau, J., J. X. Shen, M. Couchet, T. De Castro Barbosa, N. Mejhert, L. Massier, E. Grisetti, E. Mouisel, E. Z. Amri, V. M. Lauschke, M. Ryden, and D. Langin. 2021. 'In vitro and ex vivo models of adipocytes', *Am J Physiol Cell Physiol*, 320: C822-C41.
- Egan, J. J., A. S. Greenberg, M. K. Chang, S. A. Wek, M. C. Moos, Jr., and C. Londos. 1992. 'Mechanism of hormone-stimulated lipolysis in adipocytes: translocation of hormone-sensitive lipase to the lipid storage droplet', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89: 8537-41.
- Elsen, M., S. Raschke, N. Tennagels, U. Schwahn, T. Jelenik, M. Roden, T. Romacho, and J. Eckel. 2014. 'BMP4 and BMP7 induce the white-to-brown transition of primary human adipose stem cells', *Am J Physiol Cell Physiol*, 306: C431-40.
- Emont, M. P., H. Yu, H. Jun, X. Hong, N. Maganti, J. P. Stegemann, and J. Wu. 2015. 'Using a 3D Culture System to Differentiate Visceral Adipocytes In Vitro', *Endocrinology*, 156: 4761-8.
- Esteve, D., N. Boulet, C. Belles, A. Zakaroff-Girard, P. Decaunes, A. Briot, Y. Veeranagouda, M. Didier, A. Remaury, J. C. Guillemot, S. Ledoux, C. Dani, A. Bouloumie, and J. Galitzky. 2019. 'Lobular architecture of human adipose tissue defines the niche and fate of progenitor cells', *Nat Commun*, 10: 2549.
- Fain, J. N., D. S. Tichansky, and A. K. Madan. 2005. 'Transforming growth factor beta1 release by human adipose tissue is enhanced in obesity', *Metabolism*, 54: 1546-51.
- Farhan, S. M., J. F. Robinson, A. D. McIntyre, M. G. Marrosu, A. F. Ticca, S. Loddo, N. Carboni, F. Brancati, and R. A. Hegele. 2014. 'A novel LIPE nonsense mutation found using exome sequencing in sibs with late-onset familial partial lipodystrophy', *Can J Cardiol*, 30: 1649-54.
- Feldman, B. J., R. S. Streeper, R. V. Farese, Jr., and K. R. Yamamoto. 2006. 'Myostatin modulates adipogenesis to generate adipocytes with favorable metabolic effects', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 15675-80.
- Feldmann, H. M., V. Golozoubova, B. Cannon, and J. Nedergaard. 2009. 'UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality', *Cell Metab*, 9: 203-9.
- Fernie, A. R., F. Carrari, and L. J. Sweetlove. 2004. 'Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport', *Curr Opin Plant Biol*, 7: 254-61.
- Flaherty, S. E., 3rd, A. Grijalva, X. Xu, E. Ables, A. Nomani, and A. W. Ferrante, Jr. 2019. 'A lipase-independent pathway of lipid release and immune modulation by adipocytes', *Science*, 363: 989-93.
- Fredrikson, G., P. Stralfors, N. O. Nilsson, and P. Belfrage. 1981. 'Hormone-sensitive lipase of rat adipose tissue. Purification and some properties', *J Biol Chem*, 256: 6311-20.
- Friedman, J. M. 2019. 'Leptin and the endocrine control of energy balance', *Nat Metab*, 1: 754-64.
- Garton, A. J., and S. J. Yeaman. 1990. 'Identification and role of the basal phosphorylation site on hormone-sensitive lipase', *Eur J Biochem*, 191: 245-50.
- Girousse, A., G. Tavernier, C. Valle, C. Moro, N. Mejhert, A. L. Dinel, M. Houssier, B. Roussel, A. Besse-Patin, M. Combes, L. Mir, L. Monbrun, V. Bezaire, B. Prunet-Marcassus, A. Waget, I. Vila, S. Caspar-Bauguil, K. Louche, M. A. Marques, A. Mairal, M. L. Renoud, J. Galitzky, C. Holm, E. Mouisel, C. Thalamas, N. Viguerie, T. Sulpice, R. Burcelin, P. Arner, and D. Langin. 2013. 'Partial inhibition of adipose tissue lipolysis improves glucose metabolism and insulin sensitivity without alteration of fat mass', *PLoS Biol*, 11: e1001485.
- Gleizes, P. E., R. C. Beavis, R. Mazziere, B. Shen, and D. B. Rifkin. 1996. 'Identification and characterization of an eight-cysteine repeat of the latent transforming growth factor-beta binding protein-1 that mediates bonding to the latent transforming growth factor-beta1', *J Biol Chem*, 271: 29891-6.
- Glister, C., C. F. Kemp, and P. G. Knight. 2004. 'Bone morphogenetic protein (BMP) ligands and receptors in bovine ovarian follicle cells: actions of BMP-4, -6 and -7 on granulosa cells and differential modulation of Smad-1 phosphorylation by follistatin', *Reproduction*, 127: 239-54.
- Gong, K., M. Chen, R. Li, Y. He, H. Zhu, D. Yao, S. Oparil, and Z. Zhang. 2016. 'Smad3-mSin3A-HDAC1 Complex is Required for TGF-beta1-Induced Transcriptional Inhibition of PPARgamma in Mouse Cardiac Fibroblasts', *Cell Physiol Biochem*, 40: 908-20.

- Gordon, K. J., and G. C. Blobe. 2008. 'Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease', *Biochim Biophys Acta*, 1782: 197-228.
- Greco, S. H., L. Tomkoter, A. K. Vahle, R. Rokosh, A. Avanzi, S. K. Mahmood, M. Deutsch, S. Alothman, D. Alqunaibit, A. Ochi, C. Zambirinis, T. Mohaimin, M. Rendon, E. Levie, M. Pansari, A. Torres-Hernandez, D. Daley, R. Barilla, H. L. Pachter, D. Tippens, H. Malik, A. Boutajangout, T. Wisniewski, and G. Miller. 2015. 'TGF-beta Blockade Reduces Mortality and Metabolic Changes in a Validated Murine Model of Pancreatic Cancer Cachexia', *PLoS One*, 10: e0132786.
- Greenberg, A. S., W. J. Shen, K. Muliro, S. Patel, S. C. Souza, R. A. Roth, and F. B. Kraemer. 2001. 'Stimulation of lipolysis and hormone-sensitive lipase via the extracellular signal-regulated kinase pathway', *J Biol Chem*, 276: 45456-61.
- Grefhorst, A., J. C. van den Beukel, E. L. van Houten, J. Steenbergen, J. A. Visser, and A. P. Themmen. 2015. 'Estrogens increase expression of bone morphogenetic protein 8b in brown adipose tissue of mice', *Biol Sex Differ*, 6: 7.
- Guan, H. P., Y. Li, M. V. Jensen, C. B. Newgard, C. M. Steppan, and M. A. Lazar. 2002. 'A futile metabolic cycle activated in adipocytes by antidiabetic agents', *Nat Med*, 8: 1122-8.
- Guilherme, A., F. Henriques, A. H. Bedard, and M. P. Czech. 2019. 'Molecular pathways linking adipose innervation to insulin action in obesity and diabetes mellitus', *Nat Rev Endocrinol*, 15: 207-25.
- Guiu-Jurado, E., M. Unthan, N. Bohler, M. Kern, K. Landgraf, A. Dietrich, D. Schleinitz, K. Ruschke, N. Kloting, M. Fasshauer, A. Tonjes, M. Stumvoll, A. Korner, P. Kovacs, and M. Bluher. 2016. 'Bone morphogenetic protein 2 (BMP2) may contribute to partition of energy storage into visceral and subcutaneous fat depots', *Obesity (Silver Spring)*, 24: 2092-100.
- Guo, T., P. Marmol, A. Moliner, M. Bjornholm, C. Zhang, K. M. Shokat, and C. F. Ibanez. 2014. 'Adipocyte ALK7 links nutrient overload to catecholamine resistance in obesity', *Elife*, 3: e03245.
- Guo, W., J. Flanagan, R. Jasuja, J. Kirkland, L. Jiang, and S. Bhasin. 2008. 'The effects of myostatin on adipogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells are mediated through cross-communication between Smad3 and Wnt/beta-catenin signaling pathways', *J Biol Chem*, 283: 9136-45.
- Gustafson, B., A. Hammarstedt, S. Hedjazifar, J. M. Hoffmann, P. A. Svensson, J. Grimsby, C. Rondinone, and U. Smith. 2015. 'BMP4 and BMP Antagonists Regulate Human White and Beige Adipogenesis', *Diabetes*, 64: 1670-81.
- Gustafson, B., and U. Smith. 2012. 'The WNT inhibitor Dickkopf 1 and bone morphogenetic protein 4 rescue adipogenesis in hypertrophic obesity in humans', *Diabetes*, 61: 1217-24.
- Guttridge, D. C. 2015. 'A TGF-beta pathway associated with cancer cachexia', *Nat Med*, 21: 1248-9.
- Haemmerle, G., R. Zimmermann, M. Hayn, C. Theussl, G. Waeg, E. Wagner, W. Sattler, T. M. Magin, E. F. Wagner, and R. Zechner. 2002. 'Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis', *J Biol Chem*, 277: 4806-15.
- Hanssen, M. J., J. Hoeks, B. Brans, A. A. van der Lans, G. Schaart, J. J. van den Driessche, J. A. Jorgensen, M. V. Boekschoten, M. K. Hesselink, B. Havekes, S. Kersten, F. M. Mottaghy, W. D. van Marken Lichtenbelt, and P. Schrauwen. 2015. 'Short-term cold acclimation improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes mellitus', *Nat Med*, 21: 863-5.
- Hansson, O., K. Strom, N. Guner, N. Wierup, F. Sundler, P. Hoglund, and C. Holm. 2006. 'Inflammatory response in white adipose tissue in the non-obese hormone-sensitive lipase null mouse model', *J Proteome Res*, 5: 1701-10.
- Harada, K., W. J. Shen, S. Patel, V. Natu, J. Wang, J. Osga, S. Ishibashi, and F. B. Kraemer. 2003. 'Resistance to high-fat diet-induced obesity and altered expression of adipose-specific genes in HSL-deficient mice', *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 285: E1182-95.
- Harms, M., and P. Seale. 2013. 'Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential', *Nat Med*, 19: 1252-63.
- Harrington, A. E., S. A. Morris-Triggs, B. T. Ruotolo, C. V. Robinson, S. Ohnuma, and M. Hyvonen. 2006. 'Structural basis for the inhibition of activin signalling by follistatin', *EMBO J*, 25: 1035-45.
- Hasegawa, Y., K. Ikeda, Y. Chen, D. L. Alba, D. Stifler, K. Shinoda, T. Hosono, P. Maretich, Y. Yang, Y. Ishigaki, J. Chi, P. Cohen, S. K. Koliwad, and S. Kajimura. 2018. 'Repression of Adipose Tissue

- Fibrosis through a PRDM16-GTF2IRD1 Complex Improves Systemic Glucose Homeostasis', *Cell Metab*, 27: 180-94 e6.
- Henegar, C., J. Tordjman, V. Achard, D. Lacasa, I. Cremer, M. Guerre-Millo, C. Poitou, A. Basdevant, V. Stich, N. Viguerie, D. Langin, P. Bedossa, J. D. Zucker, and K. Clement. 2008. 'Adipose tissue transcriptomic signature highlights the pathological relevance of extracellular matrix in human obesity', *Genome Biol*, 9: R14.
- Herz, C. T., O. C. Kulterer, M. Prager, C. Schmoltzer, F. B. Langer, G. Prager, R. Marculescu, A. Kautzky-Willer, M. Hacker, A. R. Haug, and F. W. Kiefer. 2021. 'Active Brown Adipose Tissue is Associated With a Healthier Metabolic Phenotype in Obesity', *Diabetes*.
- Hill, C. S. 2009. 'Nucleocytoplasmic shuttling of Smad proteins', *Cell Res*, 19: 36-46.
- Himms-Hagen, J., A. Melnyk, M. C. Zingaretti, E. Ceresi, G. Barbatelli, and S. Cinti. 2000. 'Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes', *Am J Physiol Cell Physiol*, 279: C670-81.
- Hino, J., T. Miyazawa, M. Miyazato, and K. Kangawa. 2012. 'Bone morphogenetic protein-3b (BMP-3b) is expressed in adipocytes and inhibits adipogenesis as a unique complex', *Int J Obes (Lond)*, 36: 725-34.
- Hinoi, E., Y. Nakamura, S. Takada, H. Fujita, T. Iezaki, S. Hashizume, S. Takahashi, Y. Odaka, T. Watanabe, and Y. Yoneda. 2014. 'Growth differentiation factor-5 promotes brown adipogenesis in systemic energy expenditure', *Diabetes*, 63: 162-75.
- Hirai, S., M. Yamanaka, H. Kawachi, T. Matsui, and H. Yano. 2005. 'Activin A inhibits differentiation of 3T3-L1 preadipocyte', *Mol Cell Endocrinol*, 232: 21-6.
- Holmquist, M. 2000. 'Alpha/Beta-hydrolase fold enzymes: structures, functions and mechanisms', *Curr Protein Pept Sci*, 1: 209-35.
- Holst, L. S., D. Langin, H. Mulder, H. Laurell, J. Grober, A. Bergh, H. W. Mohrenweiser, G. Edgren, and C. Holm. 1996. 'Molecular cloning, genomic organization, and expression of a testicular isoform of hormone-sensitive lipase', *Genomics*, 35: 441-7.
- Holzer, R. G., E. J. Park, N. Li, H. Tran, M. Chen, C. Choi, G. Solinas, and M. Karin. 2011. 'Saturated fatty acids induce c-Src clustering within membrane subdomains, leading to JNK activation', *Cell*, 147: 173-84.
- Hosokawa, M., A. Takeuchi, J. Tanihata, K. Iida, S. Takeda, and M. Hagiwara. 2019. 'Loss of RNA-Binding Protein Sfpq Causes Long-Gene Transcriptopathy in Skeletal Muscle and Severe Muscle Mass Reduction with Metabolic Myopathy', *iScience*, 13: 229-42.
- Hou, Y., F. Moreau, and K. Chadee. 2012. 'PPARgamma is an E3 ligase that induces the degradation of NFkappaB/p65', *Nat Commun*, 3: 1300.
- Hu, B., C. Jin, X. Zeng, J. M. Resch, M. P. Jedrychowski, Z. Yang, B. N. Desai, A. S. Banks, B. B. Lowell, D. Mathis, and B. M. Spiegelman. 2020. 'gammadelta T cells and adipocyte IL-17RC control fat innervation and thermogenesis', *Nature*, 578: 610-14.
- Huang, H., T. J. Song, X. Li, L. Hu, Q. He, M. Liu, M. D. Lane, and Q. Q. Tang. 2009. 'BMP signaling pathway is required for commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 12670-5.
- Hyytiainen, M., C. Penttinen, and J. Keski-Oja. 2004. 'Latent TGF-beta binding proteins: extracellular matrix association and roles in TGF-beta activation', *Crit Rev Clin Lab Sci*, 41: 233-64.
- Ibarguren, M., D. J. Lopez, J. A. Encinar, J. M. Gonzalez-Ros, X. Busquets, and P. V. Escriba. 2013. 'Partitioning of liquid-ordered/liquid-disordered membrane microdomains induced by the fluidifying effect of 2-hydroxylated fatty acid derivatives', *Biochim Biophys Acta*, 1828: 2553-63.
- Iemura, S., T. S. Yamamoto, C. Takagi, H. Uchiyama, T. Natsume, S. Shimasaki, H. Sugino, and N. Ueno. 1998. 'Direct binding of follistatin to a complex of bone-morphogenetic protein and its receptor inhibits ventral and epidermal cell fates in early Xenopus embryo', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 9337-42.
- Ikeda, K., Q. Kang, T. Yoneshiro, J. P. Camporez, H. Maki, M. Homma, K. Shinoda, Y. Chen, X. Lu, P. Maretich, K. Tajima, K. M. Ajuwon, T. Soga, and S. Kajimura. 2017. 'UCP1-independent signaling

- involving SERCA2b-mediated calcium cycling regulates beige fat thermogenesis and systemic glucose homeostasis', *Nat Med*, 23: 1454-65.
- Ikedo, K., P. Maretich, and S. Kajimura. 2018. 'The Common and Distinct Features of Brown and Beige Adipocytes', *Trends Endocrinol Metab*, 29: 191-200.
- Imai, T., R. Takakuwa, S. Marchand, E. Dentz, J. M. Bornert, N. Messaddeq, O. Wendling, M. Mark, B. Desvergne, W. Wahli, P. Chambon, and D. Metzger. 2004. '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: 4543-7.
- Ingalls, A. M., M. M. Dickie, and G. D. Snell. 1950. 'Obese, a new mutation in the house mouse', *J Hered*, 41: 317-8.
- Item, F., and D. Konrad. 2012. 'Visceral fat and metabolic inflammation: the portal theory revisited', *Obes Rev*, 13 Suppl 2: 30-9.
- Itoh, Y., M. Saitoh, and K. Miyazawa. 2018. 'Smad3-STAT3 crosstalk in pathophysiological contexts', *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 50: 82-90.
- Jenkins-Kruchten, A. E., A. Bennaars-Eiden, J. R. Ross, W. J. Shen, F. B. Kraemer, and D. A. Bernlohr. 2003. 'Fatty acid-binding protein-hormone-sensitive lipase interaction. Fatty acid dependence on binding', *J Biol Chem*, 278: 47636-43.
- Jiang, N., Y. Li, T. Shu, and J. Wang. 2019. 'Cytokines and inflammation in adipogenesis: an updated review', *Front Med*, 13: 314-29.
- Jornayvaz, F. R., and G. I. Shulman. 2010. 'Regulation of mitochondrial biogenesis', *Essays Biochem*, 47: 69-84.
- Kajimura, S., P. Seale, T. Tomaru, H. Erdjument-Bromage, M. P. Cooper, J. L. Ruas, S. Chin, P. Tempst, M. A. Lazar, and B. M. Spiegelman. 2008. 'Regulation of the brown and white fat gene programs through a PRDM16/CtBP transcriptional complex', *Genes Dev*, 22: 1397-409.
- Kaplan, J., M. Nowell, R. Chima, and B. Zingarelli. 2014. 'Pioglitazone reduces inflammation through inhibition of NF-kappaB in polymicrobial sepsis', *Innate Immun*, 20: 519-28.
- Kawabata, M., H. Inoue, A. Hanyu, T. Imamura, and K. Miyazono. 1998. 'Smad proteins exist as monomers in vivo and undergo homo- and hetero-oligomerization upon activation by serine/threonine kinase receptors', *EMBO J*, 17: 4056-65.
- Kazak, L., E. T. Chouchani, M. P. Jedrychowski, B. K. Erickson, K. Shinoda, P. Cohen, R. Vetrivelan, G. Z. Lu, D. Laznik-Bogoslavski, S. C. Hasenfuss, S. Kajimura, S. P. Gygi, and B. M. Spiegelman. 2015. 'A creatine-driven substrate cycle enhances energy expenditure and thermogenesis in beige fat', *Cell*, 163: 643-55.
- Kazak, L., E. T. Chouchani, G. Z. Lu, M. P. Jedrychowski, C. J. Bare, A. I. Mina, M. Kumari, S. Zhang, I. Vuckovic, D. Laznik-Bogoslavski, P. Dzeja, A. S. Banks, E. D. Rosen, and B. M. Spiegelman. 2017. 'Genetic Depletion of Adipocyte Creatine Metabolism Inhibits Diet-Induced Thermogenesis and Drives Obesity', *Cell Metab*, 26: 660-71 e3.
- Kazak, L., J. F. Rahbani, B. Samborska, G. Z. Lu, M. P. Jedrychowski, M. Lajoie, S. Zhang, L. C. Ramsay, F. Y. Dou, D. Tenen, E. T. Chouchani, P. Dzeja, I. R. Watson, L. Tsai, E. D. Rosen, and B. M. Spiegelman. 2019. 'Ablation of adipocyte creatine transport impairs thermogenesis and causes diet-induced obesity', *Nat Metab*, 1: 360-70.
- Kerley, J. S., S. L. Olsen, S. J. Freemantle, and M. J. Spinella. 2001. 'Transcriptional activation of the nuclear receptor corepressor RIP140 by retinoic acid: a potential negative-feedback regulatory mechanism', *Biochem Biophys Res Commun*, 285: 969-75.
- Khan, T., E. S. Muise, P. Iyengar, Z. V. Wang, M. Chandalia, N. Abate, B. B. Zhang, P. Bonaldo, S. Chua, and P. E. Scherer. 2009. 'Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI', *Mol Cell Biol*, 29: 1575-91.
- Kim, J. Y., E. van de Wall, M. Laplante, A. Azzara, M. E. Trujillo, S. M. Hofmann, T. Schraw, J. L. Durand, H. Li, G. Li, L. A. Jelicks, M. F. Mehler, D. Y. Hui, Y. Deshaies, G. I. Shulman, G. J. Schwartz, and P. E. Scherer. 2007. 'Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue', *J Clin Invest*, 117: 2621-37.

- Kim, K. H., Y. H. Kim, J. E. Son, J. H. Lee, S. Kim, M. S. Choe, J. H. Moon, J. Zhong, K. Fu, F. Lenglin, J. A. Yoo, P. J. Bilan, A. Klip, A. Nagy, J. R. Kim, J. G. Park, S. M. Hussein, K. O. Doh, C. C. Hui, and H. K. Sung. 2017. 'Intermittent fasting promotes adipose thermogenesis and metabolic homeostasis via VEGF-mediated alternative activation of macrophage', *Cell Res*, 27: 1309-26.
- Kim, K., J. K. Kang, Y. H. Jung, S. B. Lee, R. Rametta, P. Dongiovanni, L. Valenti, and U. B. Pajvani. 2021. 'Adipocyte PHLPP2 inhibition prevents obesity-induced fatty liver', *Nat Commun*, 12: 1822.
- Kim, S. J., T. Tang, M. Abbott, J. A. Viscarra, Y. Wang, and H. S. Sul. 2016. 'AMPK Phosphorylates Desnutrin/ATGL and Hormone-Sensitive Lipase To Regulate Lipolysis and Fatty Acid Oxidation within Adipose Tissue', *Mol Cell Biol*, 36: 1961-76.
- Kim, W. K., H. R. Choi, S. G. Park, Y. Ko, K. H. Bae, and S. C. Lee. 2012. 'Myostatin inhibits brown adipocyte differentiation via regulation of Smad3-mediated beta-catenin stabilization', *Int J Biochem Cell Biol*, 44: 327-34.
- Klar, A. S., T. Biedermann, K. Michalak, T. Michalczyk, C. Meuli-Simmen, A. Scherberich, M. Meuli, and E. Reichmann. 2017. 'Human Adipose Mesenchymal Cells Inhibit Melanocyte Differentiation and the Pigmentation of Human Skin via Increased Expression of TGF-beta1', *J Invest Dermatol*, 137: 2560-69.
- Klein, S., A. Gastaldelli, H. Yki-Jarvinen, and P. E. Scherer. 2022. 'Why does obesity cause diabetes?', *Cell Metab*, 34: 11-20.
- Klimcakova, E., B. Roussel, A. Marquez-Quinones, Z. Kovacova, M. Kovacikova, M. Combes, M. Siklova-Vitkova, J. Hejnova, P. Sramkova, A. Bouloumie, N. Viguerie, V. Stich, and D. Langin. 2011. 'Worsening of obesity and metabolic status yields similar molecular adaptations in human subcutaneous and visceral adipose tissue: decreased metabolism and increased immune response', *J Clin Endocrinol Metab*, 96: E73-82.
- Klingelutz, A. J., F. A. Gourronc, A. Chaly, D. A. Wadkins, A. J. Burand, K. R. Markan, S. O. Idiga, M. Wu, M. J. Potthoff, and J. A. Ankrum. 2018. 'Scaffold-free generation of uniform adipose spheroids for metabolism research and drug discovery', *Sci Rep*, 8: 523.
- Knott, G. J., C. S. Bond, and A. H. Fox. 2016. 'The DBHS proteins SFPO, NONO and PSCP1: a multipurpose molecular scaffold', *Nucleic Acids Res*, 44: 3989-4004.
- Kopietz, F., C. Berggreen, S. Larsson, J. Sall, M. Ekelund, K. Sakamoto, E. Degerman, C. Holm, and O. Goransson. 2018. 'AMPK activation by A-769662 and 991 does not affect catecholamine-induced lipolysis in human adipocytes', *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 315: E1075-E85.
- Koza, R. A., L. Nikonova, J. Hogan, J. S. Rim, T. Mendoza, C. Faulk, J. Skaf, and L. P. Kozak. 2006. 'Changes in gene expression foreshadow diet-induced obesity in genetically identical mice', *PLoS Genet*, 2: e81.
- Krintel, C., C. Klint, H. Lindvall, M. Morgelin, and C. Holm. 2010. 'Quaternary structure and enzymological properties of the different hormone-sensitive lipase (HSL) isoforms', *PLoS One*, 5: e11193.
- Krintel, C., M. Morgelin, D. T. Logan, and C. Holm. 2009. 'Phosphorylation of hormone-sensitive lipase by protein kinase A in vitro promotes an increase in its hydrophobic surface area', *FEBS J*, 276: 4752-62.
- Krintel, C., P. Osmark, M. R. Larsen, S. Resjo, D. T. Logan, and C. Holm. 2008. 'Ser649 and Ser650 are the major determinants of protein kinase A-mediated activation of human hormone-sensitive lipase against lipid substrates', *PLoS One*, 3: e3756.
- Lafontan, M., and D. Langin. 2009. 'Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue', *Prog Lipid Res*, 48: 275-97.
- Lagna, G., A. Hata, A. Hemmati-Brivanlou, and J. Massague. 1996. 'Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF-beta signalling pathways', *Nature*, 383: 832-6.
- LaMarre, J., M. A. Hayes, G. K. Wollenberg, I. Hussaini, S. W. Hall, and S. L. Gonias. 1991. 'An alpha 2-macroglobulin receptor-dependent mechanism for the plasma clearance of transforming growth factor-beta 1 in mice', *J Clin Invest*, 87: 39-44.

- LaMarre, J., G. K. Wollenberg, J. Gaudie, and M. A. Hayes. 1990. 'Alpha 2-macroglobulin and serum preferentially counteract the mitoinhibitory effect of transforming growth factor-beta 2 in rat hepatocytes', *Lab Invest*, 62: 545-51.
- Langin, D., A. Dicker, G. Tavernier, J. Hoffstedt, A. Mairal, M. Ryden, E. Arner, A. Sicard, C. M. Jenkins, N. Viguerie, V. van Harmelen, R. W. Gross, C. Holm, and P. Arner. 2005. 'Adipocyte lipases and defect of lipolysis in human obesity', *Diabetes*, 54: 3190-7.
- Langin, D., H. Laurell, L. S. Holst, P. Belfrage, and C. Holm. 1993. 'Gene organization and primary structure of human hormone-sensitive lipase: possible significance of a sequence homology with a lipase of *Moraxella TA144*, an antarctic bacterium', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90: 4897-901.
- Lawson, K. A., N. R. Dunn, B. A. Roelen, L. M. Zeinstra, A. M. Davis, C. V. Wright, J. P. Korving, and B. L. Hogan. 1999. 'Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo', *Genes Dev*, 13: 424-36.
- Lee, M. J. 2018. 'Transforming growth factor beta superfamily regulation of adipose tissue biology in obesity', *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1864: 1160-71.
- Lee, M. J., R. T. Pickering, V. Shibad, Y. Wu, K. Karastergiou, M. Jager, M. D. Layne, and S. K. Fried. 2019. 'Impaired Glucocorticoid Suppression of TGFbeta Signaling in Human Omental Adipose Tissues Limits Adipogenesis and May Promote Fibrosis', *Diabetes*, 68: 587-97.
- Lee, M. J., Y. Wu, and S. K. Fried. 2013. 'Adipose tissue heterogeneity: implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications', *Mol Aspects Med*, 34: 1-11.
- Lee, S. Y., J. H. Lee, J. Y. Kim, Y. C. Bae, K. T. Suh, and J. S. Jung. 2014. 'BMP2 increases adipogenic differentiation in the presence of dexamethasone, which is inhibited by the treatment of TNF-alpha in human adipose tissue-derived stromal cells', *Cell Physiol Biochem*, 34: 1339-50.
- Lehning, A. C., R. S. Dewal, L. A. Baer, K. M. Kitching, V. R. Munoz, P. J. Arts, D. A. Sindeldecker, F. J. May, Hpm Lauritzen, L. J. Goodyear, and K. I. Stanford. 2019. 'Exercise Training Induces Depot-Specific Adaptations to White and Brown Adipose Tissue', *iScience*, 11: 425-39.
- Leonardsson, G., J. H. Steel, M. Christian, V. Pocock, S. Milligan, J. Bell, P. W. So, G. Medina-Gomez, A. Vidal-Puig, R. White, and M. G. Parker. 2004. 'Nuclear receptor corepressor RIP140 regulates fat accumulation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 8437-42.
- Levy, L., and C. S. Hill. 2005. 'Smad4 dependency defines two classes of transforming growth factor {beta} (TGF-{beta}) target genes and distinguishes TGF-{beta}-induced epithelial-mesenchymal transition from its antiproliferative and migratory responses', *Mol Cell Biol*, 25: 8108-25.
- Lewis, K. A., P. C. Gray, A. L. Blount, L. A. MacConell, E. Wiater, L. M. Bilezikjian, and W. Vale. 2000. 'Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling', *Nature*, 404: 411-4.
- Li, G., C. Xie, S. Lu, R. G. Nichols, Y. Tian, L. Li, D. Patel, Y. Ma, C. N. Brocker, T. Yan, K. W. Krausz, R. Xiang, O. Gavrilova, A. D. Patterson, and F. J. Gonzalez. 2017. 'Intermittent Fasting Promotes White Adipose Browning and Decreases Obesity by Shaping the Gut Microbiota', *Cell Metab*, 26: 672-85 e4.
- Li, N., Q. Yang, R. G. Walker, T. B. Thompson, M. Du, and B. D. Rodgers. 2016. 'Myostatin Attenuation In Vivo Reduces Adiposity, but Activates Adipogenesis', *Endocrinology*, 157: 282-91.
- Li, X., Y. Zhao, C. Chen, L. Yang, H. H. Lee, Z. Wang, N. Zhang, M. G. Kolonin, Z. An, X. Ge, P. E. Scherer, and K. Sun. 2020. 'Critical Role of Matrix Metalloproteinase 14 in Adipose Tissue Remodeling during Obesity', *Mol Cell Biol*, 40.
- Lim, K., A. Haider, C. Adams, A. Sleigh, and D. B. Savage. 2021. 'Lipodystrophy: a paradigm for understanding the consequences of "overloading" adipose tissue', *Physiol Rev*, 101: 907-93.
- Lima, Jd, E. Simoes, G. de Castro, Mrpt Morais, E. M. de Matos-Neto, M. J. Alves, N. I. Pinto, R. G. Figueredo, T. M. T. Zorn, A. S. Felipe-Silva, F. Tokeshi, J. P. Otoch, P. Alcantara, F. J. Cabral, E. S. Ferro, A. Laviano, and M. Seelaender. 2019. 'Tumour-derived transforming growth factor-beta signalling contributes to fibrosis in patients with cancer cachexia', *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 10: 1045-59.

- Liu, X., Z. Zheng, X. Zhu, M. Meng, L. Li, Y. Shen, Q. Chi, D. Wang, Z. Zhang, C. Li, Y. Li, Y. Xue, J. R. Speakman, and W. Jin. 2013. 'Brown adipose tissue transplantation improves whole-body energy metabolism', *Cell Res*, 23: 851-4.
- Lopez-Casillas, F., J. L. Wrana, and J. Massague. 1993. 'Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor', *Cell*, 73: 1435-44.
- Lu, X., S. Altshuler-Keylin, Q. Wang, Y. Chen, C. Henrique Sponton, K. Ikeda, P. Maretich, T. Yoneshiro, and S. Kajimura. 2018. 'Mitophagy controls beige adipocyte maintenance through a Parkin-dependent and UCP1-independent mechanism', *Sci Signal*, 11.
- Lucarelli, P., M. Schilling, C. Kreutz, A. Vlasov, M. E. Boehm, N. Iwamoto, B. Steiert, S. Lattermann, M. Wasch, M. Stepath, M. S. Matter, M. Heikenwalder, K. Hoffmann, D. Deharde, G. Damm, D. Seehofer, M. Muciek, N. Gretz, W. D. Lehmann, J. Timmer, and U. Klingmuller. 2018. 'Resolving the Combinatorial Complexity of Smad Protein Complex Formation and Its Link to Gene Expression', *Cell Syst*, 6: 75-89 e11.
- Luo, K. 2017. 'Signaling Cross Talk between TGF-beta/Smad and Other Signaling Pathways', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 9.
- Macotela, Y., B. Emanuelli, M. A. Mori, S. Gesta, T. J. Schulz, Y. H. Tseng, and C. R. Kahn. 2012. 'Intrinsic differences in adipocyte precursor cells from different white fat depots', *Diabetes*, 61: 1691-9.
- Marcelin, G., E. L. Gautier, and K. Clement. 2022. 'Adipose Tissue Fibrosis in Obesity: Etiology and Challenges', *Annu Rev Physiol*, 84: 135-55.
- Marcelin, G., A. L. M. Silveira, L. B. Martins, A. V. Ferreira, and K. Clement. 2019. 'Deciphering the cellular interplays underlying obesity-induced adipose tissue fibrosis', *J Clin Invest*, 129: 4032-40.
- Massague, J. 2012. 'TGFbeta signalling in context', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13: 616-30.
- Matzuk, M. M., N. Lu, H. Vogel, K. Sellheyer, D. R. Roop, and A. Bradley. 1995. 'Multiple defects and perinatal death in mice deficient in follistatin', *Nature*, 374: 360-3.
- Mazzucotelli, A., N. Viguerie, C. Tiraby, J. S. Annicotte, A. Mairal, E. Klimcakova, E. Lepin, P. Delmar, S. Dejean, G. Tavernier, C. Lefort, J. Hidalgo, T. Pineau, L. Fajas, K. Clement, and D. Langin. 2007. 'The transcriptional coactivator peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)gamma coactivator-1 alpha and the nuclear receptor PPAR alpha control the expression of glycerol kinase and metabolism genes independently of PPAR gamma activation in human white adipocytes', *Diabetes*, 56: 2467-75.
- McGlashan, J. M., M. C. Gorecki, A. E. Kozlowski, C. K. Thirnbeck, K. R. Markan, K. L. Leslie, M. E. Kotas, M. J. Potthoff, G. B. Richerson, and M. P. Gillum. 2015. 'Central serotonergic neurons activate and recruit thermogenic brown and beige fat and regulate glucose and lipid homeostasis', *Cell Metab*, 21: 692-705.
- Miyazono, K., A. Olofsson, P. Colosetti, and C. H. Heldin. 1991. 'A role of the latent TGF-beta 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF-beta 1', *EMBO J*, 10: 1091-101.
- Modica, S., L. G. Straub, M. Balaz, W. Sun, L. Varga, P. Stefanicka, M. Profant, E. Simon, H. Neubauer, B. Ukropcova, J. Ukropec, and C. Wolfrum. 2016. 'Bmp4 Promotes a Brown to White-like Adipocyte Shift', *Cell Rep*, 16: 2243-58.
- Morigny, P., J. Boucher, P. Arner, and D. Langin. 2021. 'Lipid and glucose metabolism in white adipocytes: pathways, dysfunction and therapeutics', *Nat Rev Endocrinol*, 17: 276-95.
- Morigny, P., M. Houssier, A. Mairal, C. Ghilain, E. Mouisel, F. Benhamed, B. Masri, E. Recazens, P. D. Denechaud, G. Tavernier, S. Caspar-Bauguil, S. Virtue, V. Sramkova, L. Monbrun, A. Mazars, M. Zanoun, S. Guilmeau, V. Barquissau, D. Beuzelin, S. Bonnel, M. Marques, B. Monge-Roffarello, C. Lefort, B. Fielding, T. Sulpice, A. Astrup, B. Payrastre, J. Bertrand-Michel, E. Meugnier, L. Ligat, F. Lopez, H. Guillou, C. Ling, C. Holm, R. Rabasa-Lhoret, W. H. M. Saris, V. Stich, P. Arner, M. Ryden, C. Moro, N. Viguerie, M. Harms, S. Hallen, A. Vidal-Puig, H. Vidal, C. Postic, and D. Langin. 2019. 'Interaction between hormone-sensitive lipase and ChREBP in fat cells controls insulin sensitivity', *Nat Metab*, 1: 133-46.
- Morigny, P., M. Houssier, E. Mouisel, and D. Langin. 2016. 'Adipocyte lipolysis and insulin resistance', *Biochimie*, 125: 259-66.

- Morikawa, M., R. Derynck, and K. Miyazono. 2016. 'TGF-beta and the TGF-beta Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 8.
- Mulder, H., M. Sorhede-Winzell, J. A. Contreras, M. Fex, K. Strom, T. Ploug, H. Galbo, P. Arner, C. Lundberg, F. Sundler, B. Ahren, and C. Holm. 2003. 'Hormone-sensitive lipase null mice exhibit signs of impaired insulin sensitivity whereas insulin secretion is intact', *J Biol Chem*, 278: 36380-8.
- Muller, S., I. Ader, J. Creff, H. Lemenager, P. Achard, L. Casteilla, L. Sensebe, A. Carriere, and F. Deschaseaux. 2019. 'Human adipose stromal-vascular fraction self-organizes to form vascularized adipose tissue in 3D cultures', *Sci Rep*, 9: 7250.
- Nardozi, J. D., K. Lott, and G. Cingolani. 2010. 'Phosphorylation meets nuclear import: a review', *Cell Commun Signal*, 8: 32.
- Ohsaki, Y., T. Kawai, Y. Yoshikawa, J. Cheng, E. Jokitalo, and T. Fujimoto. 2016. 'PML isoform II plays a critical role in nuclear lipid droplet formation', *J Cell Biol*, 212: 29-38.
- OMS. 2020. 'Obésité et surpoids'. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
- Osterlund, T., D. J. Beussman, K. Julenius, P. H. Poon, S. Linse, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, M. C. Scholtz, Z. S. Derewenda, and C. Holm. 1999. 'Domain identification of hormone-sensitive lipase by circular dichroism and fluorescence spectroscopy, limited proteolysis, and mass spectrometry', *J Biol Chem*, 274: 15382-8.
- Osterlund, T., J. A. Contreras, and C. Holm. 1997. 'Identification of essential aspartic acid and histidine residues of hormone-sensitive lipase: apparent residues of the catalytic triad', *FEBS Lett*, 403: 259-62.
- Osuga, J., S. Ishibashi, T. Oka, H. Yagyu, R. Tozawa, A. Fujimoto, F. Shionoiri, N. Yahagi, F. B. Kraemer, O. Tsutsumi, and N. Yamada. 2000. 'Targeted disruption of hormone-sensitive lipase results in male sterility and adipocyte hypertrophy, but not in obesity', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 787-92.
- Otero-Diaz, B., M. Rodriguez-Flores, V. Sanchez-Munoz, F. Monraz-Preciado, S. Ordonez-Ortega, V. Becerril-Elias, G. Baay-Guzman, R. Obando-Monge, E. Garcia-Garcia, B. Palacios-Gonzalez, M. T. Villarreal-Molina, M. Sierra-Salazar, and B. Antuna-Puente. 2018. 'Exercise Induces White Adipose Tissue Browning Across the Weight Spectrum in Humans', *Front Physiol*, 9: 1781.
- Ottaviani, E., D. Malagoli, and C. Franceschi. 2011. 'The evolution of the adipose tissue: a neglected enigma', *Gen Comp Endocrinol*, 174: 1-4.
- Pajed, L., U. Taschler, A. Tilp, P. Hofer, P. Kotzbeck, S. Kolleritsch, F. P. W. Radner, I. Pototschnig, C. Wagner, M. Schratte, S. Eder, S. Huetter, R. Schreiber, G. Haemmerle, T. O. Eichmann, M. Schweiger, G. Hoefler, E. E. Kershaw, A. Lass, and G. Schoiswohl. 2021. 'Advanced lipodystrophy reverses fatty liver in mice lacking adipocyte hormone-sensitive lipase', *Commun Biol*, 4: 323.
- Park, J., S. Shin, L. Liu, I. Jahan, S. G. Ong, P. Xu, D. C. Berry, and Y. Jiang. 2021. 'Progenitor-like characteristics in a subgroup of UCP1+ cells within white adipose tissue', *Dev Cell*, 56: 985-99 e4.
- Park, K. W., D. S. Halperin, and P. Tontonoz. 2008. 'Before they were fat: adipocyte progenitors', *Cell Metab*, 8: 454-7.
- Park, S. Y., H. J. Kim, S. Wang, T. Higashimori, J. Dong, Y. J. Kim, G. Cline, H. Li, M. Prentki, G. I. Shulman, G. A. Mitchell, and J. K. Kim. 2005. 'Hormone-sensitive lipase knockout mice have increased hepatic insulin sensitivity and are protected from short-term diet-induced insulin resistance in skeletal muscle and heart', *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 289: E30-9.
- Pellegrinelli, V., J. Heuvingh, O. du Roure, C. Rouault, A. Devulder, C. Klein, M. Lacasa, E. Clement, D. Lacasa, and K. Clement. 2014. 'Human adipocyte function is impacted by mechanical cues', *J Pathol*, 233: 183-95.
- Petrus, P., N. Mejhert, P. Corrales, S. Lecoutre, Q. Li, E. Maldonado, A. Kulyte, Y. Lopez, M. Campbell, J. R. Acosta, J. Laurencikiene, I. Douagi, H. Gao, C. Martinez-Alvarez, P. Heden, K. L. Spalding, A. Vidal-Puig, G. Medina-Gomez, P. Arner, and M. Ryden. 2018. 'Transforming Growth Factor-



- beta3 Regulates Adipocyte Number in Subcutaneous White Adipose Tissue', *Cell Rep*, 25: 551-60 e5.
- Pietilainen, K. H., T. Rog, T. Seppanen-Laakso, S. Virtue, P. Gopalacharyulu, J. Tang, S. Rodriguez-Cuenca, A. Maciejewski, J. Naukkarinen, A. L. Ruskeepaa, P. S. Niemela, L. Yetukuri, C. Y. Tan, V. Velagapudi, S. Castillo, H. Nygren, T. Hyotylainen, A. Rissanen, J. Kaprio, H. Yki-Jarvinen, I. Vattulainen, A. Vidal-Puig, and M. Oresic. 2011. 'Association of lipidome remodeling in the adipocyte membrane with acquired obesity in humans', *PLoS Biol*, 9: e1000623.
- Pini, M., G. Czibik, D. Sawaki, Z. Mezdari, L. Braud, T. Delmont, R. Mercedes, C. Martel, N. Buron, G. Marcelin, A. Borgne-Sanchez, R. Foresti, R. Motterlini, C. Henegar, and G. Derumeaux. 2021. 'Adipose tissue senescence is mediated by increased ATP content after a short-term high-fat diet exposure', *Aging Cell*, 20: e13421.
- Pond, C. M. 1992. 'An evolutionary and functional view of mammalian adipose tissue', *Proc Nutr Soc*, 51: 367-77.
- Qian, S. W., Y. Tang, X. Li, Y. Liu, Y. Y. Zhang, H. Y. Huang, R. D. Xue, H. Y. Yu, L. Guo, H. D. Gao, Y. Liu, X. Sun, Y. M. Li, W. P. Jia, and Q. Q. Tang. 2013. 'BMP4-mediated brown fat-like changes in white adipose tissue alter glucose and energy homeostasis', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: E798-807.
- Rahbani, J. F., A. Roesler, M. F. Hussain, B. Samborska, C. B. Dykstra, L. Tsai, M. P. Jedrychowski, L. Vergnes, K. Reue, B. M. Spiegelman, and L. Kazak. 2021. 'Creatine kinase B controls futile creatine cycling in thermogenic fat', *Nature*, 590: 480-85.
- Rauwerdink, A., and R. J. Kazlauskas. 2015. 'How the Same Core Catalytic Machinery Catalyzes 17 Different Reactions: the Serine-Histidine-Aspartate Catalytic Triad of alpha/beta-Hydrolase Fold Enzymes', *ACS Catal*, 5: 6153-76.
- Reczens, E., E. Mouisel, and D. Langin. 2021. 'Hormone-sensitive lipase: sixty years later', *Prog Lipid Res*, 82: 101084.
- Reczens, E., G. Tavernier, J. Dufau, C. Bergoglio, F. Benhamed, S. Cassant-Sourdy, M. A. Marques, S. Caspar-Bauguil, A. Brion, L. Monbrun, R. Dentin, C. Ferrier, M. Leroux, P. D. Denechaud, C. Moro, J. P. Concordet, C. Postic, E. Mouisel, and D. Langin. 2022. 'ChREBPbeta is dispensable for the control of glucose homeostasis and energy balance', *JCI Insight*, 7.
- Remels, A. H., R. C. Langen, H. R. Gosker, A. P. Russell, F. Spaapen, J. W. Voncken, P. Schrauwen, and A. M. Schols. 2009. 'PPARgamma inhibits NF-kappaB-dependent transcriptional activation in skeletal muscle', *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 297: E174-83.
- Roberts, A. B., M. A. Anzano, L. C. Lamb, J. M. Smith, and M. B. Sporn. 1981. 'New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78: 5339-43.
- Roberts, A. B., L. C. Lamb, D. L. Newton, M. B. Sporn, J. E. De Larco, and G. J. Todaro. 1980. 'Transforming growth factors: isolation of polypeptides from virally and chemically transformed cells by acid/ethanol extraction', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77: 3494-8.
- Robertson, I. B., and D. B. Rifkin. 2016. 'Regulation of the Bioavailability of TGF-beta and TGF-beta-Related Proteins', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 8.
- Roh, H. C., M. Kumari, S. Taleb, D. Tenen, C. Jacobs, A. Lyubetskaya, L. T. Tsai, and E. D. Rosen. 2020. 'Adipocytes fail to maintain cellular identity during obesity due to reduced PPARgamma activity and elevated TGFbeta-SMAD signaling', *Mol Metab*, 42: 101086.
- Romanuska, A., and A. Kohler. 2018. 'The Inner Nuclear Membrane Is a Metabolically Active Territory that Generates Nuclear Lipid Droplets', *Cell*, 174: 700-15 e18.
- . 2021. 'Reprogrammed lipid metabolism protects inner nuclear membrane against unsaturated fat', *Dev Cell*, 56: 2562-78 e3.
- Rosen, E. D., and B. M. Spiegelman. 2014. 'What we talk about when we talk about fat', *Cell*, 156: 20-44.
- Rosenwald, M., A. Perdikari, T. Rulicke, and C. Wolfrum. 2013. 'Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes', *Nat Cell Biol*, 15: 659-67.

- Rossmeislova, L., L. Malisova, J. Kracmerova, M. Tencerova, Z. Kovacova, M. Koc, M. Siklova-Vitkova, N. Viquerie, D. Langin, and V. Stich. 2013. 'Weight loss improves the adipogenic capacity of human preadipocytes and modulates their secretory profile', *Diabetes*, 62: 1990-5.
- Ruan, H. B., M. O. Dietrich, Z. W. Liu, M. R. Zimmer, M. D. Li, J. P. Singh, K. Zhang, R. Yin, J. Wu, T. L. Horvath, and X. Yang. 2014. 'O-GlcNAc transferase enables AgRP neurons to suppress browning of white fat', *Cell*, 159: 306-17.
- Rytka, J. M., S. Wueest, E. J. Schoenle, and D. Konrad. 2011. 'The portal theory supported by venous drainage-selective fat transplantation', *Diabetes*, 60: 56-63.
- Saharinen, J., J. Taipale, and J. Keski-Oja. 1996. 'Association of the small latent transforming growth factor-beta with an eight cysteine repeat of its binding protein LTBP-1', *EMBO J*, 15: 245-53.
- Sakers, A., M. K. De Siqueira, P. Seale, and C. J. Villanueva. 2022. 'Adipose-tissue plasticity in health and disease', *Cell*, 185: 419-46.
- Sarvari, A. K., E. L. Van Hauwaert, L. K. Markussen, E. Gammelmark, A. B. Marcher, M. F. Ebbesen, R. Nielsen, J. R. Brewer, J. G. S. Madsen, and S. Mandrup. 2021. 'Plasticity of Epididymal Adipose Tissue in Response to Diet-Induced Obesity at Single-Nucleus Resolution', *Cell Metab*, 33: 437-53 e5.
- Schatton, D., and E. I. Rugarli. 2018. 'A concert of RNA-binding proteins coordinates mitochondrial function', *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 53: 652-66.
- Scheja, L., and J. Heeren. 2019. 'The endocrine function of adipose tissues in health and cardiometabolic disease', *Nat Rev Endocrinol*, 15: 507-24.
- Scherer, P. E. 2019. 'The many secret lives of adipocytes: implications for diabetes', *Diabetologia*, 62: 223-32.
- Schmierer, B., and C. S. Hill. 2007. 'TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8: 970-82.
- Schoettl, T., I. P. Fischer, and S. Ussar. 2018. 'Heterogeneity of adipose tissue in development and metabolic function', *J Exp Biol*, 221.
- Scirpo, R., R. Fiorotto, A. Villani, M. Amenduni, C. Spirli, and M. Strazzabosco. 2015. 'Stimulation of nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-gamma limits NF-kappaB-dependent inflammation in mouse cystic fibrosis biliary epithelium', *Hepatology*, 62: 1551-62.
- Sengenès, C., M. Berlan, I. De Glizezinski, M. Lafontan, and J. Galitzky. 2000. 'Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes', *FASEB J*, 14: 1345-51.
- Sengenès, C., A. Bouloumie, H. Hauner, M. Berlan, R. Busse, M. Lafontan, and J. Galitzky. 2003. 'Involvement of a cGMP-dependent pathway in the natriuretic peptide-mediated hormone-sensitive lipase phosphorylation in human adipocytes', *J Biol Chem*, 278: 48617-26.
- Senkal, C. E., M. F. Salama, A. J. Snider, J. J. Allopenna, N. A. Rana, A. Koller, Y. A. Hannun, and L. M. Obeid. 2017. 'Ceramide Is Metabolized to Acylceramide and Stored in Lipid Droplets', *Cell Metab*, 25: 686-97.
- Shamsi, F., M. Piper, L. L. Ho, T. L. Huang, A. Gupta, A. Streets, M. D. Lynes, and Y. H. Tseng. 2021. 'Vascular smooth muscle-derived Trpv1(+) progenitors are a source of cold-induced thermogenic adipocytes', *Nat Metab*, 3: 485-95.
- Shapira, S. N., and P. Seale. 2019. 'Transcriptional Control of Brown and Beige Fat Development and Function', *Obesity (Silver Spring)*, 27: 13-21.
- Shen, J. X., M. Couchet, J. Dufau, T. de Castro Barbosa, M. H. Ulbrich, M. Helmstadter, A. M. Kemas, R. Zandi Shafagh, M. A. Marques, J. B. Hansen, N. Mejhert, D. Langin, M. Ryden, and V. M. Lauschke. 2021. '3D Adipose Tissue Culture Links the Organotypic Microenvironment to Improved Adipogenesis', *Adv Sci (Weinh)*, 8: e2100106.
- Shen, W. J., Y. Liang, R. Hong, S. Patel, V. Natsu, K. Sridhar, A. Jenkins, D. A. Bernlohr, and F. B. Kraemer. 2001. 'Characterization of the functional interaction of adipocyte lipid-binding protein with hormone-sensitive lipase', *J Biol Chem*, 276: 49443-8.
- Shen, W. J., S. Patel, J. E. Eriksson, and F. B. Kraemer. 2010. 'Vimentin is a functional partner of hormone sensitive lipase and facilitates lipolysis', *J Proteome Res*, 9: 1786-94.

- Shen, W. J., S. Patel, R. Hong, and F. B. Kraemer. 2000. 'Hormone-sensitive lipase functions as an oligomer', *Biochemistry*, 39: 2392-8.
- Shen, W. J., Z. Yu, S. Patel, D. Jue, L. F. Liu, and F. B. Kraemer. 2011. 'Hormone-sensitive lipase modulates adipose metabolism through PPARgamma', *Biochim Biophys Acta*, 1811: 9-16.
- Shi, F., and S. Collins. 2017. 'Second messenger signaling mechanisms of the brown adipocyte thermogenic program: an integrative perspective', *Horm Mol Biol Clin Investig*, 31.
- Shull, M. M., I. Ormsby, A. B. Kier, S. Pawlowski, R. J. Diebold, M. Yin, R. Allen, C. Sidman, G. Proetzel, D. Calvin, and et al. 1992. 'Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease', *Nature*, 359: 693-9.
- Siersbaek, R., R. Nielsen, and S. Mandrup. 2010. 'PPARgamma in adipocyte differentiation and metabolism--novel insights from genome-wide studies', *FEBS Lett*, 584: 3242-9.
- Singh, R., M. Braga, S. T. Reddy, S. J. Lee, M. Parveen, V. Grijalva, L. Vergnes, and S. Pervin. 2017. 'Follistatin Targets Distinct Pathways To Promote Brown Adipocyte Characteristics in Brown and White Adipose Tissues', *Endocrinology*, 158: 1217-30.
- Skillington, J., L. Choy, and R. Derynck. 2002. 'Bone morphogenetic protein and retinoic acid signaling cooperate to induce osteoblast differentiation of preadipocytes', *J Cell Biol*, 159: 135-46.
- Smith, A. J., B. R. Thompson, M. A. Sanders, and D. A. Bernlohr. 2007. 'Interaction of the adipocyte fatty acid-binding protein with the hormone-sensitive lipase: regulation by fatty acids and phosphorylation', *J Biol Chem*, 282: 32424-32.
- Soltysik, K., Y. Ohsaki, T. Tatematsu, J. Cheng, and T. Fujimoto. 2019. 'Nuclear lipid droplets derive from a lipoprotein precursor and regulate phosphatidylcholine synthesis', *Nat Commun*, 10: 473.
- Song, A., W. Dai, M. J. Jang, L. Medrano, Z. Li, H. Zhao, M. Shao, J. Tan, A. Li, T. Ning, M. M. Miller, B. Armstrong, J. M. Huss, Y. Zhu, Y. Liu, V. Gradinaru, X. Wu, L. Jiang, P. E. Scherer, and Q. A. Wang. 2020. 'Low- and high-thermogenic brown adipocyte subpopulations coexist in murine adipose tissue', *J Clin Invest*, 130: 247-57.
- Sottile, V., and K. Seuwen. 2000. 'Bone morphogenetic protein-2 stimulates adipogenic differentiation of mesenchymal precursor cells in synergy with BRL 49653 (rosiglitazone)', *FEBS Lett*, 475: 201-4.
- Stanford, K. I., R. J. Middelbeek, and L. J. Goodyear. 2015. 'Exercise Effects on White Adipose Tissue: Beiging and Metabolic Adaptations', *Diabetes*, 64: 2361-8.
- Stewart, A., H. Guan, and K. Yang. 2010. 'BMP-3 promotes mesenchymal stem cell proliferation through the TGF-beta/activin signaling pathway', *J Cell Physiol*, 223: 658-66.
- Stralfors, P., and P. Belfrage. 1983. 'Phosphorylation of hormone-sensitive lipase by cyclic AMP-dependent protein kinase', *J Biol Chem*, 258: 15146-52.
- Stralfors, P., P. Bjorgell, and P. Belfrage. 1984. 'Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase in intact adipocytes: identification of phosphorylated sites and effects on the phosphorylation by lipolytic hormones and insulin', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81: 3317-21.
- Strom, K., T. E. Gundersen, O. Hansson, S. Lucas, C. Fernandez, R. Blomhoff, and C. Holm. 2009. 'Hormone-sensitive lipase (HSL) is also a retinyl ester hydrolase: evidence from mice lacking HSL', *FASEB J*, 23: 2307-16.
- Strom, K., O. Hansson, S. Lucas, P. Nevsten, C. Fernandez, C. Klint, S. Moverare-Skrtic, F. Sundler, C. Ohlsson, and C. Holm. 2008. 'Attainment of brown adipocyte features in white adipocytes of hormone-sensitive lipase null mice', *PLoS One*, 3: e1793.
- Su, C. L., C. Sztalryd, J. A. Contreras, C. Holm, A. R. Kimmel, and C. Londos. 2003. 'Mutational analysis of the hormone-sensitive lipase translocation reaction in adipocytes', *J Biol Chem*, 278: 43615-9.
- Sun, K., J. Tordjman, K. Clement, and P. E. Scherer. 2013. 'Fibrosis and adipose tissue dysfunction', *Cell Metab*, 18: 470-7.
- Sun, W., H. Dong, M. Balaz, M. Slyper, E. Drokhlyansky, G. Colleluori, A. Giordano, Z. Kovanicova, P. Stefanicka, L. Balazova, L. Ding, A. S. Husted, G. Rudofsky, J. Ukropec, S. Cinti, T. W. Schwartz, A. Regev, and C. Wolfrum. 2020. 'snRNA-seq reveals a subpopulation of adipocytes that regulates thermogenesis', *Nature*, 587: 98-102.

- Sun, Y., J. F. Rahbani, M. P. Jedrychowski, C. L. Riley, S. Vidoni, D. Bogoslavski, B. Hu, P. A. Dumesic, X. Zeng, A. B. Wang, N. H. Knudsen, C. R. Kim, A. Marasciullo, J. L. Millan, E. T. Chouchani, L. Kazak, and B. M. Spiegelman. 2021. 'Mitochondrial TNAP controls thermogenesis by hydrolysis of phosphocreatine', *Nature*, 593: 580-85.
- Sveidahl Johansen, O., T. Ma, J. B. Hansen, L. K. Markussen, R. Schreiber, L. Reverte-Salisa, H. Dong, D. P. Christensen, W. Sun, T. Gnad, I. Karavaeva, T. S. Nielsen, S. Kooijman, C. Cero, O. Dmytriyeva, Y. Shen, M. Razzoli, S. L. O'Brien, E. N. Kuipers, C. H. Nielsen, W. Orchard, N. Willemsen, N. Z. Jespersen, M. Lundh, E. G. Sustarsic, C. M. Hallgren, M. Frost, S. McGonigle, M. S. Isidor, C. Broholm, O. Pedersen, J. B. Hansen, N. Grarup, T. Hansen, A. Kjaer, J. G. Granneman, M. M. Babu, D. Calebiro, S. Nielsen, M. Ryden, R. Soccio, P. C. N. Rensen, J. T. Treebak, T. W. Schwartz, B. Emanuelli, A. Bartolomucci, A. Pfeifer, R. Zechner, C. Scheele, S. Mandrup, and Z. Gerhart-Hines. 2021. 'Lipolysis drives expression of the constitutively active receptor GPR3 to induce adipose thermogenesis', *Cell*, 184: 3502-18 e33.
- Sztalryd, C., G. Xu, H. Dorward, J. T. Tansey, J. A. Contreras, A. R. Kimmel, and C. Londos. 2003. 'Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation', *J Cell Biol*, 161: 1093-103.
- Takahashi, H., C. R. R. Alves, K. I. Stanford, R. J. W. Middelbeek, Nigro Pasquale, R. E. Ryan, R. Xue, M. Sakaguchi, M. D. Lynes, K. So, J. D. Mul, M. Y. Lee, E. Balan, H. Pan, J. M. Dreyfuss, M. F. Hirshman, M. Azhar, J. C. Hannukainen, P. Nuutila, K. K. Kalliokoski, S. Nielsen, B. K. Pedersen, C. R. Kahn, Y. H. Tseng, and L. J. Goodyear. 2019. 'TGF-beta2 is an exercise-induced adipokine that regulates glucose and fatty acid metabolism', *Nat Metab*, 1: 291-303.
- Takeuchi, A., K. Iida, T. Tsubota, M. Hosokawa, M. Denawa, J. B. Brown, K. Ninomiya, M. Ito, H. Kimura, T. Abe, H. Kiyonari, K. Ohno, and M. Hagiwara. 2018. 'Loss of Sfpq Causes Long-Genes Transcriptopathy in the Brain', *Cell Rep*, 23: 1326-41.
- Tan, C. K., N. Leuenberger, M. J. Tan, Y. W. Yan, Y. Chen, R. Kambadur, W. Wahli, and N. S. Tan. 2011. 'Smad3 deficiency in mice protects against insulin resistance and obesity induced by a high-fat diet', *Diabetes*, 60: 464-76.
- Tan, C. Y., and A. Vidal-Puig. 2008. 'Adipose tissue expandability: the metabolic problems of obesity may arise from the inability to become more obese', *Biochem Soc Trans*, 36: 935-40.
- Tan, D., M. E. Ertunc, S. Konduri, J. Zhang, A. M. Pinto, Q. Chu, B. B. Kahn, D. Siegel, and A. Saghatelian. 2019. 'Discovery of FAHFA-Containing Triacylglycerols and Their Metabolic Regulation', *J Am Chem Soc*, 141: 8798-806.
- Tang, Y., S. W. Qian, M. Y. Wu, J. Wang, P. Lu, X. Li, H. Y. Huang, L. Guo, X. Sun, C. J. Xu, and Q. Q. Tang. 2016. 'BMP4 mediates the interplay between adipogenesis and angiogenesis during expansion of subcutaneous white adipose tissue', *J Mol Cell Biol*, 8: 302-12.
- Taschler, U., F. P. Radner, C. Heier, R. Schreiber, M. Schweiger, G. Schoiswohl, K. Preiss-Landl, D. Jaeger, B. Reiter, H. C. Koefeler, J. Wojciechowski, C. Theussl, J. M. Penninger, A. Lass, G. Haemmerle, R. Zechner, and R. Zimmermann. 2011. 'Monoglyceride lipase deficiency in mice impairs lipolysis and attenuates diet-induced insulin resistance', *J Biol Chem*, 286: 17467-77.
- Tchkonina, T., N. Giorgadze, T. Pirtskhalava, Y. Tchoukalova, I. Karagiannides, R. A. Forse, M. DePonte, M. Stevenson, W. Guo, J. Han, G. Waloga, T. L. Lash, M. D. Jensen, and J. L. Kirkland. 2002. 'Fat depot origin affects adipogenesis in primary cultured and cloned human preadipocytes', *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 282: R1286-96.
- Tchkonina, T., N. Giorgadze, T. Pirtskhalava, T. Thomou, M. DePonte, A. Koo, R. A. Forse, D. Chinnappan, C. Martin-Ruiz, T. von Zglinicki, and J. L. Kirkland. 2006. 'Fat depot-specific characteristics are retained in strains derived from single human preadipocytes', *Diabetes*, 55: 2571-8.
- Tchkonina, T., T. Thomou, Y. Zhu, I. Karagiannides, C. Pothoulakis, M. D. Jensen, and J. L. Kirkland. 2013. 'Mechanisms and metabolic implications of regional differences among fat depots', *Cell Metab*, 17: 644-56.
- Teicher, B. A. 2021. 'TGFbeta-Directed Therapeutics: 2020', *Pharmacol Ther*, 217: 107666.
- Thunen, A., D. La Placa, Z. Zhang, and J. E. Shively. 2022. 'Role of lncRNA LIPE-AS1 in adipogenesis', *Adipocyte*, 11: 11-27.

- Tiano, J. P., D. A. Springer, and S. G. Rane. 2015. 'SMAD3 negatively regulates serum irisin and skeletal muscle FNDC5 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1alpha) during exercise', *J Biol Chem*, 290: 7671-84.
- Tominaga, K., and H. I. Suzuki. 2019. 'TGF-beta Signaling in Cellular Senescence and Aging-Related Pathology', *Int J Mol Sci*, 20.
- Tseng, Y. H., E. Kokkotou, T. J. Schulz, T. L. Huang, J. N. Winnay, C. M. Taniguchi, T. T. Tran, R. Suzuki, D. O. Espinoza, Y. Yamamoto, M. J. Ahrens, A. T. Dudley, A. W. Norris, R. N. Kulkarni, and C. R. Kahn. 2008. 'New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure', *Nature*, 454: 1000-4.
- Uldry, M., W. Yang, J. St-Pierre, J. Lin, P. Seale, and B. M. Spiegelman. 2006. 'Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation', *Cell Metab*, 3: 333-41.
- Umans, L., L. Serneels, L. Overbergh, K. Lorent, F. Van Leuven, and H. Van den Berghe. 1995. 'Targeted inactivation of the mouse alpha 2-macroglobulin gene', *J Biol Chem*, 270: 19778-85.
- Vanhatupa, S., M. Ojansivu, R. Autio, M. Juntunen, and S. Miettinen. 2015. 'Bone Morphogenetic Protein-2 Induces Donor-Dependent Osteogenic and Adipogenic Differentiation in Human Adipose Stem Cells', *Stem Cells Transl Med*, 4: 1391-402.
- Vernochet, C., F. Damilano, A. Mourier, O. Bezy, M. A. Mori, G. Smyth, A. Rosenzweig, N. G. Larsson, and C. R. Kahn. 2014. 'Adipose tissue mitochondrial dysfunction triggers a lipodystrophic syndrome with insulin resistance, hepatosteatosis, and cardiovascular complications', *FASEB J*, 28: 4408-19.
- Vidal, P., and K. I. Stanford. 2020. 'Exercise-Induced Adaptations to Adipose Tissue Thermogenesis', *Front Endocrinol (Lausanne)*, 11: 270.
- Vigouroux, C., M. Caron-Debarle, C. Le Dour, J. Magre, and J. Capeau. 2011. 'Molecular mechanisms of human lipodystrophies: from adipocyte lipid droplet to oxidative stress and lipotoxicity', *Int J Biochem Cell Biol*, 43: 862-76.
- Vijay, J., M. F. Gauthier, R. L. Biswell, D. A. Louiselle, J. J. Johnston, W. A. Cheung, B. Belden, A. Pramatarova, L. Biertho, M. Gibson, M. M. Simon, H. Djambazian, A. Staffa, G. Bourque, A. Laitinen, J. Nystedt, M. C. Vohl, J. D. Fraser, T. Pastinen, A. Tchernof, and E. Grundberg. 2020. 'Single-cell analysis of human adipose tissue identifies depot and disease specific cell types', *Nat Metab*, 2: 97-109.
- Vila, I. K., P. M. Badin, M. A. Marques, L. Monbrun, C. Lefort, L. Mir, K. Louche, V. Bourlier, B. Roussel, P. Gui, J. Grober, V. Stich, L. Rossmeislova, A. Zakaroff-Girard, A. Bouloumie, N. Viguerie, C. Moro, G. Tavernier, and D. Langin. 2014. 'Immune cell Toll-like receptor 4 mediates the development of obesity- and endotoxemia-associated adipose tissue fibrosis', *Cell Rep*, 7: 1116-29.
- Vitali, A., I. Murano, M. C. Zingaretti, A. Frontini, D. Ricquier, and S. Cinti. 2012. 'The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes', *J Lipid Res*, 53: 619-29.
- Voshol, P. J., G. Haemmerle, D. M. Ouwens, R. Zimmermann, R. Zechner, B. Teusink, J. A. Maassen, L. M. Havekes, and J. A. Romijn. 2003. 'Increased hepatic insulin sensitivity together with decreased hepatic triglyceride stores in hormone-sensitive lipase-deficient mice', *Endocrinology*, 144: 3456-62.
- Walkey, C. J., and B. M. Spiegelman. 2008. 'A functional peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand-binding domain is not required for adipogenesis', *J Biol Chem*, 283: 24290-4.
- Walther, T. C., J. Chung, and R. V. Farese, Jr. 2017. 'Lipid Droplet Biogenesis', *Annu Rev Cell Dev Biol*, 33: 491-510.
- Wang, H., L. Hu, K. Dalen, H. Dorward, A. Marcinkiewicz, D. Russell, D. Gong, C. Londos, T. Yamaguchi, C. Holm, M. A. Rizzo, D. Brasaemle, and C. Sztalryd. 2009. 'Activation of hormone-sensitive lipase requires two steps, protein phosphorylation and binding to the PAT-1 domain of lipid droplet coat proteins', *J Biol Chem*, 284: 32116-25.

- Wang, Q. A., C. Tao, R. K. Gupta, and P. E. Scherer. 2013. 'Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration', *Nat Med*, 19: 1338-44.
- Wang, S. P., N. Laurin, J. Himms-Hagen, M. A. Rudnicki, E. Levy, M. F. Robert, L. Pan, L. Oligny, and G. A. Mitchell. 2001. 'The adipose tissue phenotype of hormone-sensitive lipase deficiency in mice', *Obes Res*, 9: 119-28.
- Wang, W., J. Ishibashi, S. Trefely, M. Shao, A. J. Cowan, A. Sakers, H. W. Lim, S. O'Connor, M. T. Doan, P. Cohen, J. A. Baur, M. T. King, R. L. Veech, K. J. Won, J. D. Rabinowitz, N. W. Snyder, R. K. Gupta, and P. Seale. 2019. 'A PRDM16-Driven Metabolic Signal from Adipocytes Regulates Precursor Cell Fate', *Cell Metab*, 30: 174-89 e5.
- Wang, Y., S. B. Hu, M. R. Wang, R. W. Yao, D. Wu, L. Yang, and L. L. Chen. 2018. 'Genome-wide screening of NEAT1 regulators reveals cross-regulation between paraspeckles and mitochondria', *Nat Cell Biol*, 20: 1145-58.
- Wang, Z. V., and P. E. Scherer. 2016. 'Adiponectin, the past two decades', *J Mol Cell Biol*, 8: 93-100.
- Wei, S., K. Lai, S. Patel, R. Piantedosi, H. Shen, V. Colantuoni, F. B. Kraemer, and W. S. Blaner. 1997. 'Retinyl ester hydrolysis and retinol efflux from BFC-1beta adipocytes', *J Biol Chem*, 272: 14159-65.
- Wei, Y., J. A. Contreras, P. Sheffield, T. Osterlund, U. Derewenda, R. E. Kneusel, U. Matern, C. Holm, and Z. S. Derewenda. 1999. 'Crystal structure of brefeldin A esterase, a bacterial homolog of the mammalian hormone-sensitive lipase', *Nat Struct Biol*, 6: 340-5.
- White, U. A., and Y. D. Tchoukalova. 2014. 'Sex dimorphism and depot differences in adipose tissue function', *Biochim Biophys Acta*, 1842: 377-92.
- Whittle, A. J., S. Carobbio, L. Martins, M. Slawik, E. Hondares, M. J. Vazquez, D. Morgan, R. I. Csikasz, R. Gallego, S. Rodriguez-Cuenca, M. Dale, S. Virtue, F. Villarroja, B. Cannon, K. Rahmouni, M. Lopez, and A. Vidal-Puig. 2012. 'BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions', *Cell*, 149: 871-85.
- Wiater, E., C. A. Harrison, K. A. Lewis, P. C. Gray, and W. W. Vale. 2006. 'Identification of distinct inhibin and transforming growth factor beta-binding sites on betaglycan: functional separation of betaglycan co-receptor actions', *J Biol Chem*, 281: 17011-22.
- Williams, K. W., T. Liu, X. Kong, M. Fukuda, Y. Deng, E. D. Berglund, Z. Deng, Y. Gao, T. Liu, J. W. Sohn, L. Jia, T. Fujikawa, D. Kohno, M. M. Scott, S. Lee, C. E. Lee, K. Sun, Y. Chang, P. E. Scherer, and J. K. Elmquist. 2014. 'Xbp1s in Pomc neurons connects ER stress with energy balance and glucose homeostasis', *Cell Metab*, 20: 471-82.
- Wood, S. L., N. Emmison, A. C. Borthwick, and S. J. Yeaman. 1993. 'The protein phosphatases responsible for dephosphorylation of hormone-sensitive lipase in isolated rat adipocytes', *Biochem J*, 295 ( Pt 2): 531-5.
- Wu, M. Y., and C. S. Hill. 2009. 'Tgf-beta superfamily signaling in embryonic development and homeostasis', *Dev Cell*, 16: 329-43.
- Xia, B., G. H. Cai, H. Yang, S. P. Wang, G. A. Mitchell, and J. W. Wu. 2017. 'Adipose tissue deficiency of hormone-sensitive lipase causes fatty liver in mice', *PLoS Genet*, 13: e1007110.
- Xie, X., G. Urabe, L. Marcho, C. Williams, L. W. Guo, and K. C. Kent. 2020. 'Smad3 Regulates Neuropilin 2 Transcription by Binding to its 5' Untranslated Region', *J Am Heart Assoc*, 9: e015487.
- Xu, L., and J. Massague. 2004. 'Nucleocytoplasmic shuttling of signal transducers', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5: 209-19.
- Xu, P., X. Lin, and X. H. Feng. 2016. 'Posttranslational Regulation of Smads', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 8.
- Xue, R., Y. Wan, S. Zhang, Q. Zhang, H. Ye, and Y. Li. 2014. 'Role of bone morphogenetic protein 4 in the differentiation of brown fat-like adipocytes', *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 306: E363-72.
- Yadav, H., C. Quijano, A. K. Kamaraju, O. Gavrilova, R. Malek, W. Chen, P. Zerfas, D. Zhigang, E. C. Wright, C. Stuelten, P. Sun, S. Lonning, M. Skarulis, A. E. Sumner, T. Finkel, and S. G. Rane. 2011. 'Protection from obesity and diabetes by blockade of TGF-beta/Smad3 signaling', *Cell Metab*, 14: 67-79.

- Yan, X., X. Xiong, and Y. G. Chen. 2018. 'Feedback regulation of TGF-beta signaling', *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 50: 37-50.
- Yoshida, H., Y. Kanamori, H. Asano, O. Hashimoto, M. Murakami, T. Kawada, T. Matsui, and M. Funaba. 2013. 'Regulation of brown adipogenesis by the Tgf-beta family: involvement of Srebp1c in Tgf-beta- and Activin-induced inhibition of adipogenesis', *Biochim Biophys Acta*, 1830: 5027-35.
- Young, D. A., Y. S. Choi, A. J. Engler, and K. L. Christman. 2013. 'Stimulation of adipogenesis of adult adipose-derived stem cells using substrates that mimic the stiffness of adipose tissue', *Biomaterials*, 34: 8581-8.
- Zamani, N., and C. W. Brown. 2011. 'Emerging roles for the transforming growth factor- $\beta$  superfamily in regulating adiposity and energy expenditure', *Endocr Rev*, 32: 387-403.
- Zaragosi, L. E., B. Wdziekonski, P. Villageois, M. Keophiphath, M. Maumus, T. Tchkonja, V. Bourlier, T. Mohsen-Kanson, A. Ladoux, C. Elabd, M. Scheideler, Z. Trajanoski, Y. Takashima, E. Z. Amri, D. Lacasa, C. Sengenès, G. Ailhaud, K. Clement, A. Bouloumie, J. L. Kirkland, and C. Dani. 2010. 'Activin A plays a critical role in proliferation and differentiation of human adipose progenitors', *Diabetes*, 59: 2513-21.
- Zhang, C., C. McFarlane, S. Lokireddy, S. Masuda, X. Ge, P. D. Gluckman, M. Sharma, and R. Kambadur. 2012. 'Inhibition of myostatin protects against diet-induced obesity by enhancing fatty acid oxidation and promoting a brown adipose phenotype in mice', *Diabetologia*, 55: 183-93.
- Zhang, H., and A. Bradley. 1996. 'Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development', *Development*, 122: 2977-86.
- Zhang, J., M. Fu, T. Cui, C. Xiong, K. Xu, W. Zhong, Y. Xiao, D. Floyd, J. Liang, E. Li, Q. Song, and Y. E. Chen. 2004. 'Selective disruption of PPARG $\gamma$  2 impairs the development of adipose tissue and insulin sensitivity', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 10703-8.
- Zhang, X., C. C. Zhang, H. Yang, K. G. Soni, S. P. Wang, G. A. Mitchell, and J. W. Wu. 2019. 'An Epistatic Interaction between Pnpla2 and Lipe Reveals New Pathways of Adipose Tissue Lipolysis', *Cells*, 8.
- Zhang, Y., X. Feng, R. We, and R. Derynck. 1996. 'Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF-beta response', *Nature*, 383: 168-72.
- Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold, and J. M. Friedman. 1994. 'Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue', *Nature*, 372: 425-32.
- Zhou, S. R., L. Guo, X. Wang, Y. Liu, W. Q. Peng, Y. Liu, X. B. Wei, X. Dou, M. Ding, Q. Y. Lei, S. W. Qian, X. Li, and Q. Q. Tang. 2017. 'Acetylation of Cavin-1 Promotes Lipolysis in White Adipose Tissue', *Mol Cell Biol*, 37.
- Zhu, Y., Y. Gao, C. Tao, M. Shao, S. Zhao, W. Huang, T. Yao, J. A. Johnson, T. Liu, A. M. Cypess, O. Gupta, W. L. Holland, R. K. Gupta, D. C. Spray, H. B. Tanowitz, L. Cao, M. D. Lynes, Y. H. Tseng, J. K. Elmquist, K. W. Williams, H. V. Lin, and P. E. Scherer. 2016. 'Connexin 43 Mediates White Adipose Tissue Beiging by Facilitating the Propagation of Sympathetic Neuronal Signals', *Cell Metab*, 24: 420-33.
- Zolotov, S., C. Xing, R. Mahamid, A. Shalata, M. Sheikh-Ahmad, and A. Garg. 2017. 'Homozygous LIPE mutation in siblings with multiple symmetric lipomatosis, partial lipodystrophy, and myopathy', *Am J Med Genet A*, 173: 190-94.
- Zwick, R. K., C. F. Guerrero-Juarez, V. Horsley, and M. V. Plikus. 2018. 'Anatomical, Physiological, and Functional Diversity of Adipose Tissue', *Cell Metab*, 27: 68-83.

## **Annexes**

**The carbohydrate response element binding protein isoform, ChREBP $\beta$ , is dispensable for the control of glucose homeostasis and energy balance**

Emeline Recazens, Geneviève Tavernier, Jérémy Dufau, Camille Bergoglio, Fadila Benhamed, Stéphanie Cassant-Sourdy, Marie-Adeline Marques, Sylvie Caspar-Bauguil, Alice Brion, Laurent Monbrun, Renaud Dentin, Clara Ferrier, Mélanie Leroux, Pierre-Damien Denechaud, Cedric Moro, Jean-Paul Concordet, Catherine Postic, Etienne Mouisel, Dominique Langin

*JCI Insight 2022*



## ChREBP $\beta$ is dispensable for the control of glucose homeostasis and energy balance

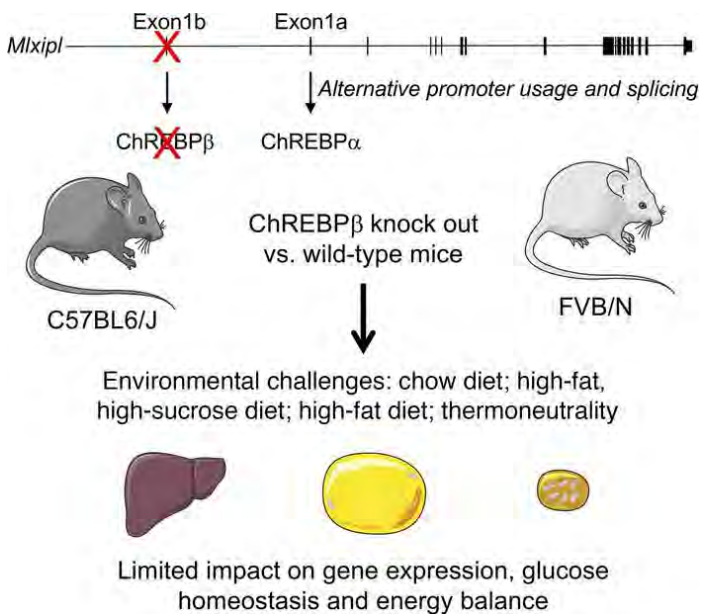
Emeline Recazens, ... , Etienne Mouisel, Dominique Langin

JCI Insight. 2022;7(4):e153431. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.153431>.

Research Article

Metabolism

### Graphical abstract



Find the latest version:

<https://jci.me/153431/pdf>



# ChREBP $\beta$ is dispensable for the control of glucose homeostasis and energy balance

Emeline Recazens,<sup>1</sup> Geneviève Tavernier,<sup>1</sup> Jérémy Dufau,<sup>1</sup> Camille Bergoglio,<sup>1</sup> Fadila Benhamed,<sup>2</sup> Stéphanie Cassant-Sourdy,<sup>1</sup> Marie-Adeline Marques,<sup>1</sup> Sylvie Caspar-Bauguil,<sup>1,3</sup> Alice Brion,<sup>4</sup> Laurent Monbrun,<sup>1</sup> Renaud Dentin,<sup>2</sup> Clara Ferrier,<sup>1</sup> Mélanie Leroux,<sup>1</sup> Pierre-Damien Denechaud,<sup>1</sup> Cedric Moro,<sup>1</sup> Jean-Paul Concordet,<sup>4</sup> Catherine Postic,<sup>2</sup> Etienne Mouisel,<sup>1</sup> and Dominique Langin<sup>1,3,5</sup>

<sup>1</sup>Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases (I2MC), Equipe MetaDiab, University of Toulouse, INSERM, University of Toulouse III - Paul Sabatier (UPS), Toulouse, France. <sup>2</sup>University of Paris, Cochin Institute, CNRS, INSERM, Paris, France. <sup>3</sup>Toulouse University Hospital Center, Biochemistry Laboratory, Toulouse, France. <sup>4</sup>Genome Structure and Instability Laboratory, INSERM, CNRS, National Museum of Natural History, Paris, France. <sup>5</sup>Academic Institute of France (IUF), Paris, France.

Impaired glucose metabolism is observed in obesity and type 2 diabetes. Glucose controls gene expression through the transcription factor ChREBP in liver and adipose tissues. *Mlx1l* encodes 2 isoforms: ChREBP $\alpha$ , the full-length form (translocation into the nucleus is under the control of glucose), and ChREBP $\beta$ , a constitutively nuclear shorter form. ChREBP $\beta$  gene expression in white adipose tissue is strongly associated with insulin sensitivity. Here, we investigated the consequences of ChREBP $\beta$  deficiency on insulin action and energy balance. ChREBP $\beta$ -deficient male and female C57BL6/J and FVB/N mice were produced using CRISPR/Cas9-mediated gene editing. Unlike global ChREBP deficiency, lack of ChREBP $\beta$  showed modest effects on gene expression in adipose tissues and the liver, with variations chiefly observed in brown adipose tissue. In mice fed chow and 2 types of high-fat diets, lack of ChREBP $\beta$  had moderate effects on body composition and insulin sensitivity. At thermoneutrality, ChREBP $\beta$  deficiency did not prevent the whitening of brown adipose tissue previously reported in total ChREBP-KO mice. These findings revealed that ChREBP $\beta$  is dispensable for metabolic adaptations to nutritional and thermic challenges.

## Introduction

In mammals, ChREBP (carbohydrate responsive element binding protein) is a transcription factor mediating the response to dietary carbohydrates (1, 2). ChREBP is highly expressed in the liver and adipose tissues, where it acts as a master regulator of lipid synthesis. The ChREBP protein contains several functional domains, including nuclear import and export signals and a polyproline region in the C-terminal region. The C-terminal region also contains a DNA-binding basic helix-loop-helix/Zip domain, responsible for ChREBP transcriptional activity through heterodimerization with MLX (Max-like protein X) (3). Serial deletions of the ChREBP protein led to the identification of an evolutionarily conserved domain, the glucose-sensing module (GSM), composed of a low-glucose inhibitory domain (LID) and a transactivation domain called glucose-response activation conserved element (GRACE) (4). The glucose responsiveness of ChREBP is mediated by a dynamic intramolecular inhibition between LID and GRACE, where low glucose concentrations restrain the transcriptional activity of GRACE through the LID, while high glucose releases this inhibition.

In 2012, a variant of ChREBP, termed ChREBP $\beta$ , transcribed from an alternative promoter located upstream of the previously known promoter adjacent to exon 1a, was identified in mouse white adipose tissue (5). The ChREBP $\beta$  transcript undergoes splicing from exon 1b to exon 2; translation begins at exon 4, leading to a shorter protein (687aa for ChREBP $\beta$  vs. 864aa for the full-length ChREBP renamed ChREBP $\alpha$ ). Interestingly, a feed-forward mechanism has been suggested that places ChREBP $\beta$  under the transcriptional control of ChREBP $\alpha$ . In this scenario, ChREBP $\alpha$  is first activated by glucose metabolism and, in turn, stimulates ChREBP $\beta$  expression through a carbohydrate responsive element (ChoRE) in exon 1b, thus amplifying the response to glucose (5). From a structural point of view, ChREBP $\beta$  lacks most of the LID domain. Its transcriptional activity has been reported to be independent of glucose concentrations and 20-fold higher

**Conflict of interest:** The authors have declared that no conflict of interest exists.

**Copyright:** © 2022, Recazens et al. This is an open access article published under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License.

**Submitted:** July 22, 2021

**Accepted:** January 5, 2022

**Published:** February 22, 2022

**Reference information:** *JCI Insight*. 2022;7(4):e153431.  
<https://doi.org/10.1172/jci.insight.153431>.

than that of ChREBP $\alpha$  (5). In addition, ChREBP $\beta$  lacks the N-terminal domain, which, by interacting with 14-3-3 proteins, involves cytosolic sequestration and therefore protein stability (6).

A central role for adipose ChREBP $\beta$  isoform in insulin sensitivity was suggested in different models of obesity and glucose intolerance where expression of ChREBP $\beta$  in white adipose tissue strongly correlates with lipogenic activity and systemic insulin sensitivity (5, 7–9). High-fat feeding results in early downregulation of white adipose tissue ChREBP $\beta$  during development of obesity (5, 9). In mouse and human adipose tissues, ChREBP $\beta$  gene expression is more closely associated with insulin sensitivity than ChREBP $\alpha$  gene expression (5, 7, 9–12). However, variations in ChREBP $\beta$  protein levels have not been reported so far.

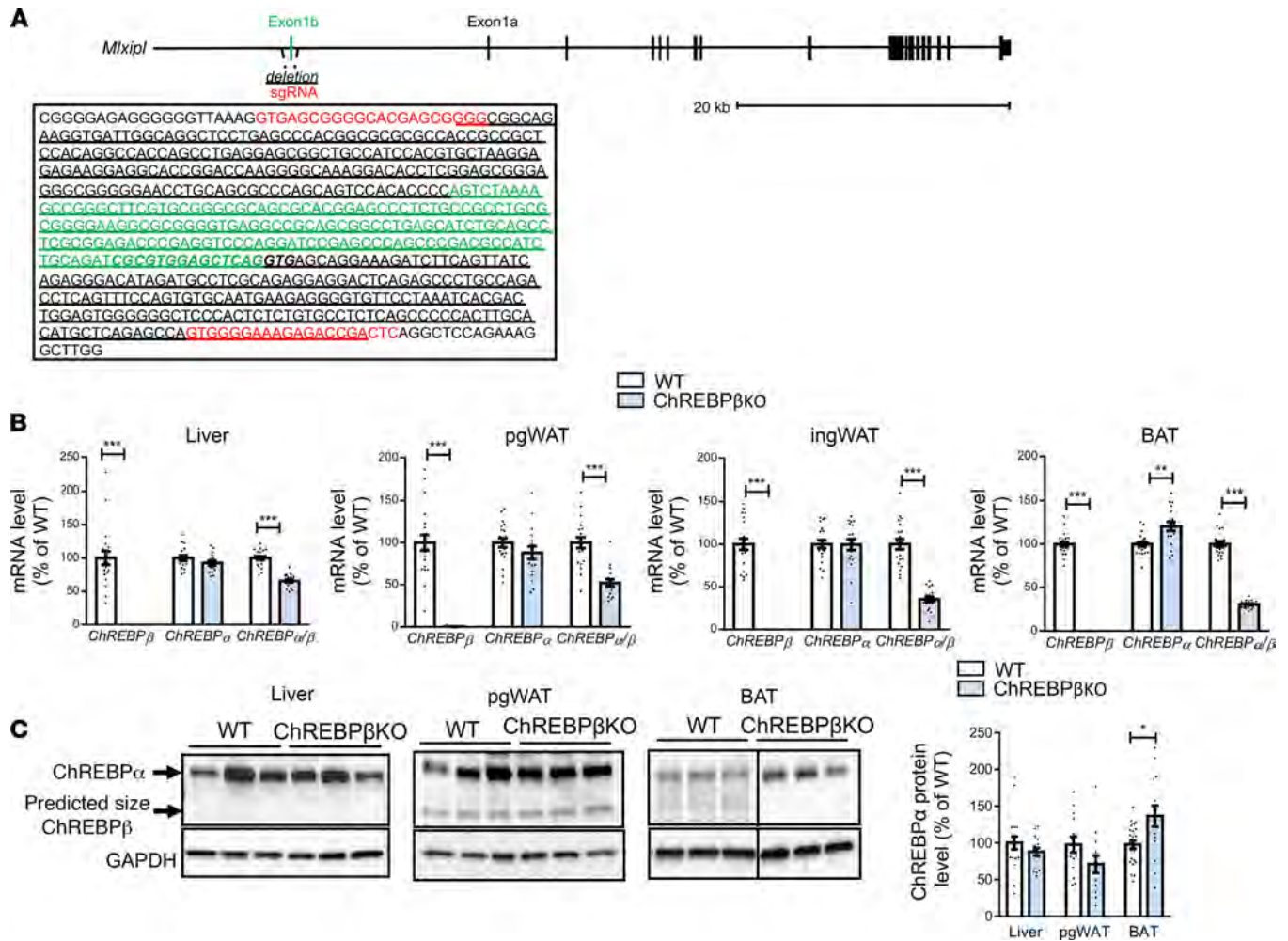
The differences in induction pattern and transcriptional activity and the link with insulin sensitivity suggest distinct physiological roles of the 2 ChREBP isoforms. While studies suggest that ChREBP $\beta$  expression reflects total ChREBP lipogenic activity in white adipose tissue and the liver, the specific contribution of ChREBP $\beta$  to metabolic adaptations *in vivo* is not known (5, 13). Here, we investigated the consequences of ChREBP $\beta$  deficiency on insulin action and energy balance. The lack of ChREBP $\beta$  was studied in male and female mice from 2 genetic backgrounds, C57BL6/J and FVB/N. Whole-body and tissue characterizations were performed in mice fed chow and high-fat diets. The effect of housing temperature was also studied.

## Results

We used CRISPR/Cas9-mediated gene editing, which recently emerged as an efficient technology to generate gene KO mouse models to produce ChREBP $\beta$ -deficient mice (14). Compared with homologous recombination in embryonic stem cells, targeted gene editing in one-cell embryos may be more rapid. Electroporation of fertilized oocytes was performed using 2 guide RNAs targeting ChREBP $\beta$ -specific exon (Figure 1A) complexed to purified Cas9 protein. The protocol proved highly efficient: one-third to one-half of F0 mice had expected deletion (Supplemental Table 1A; supplemental material available online with this article; <https://doi.org/10.1172/jci.insight.153431DS1>). Counting from the electroporation day, the first experimental groups composed of F2 mice were obtained in 7 months. ChREBP $\beta$  deficiency was induced in C57BL6/J and FVB/N strains to assess the influence of the genetic background on the phenotype. We derived for each of the strains 2 transgenic lines and observed no phenotypic differences between the lines (data not shown). Mice were born at the expected Mendelian ratio. The number of pups per litter was similar in WT and ChREBP $\beta$ -deficient mice (Supplemental Table 1B). Examination of pup appearance and growth during lactation and the weaning period did not reveal any gross defect due to the absence of ChREBP $\beta$ .

Gene expression analyses in tissues expressing ChREBP showed complete lack of ChREBP $\beta$  mRNA in male and female mice (Figure 1B and Supplemental Figure 1, A–C). Quantitation of ChREBP isoform mRNA levels showed that ChREBP $\beta$  contributed more to total ChREBP transcripts in adipose tissues than in the liver (Figure 1B and Supplemental Figure 1, A–D). In C57BL6/J and FVB/N male but not female mice with ChREBP $\beta$  deficiency, mRNA and protein levels of ChREBP $\alpha$  were increased in brown adipose tissue and unchanged in other tissues (Figure 1, B and C, and Supplemental Figure 1, A–C and E). In male and female mice of the 2 strains, induction of ChREBP $\beta$  gene expression during refeeding with glucose in food and water was more pronounced in brown adipose tissue than in white fat pads (Supplemental Figure 1D). The lowest induction was observed in the liver. These profiles were observed in male and female mice from the 2 genetic strains. The rank order of induction is consistent with earlier data suggesting higher induction of ChREBP $\beta$  in white fat than in the liver and with the importance of glucose uptake in brown adipose tissue (5, 15–17). In contrast, ChREBP $\alpha$  mRNA levels showed the highest induction in perigonadal fat and the liver. Of note, we failed in detecting a specific band corresponding to ChREBP $\beta$  protein (Figure 1C).

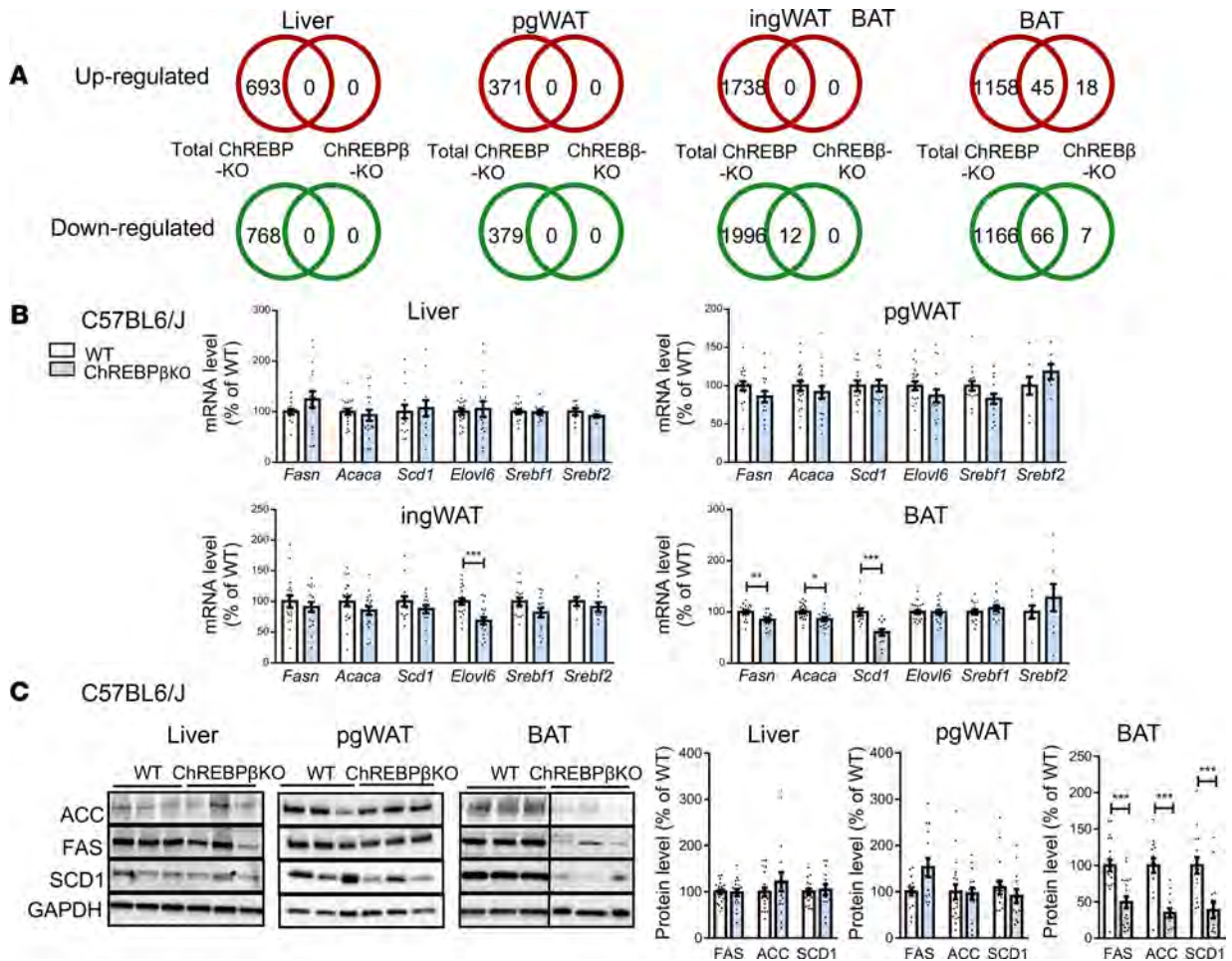
To assess the transcriptional consequences of the lack of ChREBP $\beta$  in target tissues, transcriptomic analysis using DNA microarrays was performed in parallel in white (perigonadal and inguinal depots) and brown (interscapular depot) adipose tissues and in the liver of C57BL6/J male mice with deficiency in ChREBP $\beta$  or in ChREBP $\alpha$  and  $\beta$  isoforms (*Mlxipl*-null mice, here referred to as total ChREBP-KO mice) (18) (Figure 2A). Unexpectedly, in the liver and white adipose tissues, no significant change in gene expression was observed when ChREBP $\beta$  was lacking, whereas, as expected, multiple genes and pathways were regulated in total ChREBP-KO mice (Figure 2A and Supplemental Figure 2A). In brown adipose tissue, 63 and 73 genes were, respectively, upregulated and downregulated in ChREBP $\beta$ -deficient versus WT mice (Figure 2A). A majority of these genes were also regulated in brown adipose tissue of total ChREBP-KO mice. Eighteen upregulated and 7 downregulated genes may be specific to the absence of ChREBP $\beta$  compared with lack of the 2



**Figure 1. Generation of ChREBP $\beta$ -deficient mice. (A)** Structure of the *Mixl1* gene. sgRNA sequences are shown in red. Exon 1b sequence is shown in green. Sequence of the carbohydrate responsive element (ChRE) is italicized and bolded. Deleted sequence is underlined. **(B)** mRNA levels of ChREBP isoforms in liver, perigonadal white adipose tissue (pgWAT), inguinal WAT (ingWAT), and interscapular brown adipose tissue (BAT) of refed C57BL6/J male ( $n = 16-21$ ) mice. **(C)** Representative Western blots and quantitation of ChREBP protein levels in liver, pgWAT, and BAT of refed C57BL6/J male mice ( $n = 12-24$ ). Data are mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney test. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

ChREBP isoforms (Figure 2A and Supplemental Table 2). Of note, the number of genes regulated in brown adipose tissue of ChREBP $\beta$ -deficient mice represents less than 5% of the number of genes regulated in brown adipose tissue of total ChREBP-KO mice (Figure 2A). Because ChREBP is known to be a master regulator of de novo lipogenesis, we further probed the effect of ChREBP $\beta$  deficiency through measurements of cognate mRNA and protein levels in the liver and adipose tissues of male and female C57BL6/J and FVB/N mice. In mice refed after a fasting period to favor induction of de novo lipogenesis, ChREBP $\beta$  deficiency induced impairment in mRNA and protein expression chiefly in brown adipose tissue (Figure 2, B and C, and Supplemental Figure 2, B–D). In fasting conditions, lack of ChREBP $\beta$  affected expression of de novo lipogenesis genes mainly in brown adipose tissue, suggesting that ChREBP $\beta$  may play a role in the maintenance rather than induction of gene expression by glucose (Supplemental Figure 3, A and B). The number of genes and magnitude of mRNA level changes in brown adipose tissue are much lower in mice lacking ChREBP $\beta$  than in total ChREBP-KO mice. Altogether, the data suggest that ChREBP $\beta$  plays no significant role in white adipose tissue and liver gene expression.

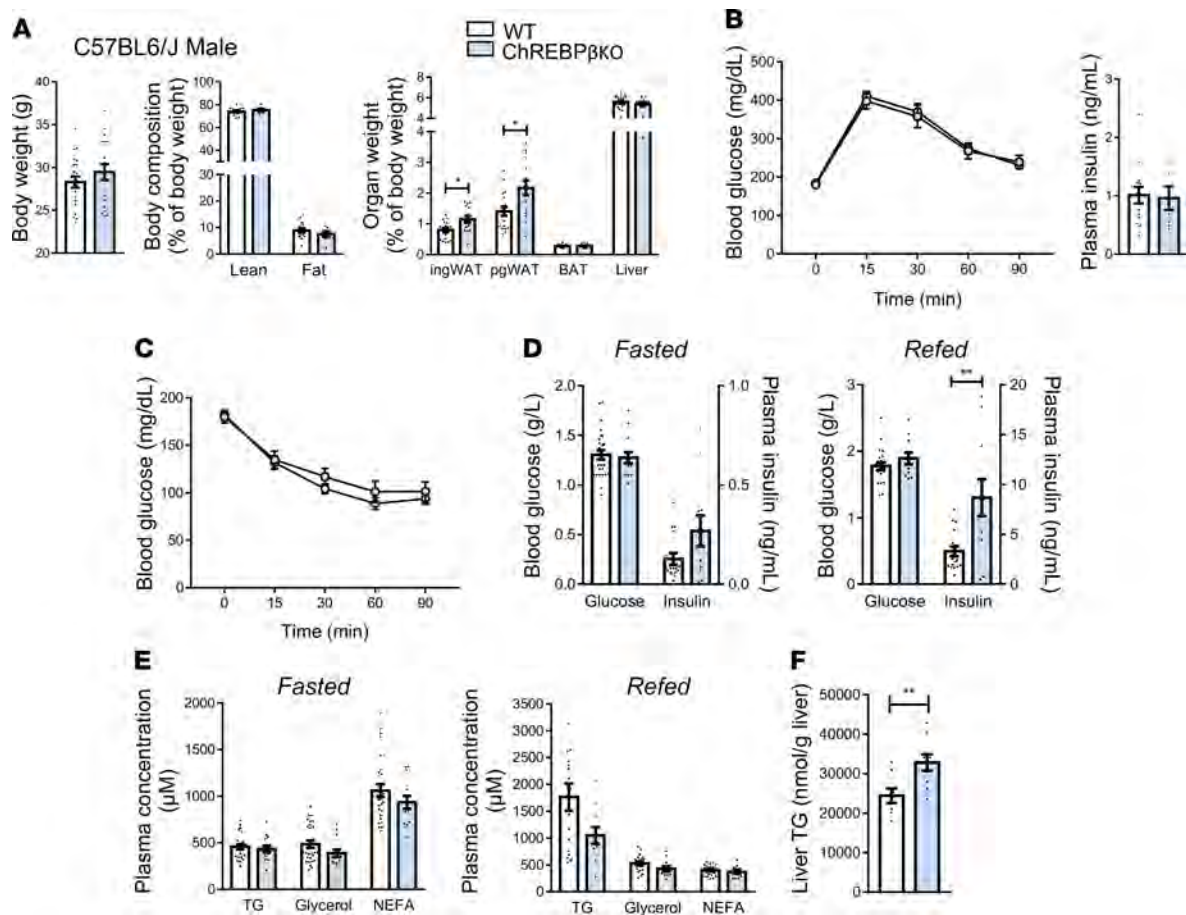
Given that combined deficiency in ChREBP $\alpha$  and  $\beta$  results in alterations of metabolic traits, we next addressed the functional consequences of the lack of ChREBP $\beta$  on energy balance and glucose homeostasis. In mice fed a chow diet, body weight and lean and fat mass were not different between genotypes in male and female C57BL6/J and FVB/N mice (Figure 3A, Supplemental Figure 4A,



**Figure 2. Gene expression profiles in male ChREBP $\beta$ -deficient mice.** (A) Number of regulated genes in the absence of ChREBP $\beta$  (ChREBP $\beta$  KO) or of ChREBP $\alpha$  and  $\beta$  isoforms (total ChREBP KO) compared with WT in liver, perigonadal white adipose tissue (pgWAT), inguinal WAT (ingWAT), and interscapular brown adipose tissue (BAT) of C57BL6/J refed male mice ( $n = 6-8$  per group). (B) mRNA levels of de novo lipogenesis genes in liver, pgWAT, ingWAT, and BAT of C57BL6/J mice ( $n = 7-21$ ). (C) Representative Western blots and quantitation of de novo lipogenesis proteins in liver, pgWAT, ingWAT, and BAT of C57BL6/J refed male mice ( $n = 12-21$ ). Representative Western blots for pgWAT here and in Figure 1C are from the same experiment. Data are mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney test. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

and Supplemental Figure 5, A and B). The higher weight of perigonadal and inguinal white adipose tissues was only observed in C57BL6/J male mice (Figure 3A). No difference was observed during insulin and glucose tolerance tests except for a genotype effect in female C57BL6/J mice with a maximum of 20% difference in glycemia during the insulin tolerance test (Figure 3, B and C, Supplemental Figure 4, B and C, and Supplemental Figure 5, C and D). Regarding the latter group, the difference between the 2 curves was no longer significant when data were expressed as a percentage of glucose levels at the beginning of the test (data not shown). Concerning plasma parameters, glucose and insulin levels in fasting and refeeding conditions were similar except for the higher plasma insulin levels seen in refeeding conditions in male and female C57BL6/J mice (Figure 3D and Supplemental Figure 4D, and Supplemental Figure 5, E and F). There were no marked genotype differences in blood lipid parameters in male and female mice of the 2 genetic strains (Figure 3E, Supplemental Figure 4E, and Supplemental Figure 5, G and H). No difference was seen in liver triglyceride levels except for male C57BL6/J mice (Figure 3F, Supplemental Figure 4F, and Supplemental Figure 5, I and J). These data showed that ChREBP $\beta$  is not required to maintain body composition and glucose homeostasis in mice fed a chow diet.

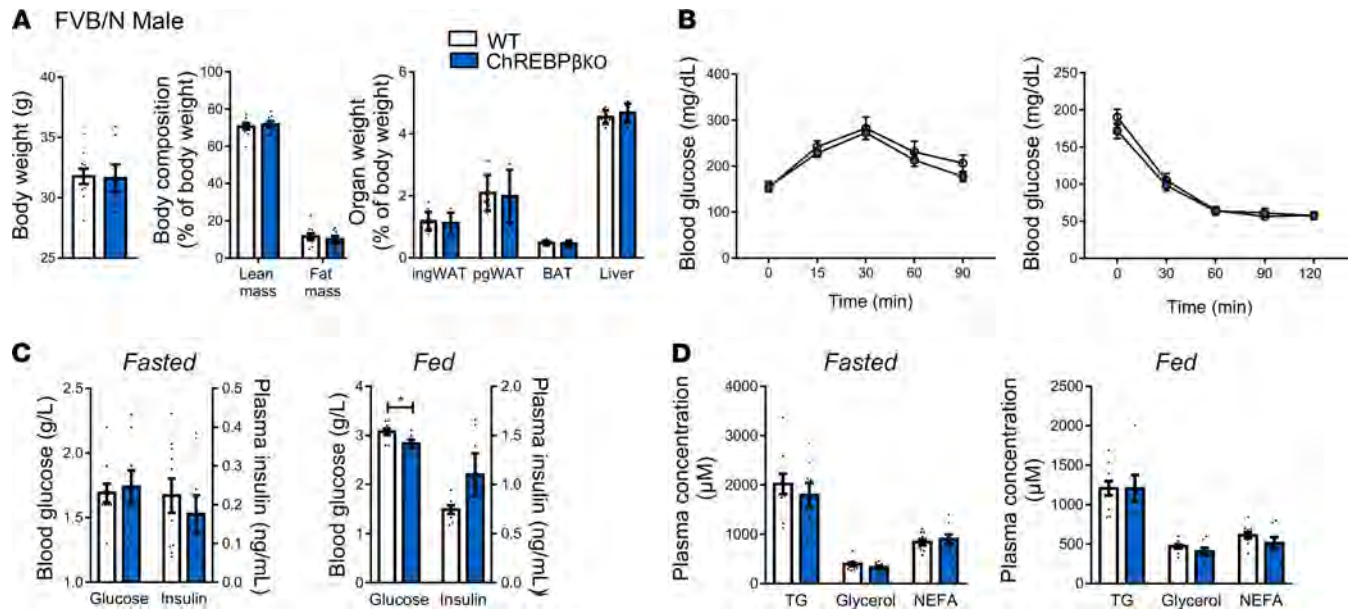
To unravel the potential role of ChREBP $\beta$  in pathophysiological conditions, ChREBP $\beta$ -deficient mice were subjected to nutritional and thermic challenges. Feeding a high-fat, high-sucrose diet (32% fat, 51% carbohydrates containing 50% sucrose) for 12 weeks resulted in lower body weight and fat mass in female



**Figure 3. Body composition and glucose homeostasis in male ChREBP $\beta$ -deficient mice.** (A) Body weight, lean and fat mass, and organ weight in male C57BL6/J ( $n = 7$ –18) mice. (B) Glucose tolerance test and blood insulin levels 15 minutes after injection during glucose tolerance tests ( $n = 7$ –18). (C) Insulin tolerance test ( $n = 9$ –18). (D) Blood glucose and insulin levels after 24 hours of fasting (left panels) and 18 hours of refeeding (right panels) ( $n = 11$ –17). (E) Blood lipid levels after 24 hours of fasting (left panels) and 18 hours of refeeding (right panels) ( $n = 11$ –17). (F) Liver triglyceride (TG) levels after 18 hours of refeeding ( $n = 8$ –9). NEFA, nonesterified fatty acid. Data are mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney test (A, B, and D–F) or 2-way ANOVA with Šidák's post hoc test (B and C). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

C57BL6/J mice but not in male and female FVB/N mice lacking ChREBP $\beta$  compared with WT littermates (Figure 4A and Supplemental Figure 6, A and B). Glucose and insulin tolerance tests showed no genotype effect (Figure 4B and Supplemental Figure 6, C and D). Blood glucose, insulin, lipid, and liver triglyceride levels in the 2 genotypes were similar in fasting and refeeding conditions for most of the measurements (Figure 4, C and D, and Supplemental Figure 6, E–J). The few significant differences were not consistently found in the various nutritional conditions or sex and genetic backgrounds investigated in this work. Feeding male C57BL6/J mice a diet with 45% fat for 12 weeks resulted in no difference in body composition and insulin tolerance according to genotype (Figure 5, A and B). Plasma glucose and insulin as well as blood lipid levels were similar in fasting and refeeding conditions (Figure 5, C and D). No difference was seen in liver triglyceride levels (Figure 5E). These phenotypic data on body composition and insulin sensitivity are in agreement with the limited impact of ChREBP $\beta$  deficiency on gene expression profiles.

The impairment of de novo lipogenesis in brown adipose tissue of mice with total ChREBP deficiency has been reported to prevent the decrease in mitochondrial oxidative capacity and tissue whitening induced by thermoneutral adaptation (19). Because the highest level of ChREBP $\beta$  mRNA expression was observed in brown adipose tissue (Supplemental Figure 1D), we investigated whether ChREBP $\beta$  deficiency led to a similar adaptation. WT and ChREBP $\beta$ -deficient male C57BL6/J mice were transferred from a housing temperature of 21°C to a thermoneutral condition of 30°C over 6 weeks. Histological analyses revealed similar transition to white adipocyte-like appearance of interscapular brown adipose tissue in WT and ChREBP $\beta$ -deficient littermates (Figure 6A). As observed at a



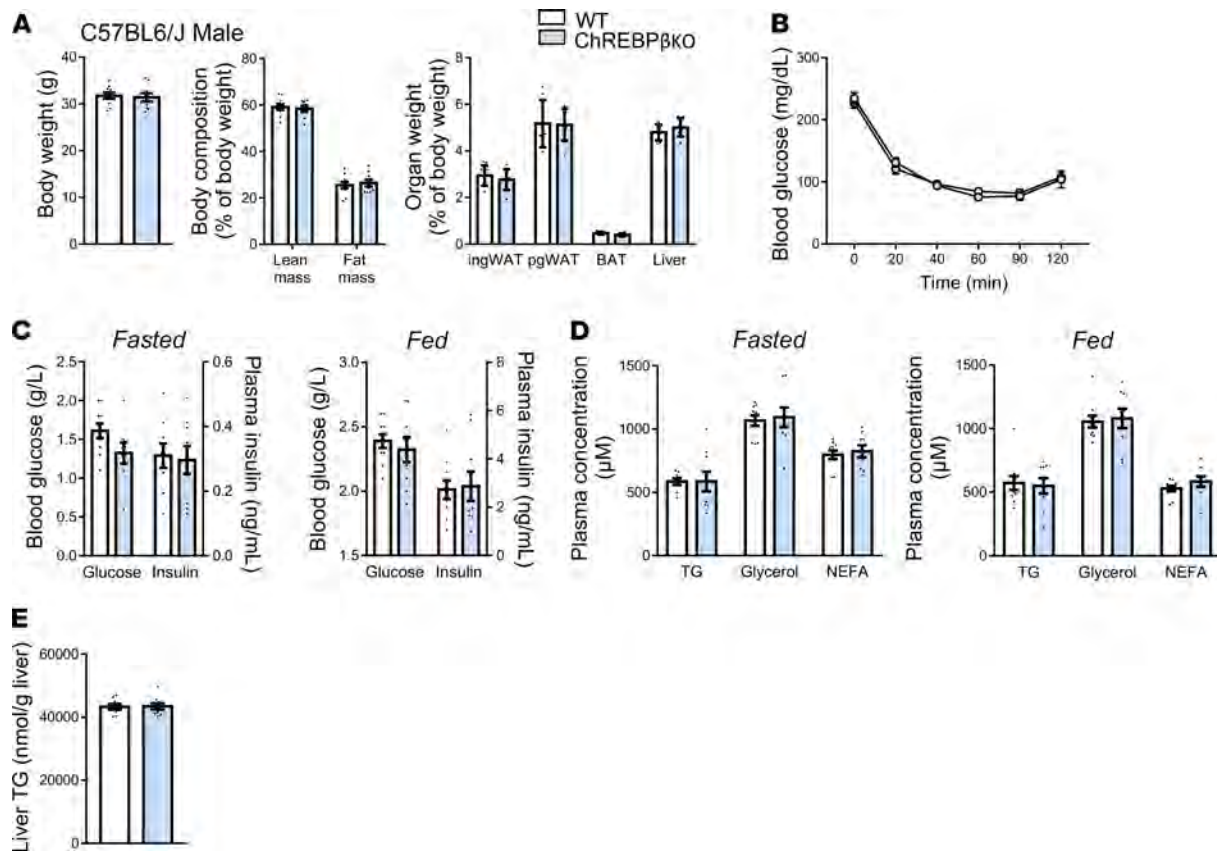
**Figure 4. Response of ChREBP $\beta$ -deficient mice to high-fat, high-sucrose diet.** (A) Body weight, lean and fat mass, and organ weight in male FVB/N ( $n = 7$ – $14$ ) mice fed high-fat, high-sucrose diet. (B) Glucose (left panels) and insulin (right panels) tolerance tests ( $n = 8$ – $14$ ). (C) Blood glucose and insulin levels after 24 hours of fasting (left panels) and 18 hours of refeeding (right panels) ( $n = 6$ – $14$ ). (D) Blood lipid levels after 24 hours of fasting (left panels) and 18 hours of refeeding (right panels) ( $n = 6$ – $10$ ). Data are mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney test (A, C, and D) or 2-way ANOVA with Sidak's post hoc test (B). \* $P < 0.05$ .

housing temperature of 21°C (Supplemental Figure 2D), gene expression of *Fasn* and *Elovl6* was lower in ChREBP $\beta$ -deficient mice at 30°C (Figure 6B). However, the changes in de novo lipogenesis gene expression did not translate into differences in the profile of fatty acids composing brown adipose tissue triglycerides (Figure 6C). Genes involved in thermogenesis showed similar expression in the 2 genotypes (Figure 6B). Accordingly, OXPHOS and UCP1 protein levels and mitochondrial DNA content were comparable in the brown fat of WT and ChREBP $\beta$ -deficient mice (Figure 6, D and E). Altogether, our data revealed that ChREBP $\beta$  deficiency did not influence the involution of brown adipose tissue observed during adaptation to a thermoneutral environment.

## Discussion

The *Mlxip1* gene encodes 2 isoforms. ChREBP $\alpha$  contains the functional domains governing DNA binding, modulation of transactivation, and the highly regulated intracellular trafficking between the cytosol and the nucleus (1, 2). Generated from alternative promoter usage and splicing, ChREBP $\beta$  is a shorter protein lacking the N-terminal regions involved in intracellular trafficking and the control of transactivation (5). In human and mouse adipocytes, induction of ChREBP $\beta$  gene expression in conditions of increased glucose transport is much higher than for ChREBP $\alpha$ , suggesting an important role for this isoform (5, 8, 12). Opposite to our expectations, we observed mild consequences of a lack of ChREBP $\beta$  on ChREBP target gene expression, body composition, and whole-body glucose homeostasis.

CRISPR/Cas9-mediated gene editing recently emerged as an efficient technology to generate gene KO mouse models (14). As homologous recombination in embryonic stem cells is replaced by targeted gene editing in one-cell embryos, it proves remarkably rapid in generating multiple lines of KO mice. Electroporation of fertilized oocytes as shown here further simplifies and speeds up the process with remarkable efficiency. It allows generation of transgenic lines on various genetic backgrounds without costly mouse- and time-consuming backcrossing and favors better compliance to the 3R principles (Replacement, Reduction, and Refinement). Most gene KO models in the metabolism field have been generated in the C57BL6 strain. Various inbred strains show differences in whole-body and tissue responses, so the consequences of gene deficiency may vary between strains and alter conclusions on phenotypes associated with genetic ablation, as exemplified by *Lep*<sup>ob/ob</sup> mouse studies (20). Therefore, we produced ChREBP $\beta$ -deficient mice on C57BL6/J and FVB/N backgrounds because the 2 strains show



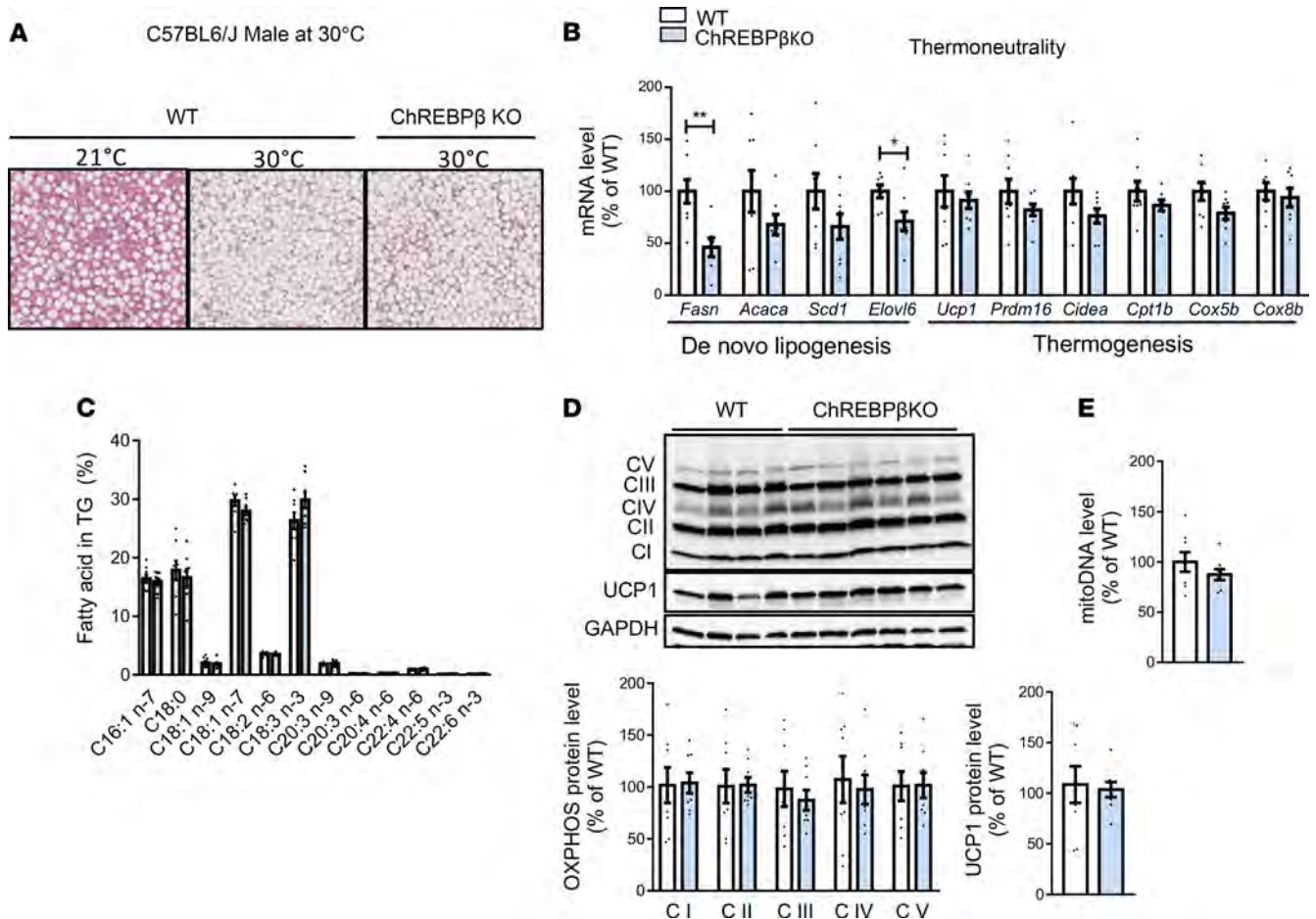
**Figure 5. Response of ChREBP $\beta$ -deficient mice to high-fat (45%) diet.** (A) Body weight, lean and fat mass, and organ weight in male C57BL6/J mice ( $n = 9-10$ ). (B) Insulin tolerance test ( $n = 9-10$ ). (C and D) Blood glucose, insulin (C), and lipid (D) levels in fasted (left panels) and fed (right panels) conditions ( $n = 8-10$ ). (E) Liver triglyceride (TG) levels after 18 hours of refeeding ( $n = 9$ ). NEFA, nonesterified fatty acid. Data are mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney test (A and C-E) or 2-way ANOVA with Sidak's post hoc test (B).

differences in terms of body composition and metabolic responses to environmental challenges that are dependent on sex (21–23). The consequences of a lack of ChREBP $\beta$  were similar in the 2 strains in both sexes, pointing at a moderate impact on systemic insulin action and energy balance.

In male and female mice of the 2 strains, ChREBP $\beta$  expression was strongly induced when a fasting period was followed by refeeding. The exquisite sensitivity of ChREBP $\beta$  gene expression to glucose, constitutive nuclear localization, and association with insulin sensitivity in humans has been considered as supporting a role for ChREBP $\beta$  being a much more potent transcriptional activator than ChREBP $\alpha$  (5, 10–12). However, the data of the current study in ChREBP $\beta$ -deficient mice do not support such a role. Deficiency in both ChREBP $\alpha$  and  $\beta$  had a profound impact on gene expression in the tissues tested, whereas parallel DNA microarray analyses showed an impact of ChREBP $\beta$  deficiency restricted to a few genes in brown fat. Direct measurements of known targets of ChREBP involved in *de novo* lipogenesis confirmed a limited impact at mRNA and protein levels, chiefly observed in brown adipose tissue. Our *in vivo* data are coherent with a model where ChREBP $\beta$  is a weak transactivator as suggested *in vitro* (24, 25). In the context of massive overexpression, ChREBP $\beta$ , which can freely enter the nucleus may, however, exert a transactivation capacity. However, as reported by others, we failed to detect the ChREBP $\beta$  protein through Western blot analysis in mouse tissues, suggesting very low levels of endogenous expression *in vivo* (9, 26).

The limited impact of ChREBP $\beta$  deficiency was also seen on energy balance and insulin sensitivity. Combined deficiency in ChREBP $\alpha$  and  $\beta$  results in metabolic alterations that are not observed when only ChREBP $\beta$  is lacking. Total ChREBP-KO mice have lower amount of gonadal white adipose tissue than WT littermates (27). Phenotypic differences between global ChREBP and ChREBP $\beta$ -selective deficiency are exacerbated when investigating glucose homeostasis and insulin sensitivity. The impaired glucose and insulin tolerance reported in total ChREBP-KO mice was not found in ChREBP $\beta$ -deficient mice (28). Whereas adipose- and liver-specific ablations of both ChREBP $\alpha$  and  $\beta$  alter insulin sensitivity in mice fed





**Figure 6. Response of ChREBPβ-deficient mice to thermic challenges.** (A–E) Representative H&E staining (A), mRNA levels of de novo lipogenesis and thermogenic genes (B), fatty acid profile in triglycerides (TG) (C), OXPHOS and UCP1 protein levels (D), and mitochondrial DNA (mitoDNA) content (E) in interscapular brown adipose tissue of C57BL6/J male mice adapted to thermoneutrality for 6 weeks ( $n = 7$ –9). Data are mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney test. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

chow and high-fat diets, we found no modification of insulin and glucose tolerance in ChREBPβ-deficient mice regardless of sex, genetic strain, or diet (29, 30).

Because the highest level of ChREBPβ mRNA expression was observed in brown adipose tissue, we performed further analyses on this tissue. ChREBPβ deficiency did not influence the involution of brown adipose tissue observed during adaptation to a thermoneutral environment. In contrast, the absence of ChREBPα and β results in inhibition of fatty acid synthesis in brown adipose tissue, preventing whitening of the tissue (19). The impairment of de novo lipogenesis in mice with global ChREBP deficiency results in preservation of mitochondrial mass and function during transition from a housing temperature of 21°C to 30°C. Brown fat from ChREBPβ-deficient mice showed similar fatty acid profiles, triglyceride amount, and mitochondrial protein and DNA levels as WT littermates, indicating unaltered involution of brown adipose tissue at thermoneutrality.

This study has limitations. For the in vivo investigation of ChREBPβ deficiency, ablation was performed in all tissues expressing the transcription factor. It cannot, therefore, be excluded that different actions in tissues expressing ChREBPβ result in compensatory mechanisms and the mild phenotype reported here. However, experiments performed in multiple genetic, sex, and environmental conditions potentially engaging ChREBPβ did not support a major role in these adaptations. After other nutritional challenges, such as high fructose or alcohol intake, it may be envisaged that ChREBPβ contributes more to ChREBP transcriptional activity than in the conditions reported here (13, 31, 32). Finally, identification of factors regulating ChREBPβ protein stability may be required to pave the way for future in vivo investigation of ChREBPβ.

In conclusion, we showed that ChREBP $\beta$ , a shorter product of the *Mlxipl* gene, is dispensable in vivo for metabolic adaptations to nutritional and thermic challenges. ChREBP $\alpha$  exerts the predominant role in these adaptations.

## Methods

**Mouse strains and environmental challenges.** C57BL6/J and FVB/N male and female ChREBP $\beta$ -deficient and WT littermate mice (Janvier Labs) were used. Mice from several litters were used in each protocol to avoid litter-to-litter variation. Mice were housed at 21°C with food and water provided ad libitum and maintained on a 12-hour light/12-hour dark cycle (8 am–8 pm). Mice were fed either chow (Ssniff V1534); a high-fat, high-sucrose diet (Ssniff E15778-3447); or a 45% high-fat diet (Ssniff E15744-34). In fasting refeeding experiments, mice were fasted for 24 hours followed by refeeding with a diet used prior to fasting and drinking water containing 20% glucose for 18 hours. During thermoneutrality experiments, mice were placed in vented animal cabinets (Noroit A-box EP-20) for 6 weeks at 30°C.

**Generation of ChREBP $\beta$ -deficient mice.** One-cell embryos from 2 genetic backgrounds, C57BL6/J and FVB/N (Janvier Labs), were used. Five- to seven-week-old female mice were super-ovulated by i.p. administration of 5 IU of pregnant mare serum gonadotropin (Centravet), followed by an additional i.p. injection of 5 IU human chorionic gonadotropin 42 to 48 hours later (Centravet). Super-ovulated females were mated with adult males and euthanatized at 0.5 dpc. Oviduct were dissected and the ampulla nicked to release zygotes associated with surrounding cumulus cells into a dish of hyaluronidase (Merck-Sigma) in M2 solution (300  $\mu$ g/mL, Merck-Sigma) under a stereomicroscope. Zygotes were washed 3 times in M2 medium to remove cumulus cells. Zygotes were kept in KSOM (potassium simplex optimization medium) (Merck-Sigma) in a water-jacketed CO<sub>2</sub> incubator (5% CO<sub>2</sub>, 37°C) until electroporation.

In silico analysis was performed using CRISPOR freeware (<http://crispor.tefor.net>) (33). A 991 bp sequence containing the 171 bp of *Mlxipl* exon 1b was chosen as target (Figure 1A). Guide RNA (sgRNA) was designed both upstream and downstream of exon 1b. sgRNAs were produced by T7 Hiscribe transcription kit (NEB) and purified by EZNA microelute RNA cleanup kit (Omega Bio-Tek), eluted in approximately 25  $\mu$ L of RNase-free water, and stored at –80°C. Efficacies of sgRNAs were tested in mouse embryonic fibroblasts using 0.5  $\mu$ g of SpyCas9-NLS mRNA and 0.5  $\mu$ g of sgRNA to be tested. After genomic DNA extraction, T7 endonuclease tests were performed on upstream and downstream amplicons.

To remove the entire sequence of *Mlxipl* exon 1b, SpyCas9-NLS was complexed with 2 sgRNAs (Figure 1A). Aliquots of sgRNA were denatured at 80°C for 2 minutes and then put on ice for 2 minutes before adding the protein. The complex was performed at 1–1.5:1 (sgRNA/Cas9 protein) molar stoichiometry. Cas9 protein and sgRNA were incubated for 10 minutes at room temperature and kept on ice during electroporation.

Repeated pulses of electroporation were delivered by a NEPA 21 electroporator (Sonidel Ltd.) to first create pores in the *zona pellucida* and then favor the intracellular entry of ribonucleoproteins (34). A glass chamber with platinum plate electrodes (CUY520P5, Sonidel Ltd.) was filled with 50  $\mu$ L of Opti-MEM I reduced serum medium (Thermo Fisher Scientific) or with ribonucleoprotein-containing medium. Between 23 and 48 fresh embryos were aligned in the chamber, taking care to avoid contacts between zygotes and electrodes. Impedance was measured and maintained between 0.5 and 0.54 k $\Omega$  by liquid volume adjustment (reducing volume increases impedance). Four “poring pulses” were applied (250 V, 1 ms, interval 50 ms, 10% voltage decay; positive polarity), followed by 5 “transfer pulses” (20 V, 50 ms, interval 50 ms, 40% voltage decay; alternating positive and negative polarity). Zygotes were then transferred into KSOM medium and kept in an incubator until reimplantation into the oviduct of Swiss-CD1 (Janvier Labs) pseudopregnant females (10–15 embryos per female).

**Glucose and insulin tolerance tests.** For glucose and insulin tolerance tests performed around 2 pm, 1 to 2 mg/g body weight of D-(+)-glucose (Sigma-Aldrich) and 0.7 to 1.2 mU/g body weight of insulin (Lilly) were administered (i.p.) to 6-hour fasted mice according to sex, age, diet, and genetic backgrounds (35, 36). Glycemia was checked in blood from the tail vein 30 minutes before glucose injection and then at various times after glucose administration with a Glucotrend Accu-Chek Performa (Roche SAS).

**Blood analyses.** Blood was collected in EDTA tubes through retro-orbital sampling. Except for tolerance tests (see above), blood was collected around 8 am. Mouse plasma glycerol was measured by enzymatic assay (free glycerol reagent, Sigma-Aldrich); plasma nonesterified fatty acid and triglyceride levels were measured using the NEFA C kit (Wako) and TG reagent (Sigma-Aldrich), respectively. Glucose levels were measured using a glucometer (AccuCheck, Roche) or Glucose GOD FS kit (DiaSys). Plasma insulin was measured using an ultrasensitive ELISA kit (ALPCO Diagnostics).

*Gene expression analyses.* Tissues were homogenized in QIAzol buffer (Qiagen) using Precellys tissue homogenizer. Total RNA from tissues was extracted using RNeasy kit (Qiagen). RNA concentration and purity were assessed spectrophotometrically using NanoDrop (DigitalBio).

For each sample, cRNA labeled with Cyanine-3 (Cy3) was prepared from 200 ng of total RNA using the One-Color Quick Amp Labeling kit (Agilent Technologies) according to the manufacturer's instructions, followed by RNAClean XP (Agencourt Bioscience Corporation) purification. Dye incorporation and cRNA yield were checked using Drosense 96 UV/VIS droplet reader (Trinean). Next, 600 ng of Cy3-labeled cRNA (specific activity >6 pmol Cy3/ $\mu$ g cRNA) was fragmented at 60°C for 30 minutes in a reaction volume of 25  $\mu$ L containing 10 $\times$  Agilent fragmentation buffer and 25 $\times$  Agilent blocking agent following the manufacturer's instructions. On completion of the fragmentation reaction, 25  $\mu$ L of 2 $\times$  Agilent hybridization buffer was added to the fragmentation mixture and hybridized to SurePrint G3 Mouse GE v2 microarray (8X60K, design 074809, enclosed in Agilent SureHyb-enabled hybridization chambers) for 17 hours at 65°C in a rotating Agilent hybridization oven. After hybridization, microarrays were washed sequentially in wash buffer 1 (Agilent Technologies, 1 minute) and wash buffer 2 (Agilent Technologies, 37°C, 1 minute). Slides were scanned immediately after washing on an Agilent G2505C Microarray Scanner with Agilent Scan Control A.8.5.1 software. The scanned images were analyzed with Feature Extraction Software 10.10.1.1 (Agilent Technologies) using default parameters (protocol GE1\_1010\_Sep10 and Grid: 074809\_D\_F\_20150624). All subsequent data analyses were done under R ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)) using packages of Bioconductor ([www.bioconductor.org](http://www.bioconductor.org)). Raw data (median of pixel intensity) were imported into R using the `read.maimages` function from the `limma` package with the following weight function (assigning a weight of 1 or 0 to each spot): `myfunw<-function(x) {okType<-x$ControlType==0; okFoundGreen<-x$gIsFound==1; okPos=x-$gIsPosAndSignif==1; okWellAbove<- x$gIsWellAboveBG==1; as.numeric(okType & okFoundGreen & okPos & okWellAbove);}`. We selected the spots with a minimal weight of 1 for 26 out of 32 microarrays or with a minimal weight of 6 per group from at least 1 experimental group for each tissue. Data were then stored in an `ExpressionSet` object and normalized by the quantile method using the `normalize.quantiles` function from the `preprocessCore` R library. Replicated probes on the array (identical `ProbeName`) were resolved by taking the median normalized signal of each set of replicated probes. Pathway analysis was performed using the ENRICH web-based tool (37–39). Gene expression data from DNA microarray analyses reported in this study have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus (GEO GSE179564).

After treatment with DNase I (Invitrogen) and reverse transcription of 1 mg of total RNA with Multiscribe Reverse Transcriptase, real-time quantitative PCR was performed with Fast SYBR Green Master Mix or TaqMan Fast Advanced Master Mix and QuantStudio5 real-time PCR system (Thermo Fisher Scientific). HPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) mRNA was used as control to normalize gene expression. A list of primers is provided in Supplemental Table 3.

*Protein analyses.* Tissues were homogenized in RIPA buffer containing protease and phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich) using a Precellys homogenizer and centrifuged. Supernatants were harvested for determination of total protein concentration. Equal amounts of solubilized proteins were loaded on 4%–20% gradient SDS-PAGE gels (Bio-Rad), blotted onto nitrocellulose membranes, and incubated overnight with primary antibodies, rabbit anti-GAPDH (1:1000, CST, 2118), rabbit anti-ChREBP (1:1000, Novus, NB135), rabbit anti-SCD1 (1:1000, CST, 2794), rabbit anti-FAS (1:1000, CST, 3180), rabbit anti-ACC (1:1000, CST, 3662), mouse anti-OXPHOS (1:1000, Abcam, ab110413), and rabbit anti-UCP1 (1:1000, Abcam, ab10983). Subsequently, immunoreactive proteins were blotted with anti-rabbit or mouse HRP-labeled secondary antibodies for 1 hour at room temperature, revealed by enhanced chemiluminescence reagent (SuperSignal West Femto, Thermo Fisher Scientific), and visualized using ChemiDoc MP Imaging System; data were analyzed using ImageLab 4.2 (Bio-Rad).

*Fatty acid profiles in brown adipose tissue.* Fatty acid composition of brown adipose tissue triglycerides was determined by capillary gas chromatography. Tissue samples were homogenized in methanol/butylated hydroxy toluene (10 mg/L) and stored at –20°C until analysis. Neutral lipids (corresponding to an equivalent of 20 mg tissue) were extracted following the Folch method using chloroform/methanol (2:1 vol/vol), in the presence of the internal standard glyceryl trionadecanoate (Sigma-Aldrich). The triglyceride fraction was isolated by thin layer chromatography on silica glass plates (Merck) using petrol ether/diethyl ether/acetic acid (80:20:1 vol/vol/vol) as the mobile phase. Separation and quantitation of fatty acid methyl esters generated by transmethylation was achieved on a GC 2030 (Shimadzu) with flame ionization detection (40).

**Hepatic triglyceride content quantitation.** First, 100 mg of crushed liver was resuspended in 500  $\mu$ L of PBS and lysed using a Precellys tissue homogenizer. The suspension was diluted in absolute ethanol 1:9 and incubated 1 hour under strong shaking at room temperature. After 2 rounds of 20-second centrifugation at 492g, the supernatant was collected and triglyceride content was assessed as described in *Blood analyses*.

**Mitochondrial DNA content.** Brown adipose tissue was crushed into powder using a mortar and total DNA was extracted using DNeasy kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. Real-time quantitative PCR was performed as described above using *Cox1* primers for mitochondrial DNA and *Ppia* primers for nuclear DNA. Mitochondrial DNA quantitation was calculated as  $2\Delta\text{Ct}$  of the mitochondrial gene *Cox1* using *Ppia* as nuclear housekeeping gene.

**Histology.** Intrascapular brown adipose tissues were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS, dehydrated, embedded in paraffin, and cut into 7  $\mu$ m sections. Sections were stained with H&E using standard protocols.

**Statistics.** Statistical analyses and graphical representations were performed using GraphPad Prism 9. Figure legends contain the description of the statistical test performed for each graphical representation as well as the number of animals used in each experiment (*n*). All results are represented as mean  $\pm$  SEM. *P* values of less than 0.05 were considered significant. No randomization or blinding was performed.

**Study approval.** Mice were housed and manipulated according to INSERM guidelines and European Directive 2010/63/UE in the local animal care facility (agreements A 31 555 04 and C 31 555 07). Protocols were approved by the French Ministry of Research after review by the local ethical committee (comité d'éthique en expérimentation animale de l'UMS006/CREFRE, CEEA122, Toulouse, France).

## Author contributions

ER, GT, JD, JPC, CP, EM, and DL participated in research design. ER, GT, JD, CB, FB, SCS, MAM, AB, LM, CF, ML, and EM conducted experiments. ER, GT, JD, SCB, CP, EM, and DL performed data analysis and interpretation. ER, JD, CP, and DL drafted the paper. RD, PDD, and CM provided useful advice and edited the paper. CP, EM, and DL supervised the studies. All authors read and approved the final manuscript.

## Acknowledgments

The following GenoToul (Toulouse network of technological platforms in life sciences) facilities contributed to the work: Animal housing and phenotyping (Xavier Sudre, Caroline Nevoit), GeT-TRiX (Yannick Lippi), and GeT Santé (Emeline Lhuillier, Frédéric Martins).

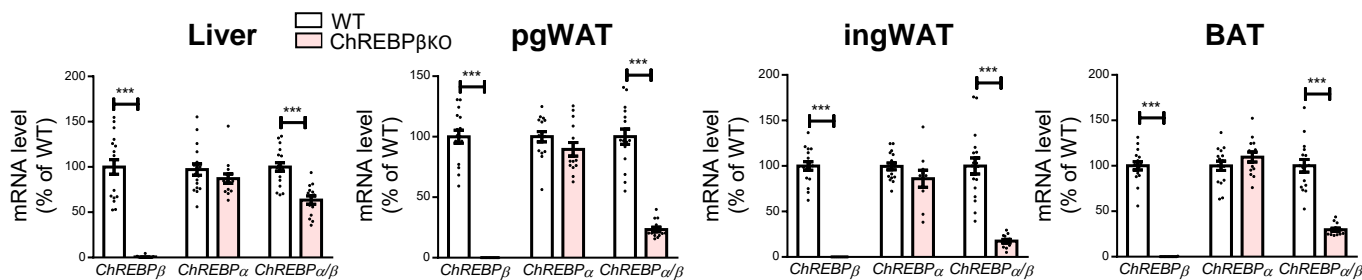
This work was supported by INSERM, Université Toulouse III, European Foundation for the Study of Diabetes (EFSD/Novo Nordisk Programme for Diabetes Research in Europe 2019 to DL), Fondation pour la Recherche Médicale (DEQ20170336720 to DL), Agence Nationale de la Recherche (ANR-17-CE14-0015Hepadialogue to DL and CP), Région Occitanie (DIALOGUE project to DL), AstraZeneca France (to DL), and European Research Council (ERC) under the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme (SPHERES, ERC Synergy Grant agreement 856404 to DL).

Address correspondence to: Catherine Postic, Institut Cochin, 24 rue du Faubourg Saint Jacques, 75 014 Paris, France. Phone: 33.1.53.73.27.07; Email: catherine.postic@inserm.fr. Or to: Dominique Langin, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC), BP 84 225, 31 432 Toulouse Cedex 4, France. Phone: 33.5.61.32.56.20; Email: dominique.langin@inserm.fr.

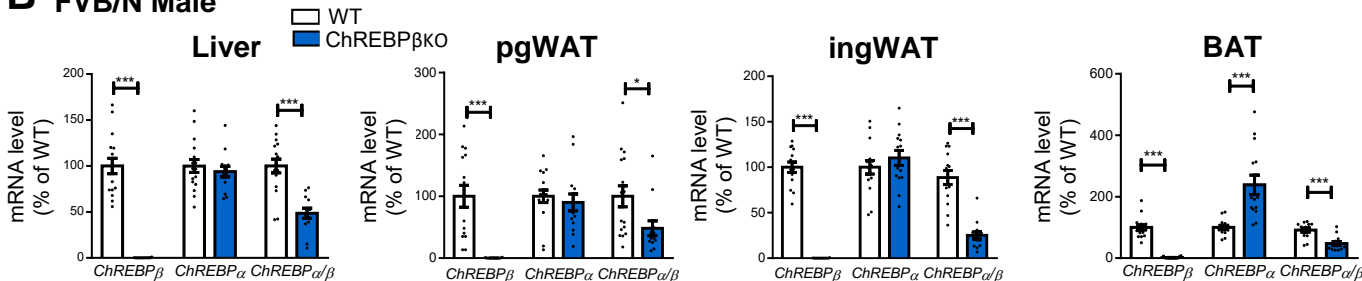
1. Abdul-Wahed A, et al. Sweet sixteenth for ChREBP: established roles and future goals. *Cell Metab.* 2017;26(2):324–341.
2. Yamashita H, et al. A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(16):9116–9121.
3. Stoeckman AK, et al. Mlx is the functional heteromeric partner of the carbohydrate response element-binding protein in glucose regulation of lipogenic enzyme genes. *J Biol Chem.* 2004;279(15):15662–15669.
4. Li MV, et al. Glucose-dependent transcriptional regulation by an evolutionarily conserved glucose-sensing module. *Diabetes.* 2006;55(5):1179–1189.
5. Herman MA, et al. A novel ChREBP isoform in adipose tissue regulates systemic glucose metabolism. *Nature.* 2012;484(7394):333–338.
6. Ge Q, et al. Structural characterization of a unique interface between carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) and 14-3-3 $\beta$  protein. *J Biol Chem.* 2012;287(50):41914–41921.

7. Beaven SW, et al. Reciprocal regulation of hepatic and adipose lipogenesis by liver X receptors in obesity and insulin resistance. *Cell Metab.* 2013;18(1):106–117.
8. Morigny P, et al. Lipid and glucose metabolism in white adipocytes: pathways, dysfunction and therapeutics. *Nat Rev Endocrinol.* 2021;17(5):276–295.
9. Tang Y, et al. Adipose tissue mTORC2 regulates ChREBP-driven de novo lipogenesis and hepatic glucose metabolism. *Nat Commun.* 2016;7:11365.
10. Eissing L, et al. De novo lipogenesis in human fat and liver is linked to ChREBP- $\beta$  and metabolic health. *Nat Commun.* 2013;4:1528.
11. Kursawe R, et al. Decreased transcription of ChREBP- $\alpha/\beta$  isoforms in abdominal subcutaneous adipose tissue of obese adolescents with prediabetes or early type 2 diabetes: associations with insulin resistance and hyperglycemia. *Diabetes.* 2013;62(3):837–844.
12. Morigny P, et al. Interaction between hormone-sensitive lipase and ChREBP in fat cells controls insulin sensitivity. *Nat Metab.* 2019;1(1):133–146.
13. Kim MS, et al. ChREBP regulates fructose-induced glucose production independently of insulin signaling. *J Clin Invest.* 2016;126(11):4372–4386.
14. Low BE, et al. Simple, efficient CRISPR-Cas9-mediated gene editing in mice: strategies and methods. *Methods Mol Biol.* 2016;1438:19–53.
15. Cypess AM, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med.* 2009;360(15):1509–1517.
16. van Marken Lichtenbelt WD, et al. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med.* 2009;360(15):1500–1508.
17. Virtanen KA, et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med.* 2009;360(15):1518–1525.
18. Iroz A, et al. A specific ChREBP and PPAR $\alpha$  cross-talk is required for the glucose-mediated FGF21 response. *Cell Rep.* 2017;21(2):403–416.
19. Schlein C, et al. Endogenous fatty acid synthesis drives brown adipose tissue involution. *Cell Rep.* 2021;34(2):108624.
20. Kennedy AJ, et al. Mouse models of the metabolic syndrome. *Dis Model Mech.* 2010;3(3–4):156–166.
21. Montgomery MK, et al. Mouse strain-dependent variation in obesity and glucose homeostasis in response to high-fat feeding. *Diabetologia.* 2013;56(5):1129–1139.
22. Parks BW, et al. Genetic control of obesity and gut microbiota composition in response to high-fat, high-sucrose diet in mice. *Cell Metab.* 2013;17(1):141–152.
23. Parks BW, et al. Genetic architecture of insulin resistance in the mouse. *Cell Metab.* 2015;21(2):334–347.
24. Jing G, et al. Islet ChREBP- $\beta$  is increased in diabetes and controls ChREBP- $\alpha$  and glucose-induced gene expression via a negative feedback loop. *Mol Metab.* 2016;5(12):1208–1215.
25. Witte N, et al. The glucose sensor ChREBP links de novo lipogenesis to PPAR $\gamma$  activity and adipocyte differentiation. *Endocrinology.* 2015;156(11):4008–4019.
26. Nuotio-Antar AM, et al. FABP4-Cre mediated expression of constitutively active ChREBP protects against obesity, fatty liver, and insulin resistance. *Endocrinology.* 2015;156(11):4020–4032.
27. Iizuka K, et al. Deficiency of carbohydrate-activated transcription factor ChREBP prevents obesity and improves plasma glucose control in leptin-deficient (ob/ob) mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006;291(2):E358–E364.
28. Iizuka K, et al. Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(19):7281–7286.
29. Jois T, et al. Deletion of hepatic carbohydrate response element binding protein (ChREBP) impairs glucose homeostasis and hepatic insulin sensitivity in mice. *Mol Metab.* 2017;6(11):1381–1394.
30. Vijayakumar A, et al. Absence of carbohydrate response element binding protein in adipocytes causes systemic insulin resistance and impairs glucose transport. *Cell Rep.* 2017;21(4):1021–1035.
31. Marmier S, et al. Novel role for carbohydrate responsive element binding protein in the control of ethanol metabolism and susceptibility to binge drinking. *Hepatology.* 2015;62(4):1086–1100.
32. Shi JH, et al. Liver ChREBP protects against fructose-induced glycogenic hepatotoxicity by regulating L-type pyruvate kinase. *Diabetes.* 2020;69(4):591–602.
33. Concordet JP, Haeussler M. CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(w1):W242–W245.
34. Teixeira M, et al. Electroporation of mice zygotes with dual guide RNA/Cas9 complexes for simple and efficient cloning-free genome editing. *Sci Rep.* 2018;8(1):474.
35. Ayala JE, et al. Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice. *Dis Model Mech.* 2010;3(9–10):525–534.
36. Virtue S, Vidal-Puig A. GTTs and ITTs in mice: simple tests, complex answers. *Nat Metab.* 2021;3(7):883–886.
37. Chen EY, et al. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics.* 2013;14:128.
38. Kuleshov MV, et al. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(w1):W90–W97.
39. Xie Z, et al. Gene set knowledge discovery with Enrichr. *Curr Protoc.* 2021;1(3):e90.
40. Caspar-Bauguil S, et al. Anorexia nervosa patients display a deficit in membrane long chain poly-unsaturated fatty acids. *Clin Nutr.* 2012;31(3):386–390.

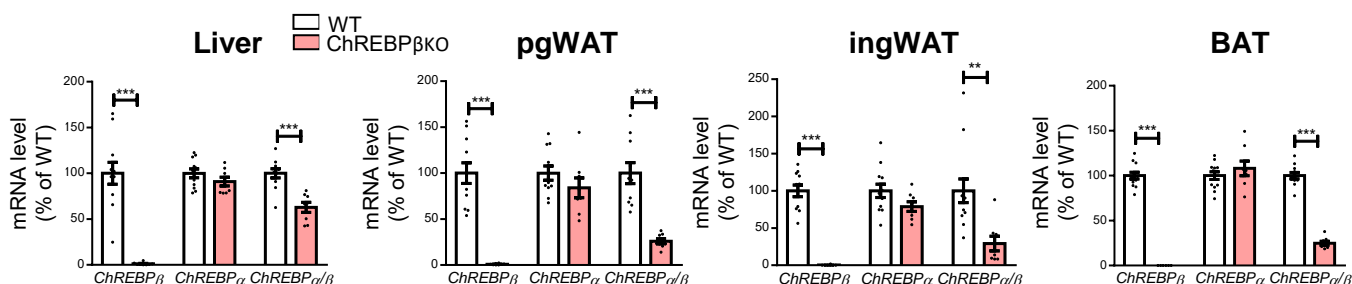
## A C57BL6/J Female



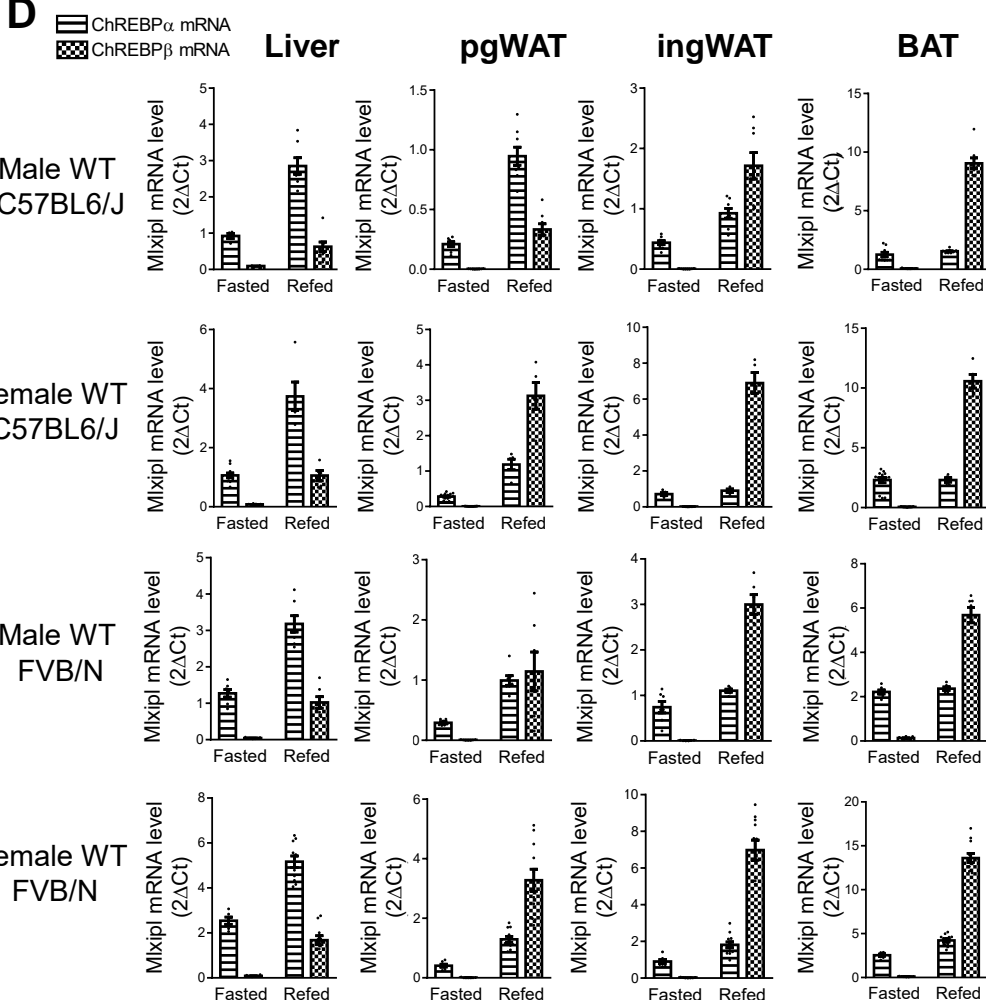
## B FVB/N Male



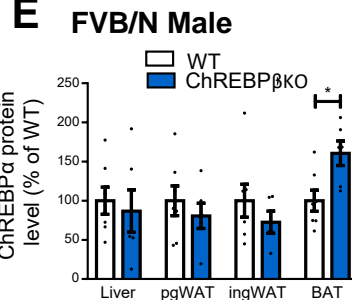
## C FVB/N Female



## D



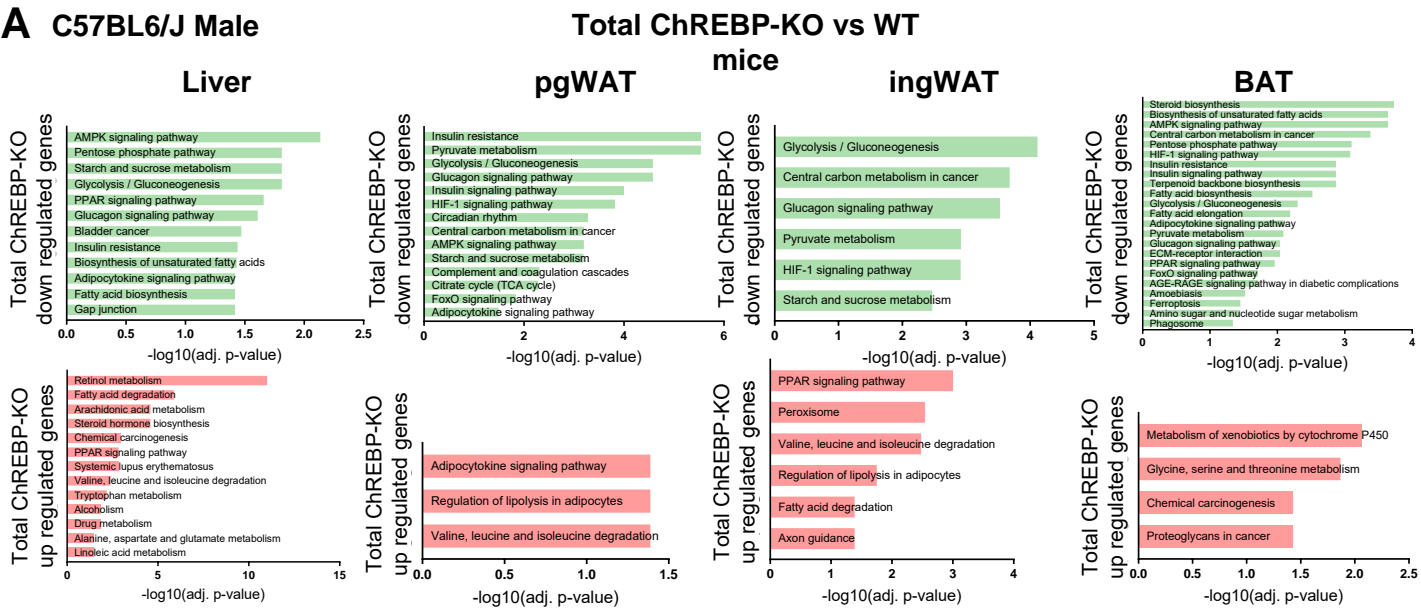
## E



**Figure S1. Generation of ChREBP $\beta$ -deficient mice in C57BL6/J and FVB/N genetic backgrounds**

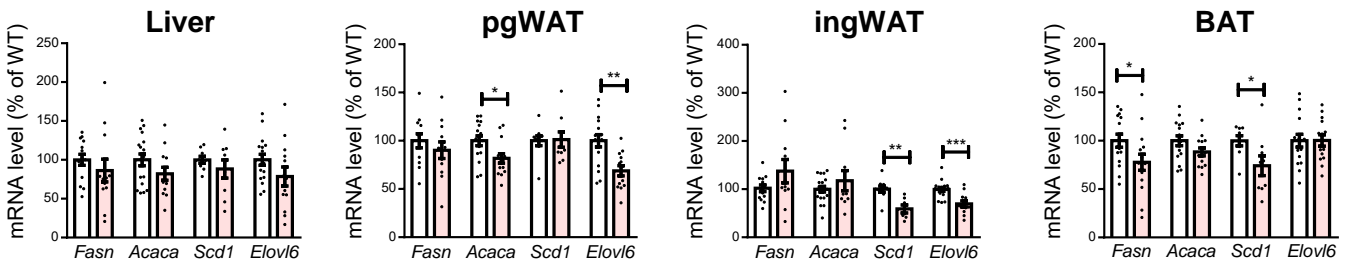
(A,B,C) mRNA levels of ChREBP isoforms in liver, perigonadal white adipose tissue (pgWAT), inguinal WAT (ingWAT) and interscapular brown adipose tissue (BAT) of refed female C57BL6/J (n=14-16) (A), male (n=13-16) (B) and female FVB/N (n=8-11) (C) mice. (D) mRNA levels of the ChREBP $\alpha$  and  $\beta$  isoforms of the *Mlxipl* gene in liver, pgWAT, ingWAT and BAT of wild type fasted and refed male and female C57BL6/J (n=6-15) and FVB/N (n=6-12) mice. Data are represented as  $2^{\Delta Ct}$  values. (E) Quantitation of ChREBP protein levels in liver, pgWAT and BAT of refed male FVB/N (n=5-7) mice. Data are mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney tests. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

## A C57BL6/J Male



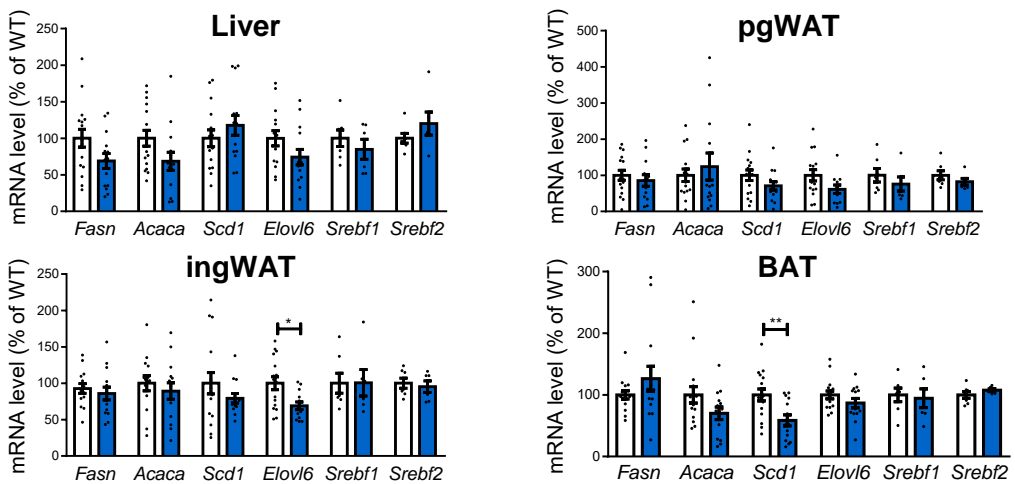
## B C57BL6/J Female

□ WT  
□ ChREBP $\beta$ KO



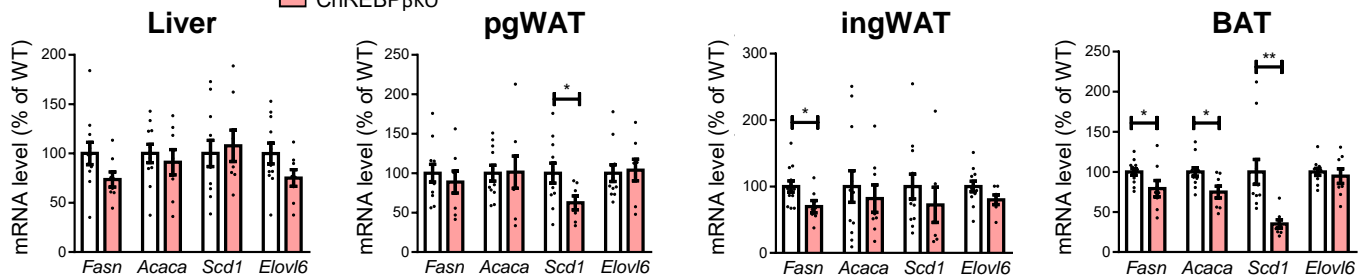
## C FVB/N Male

□ WT  
□ ChREBP $\beta$ KO



## D FVB/N Female

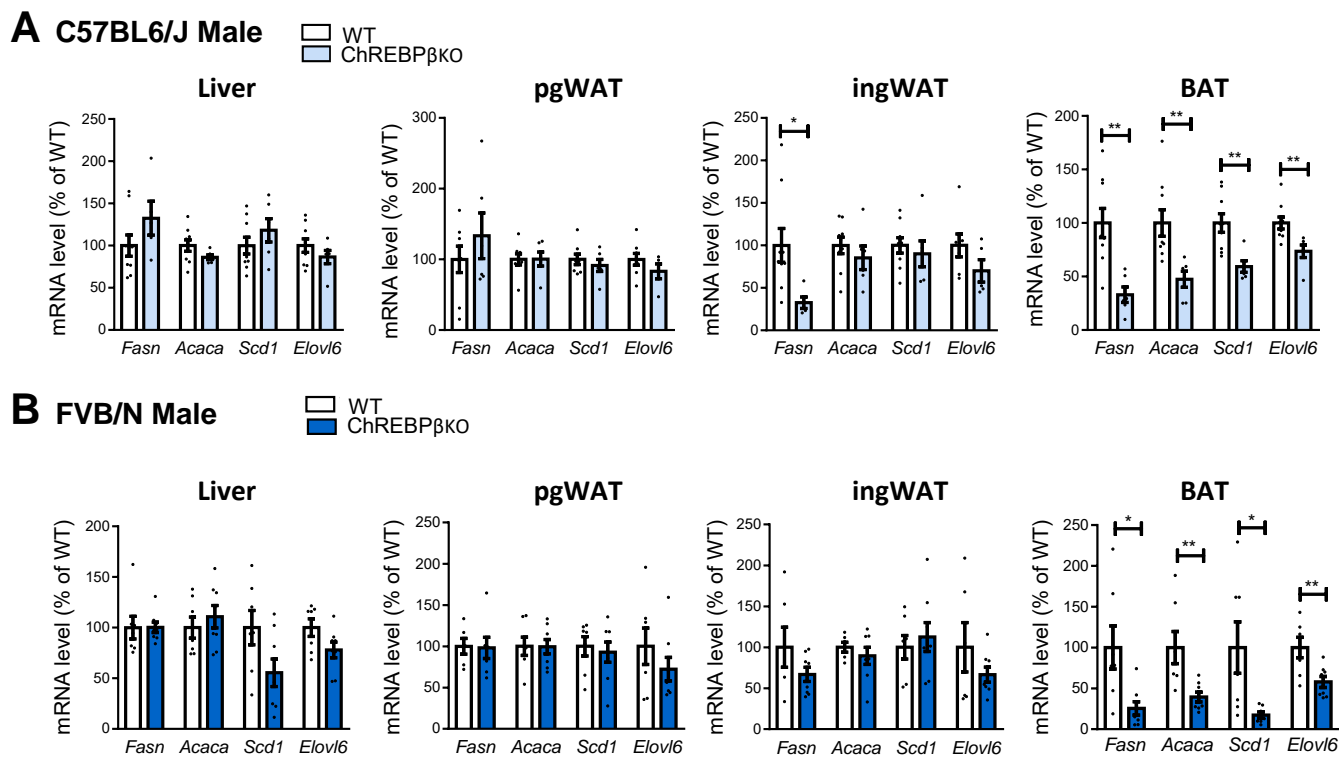
□ WT  
□ ChREBP $\beta$ KO





## Figure S2. Gene expression profiles in ChREBP-deficient mice

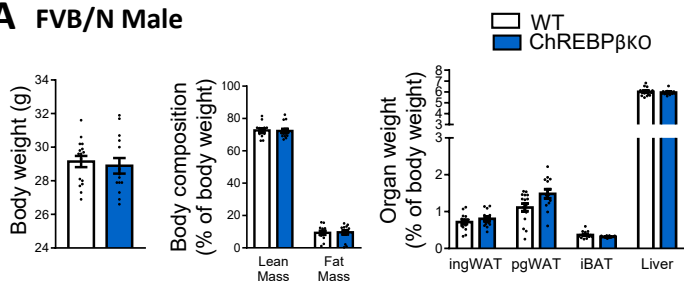
(A) Pathway analyses from DNA microarray data in liver, perigonadal white adipose tissue (pgWAT), inguinal WAT (ingWAT) and interscapular brown adipose tissue (BAT) of refed C57BL6/J male mice deficient in ChREBP $\alpha$  and  $\beta$  isoforms (Total ChREBP KO) (n=8 per group). (B,C,D) mRNA levels of de novo lipogenesis genes in liver, pgWAT, ingWAT and BAT of refed C57BL6/J female (n=9-18) (B), FVB/N male (n=6-16) (C) and female (n=8-12) (D) refed mice with ChREBP $\beta$  deficiency. Data are mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney tests. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.



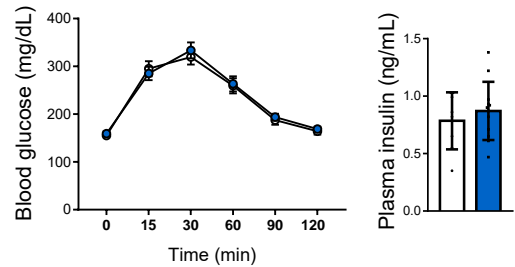
**Figure S3. Gene expression profiles in fasted ChREBP-deficient mice**

(A,B) mRNA levels of de novo lipogenesis genes in liver, pgWAT, ingWAT and BAT of C57BL6/J (n=5-9) (A) and FVB/N (n=7-8) (B) fasted male mice with ChREBP $\beta$  deficiency. Data are mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney tests. \*P<0.05, \*\*P<0.01.

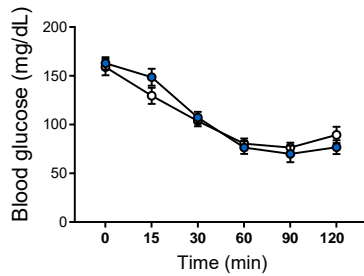
## A FVB/N Male



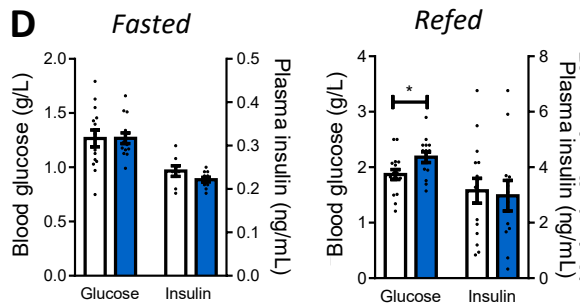
## B



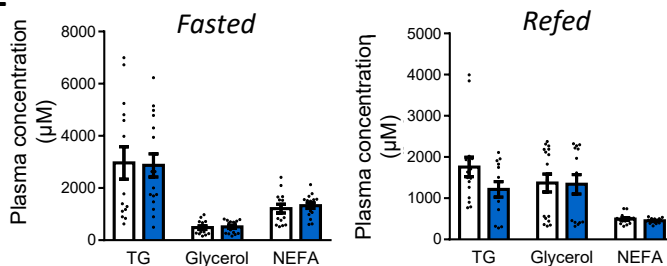
## C



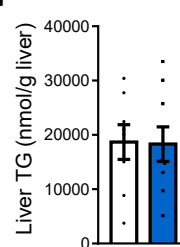
## D



## E

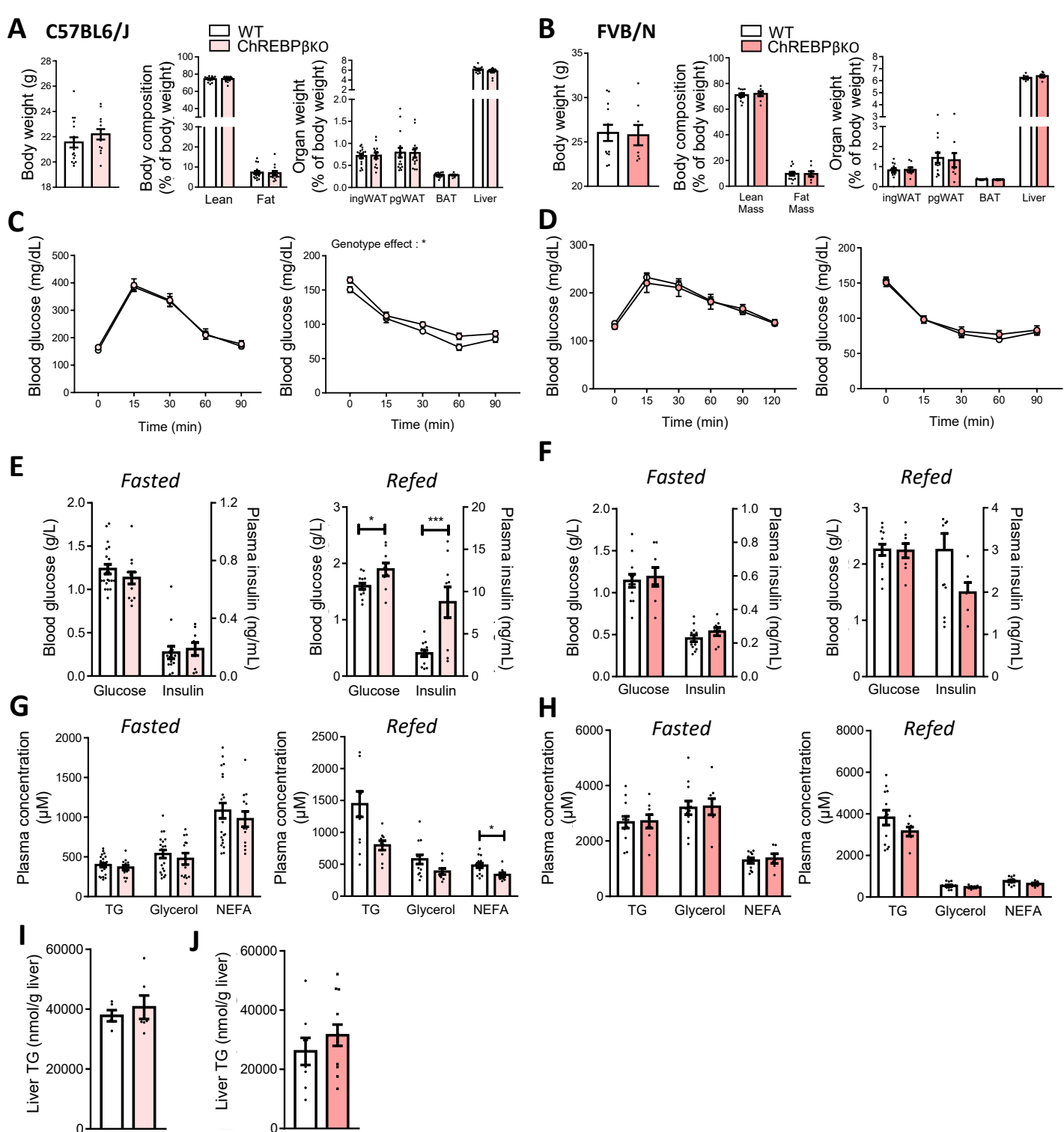


## F



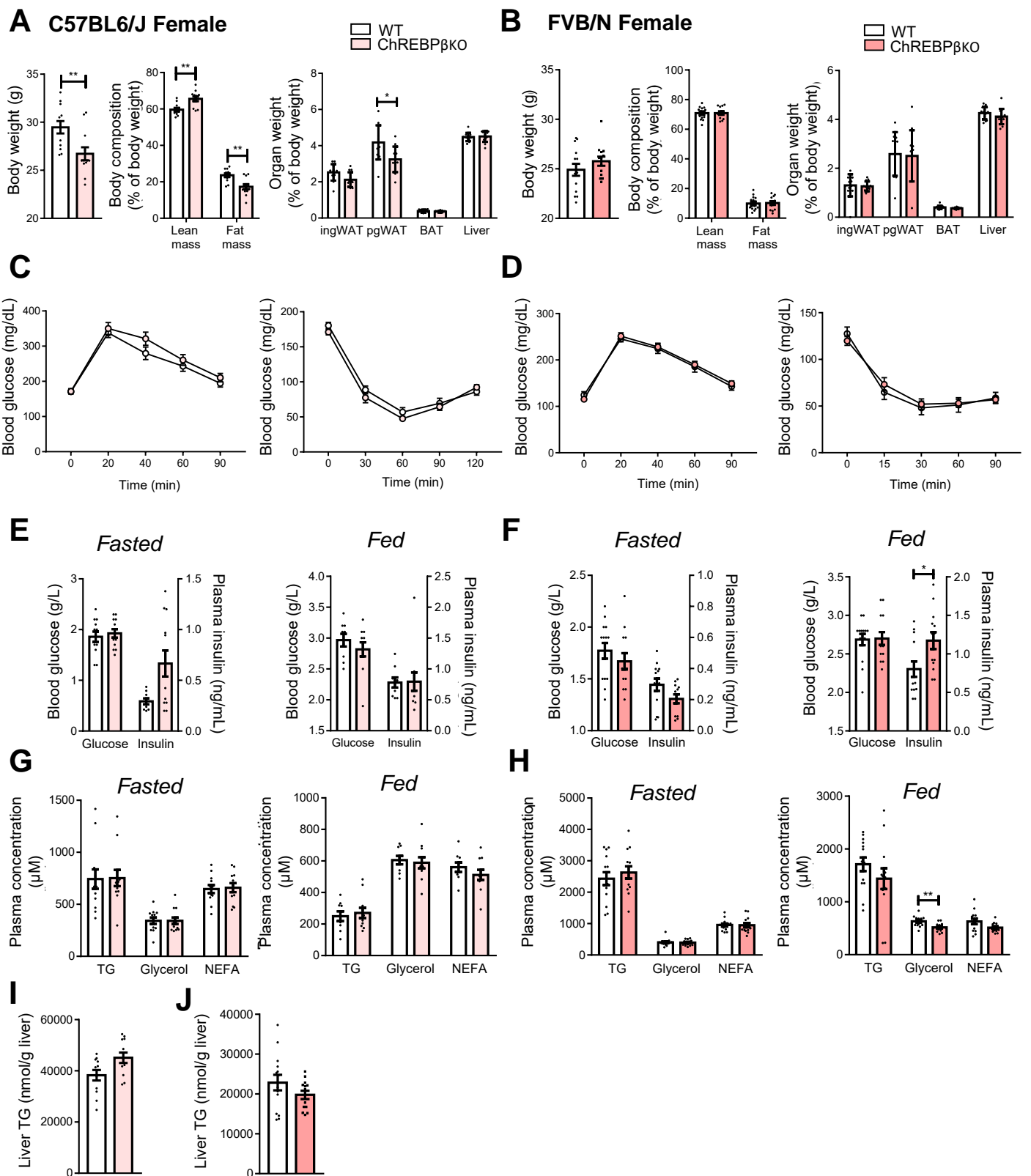
## Figure S4. Body composition and glucose homeostasis in male FVB/N ChREBP $\beta$ -deficient mice

(A) Body weight, lean and fat mass and, organ weight in refed male FVB/N mice (n=13-16). (B) Glucose tolerance tests and blood insulin levels 15 min post-injection during glucose tolerance tests (n=7-16). (C) Insulin tolerance test (n=7-11). (D) Blood glucose and insulin levels after 24h of fasting (left panels) and 18h of refeeding (right panels) (n=8-16). (E) Blood lipid levels after 24h of fasting (left panels) and 18h of refeeding (right panels). (F) Liver triglyceride (TG) levels after 18h of refeeding (n=8-9). NEFA, non esterified fatty acid. Data are mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney test (A, B, D-F) or two-way ANOVA with Šídák post-hoc tests (B,C). \*P<0.05, \*\*P<0.01.



**Figure S5. Body composition and glucose homeostasis in female ChREBP $\beta$ -deficient mice**

(A,B) Body weight, lean and fat mass and, organ weight in refeed female C57BL6/J (n=13-18) (A) and FVB/N (n=8-12) (B) mice. (C,D) Glucose (left panels) and insulin (right panels) tolerance tests in female C57BL6/J (n=7-18) (C) and FVB/N (n=10-15) (D) mice. (E-F) Blood glucose and insulin levels after 24h of fasting (left panels) and 18h of refeeding (right panels) in female C57BL6/J (n=9-16) (E) and FVB/N (n=6-13) (F) mice. (G-H) Blood lipid levels after 24h of fasting (left panels) and 18h of refeeding (right panels) in female C57BL6/J (n=9-17) (G) and FVB/N (n=7-13) (H) mice. (I-J) Liver triglyceride (TG) levels in female C57BL6/J (n=5-6) (I) and FVB/N (n=8-12) (J) mice after 18h of refeeding. NEFA, non esterified fatty acid. Data are mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney test (A, B, E-J) or two-way ANOVA with Šidák post-hoc tests (C,D). \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.



**Figure S6. Response of female ChREBP $\beta$ -deficient mice to high fat high sucrose diet**

(A-B) Body weight, lean and fat mass and, organ weight in C57BL6/J (n=12) (A) and FVB/N N (n=7-14) (B) mice fed high fat high sucrose diet. (C-D) Glucose (left panels) and insulin (right panels) tolerance tests in C57BL6/J (n=12) and FVB/N (8-14) mice. (E-F) Blood glucose and insulin levels after 24h of fasting (left panels) and 18h of refeeding (right panels) in C57BL6/J (n=9-12) (E) and FVB/N mice (n=14-13) (F). (G-H) Blood lipid levels after 24h of fasting (left panels) and 18h of refeeding (right panels) in C57BL6/J (n=9-12) (E) and FVB/N mice (n=14-13) (H). (I-J) Liver triglyceride (TG) levels in C57BL6/J (n=12) (I) and FVB/N (n=13-14) (J) mice. NEFA, non esterified fatty acid. Data are mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney tests (A, B, E-J) or two-way ANOVA with Šidák post-hoc tests (C, D). \*P<0.05, \*\*P<0.01..

**Supplemental Table 1. ChREBPβ deficiency through CRISPR-Cas9-mediated gene editing technology**

(A) Mice born after electroporation of SpyCas9 complexed to two single guide RNAs

Genetic strain	Nb of F0	Nb of mutated F0	Nb of mutated F0	
			with a single deletion > 500 bp	% mice of interest / F0
C57BL/6J	8	6	4	50
FVB/N	51	20	16	31
Both strains	59	26	20	34

(B) Numbers of litters and pups according to genotypes

Strain	Line	Nb of litters	Nb of pups	Nb of pups per litter	WT	Hemizygous	KO (nb/%)
					(nb/%)	(nb/%)	
C57BL/6J	32	42	313	7.5	80 / 26	147 / 47	86 / 27
	52	18	129	7.2	33 / 26	44 / 34	52 / 40
	<i>Both lines</i>	<i>60</i>	<i>442</i>	<i>7.4</i>	<i>113 / 26</i>	<i>191 / 43</i>	<i>138 / 31</i>
FVB/N	15	38	363	9.6	100 / 27	170 / 47	93 / 26
	34	4	30	7.5	11 / 38	13 / 43	6 / 20
	<i>Both lines</i>	<i>42</i>	<i>393</i>	<i>9.4</i>	<i>111 / 28</i>	<i>183 / 47</i>	<i>99 / 25</i>

Mice were from F2 generation and above were derived from matings of heterozygous parents.

WT, wild type mice; KO, ChREBPβ-knock-out mice.

**Supplemental Table 2. List of genes regulated in brown adipose tissue of ChREBP $\beta$ -deficient mice compared to brown adipose tissue of ChREBP $\alpha$  and  $\beta$ -deficient mice**

Common ChREBP $\alpha$ and $\beta$ Up-regulated	ChREBP $\beta$ -specific Up-regulated	Common ChREBP $\alpha$ and $\beta$ Down-regulated	ChREBP $\beta$ -specific Down-regulated
<i>Adra1d</i>	<i>Adrb3</i>	<i>Pgm3</i>	<i>AK086179</i>
<i>AK163904</i>	<i>Clqtnf7</i>	<i>Maff</i>	<i>A530010L16Rik</i>
<i>Armxc3</i>	<i>Enc1</i>	<i>Recql4</i>	<i>Tmprss9</i>
<i>Baalc</i>	<i>Epdr1</i>	<i>Dcaf6</i>	<i>AK047114</i>
<i>Car14</i>	<i>Espn</i>	<i>Cbfa2t3</i>	<i>Oprl1</i>
<i>Car3</i>	<i>Fam124a</i>	<i>Acot1</i>	<i>BC049352</i>
<i>Cbr3</i>	<i>Fbxw4</i>	<i>Fras1</i>	<i>Sik1</i>
<i>Ccdc3</i>	<i>Fgf1</i>	<i>Tjp3</i>	
<i>Cd274</i>	<i>Mutyh</i>	<i>Glul</i>	
<i>Chst11</i>	<i>Prrt4</i>	<i>Prss35</i>	
<i>Efemp1</i>	<i>Rspo4</i>	<i>Cldn22</i>	
<i>Esrrb</i>	<i>Tnk2</i>	<i>Cnst</i>	
<i>Fam20c</i>	<i>Trem3</i>	<i>Hemk1</i>	
<i>Fam222a</i>	<i>Trib3</i>	<i>Pdzk1ip1</i>	
<i>Fzd4</i>	<i>Trim80</i>	<i>Kit</i>	
<i>Gm14964</i>	<i>Tuba1a</i>	<i>Dmrtc1a</i>	
<i>Gm6756</i>	<i>Tuba8</i>	<i>Pth1r</i>	
<i>Gm8096</i>	<i>Zfp36l2</i>	<i>Tspan18</i>	
<i>Grb14</i>		<i>AK158867</i>	
<i>Gss</i>		<i>C81189</i>	
<i>Hipk3</i>		<i>Oxtr</i>	

<i>Krt79</i>	<i>Nudt4</i>
<i>Lgr6</i>	<i>Fam57b</i>
<i>Lhfpl2</i>	<i>Atp1a3</i>
<i>Lppr4</i>	<i>Ttc25</i>
<i>Lrtm1</i>	<i>BB211547</i>
<i>Neat1</i>	<i>Cpeb2</i>
<i>Ninl</i>	<i>Gm9112</i>
<i>Nnmt</i>	<i>Slc25a1</i>
<i>Npr3</i>	<i>Adcy10</i>
<i>Nr0b1</i>	<i>Sorl1</i>
<i>Nrxn2</i>	<i>Map6</i>
<i>Phgdh</i>	<i>Mlxipl</i>
<i>Plekhg6</i>	<i>Rhob</i>
<i>Pon1</i>	<i>Atp8a1</i>
<i>Prr32</i>	<i>Tekt1</i>
<i>Rnf182</i>	<i>Gm5126</i>
<i>Ryr2</i>	<i>March3</i>
<i>S100b</i>	<i>Slc27a1</i>
<i>Sesn2</i>	<i>Ccdc57</i>
<i>Slc40a1</i>	<i>Hyls1</i>
<i>Smyd4</i>	<i>Mc5r</i>
<i>Sncg</i>	<i>Prkab1</i>
<i>Trim67</i>	<i>Egln3</i>
<i>Vipr2</i>	<i>AK037550</i>
	<i>Tkt</i>



*Slc38a10*

*Gata6*

*Fabp5*

*Acsl5*

*Hmmr*

*Rgs16*

*Flrt1*

*Mapk8ip1*

*Fhdc1*

*Foxred2*

*Tmie*

*Aspg*

*Smoc1*

*Vps37d*

*Dock3*

*E130101M22*

*Focad*

*Ccdc92*

*Sqle*

*Phyhip*

---

**Supplemental Table 3. List of primers used in reverse transcription-quantitative PCR**

Gene name	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
<i>Mlxipl</i> (ChREBP $\alpha/\beta$ )	CACTCAGGGAATACACGCCTAC	ATCTTGGTCTTAGGGTCTTCAGG
<i>Mlxipl</i> (ChREBP $\alpha$ )	CGACACTCACCCACCTCTTC	TTGTTTCAGCCGGATCTTGTC
<i>Mlxipl</i> (ChREBP $\beta$ )	TCTGCAGATCGCGTGGAG	CTTGTCCC GG CATAGCAAC
<i>Fasn</i>	GCTGCGGAAACTTCAGGAAAT	AGAGACGTGTCACTCCTGGACTT
<i>Acaca</i>	GCCTCTTCTGACAAACGAG	TGACTGCCGAAACATCTCTG
<i>Scd1</i>	TACACCTGCCTCTTCGGGAT	GCCGTGCCTTGTAAGTTCTG
<i>Elovl6</i>	TGCAGGAAA ACTGGAAGAAGTCT	ATGCCGACCACCAAAGATAAA
<i>Srebf1</i>	GCATGCCATGGGCAAGTAC	TGTTGCCATGGAGATAGCATCT
<i>Srebf2</i>	CTCCTTTCTGCCTCTGGTTCTC	GCAAAATGCTCTCTGGTGCAA
<i>Ucp1</i>	CCTGCCTCTCTCGGAAACAA	TGTAGGCTGCCCAATGAACA
<i>Prdm16</i>	CAGCACGGTGAAGCCATTC	GCGTGCATCCGCTTGTG
<i>Cidea</i>	ATCACAACTGGCCTGGTTACG	TACTACCCGGTGTCCATTTCT
<i>Cpt1b</i>	CCGGAAAGGTATGGCCACTT	GAAGAAAATGCCTGTCGCCC
<i>Cox5b</i>	GCTGCATCTGTGAAGAGGACAAC	CAGCTTGTAATGGGTTCCACAGT
<i>Cox8b</i>	TGCGAAGTTCACAGTGGTTC	TCAGGGATGTGCAACTTCA
<i>Hprt</i>	TGGCCATCTGCCTAGTAAAGC	GGACGCAGCAACTGACATTTTC
<i>Cox1</i>	ACTATACTACTACTAACAGACCG	GGTTCTTTTTTTCCGGAGTA
<i>Ppia</i>	ACACGCCATAATGGCACTGG	CAGTCTTGGCAGTGCAGAT

## Nuclear hormone-sensitive lipase and TGF $\beta$ signaling in adipocyte

The work presented in the PhD thesis focuses on the adipocyte, the prototypical cell type of adipose tissue specialized in metabolism.

My thesis work was first devoted to the development and use of adipocyte culture models. A published review article details the *in vitro* models to investigate adipocyte biology. It delineates the pros and cons of *ex vivo* mature adipocyte cultures and progenitor cell culture models. These models do not fully recapitulate the phenotype of mature adipocytes in an *in vivo* context. The first objective of my PhD was to develop 3D cultures of murine adipocyte native progenitors in order to achieve higher differentiation than conventional existing 2D cultures. In this spheroid culture, we obtained adipocytes displaying a more mature phenotype, as shown by the formation of unilocular lipid droplets along with increased gene expression of mature adipocyte markers. This work was included in a joint publication with scientists at the Karolinska Institute of Stockholm who developed a similar technique using human progenitors.

The main research project during the PhD thesis has been the characterization of a new role of hormone-sensitive lipase (HSL) in the control of adipocyte phenotype and metabolism. This lipase has initially been identified as an enzyme catalyzing the hydrolysis of adipocyte triacylglycerol, a catalytic pathway named lipolysis. I investigated non enzymatic roles of HSL. We revealed the presence of HSL in adipocyte nucleus, a feature never reported. In this organelle, HSL participates to a transcriptional program controlled by the TGF $\beta$  signaling pathway. In adipocytes, TGF $\beta$  signaling was shown to promote tonic inhibition of mitochondrial biogenesis and oxidative metabolism, through repression of the expression of PGC-1 $\alpha$ , a master transcriptional co-activator. Oppositely, this pathway exerts a positive regulation on extracellular matrix production. The TGF $\beta$  signaling hence plays a central role in the control of adipocyte homeostasis between genes controlling mitochondrial metabolic activity and genes responsible for extracellular matrix deposition. Our work positions HSL as a cornerstone in this control. At the mechanistic level, HSL physically interacts with the TGF $\beta$ -activated transcription factor SMAD3 through constitution of a cell-specific non-canonical complex. The HSL/SMAD3 complex facilitates the transcription of extracellular matrix genes. We show that tonic inhibition of PGC-1 $\alpha$  expression requires an additional partner, the transcription factor and RNA-binding protein SFPQ. HSL/SMAD3 complex formation and nuclear translocation are induced in response to TGF $\beta$ , whereas the opposite occurs following protein kinase A-mediated phosphorylation of HSL in response to lipolytic stimuli with HSL shuttling from the nucleus to the lipid droplet. The shuttling of HSL between different cellular compartments ensures coupling of fatty acid mobilization, through its cytosolic lipase function, with control of their utilization, through its nuclear role in inhibiting oxidative metabolism. In obese mice, HSL accumulates in adipocyte nuclei. This phenomenon might contribute to the pathogenesis of obesity and insulin resistance, characterized by increased adipose tissue TGF $\beta$  signaling and defective adipocyte metabolism.

## Lipase hormono-sensible nucléaire et signalisation TGF $\beta$ de l'adipocyte

Le travail présenté dans cette thèse de doctorat s'intéresse à l'adipocyte, la cellule prototypique du tissu adipeux spécialisée dans le métabolisme.

Mon travail de thèse a d'abord été dédié au développement et à l'utilisation de modèles de culture d'adipocytes. Une revue publiée détaille les modèles d'études *in vitro* permettant l'étude de la biologie de l'adipocyte. Elle délimite les avantages et inconvénients des différentes techniques de maintien en survie d'adipocytes *ex vivo* et des modèles de culture cellulaire de progéniteurs. Cependant, ceux-ci ne récapitulent à l'heure actuelle que partiellement le phénotype de l'adipocyte mature retrouvé *in vivo*. Un premier objectif de ma thèse a été dès lors de développer un modèle de culture de progéniteurs adipocytaires murins en 3D, dans le but de favoriser leur différenciation en comparaison des cultures conventionnelles en 2D. Dans ces cultures de sphéroïdes, nous obtenons des adipocytes au phénotype plus mature, comme en témoigne la formation d'une gouttelette lipidique uniloculaire et une augmentation de l'expression génique des différents marqueurs de l'adipocyte mature. Ces travaux ont été inclus dans une publication commune avec des chercheurs du Karolinska Institute de Stockholm, qui ont développé un modèle similaire à partir de progéniteurs humains.

Le principal objectif de mes travaux de thèse a eu pour but de caractériser un nouveau rôle de la lipase hormono-sensible (LHS) dans le contrôle du phénotype et du métabolisme de l'adipocyte. Cette lipase a initialement été identifiée comme enzyme catalysant l'hydrolyse des triglycérides adipocytaires, une voie catabolique appelée lipolyse. Mes travaux de thèse ont eu pour but d'explorer de nouveaux rôles non enzymatiques de la LHS. Nous montrons ainsi que la LHS se localise au noyau de l'adipocyte, ce qui n'avait encore jamais été rapporté. Dans cet organite, la LHS participe au contrôle du programme transcriptionnel contrôlé par la voie TGF $\beta$ . Dans l'adipocyte, la voie TGF $\beta$  assure un tonus inhibiteur de la biogenèse mitochondriale et du métabolisme oxydatif, en inhibant notamment l'expression de PGC-1 $\alpha$ , un co-activateur clé de ces phénomènes. A l'inverse, cette voie est aussi responsable d'une régulation positive sur la production de matrice extracellulaire. La voie TGF $\beta$  est ainsi centrale dans le contrôle d'une homéostasie de l'adipocyte entre gènes contrôlant l'activité métabolique mitochondriale et gènes assurant la production de matrice extracellulaire. Nos travaux mettent en lumière la LHS comme pierre angulaire de ce contrôle. D'un point de vue mécanistique, la LHS interagit physiquement avec le facteur de transcription SMAD3, contrôlé par la voie TGF $\beta$ , formant un complexe non canonique et spécifique de l'adipocyte. Le complexe LHS/SMAD3 favorise la transcription des gènes de la matrice extracellulaire. Nous montrons que l'inhibition tonique de l'expression de PGC-1 $\alpha$  requiert en plus l'association d'un autre partenaire, SFPQ, facteur de transcription et protéine de liaison à l'ARN. La formation et la translocation nucléaire du complexe LHS/SMAD3 sont induites par une stimulation TGF $\beta$ , alors que les phénomènes inverses sont favorisés suite à la phosphorylation de la LHS par la PKA en réponse à un stimulus lipolytique, induisant la translocation de la lipase à la gouttelette lipidique. Les mouvements subcellulaires de la LHS vont ainsi permettre un couplage entre la libération d'acides gras, par sa fonction d'enzyme cytosolique, et le contrôle de leur utilisation, par son rôle nucléaire inhibant le métabolisme oxydatif. Nous mettons en évidence une accumulation de LHS dans le noyau de l'adipocyte au cours de l'obésité chez la souris. Ce phénomène pourrait participer à la pathogenèse de l'obésité et de la résistance à l'action de l'insuline, caractérisées par une augmentation de la signalisation TGF $\beta$  dans le tissu adipeux et des défauts de métabolisme adipocytaire.