

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier Cédric MORO et Julien PACCOU d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse et Audrey CARRIERE et Nicolas VENTECLEF d'avoir accepté d'être examinateurs.

Je remercie Romain CAPOULADE et Nicolas VENTECLEF, en tant que membres de mon comité de suivi individuel, pour leurs précieux conseils pendant ces 3 années de thèse.

Ensuite, je remercie les directeurs des deux laboratoires de recherche dans lesquels j'ai effectué ma thèse, Jérôme GUICHEUX et Pierre WEISS au laboratoire RMeS (U1229) et Richard REDON et Gervaise LOIRAND à l'institut du thorax (U1087) pour m'avoir aussi bien accueilli pendant ces années.

À ma directrice de thèse, Sarah BECK-CORMIER, et mon co-directeur de thèse, Laurent BECK, il y a maintenant plus de six ans que j'ai intégré votre groupe de recherche pour mon stage de licence, quand j'étais toute petite comme vous aimez si bien le rappeler.

Sarah, je suis très contente de t'avoir « harcelée » pour ce stage de licence (j'appellerais ça plutôt de la ténacité mais bon) parce que ça marque le début de ce projet et de ces 6 ans de travail à tes côtés. Alors merci de m'avoir fait confiance, de m'avoir donné toutes les clés pour parvenir jusqu'ici et de ne pas m'avoir lâchée. Je te remercie pour ton soutien et de t'être toujours rendue disponible dès que j'en avais besoin.

Laurent, je te remercie pour ta bienveillance, tes conseils avisés et ton regard neuf sur ce projet qui nous a permis de toujours prendre du recul pour pouvoir mieux avancer. Je te remercie d'avoir été un bon adversaire au palet (je te battrais un jour). Et bien sûr, tes petites histoires avant chaque réunion vont me manquer !

Je ne vous remercierais jamais assez pour votre aide précieuse, votre soutien sans faille, votre formation, votre passion pour la science et le plus important la brioche de Sarah et vos BBQ. Je n'aurais jamais pu rêver meilleure directrice/directeur que vous. Je suis extrêmement contente d'avoir vécu cette expérience qu'est la thèse à vos côtés. J'espère que vous serez fiers du travail que l'on a accompli ensemble. Encore merci. Ça devient peut-être un peu lourd les mercis. Mais vraiment MERCI !!!!

Je tiens à remercier également Xavier PRIEUR pour son expertise sur le tissu adipeux, sa collaboration, son temps et son aide tout au long de ces 3 années. C'est un plaisir de t'accueillir comme invité à ma soutenance de thèse.

Je remercie toutes les personnes qui ont travaillé de près ou de loin sur ce projet, Marie, Rola, Séverine, Caroline, Marie-Aude, Mathieu et tout particulièrement Sophie et Stéphanie. Je vous remercie pour toutes les expériences faites ensemble, toutes les interactions, les relectures de papier et votre collaboration sur ce projet.

Ma thèse a porté exclusivement sur le modèle murin, donc un grand merci à l'UTE et aux animaliers pour leur aide apportée à mes petites souris et sans discrimination qu'elles soient grosses, maigres ou petites. Je remercie également toutes les plateformes qui ont contribué à mon projet de thèse, CIMA, Sc3M, MicroPicell et MShark.

J'ai eu l'immense chance de travailler dans deux laboratoires au cours de ma thèse. J'ai donc rencontré deux fois plus de personnes incroyables. Et je tiens à remercier tous les membres des deux laboratoires de recherche pour leur soutien et leurs conseils tout au long de cette thèse.

Plus particulièrement je tiens à remercier le bureau 111 de RMeS pour tous les moments partagés pendant 3 ans.

Giulia, merci de m'avoir prise sous ton aile pendant ma licence. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir formé. Même si tu es parti avant que je ne commence ma thèse, tu as toujours été présente et tu m'as toujours soutenue alors merci pour ça. Ce

travail de thèse a débuté avec toi et je suis très heureuse que tu sois là pour ma soutenance. Special guest d'Italie c'est quand même la classe.

Anaïs, mon petit rayon de soleil, tu es une personne formidable. Je te remercie pour tous tes conseils, que ce soit d'ordre professionnel ou personnel. Tu m'as toujours soutenue et encouragée dans tout ce que je voulais faire. Merci pour ta bonne humeur, nos moments de rigolade et de bouffe. Je suis très heureuse de t'avoir rencontré, toi et ta petite famille trop mignonne. Pour moi, tu es une brillante scientifique et tu seras un jour une brillante chercheuse. Je n'en ai pas le moindre doute. Je n'aurai pas de special guest du Canada mais je penserai très très fort à toi. Continue d'être la personne attentionnée, gourmande, gentille et drôle que tu es.

Solène, maman Solène, merci d'avoir pris soin de moi pendant toutes ces années. De m'avoir engueulé parce que je ne rangeais pas mon bureau, que je ne mangeais pas, que je travaillais trop ou faisais n'importe quoi qui t'énervais. Merci d'être passé mettre des mots d'amour sur mon bureau (ou pour dire de le ranger) quand je n'étais pas là qui me faisait toujours chaud au cœur. Peut-être qu'un jour j'aurais la chance d'être invité pour un BBQ pour que Will nous fasse des frites... En attendant, merci d'avoir été là pour moi et d'avoir été une très bonne concurrente au meilleur pâtissier du bureau 111 !!

Nina, tu n'étais pas au bureau 111 quand j'y étais mais tu y étais en thèse donc 111 un jour, 111 toujours. Je te remercie pour ta formation exemplaire quand je suis arrivée en licence et ton soutien tout au long de ces années. Tu es une personne pétillante, entière et brillante. Ils ont de la chance de t'avoir à la transition écologique.

Sébastien, merci pour ton énergie débordante, ta gentillesse, tes pains au chocolat, croissants et rochers de chez Guerlais en venant de la gare.

Paul, merci pour ton enthousiasme sans faille pour aller boire une bière ou faire un futsal.

Baptiste, merci d'avoir essayé de courir avec moi, merci de m'avoir apporté des crêpes à l'IRS quand tu en amenais pour RMeS.

Nathan et Lily, merci pour les apéros chez vous, les petits potins et pour votre bonne humeur à tous les deux.

Je remercie également tous les ITA de RMeS avec qui j'ai pu travailler. Merci Joëlle d'avoir pris du temps pour me former à l'analyse d'image. Merci Boris de m'avoir formé à la culture cellulaire. Merci Maëva et Yoan pour leur aide en histologie. Et tout particulièrement, merci Sophie d'avoir été là et de m'avoir aidé en biologie moléculaire. Ton aide précieuse a permis de faire avancer ce travail beaucoup plus vite et je t'en remercie grandement.

La fin de ma première année de thèse a été particulièrement difficile. C'était la fin de mon aventure à RMeS. Je quittais un laboratoire avec des personnes attachantes et formidables. Je n'avais pas envie de partir. On sait ce qu'on quitte mais on ne sait jamais ce qu'on retrouve. Je débute ainsi ma deuxième année de thèse à l'institut du thorax. Et finalement, je découvre des gens plutôt sympathiques. Même vraiment très sympas. En général, je découvre et j'apprécie énormément la solidarité, l'entraide et les moments « hors science » dans cette équipe.

Tout d'abord, je remercie Gervaise et Vincent pour leur accueil dans cette nouvelle équipe. L'insertion dans un nouveau labo n'est pas toujours facile mais vous m'avez tout de suite très bien intégrée en se souciant toujours de savoir comment ça se passait. Merci Vincent de demander à chaque fois que tu passes dans notre bureau « ça va ? ». Et surtout, merci merci merci merci pour la machine à café sans laquelle je n'aurais pas pu tenir !!!!

Ensuite, je remercie les « jeunes » de l'équipe, Maxence, Manon, Mary-Adel, Hugo, Corentin, Tom et Dorian pour tous nos moments en dehors du laboratoire.

Merci Maxence (alias bichette) pour ta bonne humeur, ton enthousiasme, ton appart à Londres et les cafés pas bons que tu choisissais pour la machine à café. Tu es

quelqu'un d'authentique et de très rigolo, ne change pas et je te souhaite une très bonne fin de thèse. Fait attention à Mr CHATÉ pour moi stp. PS : T'es un malade.

Merci Manon pour ta générosité, ta disponibilité pour parler de tous les sujets et tes histoires plus incroyables les unes que les autres. Ta venue pour ton master 2 a été beaucoup trop courte, j'aurais aimé passer plus de moments à tes côtés. J'espère de tout cœur que Thibaut pourra te prendre en thèse pour que tu puisses continuer l'aventure avec les autres zigotos.

Mary Adel, ça a été un plaisir de discuter en anglais avec toi. Et surtout, n'arrête jamais tes punchlines pour les gars parce que vraiment t'es trop drôle. Moi je me casse donc tu dois continuer pour moi !

Je remercie également Morgane pour ta gentillesse et tous tes super gâteaux parce que vraiment ils sont trop bons. Céline et Marie-Aude, merci pour vos aides à l'animalerie dès que j'en avais besoin et les pauses café du matin. Anne-Clémence, j'ai été honorée de faire partie de ton secrétariat personnel pendant 1 an. Merci pour tes apparitions surprises dans nos conversations et surtout pour avoir réparé ma robe préférée !!!! Marc merci pour ton humour et je te souhaite une excellente thèse !

Pour finir, il y a deux personnes qui ont été vraiment très importantes pendant cette thèse. Merci à mes deux acolytes Julie et Nathan.

Julie, je suis plus que ravie d'avoir débuté ma thèse en même temps que toi. Je n'aurais pas pensé trouver une réelle amie. Tu as toujours été un énorme soutien autant d'un point de vue personnel que pour la thèse. Merci pour tous ces moments partagés, le spectacle de Noël, Vienne, le Délirium, Odyssée... Comme ma chère Anaïs, je suis convaincue que tu vas devenir une chercheuse brillante, n'en doute jamais. Et j'ai hâte de venir te voir à Dresde quand tu t'y seras installé !

Nathan, dois-je parler de mon collègue Nathan CHATÉ ou de mon ami Nat Nat ? Ce que je peux dire sur mon ami Nathan c'est que je suis fière de la personne, du grand sportif et du poète qu'il est. Et que je suis ravie, qu'en plus d'être mon ami depuis 5

ans il est devenu mon collègue pendant 2 ans. Ces deux dernières années n'auraient pas été les mêmes sans toi. Sache que même si on se chamaille beaucoup, que tu m'insultes et que je t'harcèle avec mon fond d'écran je suis plus qu'heureuse que tu aies rejoint l'aventure de la thèse à mes côtés. Merci d'être un ami et collègue drôle, attentionné, compatissant et prévoyant (rétroplanning tout ça tout ça). A la fin de cette thèse je suis en même temps très triste de dire au revoir à mon collègue Nathan CHATÉ et très contente de retrouver mon ami Nat Nat !

Je tiens également à remercier ma famille pour m'avoir soutenue pendant toute cette période, d'être tellement emballée par ce que je fais qu'on me demandait tout le temps quand était ma soutenance (même quand je venais de commencer), surtout toi mamie, et d'être présent à ma soutenance de thèse. Merci maman d'avoir été la meilleure des mamans. Merci papa pour ton soutien et surtout pour m'avoir permis de me changer les idées pendant les vacances avec 3 destinations incroyable. Merci Pierre d'avoir gardé bb Nala et d'avoir pris soin d'elle dès que je partais. Je vous aime.

Je remercie également mes amis qui ont toujours été là pour moi. Plus particulièrement merci aux BGD LN. Merci Anaël pour tes conseils toujours avisés, ton écoute et ta bonne humeur. Merci d'être venue à Portaventura avec moi parce que j'en avais besoin. Tu nous manques depuis que tu es à Toulouse, reviens vite. Merci Emma de me laisser t'embarquer partout où je veux aller pour me changer les idées, chercher des glaces, des cookies, des gaufres ou des vêtements et de boire du pétillant avec moi. Merci Mélissa pour ta folie, ton optimisme et tes maladresses qui nous font beaucoup rire. Vous êtes les meilleures amies que l'on puisse avoir, 8 ans que l'on se connaît mais ce n'est que le début.

Merci aux copains, Sylvain, Gabriel, Raphaël, Quentin, Félix et Manon toujours présents pour boire un verre et jouer aux fléchettes quand on sortait d'une dure journée (ou pas).

Merci aux amies de longues dates, Claire et Elvire parce qu'après toutes ces années vous êtes toujours à mes côtés. Merci de m'avoir hébergée à chaque déplacement à Paris et d'être là dès que j'ai besoin de vous.

Un merci particulier à ma Nala d'amour. Même si elle ne lira pas ce message, je tiens à lui exprimer ma reconnaissance. Elle m'accompagne depuis maintenant plus de 11 ans et grâce à elle je n'ai jamais été seule depuis ce jour.

Pour finir, merci mon amour. Merci d'être présent depuis 5 ans. Merci d'avoir été à l'écoute, d'avoir cru en moi et d'avoir pris soin de moi et de bébé Nala pendant ces années. Merci d'avoir relu mon manuscrit pour corriger mes fautes d'orthographe. Je suis fier de toi et de ce que tu as accompli entre la Datsun et ton nouveau travail. Je suis heureuse de t'avoir dans ma vie. Je t'aime.

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
LISTE DES FIGURES	3
LISTE DES TABLEAUX	5
LISTE DES ACRONYMES	6
PREAMBULE	9
INTRODUCTION	11
I. LE METABOLISME ENERGETIQUE	11
1. LES TISSUS ADIPEUX	14
A. <i>Distribution des tissus adipeux</i>	14
a. Les tissus adipeux périphériques	14
b. Le tissu adipeux médullaire	16
B. <i>Origine et développement des tissus adipeux</i>	18
C. <i>Fonctions des tissus adipeux</i>	21
a. Stockage et libération de l'énergie	22
i. Stockage de l'énergie et lipogenèse.....	22
ii. Libération de l'énergie et lipolyse	26
b. La thermogenèse	29
i. Thermogenèse dépendante d'UCP1	32
ii. Thermogenèse indépendante d'UCP1	33
c. Fonction endocrine des tissus adipeux.....	41
2. PATHOLOGIES ASSOCIEES A UN DEREGLEMENT DE LA BALANCE ENERGETIQUE.....	45
A. <i>Balance énergétique positive : l'obésité</i>	45
B. <i>Balance énergétique négative : l'anorexie mentale</i>	47
II. LES PROTEINES PITS : SLC20A1/PIT1 ET SLC20A2/PIT2	49
1. PROFIL D'EXPRESSION DES PROTEINES PIT	51
2. MULTIFONCTIONNALITES	53
A. <i>Rôle de Pit1 dans le métabolisme glucidique</i>	54
B. <i>Rôle des Pit1 dans la survie et la fonction des myocytes</i>	56
C. <i>Rôle des Pit1 dans le cerveau</i>	57
D. <i>Rôle de Pit2 dans les tissus adipeux</i>	60
OBJECTIFS DE MON TRAVAIL DE THESE	65
RESULTATS	66
I. ROLE DE PIT2 DANS LE METABOLISME ENERGETIQUE	66
1. L'ABSENCE DE PIT2 CHEZ LA SOURIS ENTRAINE UNE AUGMENTATION DE L'ACTIVITE DU TISSU ADIPEUX BRUN	66
2. EFFET DE L'ABSENCE DE PIT2 DANS UN MODELE D'OBSITE INDUITE	71
II. IDENTIFICATION DES MECANISMES D'ACTION DE PIT2 DANS LA REGULATION DU METABOLISME ENERGETIQUE	79
1. EFFET DE L'ABSENCE DE PIT2 SPECIFIQUEMENT DANS LES ADIPOCYTES	79
2. ROLE DE PIT2 SPECIFIQUEMENT DANS L'HYPOTHALAMUS	82
III. REGULATION DES VOLUMES OSSEUX ET ADIPEUX DES SOURIS SLC20A2^{-/-} EN CONDITIONS PATHOLOGIQUES	84
1. EFFET DE L'ABSENCE DE PIT2 LORS DE DESEQUILIBRE DE LA BALANCE ENERGETIQUE.....	85
A. <i>Effet de l'absence de Pit2 dans un modèle d'obésité induite</i>	85
B. <i>Effet de l'absence de Pit2 dans un modèle de restriction calorique</i>	87

2. EFFET DE L'ABSENCE DE PIT2 DANS UN MODELE D'OSTEOPENIE INDUITE PAR OVARECTOMIE.....	92
DISCUSSION.....	95
LISTE DE PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....	104
REFERENCES.....	106

Liste des figures

Figure 1 : L'équilibre énergétique.....	11
Figure 2 : Régulation hormonale de l'équilibre énergétique par différents organes.....	13
Figure 3 : Répartition des tissus adipeux blancs, beiges, bruns et médullaire chez l'humain et la souris.....	15
Figure 4 : Evolution de la répartition des dépôts de graisse blanche et brune chez l'homme et la femme.....	16
Figure 5 : Différence entre le BMAT proximal et distal.....	17
Figure 6 : Origine développementale des adipocytes blancs, beiges et bruns.....	18
Figure 7 : Transdifférenciation des adipocytes blancs et beiges.....	19
Figure 8 : Différenciation des cellules souches de la moelle osseuse en adipocytes ou en ostéoblastes.....	20
Figure 9 : Voie de signalisation du stockage et de la libération de l'énergie dans les adipocytes.....	24
Figure 10 : Mécanismes d'action de l'insuline.....	26
Figure 11 : Les acteurs de la lipolyse dans les tissus adipeux.....	27
Figure 12 : La moelle osseuse humaine est composée d'adipocytes au métabolisme lipidique spécifique.....	29
Figure 13 : Les voies thermogéniques dépendante et indépendantes d'UCP1.....	31
Figure 14 : Contrôle positif de la transcription du gène Ucp1.....	33
Figure 15 : Mécanisme d'action du cycle futile des lipides.....	37
Figure 16 : Mécanisme d'action du cycle futile calcique.....	38
Figure 17 : Neurones mis en jeu dans le contrôle central du métabolisme énergétique.....	42
Figure 18 : Tissus cibles et activité biologique de l'adiponectine.....	43
Figure 19 : Les cibles et les effets de FGF21.....	44
Figure 20 : Principales caractéristiques des cotransporteurs Na-Pi.....	49
Figure 21 : Topologie et structure 3D des protéines PiTs à la membrane.....	51
Figure 22 : Profil d'expression de Slc20a1/PiT1 et Slc20a2/PiT2.....	52
Figure 23 : Mécanismes d'action de PiT1 modulant la boucle de rétrocontrôle négative de l'insuline.....	56

Figure 24 : Schéma suggérant la signalisation métabolique du phosphate dans les myocytes.....	57
Figure 25 : Expression des Slc20a dans le cerveau chez la souris.....	59
Figure 26 : Volume de BMAT chez les souris <i>Slc20a2</i> ^{-/-}	62
Figure 27 : Les souris <i>Slc20a2</i> ^{-/-} présentent une diminution de leur masse corporelle.....	63
Figure 28 : Analyse de l'absence de PiT2 sur les régulateurs de FGF21.....	69
Figure 29 : Régulation de l'axe GH/IGFI et impact sur les organes cibles.....	70
Figure 30 : Fresque chronologique des différents lots de souris soumises à un régime riche en gras.....	71
Figure 31 : L'inactivation de PiT2 protège contre l'obésité et la stéatose hépatique induites par le régime riche en gras chez les souris mâles.....	73
Figure 32 : La résistance à l'obésité est dépendante de la thermogenèse.....	75
Figure 33 : Analyse du lot 3 de souris soumises à un régime riche en gras.....	76
Figure 34 : Effet de l'absence de PiT2 spécifiquement dans les adipocytes.....	80
Figure 35 : Expression de <i>Slc20a2</i> dans l'hypothalamus.....	82
Figure 36 : Validation de l'inactivation de <i>Slc20a2</i> dans l'hypothalamus.....	83
Figure 37 : Effet de l'absence de PiT2 sur les volumes osseux et adipeux dans un modèle d'obésité chez les souris mâles âgées de 22 semaines.....	86
Figure 38 : Effet de l'inactivation de PiT2 dans un modèle de restriction calorique chez des souris femelles.....	90
Figure 39 : Effet de l'inactivation de PiT2 sur les tissus adipeux périphériques dans un modèle d'ostéoporose post-ménauposale.....	94
Figure 40 : Localisation de l'iLoop2 dans le noyau.....	101
Figure 41 : Proposition de mécanismes sur l'effet de l'absence de FHL2 dans un modèle d'obésité.....	102

Liste des tableaux

Tableau I : Résumé des différentes voies thermogéniques et les protéines impliquées.....	39
Tableau II : Fonctions des protéines PiT1 et PiT2 dépendantes ou indépendantes de leur capacité à transporter le phosphate.....	54
Tableau III : Tableau récapitulatif des variations des tissus adipeux périphériques et des volumes osseux et adipeux lors du vieillissement, de l'obésité, de la restriction calorique et de l'ostéoporose chez une souris contrôle.....	84

Liste des acronymes

α -MSH : α -Melanocyte-Stimulating Hormone

AC : Adénylyl cyclase

ACC : Acétyl-CoA carboxylase

ACL : ATP Citrate Lyase

ACS : Acyl-CoA Synthase

ADRB : Adrenergic Receptor β

AG : Acide Gras

AGPAT : 1-Acylglycerol-3-Phosphate O-Acyltransferase

AgRP : Agouti-related Protein

AMPc : Adénosine-monophosphate cyclique

ANP : Atrial Natriuretic Peptide

ATGL : Adipose TriGlyceride Lipase

ATP : Adénosine-triphosphate

AQP : Aquaporine

ARC : Noyau Arqué

BAT : Brown Adipose Tissue

BMAT : Bone Marrow Adipose Tissue; rBMAT : regulated BMAT; cBMAT : constitutive BMAT

CKMT : Creatine Kinase Mitochondrial

CPT1 : Carnitine Palmitoyltransferase 1

Cr : Creatine

CR : Caloric Restriction

CS : Citrate Synthase

CSM : Cellule Stromale Mesenchymateuse

DAG : Diacylglycerol

DGAT : Diacylglycerol O-AcylTransferase

FABP : Fatty Acid Binding Protein

FAS : Fatty Acid Synthase

FATP : Fatty Acid Transport Protein

FGF : Fibroblast Growth Factor

G3P : Glycerol-3-Phosphate

GATM : Glycine Amidinotransferase, Mitochondrial

GDM : Mitochondrial Glycerol-3-phosphate Déhydrogénase

GH : Growth Hormone

GK : Glycerol Kinase

GLP-1 : Glucagon-like Peptide 1

GLUT4 : Glucose Transporter Type 4

GMPc : Guanosine Monophosphate cyclique

GPAT : Glycérol-3-Phosphat-O-AcylTransférase

GPD1 : Glycérol-3-Phosphate Déshydrogénase 1

GHS : Growth hormone secretagogue

GSK3 β : Glycogène Kinase Synthase 3 β

HSL : Hormone Sensitive Lipase

IGF : Insulin Growth Factor

IR : Insulin Receptor

LEPR : Leptin Receptor

LPL : Lipoprotéine Lipase

MAG : Monoacylglycerol

MALP : Marrow Adipogenic Lineage Precursors

MAP1B : Microtubule-Associated Protein 1B

MAPK : Mitogen-activated Protein Kinase

MC4R : Récepteur aux mélanocortides

MCP1 : Mitochondrial adapter Protein 1

MEF : Mouse Embryonic Fibroblasts

MGLL : MonoGlyceride Lipase

MiCK : Mitochondrial Creatine Kinase

NA : Noradrénaline

NEFA : Non Esterified Fatty Acid

NPY : Neuropeptide Y

ORX : Orchidectomie

OVX : Ovariectomie

PCK : Phosphocreatine Kinase

PCr-ase : Phosphocréatine Phosphatase

PDE3B : Phosphodiesterase 3B

PDH : Pyruvate DesHydrogenase

PiT : Phosphate inorganic Transporter

PI3K : PhosphoInositide 3-Kinase

PIP3 : PhosphatidyInositol-3,4,5-trisPhosphate

PKA/G : Protein Kinase A/G

POMC : Pro-opiomelanocortin

PPAR : Peroxisome proliferator activated receptor

PVH : Noyau Paraventriculaire de l'Hypothalamus

RE : Réticulum Endoplasmique

RUNX2 : Runt Related protéin 2

Ryr : Ryanodine Receptor

S6K : protéine Kinase S6

SERCA2b : Sarco/endoplasmic Reticulum Ca²⁺ -ATPase

SNC : Système Nerveux Central

SREBP1C : Sterol Regulatory Element Binding Transcription Factor 1

SSC : Skeletal Stem Cell

TA : Tissu Adipeux

TG : Triglycéride

TGF : Transforming Growth Factor

TNAP : Alkaline Phosphatase

UCP1 : Uncoupling Protein 1

USP7 : Ubiquitin-Specific Peptidase 7

VCO₂ : Production de dioxyde de carbone

VO₂ : Consommation d'oxygène

WAT : White Adipose Tissue ; iWAT : inguinal WAT ; gWAT : gonadique WAT

PREAMBULE

Mon projet de thèse a émergé d'une observation du groupe de recherche dans lequel j'effectue ma thèse montrant que le transporteur de phosphate *Slc20a2*/PiT2, en plus de son rôle important dans la minéralisation et la qualité du tissu osseux (Beck-Cormier *et al.*, 2019), joue un rôle dans le volume de l'adiposité médullaire. En effet, le volume d'adiposité médullaire chez les souris invalidées pour PiT2 n'augmente pas avec l'âge, contrairement à ce qui est observé chez les souris contrôles (Frangi *et al.*, 2022). A partir de cette observation, nous avons émis l'hypothèse que *Slc20a2*/PiT2 pouvait jouer un rôle dans les tissus adipeux intra- et extra-médullaires et dans le métabolisme énergétique.

Dans l'introduction, nous décrivons la fonction des tissus adipeux intra- et extra-médullaires dans le métabolisme énergétique, et particulièrement la thermogenèse sans frisson. Ensuite, deux pathologies associées à un dysfonctionnement du métabolisme sont brièvement décrites : l'obésité et la restriction calorique. Dans une deuxième partie, nous présentons les deux protéines multifonctionnelles de la famille des co-transporteurs sodium-phosphate de type III : *Slc20a1*/PiT1 et *Slc20a2*/PiT2.

L'introduction est suivie d'une première partie, Résultats, sous forme d'articles scientifiques publiés ou en cours de publication montrant le rôle de PiT2 dans la régulation des tissus adipeux périphériques dans un modèle murin de souris invalidées pour PiT2 (*Slc20a2*^{-/-}) en conditions physiologiques et dans un modèle d'obésité. La deuxième partie est consacrée à la présentation des résultats préliminaires des travaux dont l'objectif était de comprendre les mécanismes d'action de PiT2 dans la régulation du métabolisme énergétique en utilisant deux modèles murins : un modèle d'invalidation de PiT2 dans les adipocytes (*Slc20a2*^{AdKO}) et un modèle d'invalidation de PiT2 dans l'hypothalamus (*Slc20a2*^{AAV-shPiT2}). Pour finir, nous présentons le rôle de PiT2 dans la régulation des volumes osseux et de l'adiposité médullaire dans trois contextes pathologiques que sont l'obésité, la restriction calorique et l'ostéoporose postménopause induite par ovariectomie.

Le manuscrit se conclut par une discussion qui offre une synthèse générale de mes travaux de thèse, récapitule les connaissances dans ce domaine et propose de nouvelles perspectives.

INTRODUCTION

I. Le métabolisme énergétique

Le métabolisme énergétique résulte d'un équilibre entre les apports énergétiques et la dépense énergétique (Figure 1). L'alimentation apporte l'énergie nécessaire à l'organisme tandis que le métabolisme basal (fonctions cardiaque, respiratoire, cérébrale, digestive), l'activité physique et la thermogenèse utilisent l'énergie nécessaire au bon fonctionnement de l'organisme (Hill, Wyatt and Peters, 2012).

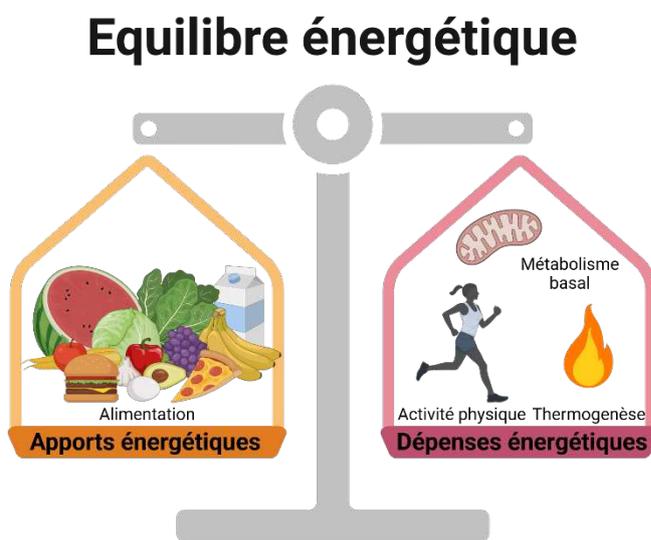


Figure 1 : L'équilibre énergétique. Le métabolisme énergétique résulte d'un équilibre entre les apports énergétiques via l'alimentation et les dépenses énergétiques comme le métabolisme basal, l'activité physique et la thermogenèse.

(Réalisé avec BioRender.com)

L'équilibre du métabolisme énergétique fait intervenir différents organes comme l'intestin, les tissus adipeux, le cerveau, les muscles, le foie et le pancréas qui communiquent entre eux afin d'adapter leur activité au statut nutritionnel (Figure 2) (Castillo-Armengol, Fajas and Lopez-Mejia, 2019). Le système nerveux central (SNC) est le chef d'orchestre du maintien de la balance énergétique. Suite à un stimuli (situation post-prandiale ou jeûne), le SNC reçoit et intègre les signaux afférents provenant des organes périphériques permettant une réponse métabolique adaptée (Myers and Olson, 2012).

En condition post-prandiale, l'ingestion de nourriture stimule la sécrétion de plusieurs molécules telles que le GLP-1 (glucagon-like peptide-1), la sécrétine et le LEAP2 (liver-expressed antimicrobial peptide 2). Ces hormones intestinales signalent au cerveau qu'il faut réduire la prise alimentaire (Gutzwiller *et al.*, 1999; Y. Li *et al.*, 2018; Hagemann *et al.*, 2022). Le GLP-1 et la sécrétine stimulent également la sécrétion d'insuline et inhibent celle du glucagon par le pancréas. À son tour, l'insuline favorise la production de glycogène et l'absorption du glucose dans les muscles et, dans le foie, diminue la production de glucose (gluconéogenèse) et augmente la lipogenèse. L'insuline augmente également l'absorption du glucose et la lipogenèse à partir du glucose et des triglycérides (TG) circulants dans les tissus adipeux (Dimitriadis *et al.*, 2021). La leptine, produite par les adipocytes blancs, agira dans le SNC pour réprimer la prise alimentaire (Meister, 2000) (Figure 2A).

En condition de jeûne, la ghréline est sécrétée par l'intestin et se fixe à son récepteur GHS (Growth hormone secretagogue) dans l'hypothalamus pour augmenter la prise alimentaire (Poher, Tschöp and Müller, 2018). La sécrétion pancréatique de glucagon est également augmentée par la ghréline et par de faibles concentrations de glucose dans le sang. Le glucagon cible le foie pour diminuer la glycolyse et augmenter la gluconéogenèse et la glycogénolyse hépatiques, ainsi que le tissu adipeux blanc pour augmenter la lipolyse (Zeigerer *et al.*, 2021). La ghréline peut favoriser l'adiposité en augmentant la synthèse des lipides et en réduisant l'oxydation des acides gras (AG). Le jeûne stimule également la sécrétion d'adipokines, l'asprosinine et l'adiponectine, qui agissent par l'intermédiaire du cerveau pour réduire la dépense énergétique et favoriser la prise alimentaire (Fang and Judd, 2018; Farrag *et al.*, 2022). L'asprosinine peut également augmenter la gluconéogenèse hépatique, tandis que l'adiponectine réduit la lipogenèse et augmente l'oxydation des AG hépatiques. L'augmentation des concentrations hépatiques de FGF21 (Fibroblast growth factor 21) dans des conditions de jeûne accroît la lipolyse dans les tissus adipeux (Figure 2B).

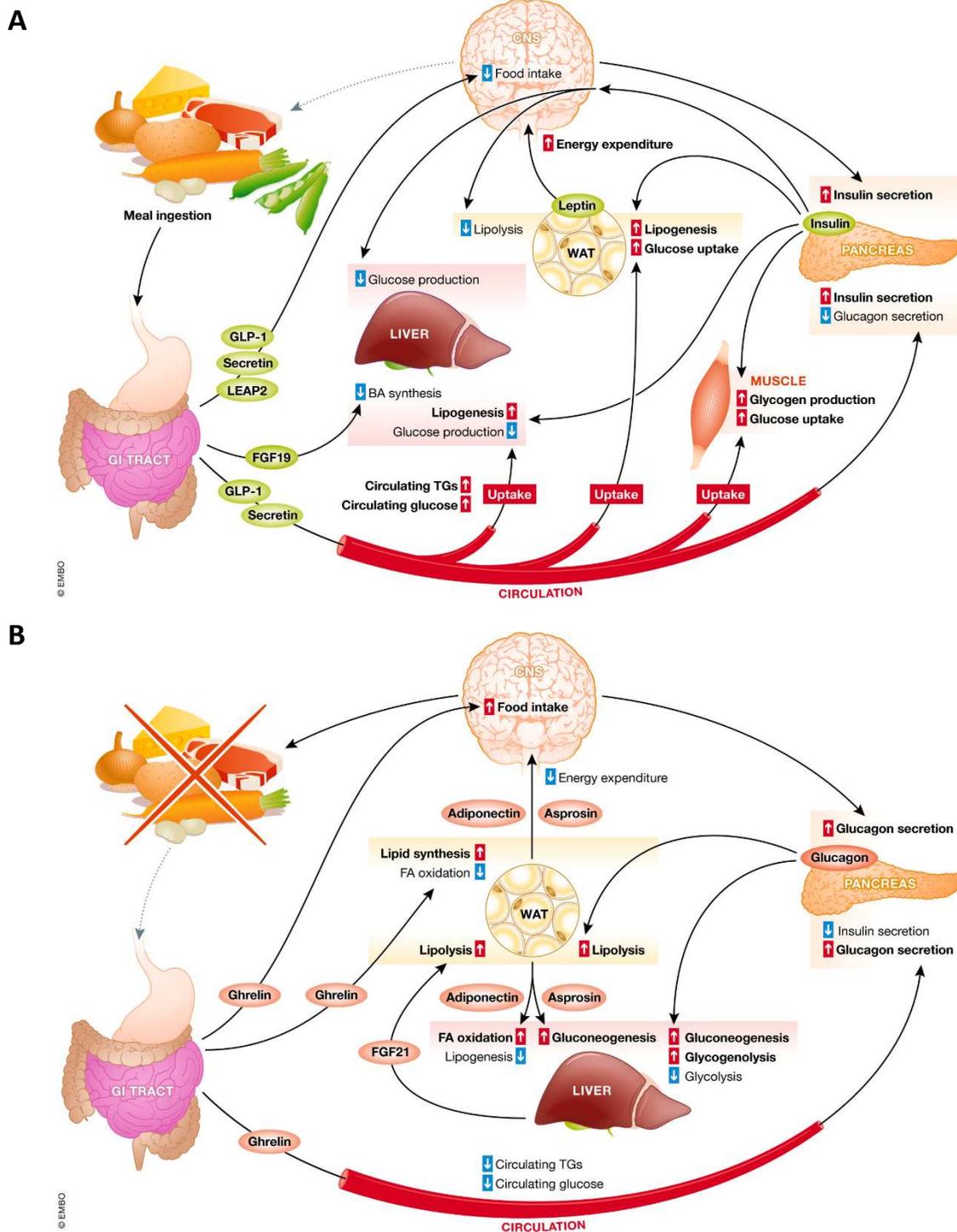


Figure 2 : L'équilibre énergétique est finement régulé par différentes hormones sécrétées par plusieurs organes. A. Communication inter-organes en condition post-prandiale. B. Communication inter-organes en condition de jeûne. (Castillo-Armengol, Fajas and Lopez-Mejia, 2019)

1. Les tissus adipeux

Les tissus adipeux (TA) sont une composante majeure de la régulation du métabolisme énergétique. Il existe différents types de TA ayant des fonctions et des localisations propres dans l'organisme (Peng *et al.*, 2024).

Les TA périphériques, ou extra-médullaires, sont constitués du tissu adipeux blanc (white adipose tissue, WAT) et du tissu adipeux brun (brown adipose tissue, BAT). Le WAT est l'organe principal de stockage des lipides tandis que le BAT, avec les adipocytes beiges présents dans le WAT, ont pour fonction principale la production de chaleur, par un processus appelé thermogénèse. Le tissu adipeux médullaire (bone marrow adipose tissue, BMAT) se distingue par une localisation propre au sein de la moelle osseuse et participe à l'homéostasie des niches osseuse et hématopoïétique.

A. Distribution des tissus adipeux

a. Les tissus adipeux périphériques

Le WAT est le plus abondant chez les mammifères. Les adipocytes blancs ont une taille allant de 25 à 200 μm de diamètre chez la souris. Il existe deux grands types de tissus adipeux blancs qui diffèrent par leur localisation : le tissu adipeux viscéral qui comprend les tissus adipeux mésentérique, omental, rétropéritonéal, péricardique et gonadique, et le tissu adipeux sous-cutané retrouvé au niveau inguinal (Figure 3). Le tissu adipeux brun (BAT) est localisé au niveau cervical, supraclaviculaire, axillaire, périaortique, paravertébral et périnéal chez l'humain. Les adipocytes bruns sont plus petits que les adipocytes blancs avec une taille allant de 15 à 60 μm de diamètre. Chez la souris, le BAT est principalement localisé au niveau interscapulaire mais également au niveau cervical et paravertébral et les adipocytes beiges thermogéniques sont retrouvés au niveau inguinal (Frontini and Cinti, 2010) (Figure 3).

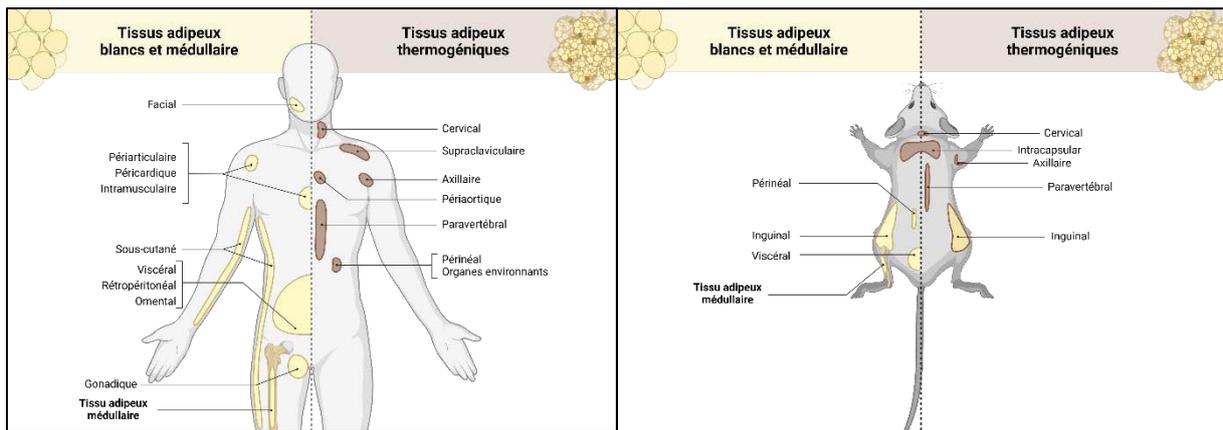


Figure 3 : Répartition des tissus adipeux blancs, beiges, bruns et médullaire chez l'humain et la souris. Les tissus adipeux blancs se retrouvent au niveau facial, périarticulaire, péricardique, intramusculaire, sous-cutané, viscéral, rétropéritonéal et gonadique chez l'humain et au niveau périnéal, inguinal et viscéral chez la souris. Le tissu adipeux brun se localise au niveau cervical, supraclaviculaire, axillaire, périaortique, paravertébral, périnéal et inguinal chez l'humain et au niveau cervical, interscapulaire, axillaire, paravertébral chez la souris. Les adipocytes beiges se localisent principalement au niveau inguinal chez la souris. Le BMAT est localisé au sein des os longs chez l'humain et la souris (d'après Peirce, Carobbio and Vidal-Puig, 2014). (Réalisé avec BioRender.com)

La distribution et le volume des dépôts adipeux est dépendante du sexe et de l'âge (Boulet *et al.*, 2022) (Figure 4). A la naissance, la graisse brune est largement représentée chez l'humain et disparaît peu à peu au cours du vieillissement. A l'inverse, la graisse blanche augmente avec l'âge et est répartie différemment en fonction du sexe. En effet, la graisse blanche se localise majoritairement au niveau viscéral chez l'homme tandis qu'elle se localise au niveau glutéo-fémoral sous-cutané chez la femme à l'âge adulte. Au cours du vieillissement, la graisse blanche est principalement localisée au niveau viscéral, chez l'homme et la femme. La distribution des dépôts de graisse est maintenant reconnue comme un facteur important pour la santé. En effet, l'accumulation de graisse viscérale augmente le risque de développer des pathologies cardiométaboliques (Hamdy, Porramatikul and Al-Ozairi, 2006) tandis que

l'accumulation au niveau inguinal est protectrice (Tran *et al.*, 2008; Ibrahim, 2010; Goossens, 2017).

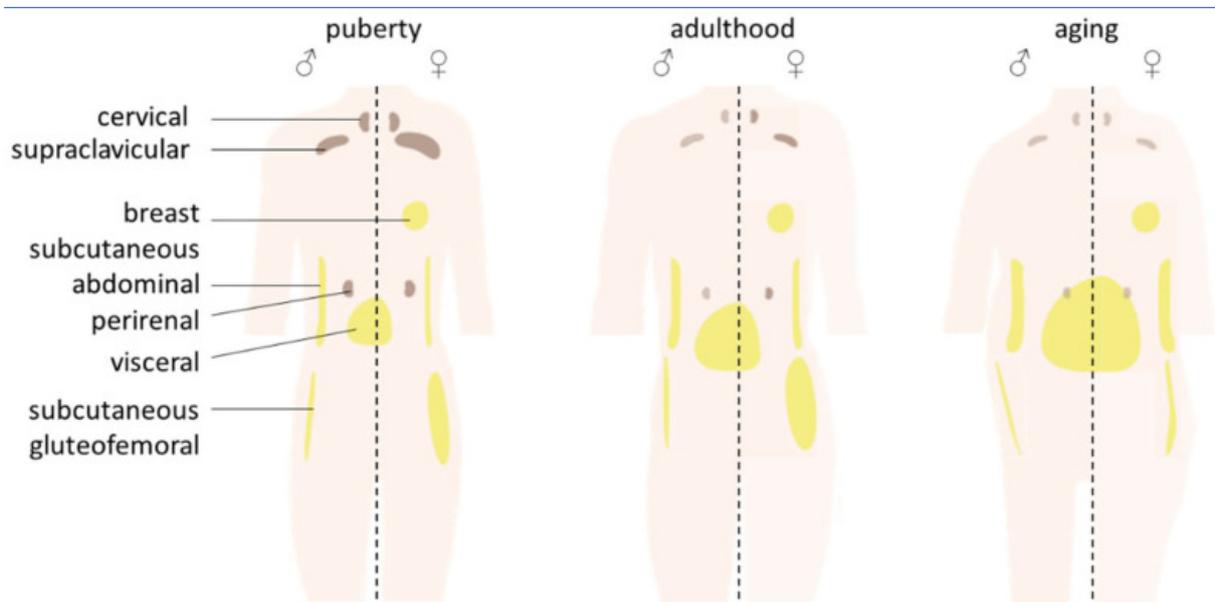


Figure 4 : Evolution de la répartition des dépôts de graisse blanche et brune chez l'homme et la femme. La graisse blanche est localisée principalement au niveau viscéral chez l'homme et sous-cutané chez la femme entre la puberté et l'âge adulte. Avec l'âge, la graisse viscérale est prédominante chez l'homme et la femme. La graisse brune est largement présente à la naissance et diminue peu à peu avec l'âge (Boulet *et al.*, 2022).

b. Le tissu adipeux médullaire

Le tissu adipeux médullaire (BMAT) représente 13% de la masse adipeuse totale et 70% du volume de la moelle osseuse à l'âge adulte (Cawthorn *et al.*, 2014). Le BMAT est localisé dans la moelle osseuse à proximité des cellules souches, des progéniteurs et des cellules matures provenant de différents lignages. Chez l'humain, le BMAT est absent à la naissance et apparaît au cours du vieillissement, tout d'abord au niveau proximal des os longs puis s'étend au niveau distal (Emery and Follett, 1964). Le BMAT est localisé dans les os longs comme le tibia, le fémur mais aussi les vertèbres (Figure 3). Chez la souris, le volume de BMAT est plus important chez les femelles que chez les mâles (Lecka-Czernik *et al.*, 2017), tandis que chez l'humain, le volume de BMAT est

plus important chez les hommes jeunes adultes que chez les femmes (Griffith *et al.*, 2012).

L'étude morphologique du BMAT par histologie a mis en évidence l'existence de deux types de BMAT (Tavassoli, 1976) qui se distinguent par leur localisation, leur morphologie, leur composition et leur réponse aux facteurs environnementaux (Figure 5). Le BMAT localisé au niveau proximal de l'os possède des adipocytes plus petits (500 μm^2 , chez la souris) constitués majoritairement de lipides saturés et se développe tout au long de la vie. Il est également régulé par des facteurs tels que l'âge, le sexe, la température ou le régime, justifiant son appellation de « regulated BMAT, rBMAT ». A l'inverse, le BMAT localisé au niveau distal de l'os possède des adipocytes de plus grande taille (1 000 μm^2 , chez la souris) contenant des lipides insaturés et se développe avant le rBMAT. Il est également moins sensible aux stimuli environnementaux et reste relativement stable, justifiant le terme « constitutive BMAT, cBMAT » (Scheller *et al.*, 2015) (Figure 5).

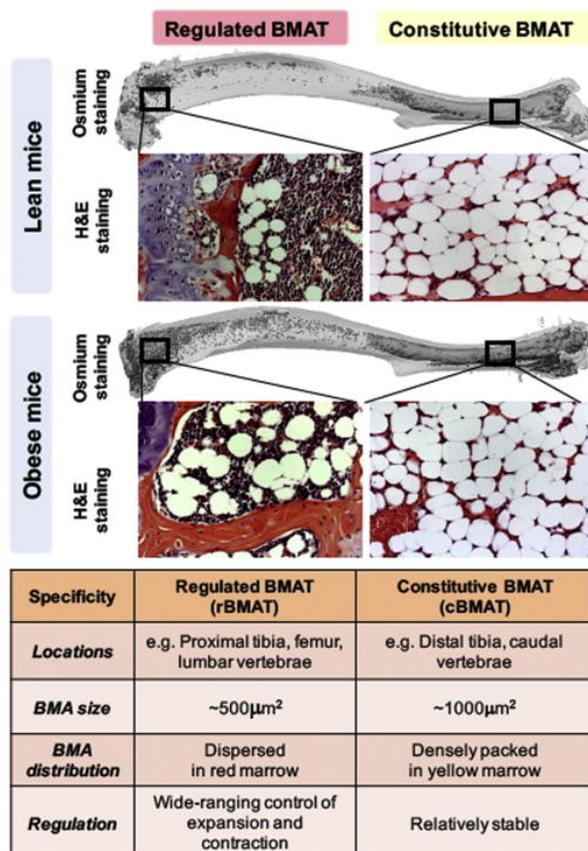


Figure 5: Caractéristiques du BMAT proximal et distal. Dans les os longs comme le tibia de l'homme et de la souris, le rBMAT est présent dans la partie proximale de l'os, il contient des adipocytes de petite taille et est régulé en fonction des stimuli. Le cBMAT est quant à lui localisé dans la partie distale de l'os, constitué d'adipocytes de plus grande taille et son volume reste relativement stable (Z. Li *et al.*, 2018).

B. Origine et développement des tissus adipeux

Les tissus adipeux périphériques (blancs, beiges et bruns) ont pour origine développementale les cellules souches mésenchymateuses (CSM) du mésoderme (Billon *et al.*, 2007) (Figure 6). Les adipocytes blancs et beiges proviennent des adipoblastes, une lignée de CSM différente des adipocytes bruns qui proviennent de la lignée myogénique. En effet, les adipocytes blancs et beiges proviennent d'un progéniteur n'exprimant pas Pax7 et Myf5 (Pax7⁻/Myf5⁻) tandis que les adipocytes bruns sont étroitement liés aux cellules précurseurs du muscle squelettique (Seale *et al.*, 2008), puisqu'il a été démontré qu'ils partagent un progéniteur commun exprimant les marqueurs de lignée myogénique Pax7/Myf5 (Pax7⁺/Myf5⁺) (Lepper and Fan, 2010). Après cette étape, deux facteurs de transcription sont essentiels pour la différenciation adipocytaire et communs aux différents types d'adipocytes : PPAR γ (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma) et C/EBP α (CCAAT/enhancer binding protein) (Farmer, 2006; Rosen and MacDougald, 2006) (Figure 6).

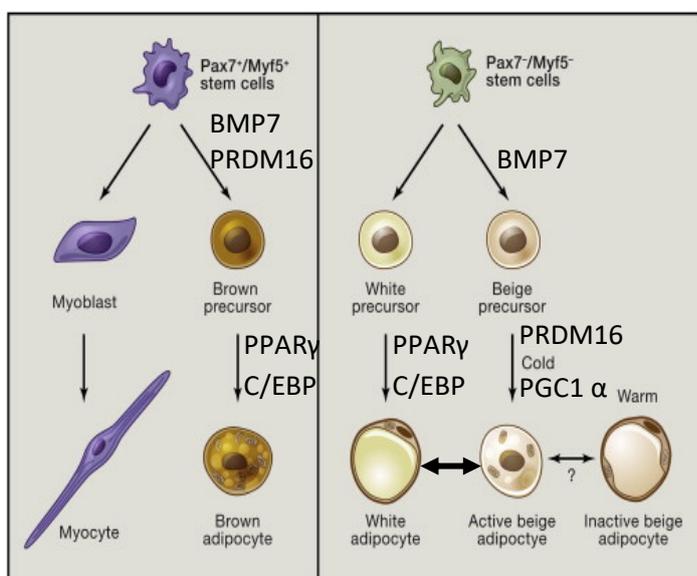


Figure 6 : Origine développementale des adipocytes blancs, beiges et bruns. Les adipocytes bruns ont pour origine un progéniteur Pax7⁺/Myf5⁺ qui, suite à l'action des facteurs BMP7 et PRDM16 se différencie en précurseur d'adipocyte brun, qui, par la stimulation de PPAR γ et C/EBP, devient un adipocyte brun. Les adipocytes blancs et beiges ont pour

origine un progéniteur Pax7⁻/Myf5⁻ qui donne les précurseurs blancs et beiges puis les adipocytes blancs grâce à la stimulation par PPAR γ et C/EBP ou les adipocytes beiges grâce à la stimulation de PGC1 α et PPAR γ . BMP7, Bone morphogenic protein 7; C/EBP, CCAAT/enhancer binding protein; PRDM16, Domain protein containing protein-16; PPAR γ ,

Peroxisome proliferator-activated receptor γ ; PGC1 α , PPAR γ coactivator 1 α . (Adaptée de Rosen et MacDougald 2006)

En plus de leur origine développementale, les adipocytes beiges peuvent provenir de la transdifférenciation des adipocytes blancs (Figure 7). Cette transdifférenciation a principalement lieu dans le tissu adipeux blanc sous-cutané/inguinal qui, de par sa localisation, est plus sensible aux stimuli extérieurs tels que le froid et le chaud. En fonction des facteurs environnementaux et des besoins énergétiques de l'organisme, la transdifférenciation des adipocytes beiges en adipocytes blancs ou des adipocytes blancs en adipocytes beiges a lieu. Lors d'apports énergétiques importants, le WAT stocke l'énergie et est principalement constitué d'adipocytes blancs. En revanche, lorsque l'organisme a besoin d'énergie notamment en réponse à des facteurs environnementaux tel que le froid, les adipocytes blancs se différencient en adipocytes beiges lors d'un processus appelé le brunissement et sont alors capables d'effectuer la thermogénèse (Barbatelli *et al.*, 2010) (Figure 7).

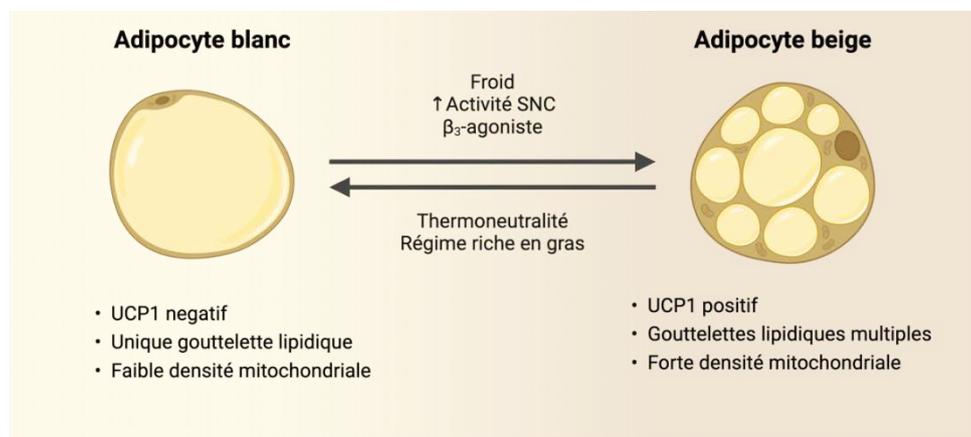


Figure 7 : Transdifférenciation des adipocytes blancs et beiges. Les stimuli comme le froid, l'augmentation de l'activité du SNC et la stimulation par un agoniste des récepteurs β_3 -adrénergique activent la transdifférenciation des adipocytes blancs en adipocytes beiges. En revanche, la thermoneutralité et le régime riche en gras activent la transdifférenciation des adipocytes beiges en adipocytes blancs. (Réalisé avec BioRender.com)

Les adipocytes médullaires proviennent des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse (Skeletal stem cell, SSC) qui se différencient en adipocytes ou en ostéoblastes en fonction des facteurs environnants (Gimble *et al.*, 2006) (Figure 8). Les SSC se différencient en adipocytes quand les facteurs de transcription PPAR γ et C/EBP sont exprimés. A l'inverse, lorsque les facteurs TGF β (Transforming Growth Factor β), WNT, irisin, Runx2 (Runt-related protein-2) et IGF-1 (insulin growth factor 1) sont exprimés, les SSC se différencient en ostéoblastes (Taipaleenmäki *et al.*, 2011; Tencerova and Kassem, 2016). Ainsi, il existe une balance entre ces voies de différenciation, certains facteurs activant une voie et inhibant l'autre. Par exemple, l'inhibition de Runx2 induit une diminution de la stimulation des SSC en ostéoblastes et stimule l'adipogenèse. A l'inverse, l'inhibition de PPAR γ inhibe l'adipogenèse et stimule la différenciation ostéoblastique (Pei and Tontonoz, 2004). De ce fait, il existe un lien étroit entre les adipocytes de la moelle osseuse et le squelette (Matsushita, Ono and Ono, 2022; Rosen and Horowitz, 2023) (Figure 8).

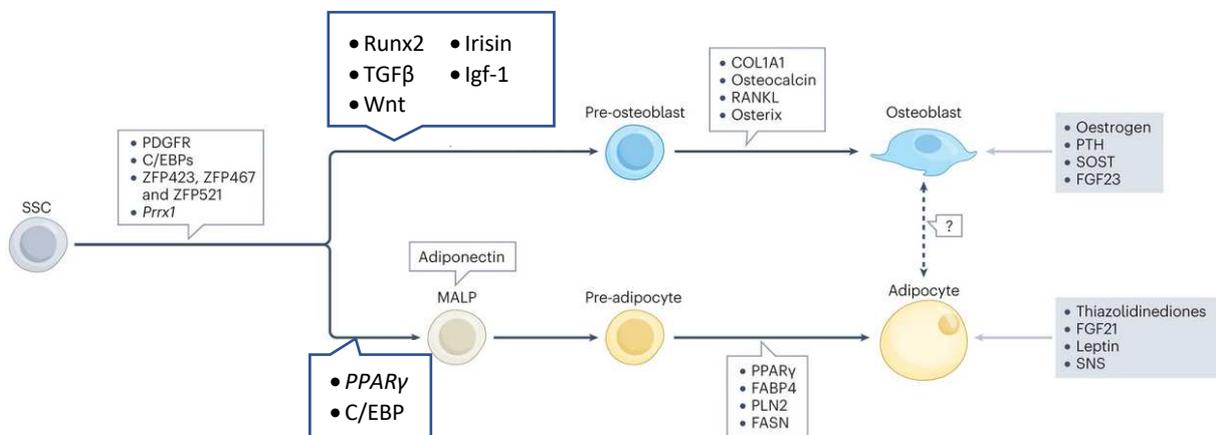


Figure 8 : Différenciation des cellules souches de la moelle osseuse (SSC) en adipocytes ou en ostéoblastes. Les SSC se différencient en cellules progénitrices mésenchymateuses, la cellule progénitrice des adipocytes de la moelle (Marrow adipogenic lineage precursors, MALP), sous l'activation de PPAR γ la différenciation adipocytaire se produit au détriment de l'ostéoblastogenèse et aboutit à la différenciation en adipocytes matures exprimant FABP4, PLN2 et FASN. Les SSC se différencient également en cellules progénitrices ostéoblastiques sous

l'influence de RUNX2, puis d'Osterix ayant comme produit final l'ostéoblaste mature exprimant COL1A1, OCN et RANKL (Adaptée de Rosen and Horowitz, 2023).

Cet équilibre entre la différenciation adipocytaire et ostéoblastique des SSC peut être à l'origine d'une corrélation inverse entre le volume osseux et le volume de BMAT (Marinelli Busilacchi, Morsia and Poloni, 2024). Au cours du vieillissement et dans certains contextes pathologiques comme l'obésité, le diabète, l'ostéoporose et l'anorexie mentale, la différenciation adipogénique est augmentée au détriment de la différenciation ostéogénique, aboutissant à un volume osseux diminué et un volume de BMAT augmenté (Justesen *et al.*, 2001; Bredella *et al.*, 2009; Scheller *et al.*, 2016; Tencerova *et al.*, 2018). Cependant, cette corrélation inverse n'est pas toujours observée. Par exemple, une diminution à la fois des volumes osseux et de BMAT est observée chez des patients obèses ayant subi une sleeve gastrectomie et chez les femmes en phase de lactation (Bornstein *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2019; Winter *et al.*, 2020). De plus, certains modèles murins génétiquement modifiés ne présentent pas cette corrélation. En effet, Chougule et ses collègues ont montré que la délétion de PPAR α chez la souris augmente à la fois le volume osseux et adipeux (Chougule *et al.*, 2023) mais les mécanismes mis en jeu sont encore inconnus. Ces études montrent que la balance de différenciation n'est probablement pas le seul régulateur de la balance entre le volume osseux et le volume adipeux.

C. Fonctions des tissus adipeux

Les adipocytes blancs, bruns, beiges et médullaires ont des fonctions communes mais aussi des fonctions qui leur sont propres. Les adipocytes blancs sont constitués d'une unique et large gouttelette lipidique qui leur permet de stocker de l'énergie sous forme de lipides (Henry *et al.*, 2012). Les adipocytes bruns et beiges sont multiloculaires avec une forte densité mitochondriale leur permettant d'effectuer la thermogénèse (Cheng *et al.*, 2021). Les adipocytes de la moelle osseuse ressemblent morphologiquement aux adipocytes blancs avec une large gouttelette lipidique (Meunier *et al.*, 1971). Depuis quelques années, les fonctions du BMAT sont explorées

et les études montrent que ce tissu possède des fonctions propres et distinctes des tissus adipeux périphériques.

a. Stockage et libération de l'énergie

Tous les tissus adipeux peuvent stocker et libérer l'énergie grâce à leur capacité à produire, stocker et utiliser les gouttelettes lipidiques (Ducharme and Bickel, 2008).

Le WAT est métaboliquement flexible en ce qui concerne le stockage et la libération d'énergie (Sakers *et al.*, 2022). En réponse à des signaux hormonaux et énergétiques, il agit comme une source d'acides gras lors de périodes de déficit énergétique telles que le jeûne, réduisant ainsi ses réserves de lipides et libérant des acides gras vers les tissus qui en ont besoin. À l'inverse, l'absorption, l'estérification et le stockage des lipides sous forme de triglycérides dans les gouttelettes lipidiques permettent au tissu adipeux de s'expandre empêchant les dépôts ectopiques de lipides et la lipotoxicité dans d'autres types cellulaires. Pour ces raisons, le WAT a longtemps été considéré comme un simple site de stockage de lipides mais nous savons désormais que la gouttelette lipidique joue un rôle actif dans le maintien de l'homéostasie énergétique globale.

Le BAT n'a pas pour fonction première de stocker et libérer de l'énergie. Il contient de multiples gouttelettes lipidiques de tailles plus réduites que le WAT (Heeren and Scheja, 2018), ce qui leur permet de disposer d'un apport supplémentaire en acide gras pour produire de la chaleur, sa fonction principale.

Le BMAT est également capable de stocker et libérer les lipides en fonction du statut nutritionnel, bien que sa réponse aux variations nutritionnelles soit différente du WAT (De Paula and Rosen, 2020). Par exemple en cas de restriction calorique, alors que le volume de WAT diminue, celui du BMAT augmente démontrant une régulation propre de ce tissu.

i. Stockage de l'énergie et lipogenèse

Les adipocytes stockent les lipides provenant de l'alimentation sous forme de triglycérides (TG), constitués d'un glycérol associé à trois acides gras. Pour pouvoir entrer dans l'adipocyte, les TG doivent préalablement être hydrolysés en glycérol et acides gras libres (non-esterified fatty acid, NEFA) par la lipoprotéine lipase (LPL) présente à la membrane externe des adipocytes (Young and Zechner, 2013). La LPL est régulée en fonction de l'état nutritionnel (Kersten, 2014), son activité est augmentée en période post-prandiale par l'insuline (Fried *et al.*, 1993) et diminuée en période de jeûne (Ladu, Kapsas and Palmer, 1991).

Les stimulus, comme le froid, stimulent la sécrétion de noradrénaline (NA) qui active les récepteurs β_3 -adrénergiques (ADRB3) et stimule l'internalisation de glucose dans les adipocytes par les transporteurs de glucose GLUT1 ou GLUT4 (Figure 9). Le glucose est hydrolysé par le processus de glycolyse afin de produire le pyruvate. Le pyruvate entre dans la mitochondrie par le transporteur MCP1 puis est, soit métabolisé par le cycle de krebs (TCA), soit externalisé de la mitochondrie sous forme de malate par l'intermédiaire de l'oxaloacetate qui sera à nouveau métabolisé en pyruvate. La première étape du cycle de krebs est effectuée par l'enzyme citrate synthase (CS) qui permet la production de citrate. Une partie sera utilisée par le TCA et une autre sera exportée par le transporteur de citrate (CC) dans le cytosol. Le citrate alimente ensuite une voie lipogénique après avoir été reconverti en acétyl-CoA par l'ATP citrate lyase (ACL). L'acétyl-CoA, en suivant la voie de la lipogénèse, est carboxylée en Malonyl-CoA puis en acide gras par les enzymes Acetyl-CoA carboxylase (ACC) et fatty acid synthase (FASN), respectivement. Les acides gras et le glycérol nécessaires à la synthèse des triglycérides (TG) peuvent également provenir de la circulation. Les NEFA entrent dans la cellule par des transporteurs exprimés à la surface des adipocytes comme CD36 (Cluster of Differentiation 36), FABP (fatty acid binding protein) et FATP (fatty acid transport protein) (Glatz, Luiken and Bonen, 2010), tandis que le glycérol entre dans la cellule par les AQP (aquaporin) 7 et 9 (Tardelli and Stulnig, 2020). L'insuline favorise l'entrée des NEFA et du glycérol dans la cellule en stimulant l'expression de ces transporteurs à la membrane (Song, Xiaoli and Yang, 2018). Les NEFA sont captés par

la cellule et sont ensuite synthétisés en acyl-CoA par l'acyl-CoA synthase (ACS). Le glycérol, quant à lui, est catalysé par la glycérol kinase (GK) en glycérol-3-phosphate (G3P) (Matschinsky and Wilson, 2019). Le G3P peut également provenir du glyceraldehyde-3-phosphate qui est converti en G3P grâce à la glycérol-3-phosphate déshydrogénase 1 (GPD1). Les acides gras contribuent avec le G3P à la synthèse des TG grâce à l'action des enzymes, glycerol-3-phosphat-O-acyltransferase 3 (GPAT3), AGPAT2, lipin 1, et diacylglycerol O-acyltransferase 2 (DGAT2) (Ameer *et al.*, 2014). Les TG sont ainsi stockés dans les gouttelettes lipidiques avant d'être hydrolysés par le processus de lipolyse. Celui-ci consiste en l'hydrolyse des TG en glycérol et en trois acides gras libres par l'action de trois enzymes : adipose triglyceride lipase (ATGL), hormone-sensible lipase (HSL) et monoacylglycerol lipase (MGLL). Les acides gras sont ensuite utilisés par les adipocytes thermogéniques et les autres organes cibles comme les muscles ou le cœur.

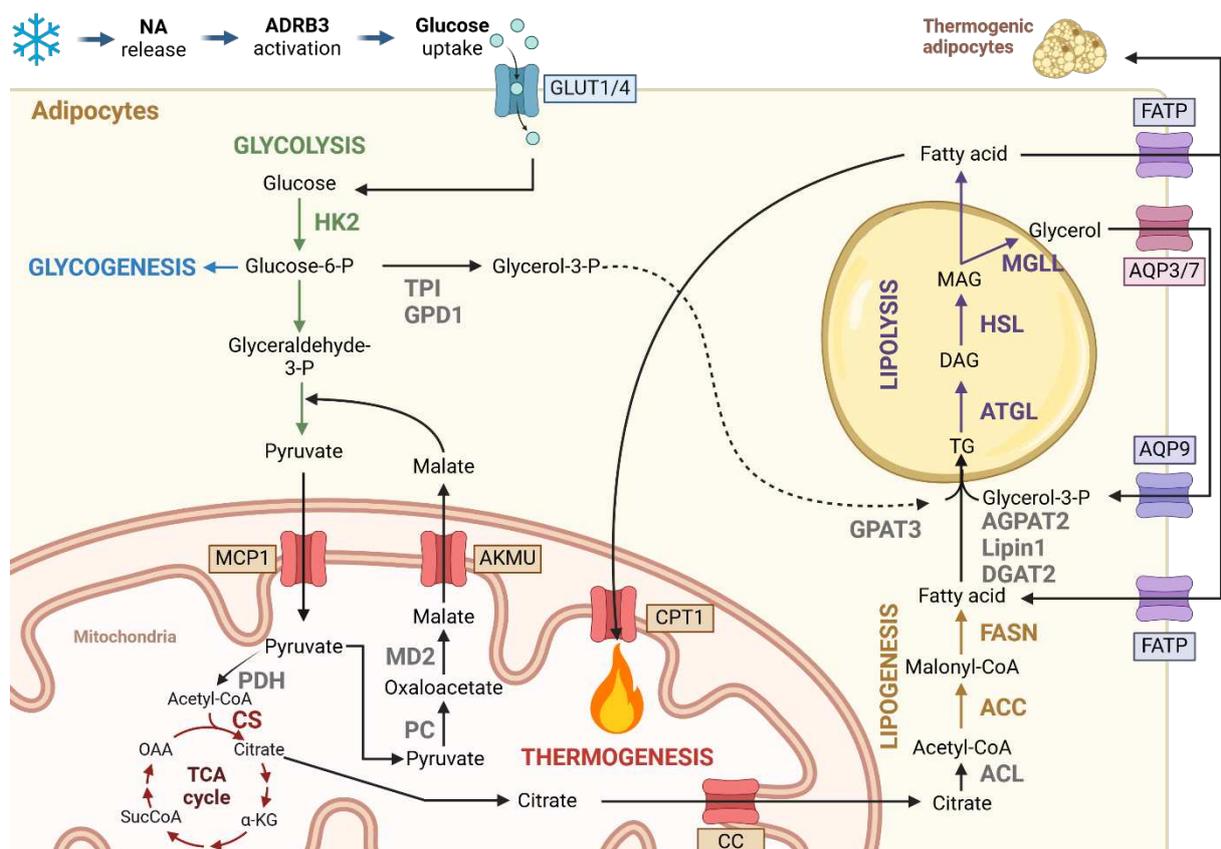


Figure 9 : Voie de signalisation du stockage et de la libération de l'énergie dans les adipocytes. Le froid stimule l'internalisation de glucose dans les adipocytes. Le glucose est hydrolysé par le processus de glycolyse afin de produire le pyruvate. Le pyruvate entre dans la

mitochondrie est, soit métabolisé par le cycle de krebs (TCA), soit externalisé de la mitochondrie sous forme de malate. Le TCA permet la production de citrate dont une partie sera exporté dans le cytosol. Le citrate alimente ensuite la lipogenèse qui permet la production de triglycérides (TG). Les TG sont ainsi stockés dans les gouttelettes lipidiques avant d'être hydrolysés par le processus de lipolyse. Les acides gras libérés intègrent la circulation afin d'être utilisés par les adipocytes thermogéniques ou d'autres cellules cibles en fonction des besoins énergétiques. (Adapté à partir de Hankir et Klingenspor 2018) (Réalisé avec BioRender.com)

L'insuline, sécrétée par le pancréas, stimule le transport de glucose, le stockage, la synthèse et la mobilisation des lipides (Figure 10). L'insuline a été découverte en 1921 (Banting *et al.*, 1922) mais ses mécanismes d'action ont été explorés 30 ans après par Rachmiel Levine (Levine *et al.*, 1950) qui démontrait son implication dans la perméabilité des membranes au glucose. L'insuline se fixe sur son récepteur (IR, insulín récepteur) (Freychet, Roth and Neville, 1971) à activité tyrosine kinase qui phosphoryle le substrat du récepteur à l'insuline IRS (insulin receptor substrate). Cette phosphorylation entraîne une cascade médiée par la phosphoinositide-3-kinase (PI3K), le phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP3), la 3-Phosphoinositide Dependent Protein Kinase 1 (PDK1) et la protéine kinase AKT. La phosphorylation d'AKT l'active et a pour conséquence une augmentation de la synthèse des lipides dans les adipocytes, de la gluconéogenèse dans le foie et de la différenciation des myoblastes dans le muscle (Lee and Dong, 2017). AKT active la protéine TSC2 (tuberous sclerosis 2) qui à son tour active le complexe mTOR 1 qui active le facteur de transcription de liaison à l'élément régulateur de stérol 1 (SREBP1c) afin d'augmenter la synthèse des lipides et la protéine kinase S6 (S6K) afin d'augmenter la synthèse des protéines. De plus, AKT active l'internalisation du glucose dans les cellules cibles grâce à la translocation du transporteur de glucose GLUT4 à la membrane dans les tissus adipeux et les muscles (Figure 10). Ainsi, l'insuline participe activement au stockage de l'énergie.

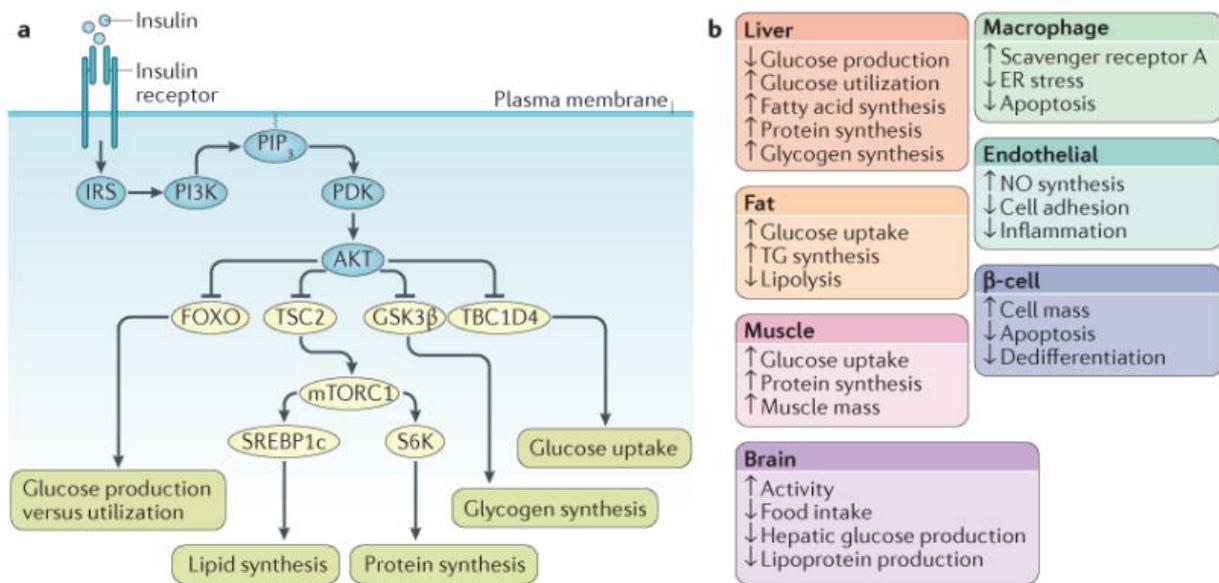


Figure 10 : Mécanismes d'action de l'insuline. A. L'insuline se fixe sur son récepteur (IR) tyrosine kinase induisant la phosphorylation du substrat du récepteur de l'insuline (IRS). Cette phosphorylation permet la liaison de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) à la membrane afin de synthétiser le phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP₃). Celui-ci recrute la 3-Phosphoinositide Dependent Protein Kinase 1 (PDPK1 ; PDK on figure) qui phosphoryle la protéine kinase AKT. AKT phosphoryle à son tour FOXO, TSC2, GSK3 β et TBC1D4 qui respectivement induisent une augmentation de la production de glucose et son utilisation, de la synthèse des lipides, des protéines du glycogène et de l'internalisation de glucose. **B.** Effets de l'insuline dans le foie, les tissus adipeux, les muscles, le cerveau, les macrophages, les cellules endothéliales et cellules β . (Haeusler, McGraw and Accili, 2018)

ii. Libération de l'énergie et lipolyse

Lorsque l'organisme a besoin d'énergie, les adipocytes hydrolysent les TG en NEFA et glycérol, ce processus s'appelle la lipolyse (Figure 11). Les TG sont hydrolysés successivement en diacylglycérols (DAG) et monoacylglycérols (MAG), pour aboutir finalement à la libération de trois molécules de NEFA et d'une molécule de glycérol grâce à l'action de trois enzymes, l'adipose triglyceride lipase (ATGL), l'hormone sensitive lipase (HSL) et la monoacylglycéryde lipase (MGLL), respectivement (Vaughan, Berger and Steinberg, 1964; Zimmermann *et al.*, 2004).

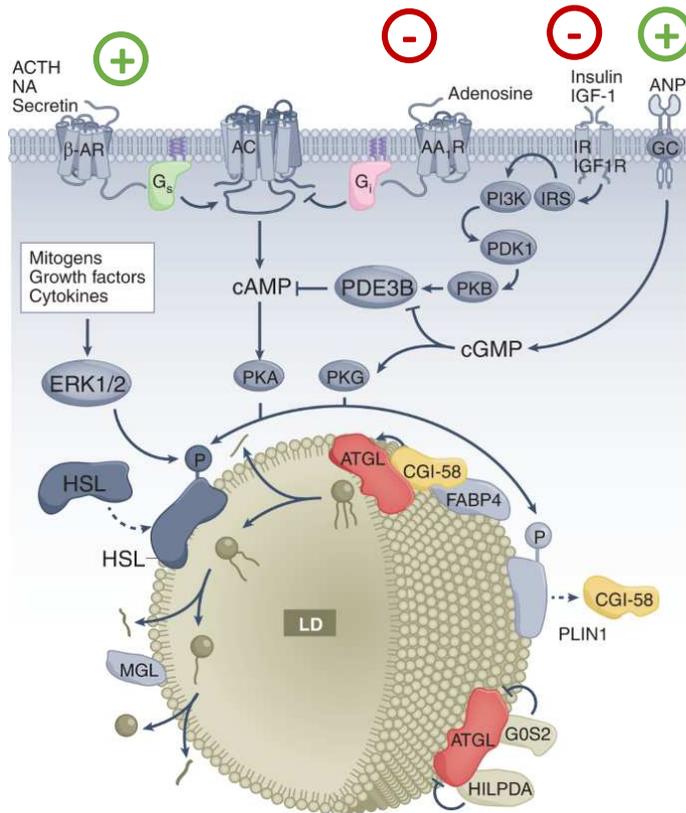


Figure 11 : Les acteurs de la lipolyse dans les tissus adipeux. La PKA activée par la voie β -adrénergique et la PKG activée par la voie de l'ANP stimulent la phosphorylation de l'hormone sensible lipase (HSL) induisant la lipolyse. La lipolyse est inhibée par l'adénosine, l'insuline et IGF-1. Le signe « + » en vert symbolise les voies qui stimulent la lipolyse, à l'inverse le signe « - » en rouge symbolise les voies qui inhibent la lipolyse.

(Adaptée de Grabner et al., 2021)

La lipolyse est stimulée par les fortes demandes d'énergie telles que le jeûne ou l'exposition au froid. Elle est activée par les catécholamines telle que la noradrénaline (NA) qui se fixe aux récepteurs β 3-adrénergiques présents à la surface des adipocytes. La liaison entre la noradrénaline et le récepteur déclenche une cascade de signalisation médiée par la protéine Gs, élevant les concentrations intracellulaires du second messager AMP cyclique (AMPc, adénosine monophosphate cyclique), par l'intermédiaire de l'activité de l'adénylyl cyclase (AC) (Sveidahl Johansen et al., 2021). Une accumulation d'AMPc dans le cytoplasme favorise l'activation de la protéine kinase A (PKA) qui, à son tour, module la lipolyse par la phosphorylation de facteurs effecteurs clés comme la HSL (Kimmel and Sztalryd, 2016) (Figure 11). Une autre voie que celle des catécholamines active la lipolyse, elle est médiée par le peptide natriurétique atrial (ANP) qui active par l'intermédiaire du GMP cyclique (GMPC, guanosine monophosphate cyclique), la protéine kinase G (PKG) qui phosphoryle HSL sur le même site que celui phosphorylé par la PKA (S563, S659 and S660) (Carper et al.,

2020) (Figure 11). HSL est également phosphorylée sur un autre site et activée par ERK1/2 en réponse à des mitogènes, des facteurs de croissance comme l'hormone de croissance (GH) ou des cytokines via la voie mitogen-activated protein kinase (MAPK) (Greenberg *et al.*, 2001) (Figure 11).

L'insuline et IGF-1 sont les principales hormones inhibitrices de la lipolyse en diminuant à la fois l'expression des gènes et l'activité des enzymes impliquées dans ce processus (Petersen and Shulman, 2018). L'insuline, via la voie de signalisation classique PI3K, stimule la phosphoinositide-dépendante kinase-1 (PDK1) et AKT/PKB, qui active la phosphodiesterase 3B (PDE3B), ce qui entraîne l'hydrolyse de l'AMPc, l'inactivation de la PKA et la diminution consécutive de la phosphorylation de la HSL et de la périlipine entraînant une inhibition de la lipolyse (DiPilato *et al.*, 2015). De même, l'activation des récepteurs adénosine couplés aux protéines Gi par l'adénosine inhibe l'adénylate cyclase et la synthèse de l'AMPc ce qui inhibe la lipolyse (Vannucci *et al.*, 1989) (Figure 11).

Dans le BMAT, la lipolyse est régulée différemment de la lipolyse des tissus adipeux périphériques. En effet, l'équipe d'Erica Scheller a montré un facteur d'augmentation du relargage du glycérol et des acides gras diminué (1,5) suite à la stimulation adrénérgique à partir d'adipocytes médullaires par rapport au iWAT provenant du rat (17,2) indiquant que l'efficacité de la lipolyse est plus faible dans le BMAT (Scheller *et al.*, 2019). Chez l'humain, Camille Attané et ses collègues ont comparé les profils protéomiques et lipidomiques du WAT et du BMAT afin de mieux comprendre le métabolisme lipidique du BMAT (Attané *et al.*, 2020). En accord avec l'étude de Scheller, les auteurs ont découvert que l'activité lipolytique du BMAT est inférieure à celle du WAT avec une diminution de l'expression de MGLL, troisième et dernière enzyme de voie de la lipolyse, accompagnée d'une augmentation du métabolisme du cholestérol observé par des analyses en lipidomique. Ce phénotype spécifique pourrait expliquer pourquoi le BMAT se comporte comme une source préservée de lipides pendant les périodes de privation extrême de nutriments comme la restriction calorique (Abella *et al.*, 2002; Devlin *et al.*, 2010; Cawthorn *et al.*, 2016).

En raison de la relation étroite entre le BMAT, le squelette et l'hématopoïèse, le groupe de Catherine MULLER et d'autres émet l'hypothèse que le BMAT pourrait être une source importante de cholestérol et de métabolites apparentés (Naveiras *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2017; Oguro, 2019) (Figure 12). La lipolyse dans les tissus adipeux périphériques est stimulée par les voies adrénérgiques et la voie du peptide natriurétique auriculaire. A ce jour, aucune étude n'a investigué une autre voie que celle activée par les catécholamines capables de stimuler la lipolyse dans le BMAT.

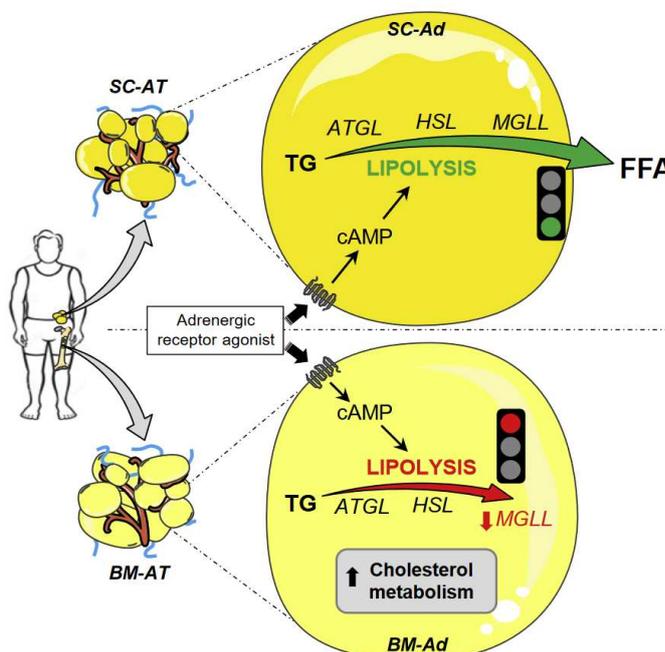


Figure 12 : La moelle osseuse humaine est composée d'adipocytes au métabolisme lipidique spécifique. Les adipocytes de la moelle présentent une forte diminution de l'expression de MGLL par rapport au WAT accompagné d'une augmentation du métabolisme du cholestérol. (Attané *et al.*, 2020)

b. La thermogénèse

La thermogénèse est le terme utilisé pour définir la production de chaleur par l'organisme nécessaire pour maintenir la température corporelle au-delà de la thermoneutralité, température où l'organisme n'a pas besoin de produire de la chaleur pour maintenir sa température corporelle. La régulation de la température corporelle dépend de l'âge, du sexe, de l'indice de masse corporelle et de l'espèce. Par exemple, la thermoneutralité chez l'homme habillé se situe à une température entre 20 et 22 °C et entre 24°C et 26°C chez la femme habillée tandis que la thermoneutralité chez la souris se situe à 30°C (Neff, 2020). La différence entre les hommes et les femmes

s'explique par les hormones sexuelles. En effet, la testostérone inhibe le canal protéique TRPM8 (Transient receptor potential cation channel subfamily M (melastatin) member 8) responsable de la sensation du froid sur la peau (Peier *et al.*, 2002; Gkika *et al.*, 2020). Les concentrations en testostérone diminuent avec l'âge ce qui explique que les hommes âgés sont plus sensibles au froid (Harman *et al.*, 2001).

En plus de la régulation de la température corporelle, la thermogénèse est effective également suite à l'alimentation (diet-induced thermogenesis) (Nedergaard and Cannon, 2022). En effet, si les apports énergétiques sont supérieurs à la dépense énergétique, l'excédent devrait accumulé et stockées sous forme de lipides. Une partie de cet excédent est utilisé pour produire de la chaleur, appelée thermogénèse induite par l'alimentation.

Il existe deux processus principaux de thermogénèse chez les mammifères, la thermogénèse sans frisson et la thermogénèse par frissons (Davis *et al.*, 1960). La thermogénèse par frissons est définie par la contraction involontaire des muscles squelettiques induite par l'exposition au froid entraînant une production de chaleur dépendante de l'ATP (Li *et al.*, 2021). La thermogénèse sans frisson est définie par une production de chaleur indépendamment de la contraction musculaire en réponse à la température ambiante. Cette thermogénèse sans frisson est active dans les adipocytes bruns et beiges.

Le tissu adipeux brun (BAT) a été découvert chez les nourrissons et les animaux en hibernation, leur permettant de maintenir leur température corporelle. Le rôle majeur des adipocytes bruns et beiges est de participer à la dépense énergétique grâce à leur capacité à effectuer la thermogénèse. Pendant longtemps chez l'humain, le BAT était considéré comme présent uniquement à la naissance et absent à l'âge adulte. Cependant, l'utilisation de la tomographie par émission de positons (PET/CT) après injection de glucose radiomarqué a permis d'identifier des régions du corps présentant une forte absorption de glucose indiquant une activité métabolique après stimulation au froid (Lichtenbelt *et al.*, 2009). Cette activité a ensuite été démontré comme

provenant de l'activité du tissu adipeux brun (Cypess *et al.*, 2009) et pouvant être une nouvelle cible thérapeutique dans le traitement des pathologies métaboliques comme l'obésité (Pfeifer and Hoffmann, 2015).

Les adipocytes thermogéniques diffèrent morphologiquement des adipocytes blancs. Ils sont constitués de gouttelettes lipidiques multiloculaires et possèdent une forte densité mitochondriale. Les lipides contenus dans les gouttelettes servent en premier lieu de carburant pour la phosphorylation oxydative et la production de chaleur (Boutant *et al.*, 2017). La thermogénèse est activée en réponse à une stimulation par le froid (Lim *et al.*, 2012) et à un excès d'apport énergétique (Bachman *et al.*, 2002). La protéine découplante mitochondriale UCP1 (Uncoupling Protein1) est l'acteur principal de la voie classique de la thermogénèse. Cependant, récemment, d'autres voies thermogéniques n'impliquant pas UCP1 ont été décrites (Roesler and Kazak, 2020) et sont citées ci-dessous (Figure 13) :

- Cycle futile créatine/phosphocréatine
- Cycle futile des lipides entre lipolyse et ré-estérification
- Cycle futile du calcium dans le réticulum sarcoplasmique/endoplasmique
- Fuite de protons par le transporteur ADP/ATP mitochondrial

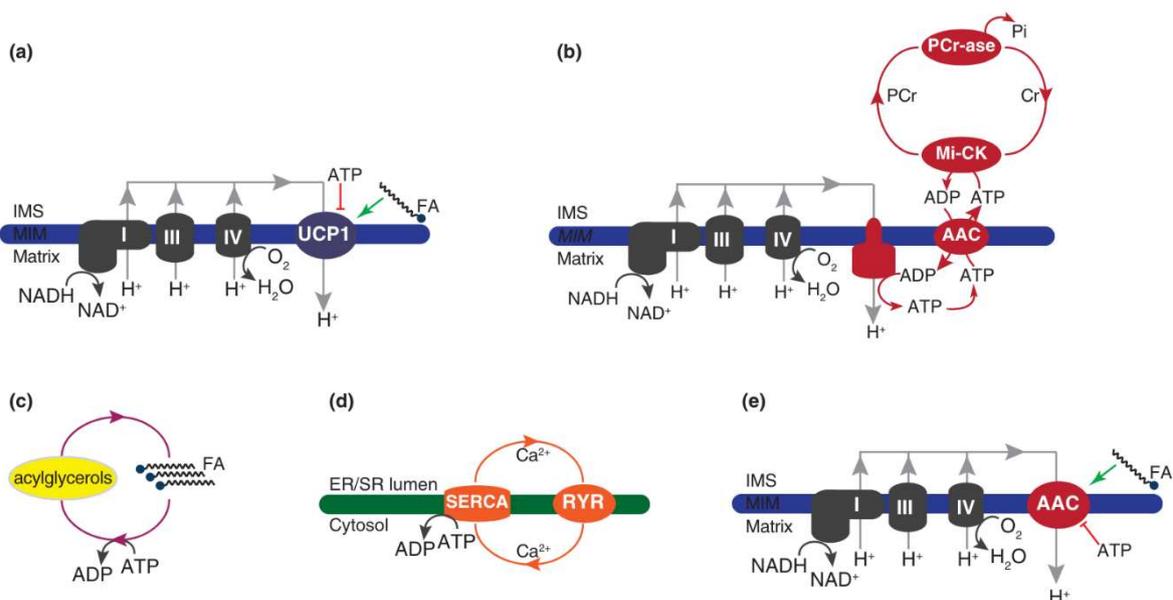


Figure 13 : Les voies thermogéniques dépendantes et indépendantes d'UCP1. A. UCP1 est un transporteur de protons présent à la membrane interne des mitochondries activé par les acides

gras (FA) et inhibé par l'ATP. Lorsqu'UCP1 est activé, il découple la chaîne d'électron de la synthèse de l'ATP et produit ainsi de la chaleur. **B.** Le cycle futile créatine/phosphocréatine fait intervenir la créatine kinase mitochondriale (Mi-CK) qui phosphoryle la créatine (Cr) pour former la phosphocréatine (PCr) grâce au phosphate (Pi) libéré lors de l'hydrolyse de l'ATP par le transporteur mitochondrial ADP/ATP (AAC). Ensuite, une phosphatase (PCr-ase) déphosphoryle la PCr en Cr qui pourra à nouveau être phosphorylée. Ce cycle fait intervenir l'hydrolyse de l'ATP qui permet la production de chaleur. **C.** Le cycle futile des lipides fait intervenir une phase catabolique qui est la lipolyse et une phase anabolique qui est la synthèse des triglycérides (TG) et permet la production de chaleur par l'hydrolyse de l'ATP lors de la phase anabolique. **D.** Le cycle futile du calcium fait intervenir le récepteur à la ryanodine (RYR) qui permet l'entrée du calcium dans le réticulum endoplasmique (ER) et la protéine SERCA qui transporte le calcium du ER vers le cytoplasme grâce à l'hydrolyse de l'ATP et ainsi génère de la chaleur. **E.** En plus de sa capacité à échanger l'ADP et l'ATP, AAC est un transporteur de proton. De la même façon qu'UCP1, lorsqu'AAC est activé par les acides gras, il permet le découplage de la chaîne d'électrons de la synthèse de l'ATP et produit ainsi de la chaleur. (Roesler and Kazak, 2020)

i. Thermogénèse dépendante d'UCP1

UCP1 est la protéine majeure capable de médier la thermogénèse et a été découverte par les Docteurs Daniel RICQUIER et Jean-Claude KADER en 1976 (Ricquier and Kader, 1976). Elle fait partie de la famille des transporteurs mitochondriaux Slc25 (Crichton, Lee and Kunji, 2017), codée par le gène *Slc25a7*, exprimée à la membrane interne des mitochondries.

La transcription d'UCP1 est augmentée par l'activation des récepteurs β 3-adrénergiques activant la PKA qui phosphoryle la MAPK p38 phosphorylant à son tour le facteur de transcription ATF-2 qui induira la transcription de *Pgc1 α* (Cao *et al.*, 2004) (Figure 14). *Pgc1 α* à son tour induit la transcription d'*Ucp1* grâce à son interaction avec PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) et RXR (Retinoid X Receptor) (Figure 14). L'activation de la PKA permet aussi d'induire une augmentation de la lipolyse pour générer des NEFA nécessaires à l'activation d'UCP1 (Nicholls and Locke,

1984; Bertholet and Kirichok, 2017). De la même façon, l'ANP stimule la transcription de Pgc1 α et Ucp1 par la voie MAPK p38 afin de stimuler la thermogénèse (Bordicchia *et al.*, 2012).

UCP1 effectue la thermogénèse car c'est un transporteur de protons qui découple la chaîne d'électron de la synthèse d'ATP qui résulte en la dissipation de l'énergie sous forme de chaleur (Figure 13a). La thermogénèse médiée par UCP1 est active dans les tissus adipeux bruns et beiges (Li *et al.*, 2014).

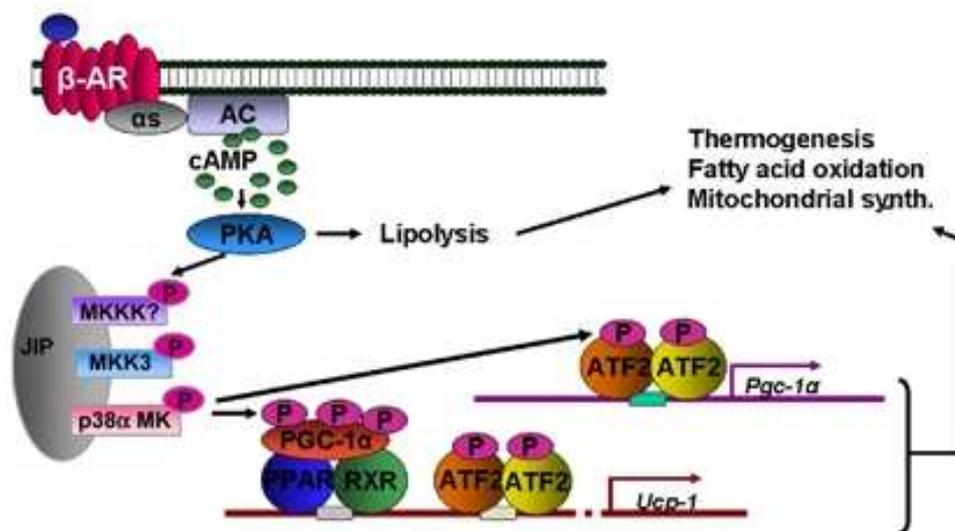


Figure 14 : Contrôle positif de la transcription du gène Ucp1. Les récepteurs β 3-adrénergiques activés induisent l'activation de la voie médiée par la PKA ayant pour conséquence la phosphorylation p38MAPK et l'activation de la lipolyse. P38 MAPK induit la transcription de Pgc1 α , facteur de transcription essentiel à la transcription d'UCP1. (Collins, Yehuda-Shnaidman and Wang, 2010)

ii. Thermogénèse indépendante d'UCP1

La thermogénèse par « la voie classique d'UCP1 » est la voie majoritaire chez une souris contrôlée cependant d'autres voies ont été décrites grâce à l'étude des souris invalidées pour UCP1 (*Ucp1*^{-/-}). En effet, les souris *Ucp1*^{-/-} maintiennent une dépense énergétique au repos et s'adaptent au froid, suggérant l'implication de mécanismes

thermogéniques indépendants d'UCP1 (Enerbäck *et al.*, 1997; Golozoubova *et al.*, 2001; Ukropec *et al.*, 2006). Les réponses thermogéniques en cages métaboliques des souris *Ucp1*^{-/-} sont similaires à celles des souris contrôles suite à une stimulation adrénérgique (Granneman *et al.*, 2003). De plus, les souris *Ucp1*^{-/-} sont résistantes au régime riche en gras suggérant que ces mécanismes indépendants d'UCP1 requièrent plus d'énergie pour dissiper la même quantité de chaleur que les souris *Ucp1*^{+/+} (Liu *et al.*, 2003). Récemment, quatre voies thermogéniques indépendantes d'UCP1 ont été mises en lumière. Trois de ces voies sont capables de dissiper de la chaleur sous forme d'énergie de manière dépendante de l'ATP (Brownstein *et al.*, 2022). Ce sont principalement des cycles appelés futiles, c'est-à-dire, des cycles de phosphorylation et de déphosphorylation catalysés par deux enzymes qui fonctionnent normalement dans deux voies métaboliques différentes ayant pour effet l'hydrolyse de l'ATP et la génération de chaleur.

Cycle futile créatine/phosphocréatine (Figure 13b)

Le cycle de consommation de l'ATP faisant intervenir la créatine et la phosphocréatine dans les adipocytes beiges et bruns a été investigué par Lawrence KAZAK et ses collègues (Kazak *et al.*, 2015). Chez l'humain, l'expression des gènes *Ckmt1* et *Ckmt2*, codant pour les créatines kinases mitochondriale 1 et 2, est supérieure dans le BAT par rapport au WAT (Svensson *et al.*, 2011). En utilisant un modèle murin d'inactivation de la glycine amidinotransférase (*Gatm*) spécifiquement dans les adipocytes (Adipo-*Gatm* KO) dans lequel la biosynthèse de la créatine est inhibée. Les auteurs ont rapporté une altération du maintien de la température corporelle en réponse à une exposition aiguë au froid ainsi qu'une diminution de la capacité respiratoire en réponse aux agonistes β 3-adrénergiques indiquant un rôle de la créatine dans le maintien de la dépense énergétique (Kazak *et al.*, 2017). Le cycle futile de la créatine a été mis en évidence dans des mitochondries isolées à partir de tissus adipeux de souris exposées au froid dans des conditions limitées en ADP. Dans

ce contexte, l'hydrolyse de l'ATP est médiée par la créatine kinase mitochondriale (Mi-CK) qui ajoute le groupement phosphate de l'ATP à la créatine (Cr) pour former la phosphocréatine (PCr). Une phosphocréatine phosphatase (PCr-ase) permet ensuite le renouvellement de la créatine. Ce cycle permet l'hydrolyse de l'ATP et donc la production de chaleur. Récemment, Yizhi SUN et ses collaborateurs ont cherché à identifier la phosphatase de la phosphocréatine associée aux mitochondries. Pour cela, les auteurs ont incubé des extraits de mitochondries avec de la phosphocréatine et quantifié les taux de libération de phosphate afin d'observer l'activité phosphatase. Ensuite, une analyse par spectrométrie de masse sur les extraits à forte activité phosphatase a permis d'identifier la TNAP (tissue-non specific alkaline phosphatase) comme étant la phosphatase (identifiée PCr-ase dans la figure 13b) à l'origine du renouvellement de la créatine dans cette voie (Sun *et al.*, 2021). Une autre étude a également montré que ce cycle était potentiellement actif en absence et en présence d'UCP1 dans les adipocytes beiges (Bertholet *et al.*, 2017).

A ce jour, ce cycle futile a été décrit par une seule équipe, celle de Lawrence KAZAK, et semble soumise à controverse par certains experts de la thermogenèse. En effet, David NICHOLLS et Martin BRAND remettent en cause ce mécanisme (Nicholls and Brand, 2023).

Tout d'abord, le modèle murin utilisé par l'équipe de Lawrence KAZAK, Adipo-Gatm KO, possède un statut métabolique altéré. De ce fait, ce qui est observé dans leurs études est peut-être une compensation de ce statut métabolique altéré ne permettant pas de conclure définitivement sur un effet direct de l'activité du BAT. De plus, d'autres auteurs ont montré que la délétion de la créatine kinase de type cérébral entraîne une thermorégulation défectueuse et une hypothermie sévère dues à une altération de la fonction neuronale plutôt qu'à un défaut du BAT (Streijger *et al.*, 2009).

De plus, dans l'étude de KAZAK, l'alimentation riche en créatine afin de restaurer le phénotype des souris Adipo-Gatm KO ne montre aucun effet avant 10h d'exposition continue aux agonistes β_3 -adrénergiques (Kazak *et al.*, 2017). Cette

vitesse de réponse aux agonistes β 3-adrénergiques est trop lente et donc elle n'est pas physiologique. Ensuite, la seule activité phosphatase détectée a été identifiée comme étant la TNAP (Sun *et al.*, 2021) après incubation d'extraits mitochondriaux avec de la phosphocréatine. Quarante-huit heures d'incubation ont été nécessaires pour détecter l'hydrolyse. Ceci montre, encore une fois, des incohérences entre un cycle futile de la créatine identifiée comme extrêmement rapide (quelques secondes) (Bertholet *et al.*, 2017) et l'hydrolyse de l'ATP nécessitant des jours (Sun *et al.*, 2021). L'activité TNAP serait donc insuffisante pour soutenir cette hypothèse dans les mitochondries isolées. La TNAP possède également une activité ATPase, ce qui implique qu'une enzyme associée à la mitochondrie pourrait directement hydrolyser l'ATP exporté sans passer par l'intermédiaire d'un cycle de la créatine (Briolay, Bessueille and Magne, 2021). Cette voie requiert donc d'autres études approfondies pour être confirmée.

Cycle futile des lipides entre lipolyse et ré-estérification (Figure 13c)

Le cycle futile des lipides fait intervenir deux composantes, une voie catabolique et une voie anabolique. La voie catabolique est la lipolyse qui consiste en la dégradation des TG en NEFA et glycérol par les enzymes ATGL, HSL et MGLL. Les NEFA et le glycérol sont ensuite réutilisés afin d'être estérifiés en TG par les enzymes GPAT (glycerol-3-phosphate acyltransferase), AGPAT (1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase), Lipin et DGAT (diacylglycerol acyltransferase), c'est le segment anabolique (Figure 15). Ce cycle consomme de l'énergie en hydrolysant l'ATP (Oeckl *et al.*, 2022). Il a été identifié par plusieurs groupes (Elia *et al.*, 1987; Wolfe Robert R. *et al.*, 1987; Patel and Kalhan, 1992; Kalderon *et al.*, 2000; Guan *et al.*, 2002; Reidy and Weber, 2002; Flachs *et al.*, 2017; Bardova *et al.*, 2020; Blondin *et al.*, 2020; Hui *et al.*, 2020) avant d'être investigué dans des adipocytes bruns primaires par Josef OECKL et ses collègues (Oeckl *et al.*, 2022). Les auteurs ont analysé le protéome d'adipocytes bruns de souris contrôles et *Ucp1*^{-/-} suite à une stimulation adrénergique

(isoproterenol). Ils ont montré l'augmentation des voies impliquées dans le métabolisme du calcium, le métabolisme lipidique et la chaîne de transport des électrons dans les adipocytes *Ucp1*^{-/-}. Les analyses de consommation d'oxygène en utilisant la technique Seahorse® à partir d'adipocytes primaires stimulés avec de l'isoproterenol a montré que les adipocytes *Ucp1*^{-/-} sont plus sensibles à l'oligomycine indiquant une augmentation de la production d'ATP. L'augmentation de la consommation d'oxygène dans ce modèle était associée au cycle des lipides. *In vivo*, l'injection de ²H₂O a permis de montrer que la synthèse des TG et la lipogenèse *de novo* sont plus actives dans le BAT des souris *Ucp1*^{-/-} à température ambiante et à 4°C. De plus, ils montrent que le WAT pourrait participer à cette augmentation en fournissant des acides gras au BAT (Oeckl *et al.*, 2022).

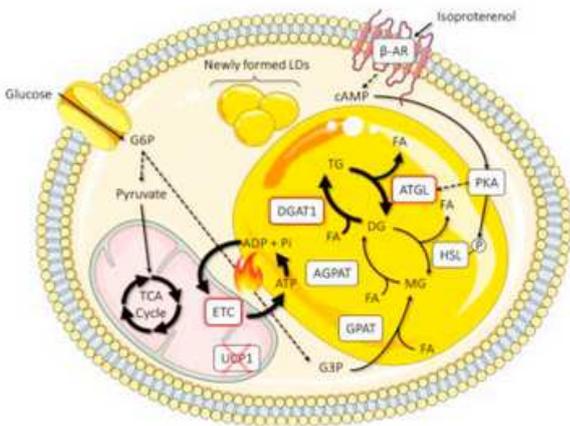


Figure 15 : Mécanisme d'action du cycle futile des lipides. Dans le BAT, le cycle futile des lipides est composé d'une voie catabolique, la lipolyse et d'une voie anabolique, l'estérification des acides gras qui induit l'hydrolyse de l'ATP et donc la production de chaleur (Oeckl *et al.*, 2022).

Cycle futile du calcium dans le réticulum sarco/endoplasmique (Figure 13d)

En réponse à une exposition au froid, la noradrénaline (NA) se lie au récepteur adrénergique $\alpha 1$ et au récepteur adrénergique $\beta 3$ pour stimuler le cycle du calcium (Ca^{2+}) intracellulaire en activant le récepteur de la ryanodine 2 (RyR2) et en favorisant la sortie du calcium dans le réticulum endoplasmique (ER) (Figure 16). L'accumulation de calcium cytoplasmique augmente alors l'activité de l'ATPase du réticulum sarco(endo)plasmique (SERCA2b), qui importe le calcium dans le RE des adipocytes. Comme SERCA2b consomme de l'ATP pour transporter le calcium vers le RE, l'activation de ce cycle calcique entraîne une consommation d'ATP qui est responsable de la dissipation d'énergie. En outre, la diminution de l'efficacité de SERCA2b à

importer du calcium entraîne une augmentation des niveaux de Ca^{2+} dans le cytosol, qui pénètrent dans les mitochondries pour stimuler l'activité de la pyruvate déshydrogénase et la synthèse de l'ATP. Ainsi, le calcium lui-même active les mitochondries pour couvrir plus efficacement cette demande accrue d'ATP (Figure 16).

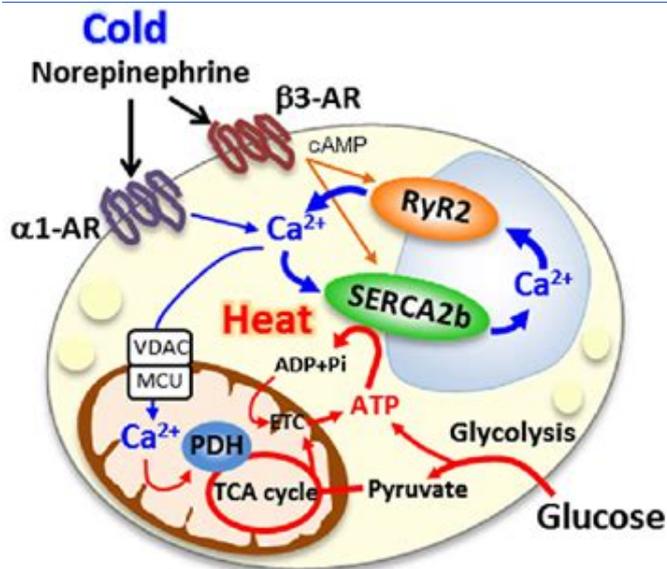


Figure 16 : Mécanisme d'action du cycle futile calcique. Dans les adipocytes beiges du iWAT, le cycle futile du calcium est médié par le récepteur à la ryanodine (RyR2) qui exporte le calcium du ER vers le cytoplasme et l'ATPase du réticulum sarco(endo)plasmique (SERCA2b), qui importe le calcium dans le RE des adipocytes en induisant l'hydrolyse de

l'ATP et donc la production de chaleur (Ikeda *et al.*, 2017).

Cette voie a été décrite par Ikeda et ses collègues (Ikeda *et al.*, 2017) en montrant l'augmentation de gènes impliqués dans le cycle calcique incluant Serca2 et RyR2 dans le iWAT de souris transgéniques issues d'un croisement entre une souris surexprimant Prdm16 dans les tissus adipeux sous le contrôle du promoteur Ap2 et une souris invalidée pour UCP1 (*Prdm16 Tg x Ucp1^{-/-}*). Ces auteurs ont montré que l'inhibition de Serca2b dans des adipocytes primaires issus du iWAT de ces souris réduit jusqu'à 78% de la consommation d'oxygène après stimulation avec la NA. Enfin, l'utilisation de l'inhibiteur de SERCA (Thapsigargin) réduit l'augmentation de la consommation d'oxygène induite par la NA dans des cellules contrôles alors que cette inhibition n'est pas observée dans les cellules délétées en Serca2b.

La grande différence entre l'étude de Kenji IKEDA et de Josef OECKL est le modèle cellulaire. Le groupe d'Oeckl utilise des adipocytes primaires dérivés de BAT de souris *Ucp1^{-/-}*, tandis que le groupe d'Ikeda utilise des adipocytes primaires dérivés de

iWAT de souris *Prdm16 Tg x Ucp1^{-/-}* suggérant que le cycle des lipides est plus actif dans le BAT et le cycle calcique dans les adipocytes beiges du iWAT.

Fuite de protons par le transporteur ADP/ATP mitochondrial (Figure 13e)

Le transporteur mitochondrial d'ADP/ATP (AAC) est exprimé à la membrane interne des mitochondries et présent dans les tissus adipeux, le muscle squelettique, le cœur, le foie et le rein. L'AAC est un membre de la famille des transporteurs de solutés mitochondrial (SLC25) qui échange l'ATP et l'ADP entre la matrice mitochondriale et le cytosol permettant de maintenir un pool d'ATP cellulaire (Klingenberg, 2008). De plus, ACC est capable de médier la thermogénèse (Figure 13e). De la même manière qu'UCP1, ACC est responsable de la fuite de proton mitochondrial dans les tissus qui n'expriment pas UCP1 (Bertholet *et al.*, 2019). L'ACC est activé par les acides gras et inhibé par les nucléotides purines.

Synthèse des différentes voies thermogéniques

Le tableau ci-dessous résume les différentes voies thermogéniques activent ainsi que les protéines impliquées dans chaque voie (Tableau I).

Tableau I : Résumé des différentes voies thermogéniques et les protéines impliquées.

*UCP1, Uncoupling protein 1 ; Mi-CK, Mitochondrial Creatine Kinase ; TNAP, Tissue non specific alkaline phosphatase ; AAC, mitochondrial ADP/ATP carrier ; ATGL, Adipose triglyceride lipase ; HSL, hormone-sensitive lipase ; MGLL, monoacylglycerol lipase ; GPAT, glycerol-3-phosphate acyltransferase ; AGPAT, 1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase ; DGAT1 ; diacylglycerol acyltransferase ; SERCA2b, sarco/ endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase et RyR, Ryanodine receptor. (Adapté de Brownstein *et al.*, 2022)*

Voies thermogéniques	Tissu	Protéines impliquées	Dépendant de l'ATP	Références
UCP1	BAT, adipocytes beiges	UCP1	Non	1, 2, 3, 4 et 5
Cycle créatine	BAT, adipocytes beiges	Mi-CK, TNAP et AAC	Oui	6, 7, 8, 9, 10 et 11

Cycle lipides	BAT, adipocytes beiges	ATGL, HSL, MGLL, GPAT, AGPAT et DGAT1	Oui	12, 13, 14 et 15
Cycle calcium	BAT, adipocytes beiges, muscle squelettique	SERCA2b et RyR2	Oui	16, 17, 18 et 19

- (Ricquier and Kader, 1976)
- (Rothwell and Stock, 1979)
- (Cannon and Nedergaard, 2004)
- (Parker *et al.*, 2009)
- (Fedorenko, Lishko and Kirichok, 2012)
- (Kazak *et al.*, 2015)
- (Bertholet *et al.*, 2017)
- (Kazak *et al.*, 2017)
- (Kazak *et al.*, 2019)
- (Rahbani *et al.*, 2021)
- (Sun *et al.*, 2021)
- (Hammond and Johnston, 1987)
- (Mottillo *et al.*, 2014)
- (Veliova *et al.*, 2020)
- (Oeckl *et al.*, 2022)
- (Ukropec *et al.*, 2006)
- (Ikeda *et al.*, 2017)
- (Gamu and Tupling, 2017)
- (Mottillo, Ramseyer and Granneman, 2018)

BMAT et thermogenèse

Le tissu adipeux brun et les adipocytes beiges du tissu adipeux blanc sont capables d'effectuer la thermogenèse mais qu'en est-il du tissu adipeux médullaire ?

Une étude a montré que le BMAT de souris âgées de 5 mois exprime des marqueurs d'adipocytes bruns impliqués dans la régulation de la thermogenèse et de la réponse $\beta 3$ adrénergique (*Pgc1 α* et *Dio2*) ainsi que des régulateurs transcriptionnels (*Prdm16* et *FoxC2*) (Krings *et al.*, 2012). En revanche, l'expression d'*Ucp1* dans le BMAT est controversée dans la littérature avec des études montrant une expression d'*Ucp1* diminuée (Ambrosi *et al.*, 2017) ou augmentée (Krings *et al.*, 2012) dans le BMAT par rapport au tissu adipeux blanc inguinal. Certaines études montrent, quant à elle, que le BMAT n'exprime pas UCP1 (Craft *et al.*, 2019). Ensuite le groupe de William CAWTHORN a vérifié par une approche fonctionnelle (^{18}F -FDG) l'activité du BMAT par rapport au BAT et iWAT à l'état basal et après stimulation au froid aiguë et chronique (Suchacki *et al.*, 2020). A l'état basal, l'utilisation du glucose est inférieure dans le BMAT par rapport au BAT. Ce résultat n'est pas étonnant puisque dans une souris contrôle, à l'état basal, le BAT est l'organe majeur qui participe à la thermogenèse sans frisson afin de réguler la température corporelle. Comme attendu, la stimulation par le froid, de façon aiguë et chronique, augmente la dépense énergétique et l'utilisation du glucose dans le BAT et le iWAT suggérant une stimulation du brunissement dans le iWAT.

Cependant, aucune augmentation de l'utilisation du glucose n'est observée dans le BMAT, suggérant que ce tissu ne participe pas à l'augmentation de la dépense énergétique. Ces études chez la souris ne suggèrent pas que le BMAT soit capable d'effectuer la thermogénèse.

c. Fonction endocrine des tissus adipeux

Les tissus adipeux sécrètent des hormones que l'on appelle « adipokines » lorsqu'elles sont sécrétées par le WAT (Sahu and Bal, 2023) et le BMAT (Sulston and Cawthorn, 2016) et « batokines » lorsqu'elles sont sécrétées par les adipocytes bruns et beiges (Ahmad *et al.*, 2021).

La **leptine** a été découverte en 1994 par Zhang et ses collègues qui ont montré que l'absence du gène codant pour la leptine chez la souris *ob/ob* induit une obésité sévère (Zhang *et al.*, 1994). La leptine, appelée hormone de la satiété, est synthétisée principalement dans les tissus adipeux blancs (Zhang *et al.*, 1994) et médullaires (Reid, Baldock and Cornish, 2018), bien qu'elle soit également exprimée dans d'autres tissus comme l'estomac (Bado *et al.*, 1998), les poumons (Vernooy *et al.*, 2009), le placenta (Hoggard *et al.*, 1997) et le cerveau (Wiesner *et al.*, 1999).

La leptine est sécrétée de manière pulsatile et présente une variation diurne, avec des concentrations plus élevées le soir et tôt le matin (Licinio *et al.*, 1997). Elle est également sécrétée de manière proportionnelle au volume de graisse blanche (Frederich *et al.*, 1995). Les facteurs augmentant la sécrétion de la leptine sont l'excès de masse grasse (Sinha *et al.*, 1996), la prise alimentaire importante, le glucose, l'insuline, les glucocorticoïdes, les estrogènes et les cytokines inflammatoires. À l'inverse, les facteurs inhibant la sécrétion de la leptine sont la diminution de la masse grasse, le jeûne (Boden *et al.*, 1996), les catécholamines et les agonistes adrénergiques, les hormones thyroïdiennes, les androgènes, les agonistes PPAR γ et certaines cytokines inflammatoires. Elle joue un rôle important dans la régulation de la satiété,

de l'appétit, de la prise alimentaire, de l'activité, de la dépense énergétique et de l'athérogenèse (Seoane-Collazo *et al.*, 2020). En effet, la leptine participe au maintien de l'homéostasie énergétique en régulant négativement la prise alimentaire et positivement la dépense énergétique au niveau central.

Les récepteurs à la leptine sont exprimés à la surface des neurones neuropeptide Y et agouti-related protein (NPY/AgRP) et pro-opiomélanocortine (POMC) contenus dans le noyau arqué (ARC) de l'hypothalamus (Nasrallah and Horvath, 2014). La leptine et l'insuline (hormone synthétisée par le pancréas) freinent l'activité des neurones AgRP tandis que la ghréline les activent. L'activation de ces neurones induit l'inhibition des récepteurs aux mélanocortides (MC4R) localisés au niveau du PVH (noyau paraventriculaire de l'hypothalamus) afin de stimuler la prise alimentaire et réduire la dépense énergétique. A l'inverse, l'activation des neurones POMC par la leptine et l'insuline va induire la synthèse d' α -MSH (α -melanocyte-stimulating hormone) qui, par l'activation des récepteurs MC4R, inhibe la prise alimentaire et stimule la dépense énergétique (Myers *et al.*, 2021) (Figure 17).

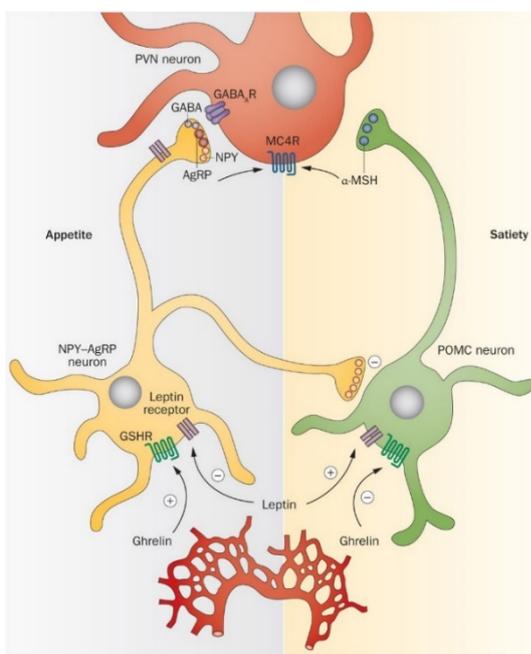


Figure 17 : Neurones mis en jeu dans le contrôle central du métabolisme énergétique. Les neurones POMC et NPY/AgRP intègrent les signaux afférents provenant des organes périphériques permettant une réponse métabolique adaptée. Les neurones POMC stimulent la satiété tandis que les neurones NPY/AgRP stimulent la prise alimentaire. La leptine active les neurones POMC et inhibe les neurones NPY/AgRP alors que la ghréline stimule les neurones NPY/AgRP et inhibe les neurones POMC (Nasrallah and Horvath, 2014).

Enfin, la leptine sécrétée par le WAT et le BMAT régule positivement la croissance en augmentant la prolifération et la différenciation des ostéoblastes et des chondrocytes (Reid, Baldock and Cornish, 2018).

L'**adiponectine** a été découverte après la leptine en 1995 (Scherer *et al.*, 1995; Arita *et al.*, 1999). Elle a suscité beaucoup d'intérêt de par son action sur la sensibilité à l'insuline, ses effets anti-inflammatoires, et anti-apoptotiques (Ye and Scherer, 2013; Straub and Scherer, 2019) (Figure 18). En effet, l'adiponectine stimule la sécrétion d'insuline en activant l'expression du gène de l'insuline mais aussi en stimulant l'exocytose des granules d'insuline. De plus, elle favorise la translocation du transporteur de glucose GLUT-4 à la membrane augmentant ainsi l'internalisation de glucose. De ce fait, l'adiponectine a été investiguée dans le traitement de l'obésité et du diabète (Achari and Jain, 2017). L'adiponectine est synthétisée principalement par les tissus adipeux intra- et extra-médullaires. L'étude de Cawthorn et ses collègues sur un modèle murin de restriction calorique, condition dans laquelle le volume de BMAT est augmenté tandis que le volume de WAT est diminué, montre que le BMAT est une source d'adiponectine importante (Cawthorn *et al.*, 2014).

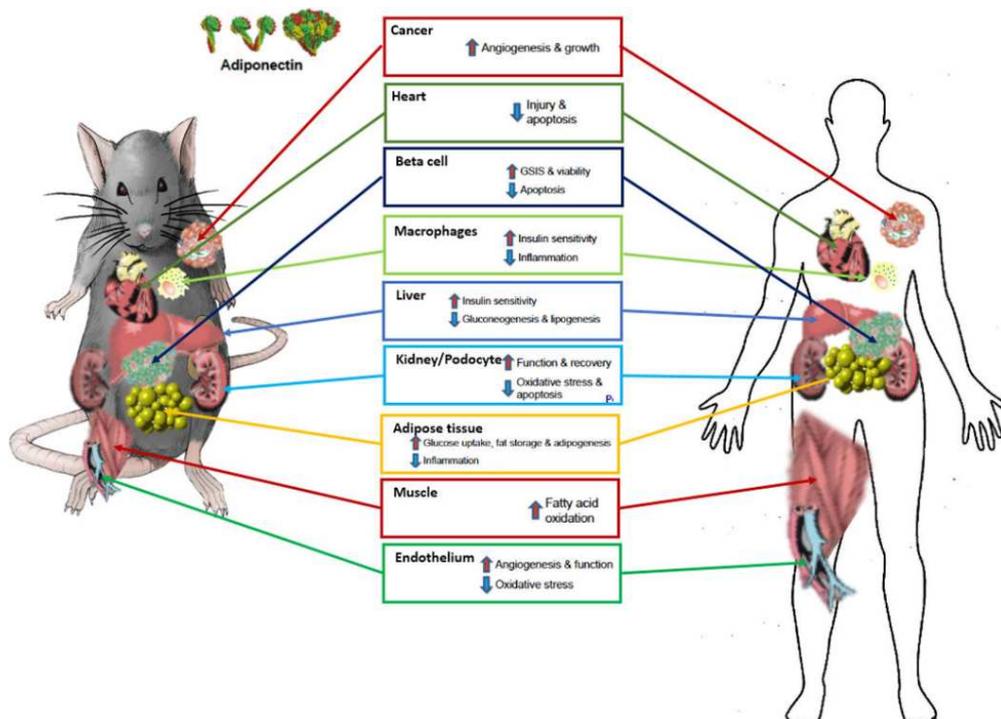


Figure 18 : Tissus cibles et activité biologique de l'adiponectine. L'adiponectine cible un ensemble varié de tissus et de types cellulaires et régulant d'importants processus

métaboliques. Elle joue un rôle dans la sensibilité à l'insuline, l'oxydation des acides gras, la vasodilatation, la cytoprotection et l'internalisation de glucose. (Straub and Scherer, 2019).

Le **Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21)** est principalement synthétisé et sécrété par le foie mais il est également sécrété par les tissu adipeux et les muscles (Itoh, 2014). La formation d'un complexe comprenant FGF21, le récepteur FGFR1 et la protéine β -klotho (Kurosu *et al.*, 2007; Ogawa *et al.*, 2007; Ding *et al.*, 2012), exprimé à la membrane des cellules cibles, est nécessaire au mode d'action de FGF21. Dans le WAT, la formation de ce complexe induit une diminution de la masse grasse, une diminution de la résistance à l'insuline, de la glycémie ainsi que des concentrations de triglycérides plasmatiques (Adams *et al.*, 2012). FGF21 stimule également l'expression et la sécrétion d'adiponectine (Lin *et al.*, 2013) (Figure 19). En plus de son rôle systémique, Abu-Odeh et ses collègues ont montré que les adipocytes sont capables de sécréter FGF21 suite à la stimulation des récepteurs β 3-adrénergiques. FGF21 a, ainsi, une action autocrine sur l'adipocyte afin de stimuler la thermogenèse et de participer au brunissement des adipocytes blancs (Abu-Odeh *et al.*, 2021). Le tissu adipeux brun est également capable de sécréter FGF21 dans un modèle murin invalidé pour UCP1 (Keipert *et al.*, 2015). De ce fait, FGF21 est devenue une cible thérapeutique prometteuse dans le traitement des pathologies métaboliques. Cependant, les différentes études menées chez des patients atteint de diabète de type 2, ayant une stéatose hépatique ou en situation d'obésité montrent des effets limités avec une installation de résistance au traitement avec les analogues de FGF21 (Geng, Lam and Xu, 2020).

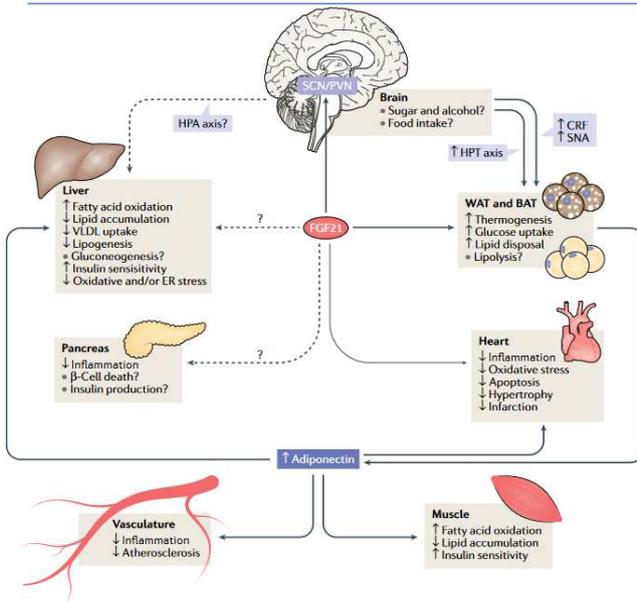


Figure 19 : Les cibles et les effets de FGF21. FGF21 agit sur le SNC afin de réguler la prise alimentaire et stimuler la thermogenèse dans le BAT et le brunissement dans le WAT. FGF21 active la sécrétion d'adiponectine dans le WAT. FGF21 protège des pathologies hépatiques comme la stéatose hépatique et des désordres cardiaques (Geng, Lam and Xu, 2020).

2. Pathologies associées à un dérèglement de la balance énergétique

A. Balance énergétique positive : l'obésité

L'obésité atteint maintenant plus d'un milliard de personnes dans le monde, avec 879 millions d'adultes et 159 millions d'enfants touchés (Phelps *et al.*, 2024). En France, plus de 8 millions de personnes (17% de la population) sont en situation d'obésité dont 500 000 en situation d'obésité sévère avec une prévalence mondiale qui a plus que doublé entre 1990 et 2022 (Fontbonne *et al.*, 2023).

Les hommes et les femmes sont tous deux sujets à l'obésité, cependant l'incidence sur la santé diffère, en grande partie à cause de la répartition différente de la graisse corporelle (Boulet *et al.*, 2022). En effet, l'obésité chez les hommes induit une augmentation plus importante de la graisse viscérale qui est plus sujet aux pathologies métaboliques. L'obésité est caractérisée par un indice de masse corporelle (IMC) égal ou supérieur à 30 kg/m².

Chez l'humain et la souris, l'obésité est caractérisée par une dérégulation de la balance énergétique de manière prolongée en faveur des apports énergétiques. Cela amène à une prise de masse corporelle, un excès de masse grasse, une intolérance au glucose et à des complications métaboliques comme la stéatose hépatique et le diabète (Arroyo-Johnson and Mincey, 2016). Lorsque les apports augmentent, les

adipocytes stockent l'excès d'apports et subissent une hypertrophie et une hyperplasie jusqu'à arriver à une limite d'expansion. L'adipocyte, en stockant l'excès, devient dysfonctionnel induisant une augmentation de l'inflammation et l'installation de fibrose (Kawai, Autieri and Scalia, 2021). Lorsque cette limite est atteinte, le tissu adipeux n'est plus capable de stocker l'excès d'énergie induisant des dépôts lipidiques ectopiques dans le foie, les muscles ou le cœur.

La prévalence et les conséquences de cette pathologie en font un problème de santé publique majeure nécessitant le développement de stratégies thérapeutiques afin de lutter contre l'obésité. A ce jour, les prises en charge sont d'abord des indications de perte de masse corporelle avec des programmes d'activité physique adaptés aux patients ainsi que des programmes nutritionnels. Il existe des traitements médicamenteux comme l'orlistat qui limite l'absorption intestinale de lipides ou encore les agonistes du récepteur au GLP-1 qui induit un état de satiété afin de contrôler la prise alimentaire (Heck, Yanovski and Calis, 2000; Wilbon and Kolonin, 2023). Cependant ces traitements sont limités. Il existe, également, des traitements chirurgicaux impliquant une chirurgie bariatrique comme l'anneau gastrique, le bypass ou la sleeve qui ralentissent le passage des aliments, réduisent la surface d'absorption ou provoquent le sentiment de satiété, permettant une perte de masse corporelle importante (Hritani *et al.*, 2023). De nouveaux traitements ciblant MC4R ont été développés afin de prendre en charge les obésités génétiques.

Différents modèles d'obésité sont utilisés expérimentalement. Le plus commun est le modèle d'induction de l'obésité par l'apport d'un régime riche en gras qui permet la dérégulation de la balance énergétique de manière prolongée et entraîne une augmentation de la prise de masse corporelle, de la masse grasse, de l'intolérance au glucose et l'apparition de pathologies associées comme la stéatose hépatique synonyme d'installation de l'obésité (Ji *et al.*, 2023). L'obésité chez la souris induit également une augmentation du volume de tissu adipeux médullaire et une perte osseuse (Scheller *et al.*, 2016; Tencerova *et al.*, 2018).

B. Balance énergétique négative : l'anorexie mentale

L'anorexie mentale est un trouble du comportement alimentaire rare qui touche essentiellement les jeunes filles. Cette pathologie entraîne une privation alimentaire stricte et volontaire et très souvent associée à des troubles psychologiques (Wade *et al.*, 2000).

La particularité de cette pathologie est la différence de régulation entre les tissus adipeux périphériques et le tissu adipeux médullaire. En effet, la restriction du régime entraîne une diminution de la masse grasse périphérique (WAT et BAT) mais une augmentation du BMAT (Devlin *et al.*, 2010; Speakman and Mitchell, 2011). Les mécanismes mis en jeu dans la régulation différentielle de ces tissus ne sont pas connus. Dans ce contexte, Cawthorn *et al.*, ont montré que le BMAT stimule la sécrétion d'adiponectine suggérant des effets systémiques sur l'homéostasie métabolique, les réponses immunitaires, la fonction vasculaire ou le risque de cancer (Cawthorn *et al.*, 2014). De plus, dans ce modèle, le volume osseux est diminué (Devlin *et al.*, 2010).

Chez la souris, il est difficile de reproduire l'anorexie mentale. Elle est donc modélisée par la restriction calorique. La restriction calorique induit une diminution de la masse grasse périphérique, une augmentation du volume de BMAT et une perte osseuse (Devlin *et al.*, 2010; Speakman and Mitchell, 2011; Villareal *et al.*, 2016). Il existe plusieurs modèles de restriction calorique, l'étude de Pak a comparé plusieurs de ces protocoles et leurs impacts sur le métabolisme énergétique et glucidique (Pak *et al.*, 2021). Dans cette étude, les souris sont isolées et soumises à un régime standard à l'âge de 9 semaines puis 1 semaine après, quatre protocoles ont été testés :

1. Régime standard.
2. Restriction calorique par un régime standard dilué à 50% avec de la cellulose indigeste n'incluant pas de mise à jeun.

3. Restriction calorique par un régime 30% moins calorique que le régime standard distribué en 3 fois sur un cycle de 12 heures et réduisant ainsi la mise à jeun à 4 heures.
4. Restriction calorique par un régime 30% moins calorique que le régime standard sur un cycle de 12 heures et nourries en une seule fois induisant une mise à jeun de 12 heures. (CR)

Les trois régimes de restriction calorique induisent une réduction de la prise de masse corporelle, de la masse grasse et de l'adiposité en comparaison aux souris contrôles. De plus, les régimes de restriction calorique induisent une amélioration de la tolérance au glucose cependant seul le régime CR induit une amélioration de la sensibilité à l'insuline en comparaison aux autres régimes de restriction calorique. Ces résultats démontrent qu'au-delà de la restriction calorique, seule la mise à jeun induit une amélioration de la sensibilité à l'insuline (Pak *et al.*, 2021)

II. Les protéines PiTs : *Slc20a1*/PiT1 et *Slc20a2*/PiT2

Le phosphate est un anion vital pour la cellule puisqu'il est nécessaire à la production de nombreuses molécules biologiques telles que l'ADN, l'ADP ou l'ATP et il est important dans la signalisation cellulaire (Kamerlin *et al.*, 2013). Il existe deux familles de transporteurs de phosphate (Pi) dépendants du sodium (Na) de haute affinité et faible capacité : Slc34 et Slc20 (Figure 20). Ils sont capables de transporter le phosphate de l'extérieur à l'intérieur de la cellule. Les transporteurs de la famille Slc34 sont exprimés spécifiquement dans les reins, l'intestin et les poumons alors que les transporteurs de la famille Slc20 sont exprimés dans tous les tissus (Figure 20).

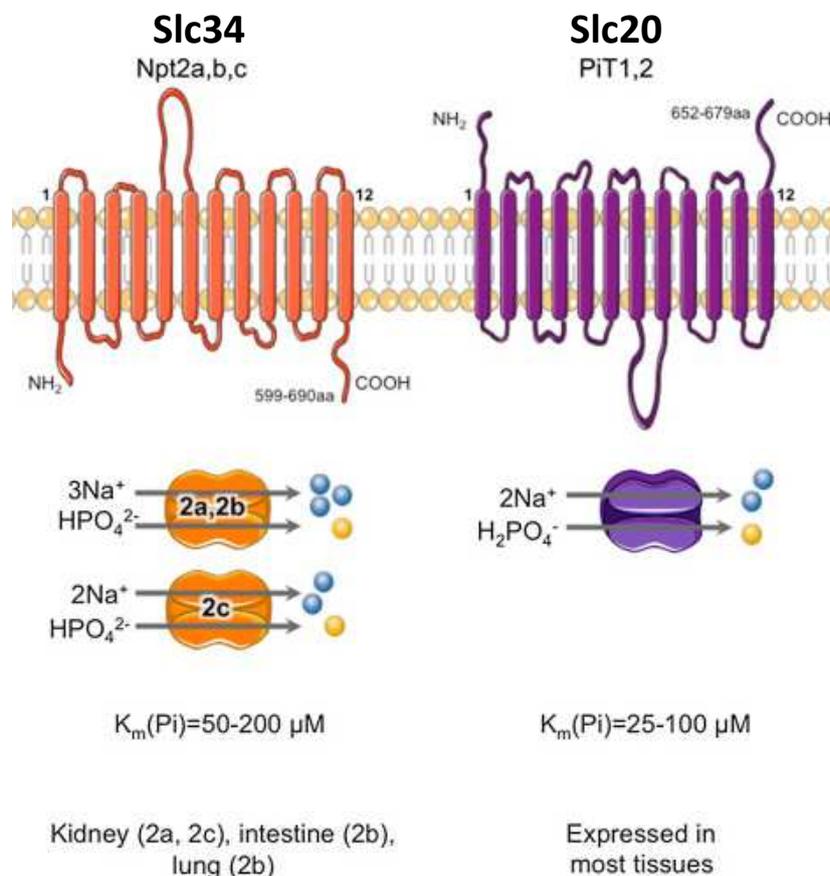


Figure 20 : Principales caractéristiques des cotransporteurs Na-Pi. Schéma illustrant la topologie membranaire des cotransporteurs Na-Pi, la spécificité du substrat, la stœchiométrie du transport de Pi, ainsi que l'affinité pour le Pi (valeur Km selon Michaelis-Menten) et les principaux profils d'expression. (Khoshniat *et al.*, 2011)

Les protéines PiTs (PiT1 et PiT2, Phosphate inorganic Transporter) ont d'abord été identifiées comme des récepteurs aux rétrovirus. En effet, PiT1 et PiT2, initialement appelées Glvr-1 et Ram-1, sont reconnues par les virus de la leucémie du Gibbon (O'Hara *et al.*, 1990) et de la leucémie du rat (Miller and Miller, 1994; van Zeijl *et al.*, 1994), respectivement. Plus tard, ils ont été décrits comme des transporteurs de Pi Na-dépendants (Kavanaugh *et al.*, 1994; Miller and Miller, 1994; Olah *et al.*, 1994) et appartiennent à la famille Slc20. *Slc20a1*/PiT1 est présent sur le chromosome 2 tandis que *Slc20a2*/PiT2 est présent sur le chromosome 8 chez l'homme et la souris.

PiT1 et PiT2 sont des protéines à 12 domaines transmembranaires qui partagent environ 75% d'identité de séquence protéique se situant en dehors de leur large boucle intracellulaire (Figure 21). Les protéines PiT possèdent entre leurs 7^{ème} et 8^{ème} domaines transmembranaires une large boucle intracellulaire étudiée, tout d'abord, par Chien et ses collègues (Chien *et al.*, 1997), puis par d'autres groupes (Salaün, Rodrigues and Heard, 2001; Virkki *et al.*, 2007; Forster *et al.*, 2013). Les protéines PiT1 et PiT2 sont respectivement composées de 679 et 652 acides aminés et leur large boucle intracellulaire de 260 et 246 acides aminés, respectivement. Ces deux boucles intracellulaires ne présentant que 34% d'identité entre elles. PiT1 et PiT2 possèdent un domaine nommé PD1131 qui est dupliqué, inversé et donc présent aux extrémités N- et C-terminale de la protéine.

En 2020, le groupe de Yuh-Ju SUN a cristallisé pour la première fois la protéine PiT provenant de la bactérie *Thermotoga maritima* (Tm) appelé TmPiT et différente des protéines PiT humaines (hPiT) puisqu'elle est dépourvue de la large boucle intracellulaire (Tsai *et al.*, 2020) dont l'équipe de Lene Pedersen avait montré qu'elle n'est pas indispensable pour la fonction de transport de Pi (Bøttger and Pedersen, 2011). Tsai et collaborateurs démontrent que la liaison de TmPiT au phosphate est unique en raison des résidus répétés et symétriques, différents des autres transporteurs de Pi. De plus, leur étude révèle l'importance des domaines HP1 et HP2 dans le transport de Pi et propose un mécanisme de transport composé de 4 phases : 1) transporteur ouvert vers l'extérieur du compartiment, une molécule de Pi et 2 de Na entrent ; 2)

transporteur se ferme vers l'extérieur ; 3) transporteur est fermé à l'intérieur et 4) le transporteur s'ouvre à l'intérieur du compartiment et libère les ions.

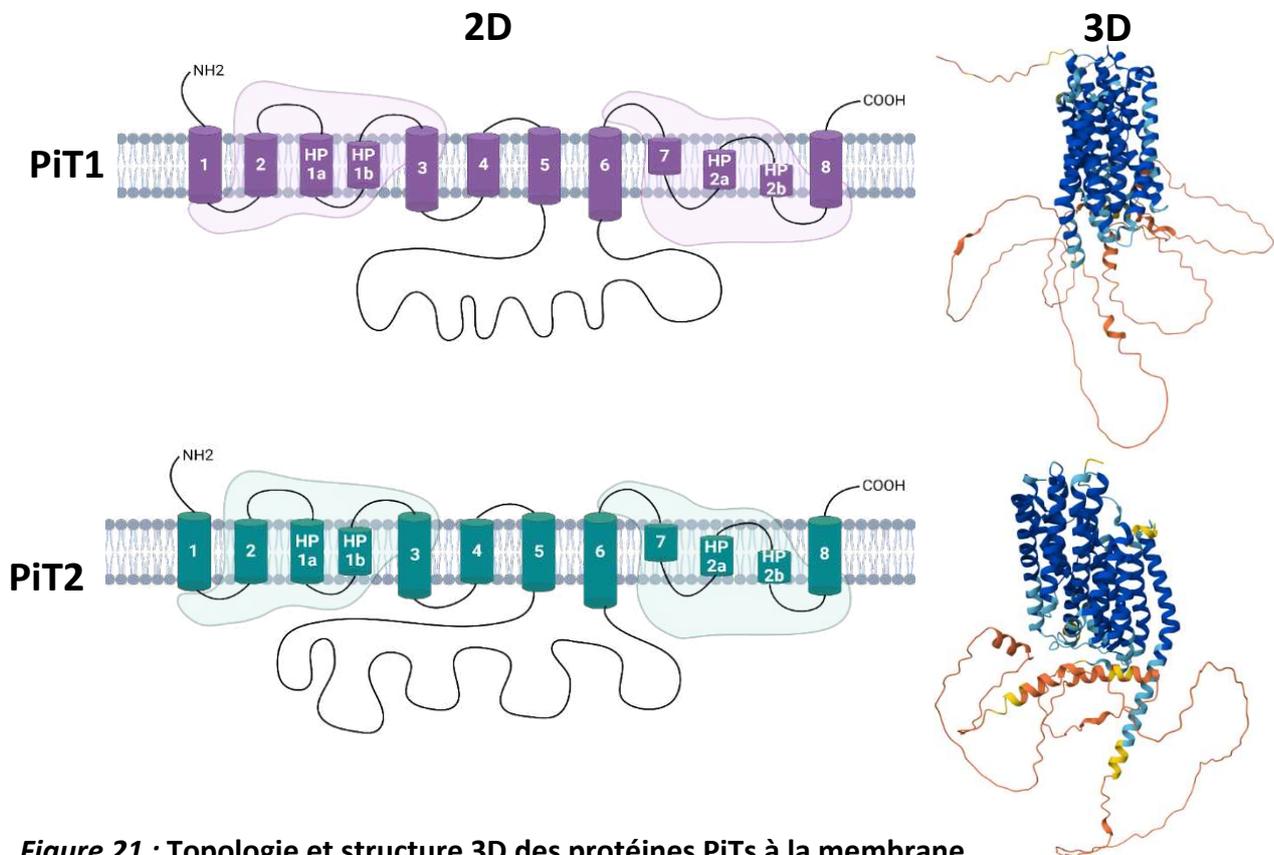


Figure 21 : Topologie et structure 3D des protéines PiTs à la membrane.

Les 12 domaines transmembranaires sont représentés par les cylindres violet (PiT1) et vert (PiT2) en 2D et par des structures en hélices en bleu marine en 3D. Les domaines HP1 et HP2 représentent les domaines importants au transport de phosphate. Les domaines PD1131 sont représentés en zone rose clair (PiT1) et vert clair (PiT2). PiT1 et PiT2 possèdent une large boucle intracellulaire entre les domaines 5 et 6 leur permettant d'interagir avec des partenaires protéiques. Structures 3D obtenues à partir d'Alphafold (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>).

1. Profil d'expression des protéines PiT

Les protéines PiT ont longtemps été décrites comme étant ubiquitaires permettant d'apporter le phosphate dans toutes les cellules de l'organisme. Jusqu'à la publication récente de l'équipe de Xiong, il n'existait pas d'anticorps commercial fiable et spécifique des protéines PiTs endogènes (Cheng *et al.*, 2024). Les profils d'expression,

des gènes *Slc20a1* et *Slc20a2* ont été analysés par Northern blot, RT-qPCR puis par analyses transcriptomiques globales, rendues publiques dans plusieurs bases de données, comme GTEX, répertorient l'expression de ces gènes (Figure 22). Les ARNm *Slc20a1* et *Slc20a2* sont retrouvés dans tous les tissus chez la souris (Forster *et al.*, 2013) et chez l'Homme (Nishimura and Naito, 2008) suggérant un rôle essentiel dans l'organisme. Cependant, leur niveau d'expression génique est variable en fonction des types cellulaires. En effet, de nombreux groupes de recherche ont montré des différences d'expression entre les différents organes (Nishimura and Naito, 2008), mais également entre différents types de cellules. Par exemple, dans l'hippocampe, l'étude de Ramos-Brossier et ses collègues a montré, par hybridation *in situ* sur cerveau de souris, que *Slc20a1* et *Slc20a2* sont exprimés différemment dans différentes régions de l'hippocampe suggérant des rôles spécifiques de ces protéines (Ramos-Brossier *et al.*, 2024). Ces différences de profils d'expression sont en accord avec le fait que PiT1 et PiT2 possèdent des fonctions différentes dans cette région du cerveau.

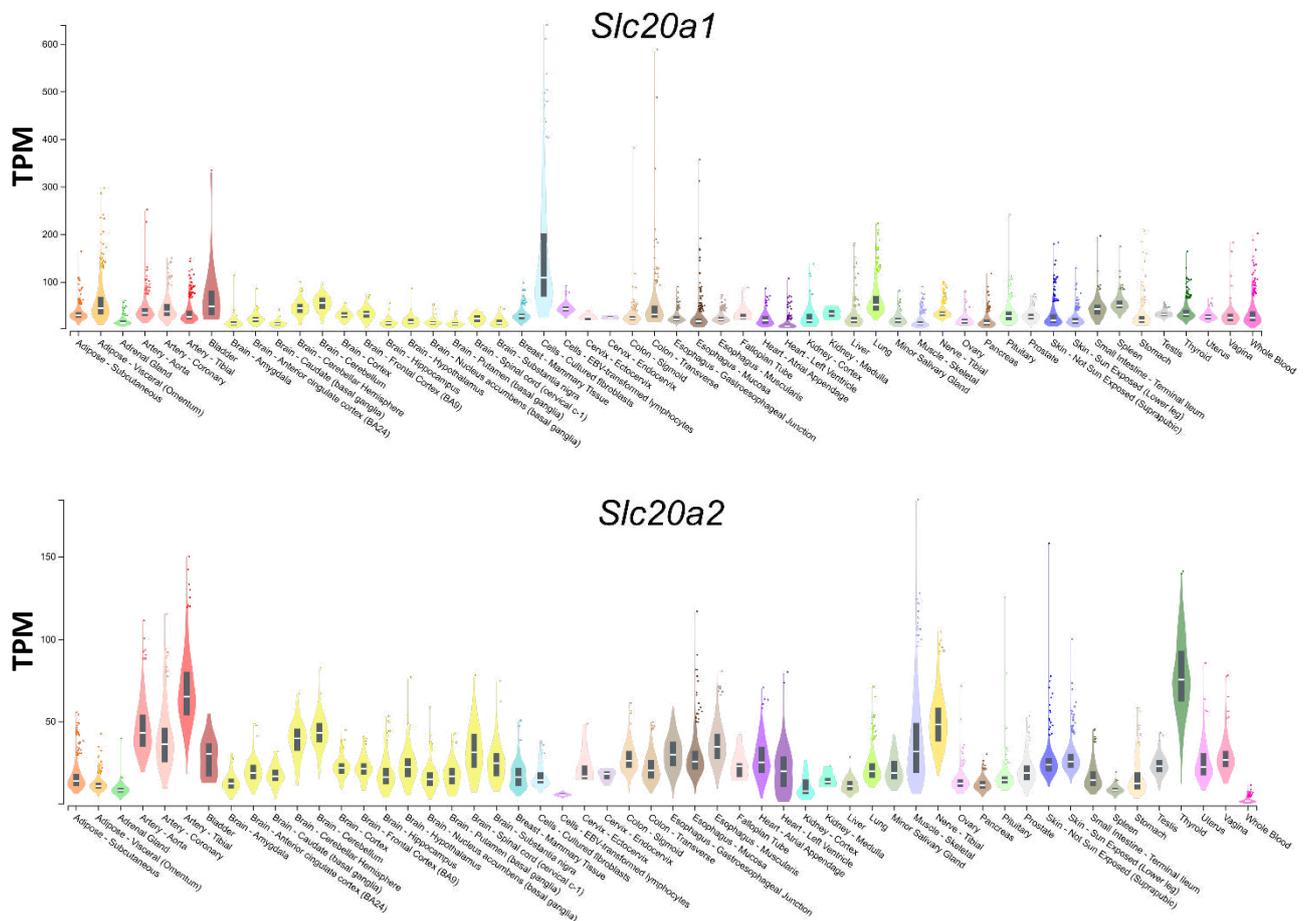


Figure 22 : Profil d'expression de Slc20a1/PiT1 et Slc20a2/PiT2. Les gènes *Slc20a1* et *Slc20a2* sont exprimés dans tous les tissus avec des niveaux d'expressions variables entre les tissus. (<https://gtexportal.org/home/>) TPM : Transcrit per million

2. Multifonctionnalités

Depuis une quinzaine d'années, les protéines PiTs se sont révélées être des protéines multifonctionnelles (Tableau II). Leur mode d'action peut dépendre ou non de leur capacité à transporter le phosphate (Pi), ou passer par la large boucle intracellulaire dont on sait maintenant qu'elle interagit physiquement avec d'autres protéines. La multifonctionnalité de la protéine PiT1 est aujourd'hui bien établie. En effet, PiT1 joue de nombreux rôles indépendamment de son transport de phosphate comme dans la prolifération cellulaire (Beck *et al.*, 2009), l'apoptose (Salaün *et al.*, 2010), la survie des chondrocytes (Couasnay *et al.*, 2019) ainsi que le métabolisme glucidique et la sensibilité à l'insuline (Forand *et al.*, 2016). Ces deux dernières fonctions dépendent de l'interaction physique de PiT1 avec, respectivement, les protéines PDI et USP7 (Couasnay *et al.*, 2019; Forand *et al.*, 2016). Les rôles de PiT2 indépendants du transport de Pi ont été identifiés plus récemment. PiT2 joue notamment un rôle dans la croissance neuronale en se liant avec la protéine MAP1B (Ma *et al.*, 2017) et l'anxiété (Ramos-Brossier *et al.*, 2024). Enfin, l'équipe a récemment montré que PiT1 et PiT2 peuvent former un hétérodimère capable de détecter les variations de concentrations de Pi extracellulaire et, *in fine*, de réguler la sécrétion de l'hormone phosphaturiante FGF23 (Bon *et al.*, 2018 a). Cette fonction de « sensor » de Pi est indépendante de leur capacité à transporter le Pi (Bon *et al.*, 2018 b).

Tableau II : Fonctions des protéines PiT1 et PiT2 dépendantes ou indépendantes de leur capacité à transporter le phosphate.

Dépendant du transport de Pi	Indépendant du transport de Pi	Mécanismes inconnus
Calcification vasculaire cérébrale (PiT2) (8, 21, 22)	Récepteur au rétrovirus (PiT1/PiT2) (1, 2, 3, 4)	Développement du foie et cancer (PiT1) (7)
	Prolifération/apoptose (PiT1) (5,6)	Qualité et solidité osseuse/minéralisation de la dentine (PiT2) (17)
	Maturation érythroïde (PiT1) (9)	Fonction et survie des myocytes (PiT1/PiT2) (18)
	Métabolisme du glucose (PiT1) (12)	Calcification vasculaire non cérébrale (PiT1/PiT2 ?) (10, 11)
	Senseur de phosphate (PiT1/PiT2) (14, 15)	Régulation du volume de BMAT (PiT2) (19)
	Croissance et plasticité neuronale (PiT1/PiT2) (13, 20)	
	Survie des chondrocytes (PiT1) (16)	

1. (O'Hara *et al.*, 1990)
2. (Miller and Miller, 1994)
3. (Pedersen *et al.*, 1995)
4. (Pedersen *et al.*, 1997)
5. (Beck *et al.*, 2009)
6. (Salaün *et al.*, 2010)
7. (Beck *et al.*, 2010)
8. (Wang *et al.*, 2012)
9. (Forand *et al.*, 2013)
10. (Crouthamel *et al.*, 2013)
11. (Chavkin *et al.*, 2015)
12. (Forand *et al.*, 2016)
13. (Ma *et al.*, 2017)
14. (Bon *et al.*, 2018 a)
15. (Bon *et al.*, 2018 b)
16. (Couasnay *et al.*, 2019)
17. (Beck-Cormier *et al.*, 2019)
18. (Chande *et al.*, 2020)
19. (Frangi *et al.*, 2022)
20. (Ramos-Brossier *et al.*, 2024)
21. (Cheng *et al.*, 2024)
22. (Zhao *et al.*, 2024)

Dans cette partie, j'ai fait le choix de présenter les rôles des protéines PiTs dans des organes métaboliques à savoir le foie, les muscles squelettiques, le cerveau et les tissus adipeux.

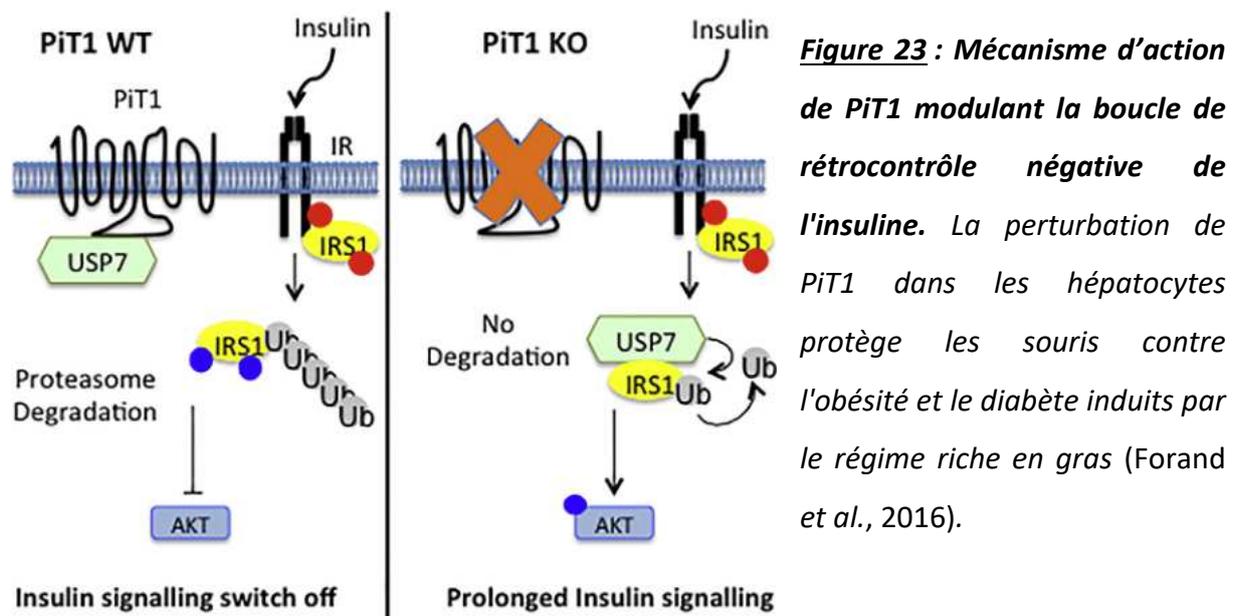
A. Rôle de PiT1 dans le métabolisme glucidique

Le premier rôle de PiT1, *in vivo*, a été décrit en 2010 par l'équipe du professeur Gérard FRIDLANDER (Beck *et al.*, 2010). Les auteurs montrent que l'inactivation de PiT1 chez la souris (*PiT1*^{-/-}) a pour conséquence une léthalité embryonnaire E12,5 associée à une croissance retardée et une anémie sévère. Le foie des embryons *PiT1*^{-/-} présente

une réduction de la cellularité. Au cours de l'embryogenèse, le foie est le principal organe où les cellules souches hématopoïétiques se multiplient et se différencient jusqu'à la fin de la vie fœtale, moment où l'hématopoïèse se délocalise dans la moelle osseuse. Cette étude démontre le rôle de PiT1 dans la prolifération et la survie des hépatocytes pendant la morphogenèse du foie. Il est important de noter que PiT2 ne compense pas la perte de PiT1, ce qui démontre, d'une part, que PiT1 est un gène essentiel pour le développement du foie chez la souris et d'autre part que PiT1 a une fonction spécifique dans le développement du foie.

Pour déterminer le rôle de PiT1 dans les hépatocytes chez l'adulte, l'équipe de Gérard FRIEDLANDER a généré un modèle murin invalidé pour PiT1 spécifiquement dans les hépatocytes (*PiT1^{HepKO}*) en croisant des souris *PiT1^{flx/flx}* avec des souris exprimant la recombinaison CRE sous le contrôle du promoteur de l'albumine (Forand *et al.*, 2016). De manière intéressante, les auteurs ont montré un rôle de PiT1 dans le métabolisme glucidique indépendamment de sa capacité à transporter le Pi. Les souris *PiT1^{HepKO}* sont protégées de la prise de masse corporelle induite par l'âge et présentent une augmentation de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline. Dans des MEF (mouse embryonic fibroblasts) invalidés pour PiT1 (*MEF^{PiT1^{-/-}}*), les auteurs ont montré une augmentation de la phosphorylation du récepteur à l'insuline associée à une augmentation de la phosphorylation d'AKT. De plus, ils ont montré que le substrat du récepteur à l'insuline 1 (IRS1) était plus stable et moins phosphorylé dans les *MEF^{PiT1^{-/-}}*. En investiguant les mécanismes d'action de PiT1 dans ce contexte, Forand et ses collègues ont montré que PiT1 est capable d'interagir avec USP7 (ubiquitin-specific peptidase 7) inhibant l'interaction d'USP7 avec IRS1 ce qui a pour conséquence la dégradation d'IRS1 dans le protéasome et une diminution du signal de l'insuline. L'invalidation de PiT1 dans les hépatocytes permet à USP7 d'interagir avec IRS1 et de limiter sa dégradation. Le complexe USP7/IRS1 augmente ainsi la phosphorylation d'AKT ce qui permet un signal de l'insuline prolongé (Figure 23). De plus, les auteurs montrent que ce rôle est indépendant de sa capacité à transporter le Pi puisque l'expression d'un mutant de PiT1 sans sa capacité à transporter le Pi dans les *MEF^{PiT1^{-/-}}*

a montré les mêmes résultats. Pour finir, les souris *PiT1^{HepKO}* dans un modèle d'obésité induite par un régime riche en gras résistent à la prise de masse corporelle, à l'augmentation et l'inflammation de la masse grasse, à la stéatose hépatique et sont plus sensibles à l'insuline.



B. Rôle des PiTs dans la survie et la fonction des myocytes

Le groupe de Clemens BERGWITZ a émis l'hypothèse que PiT1 et PiT2 était nécessaire à la production d'ATP dans le muscle squelettique. Afin de vérifier cette hypothèse, les auteurs ont généré des souris invalidées pour PiT1 et/ou PiT2 dans les myocytes en utilisant la recombinaison CRE sous le contrôle du promoteur de l'actine squelettique humaine (HSA-CRE) (Chande *et al.*, 2020). Les souris invalidées pour PiT1 (*PiT1^{sm/-}*) ou PiT2 (*PiT2^{sm/-}*) dans les myocytes ont un développement et une prise de masse corporelle semblable aux souris contrôles. Les souris invalidées à la fois pour PiT1 et PiT2 (*PiT1^{sm/-} ; PiT2^{sm/-}*) développent une myopathie sévère accompagnée d'une mobilité réduite, un remplissage gastrique diminué et une diminution sévère des tissus adipeux blancs ce qui entraîne leur mort avant l'âge de 2 semaines (P13). Ils montrent également une diminution de l'activation de la voie ERK1/2 dans le quadriceps et, à l'inverse, une augmentation de la phosphorylation de l'AMPK

suggérant une augmentation du stress énergétique et la réduction de production d'ATP dans le muscle. Des analyses en microscopie électronique à transmission ont également montré une réduction de la surface des mitochondries et une matrice mitochondriale irrégulière.

Pour conclure, la délétion de PiT1 et PiT2 dans les myocytes induit le développement d'une myopathie sévère, *in vivo*, tandis que la délétion de PiT1 ou PiT2 seul ne permet pas de reproduire le phénotype indiquant que PiT1 et PiT2 sont indispensables pour la fonction et la survie des myocytes (Figure 24).

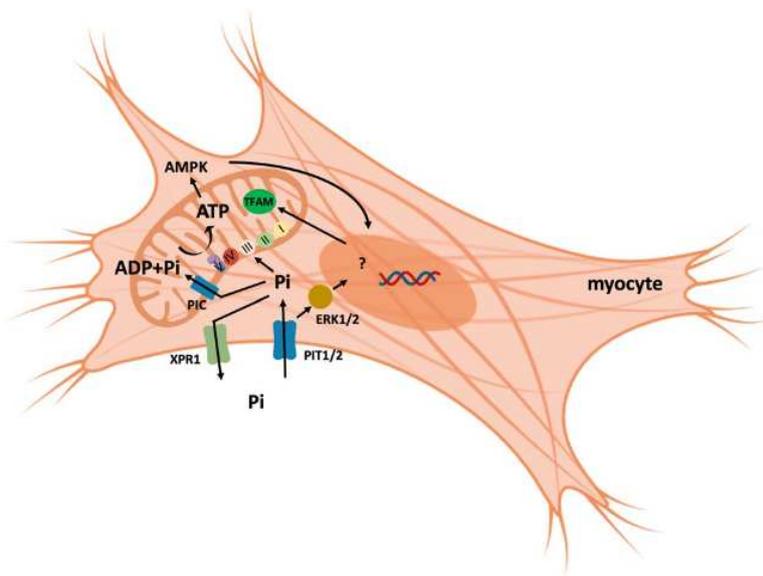


Figure 24 : Schéma suggérant la signalisation métabolique du phosphate dans les myocytes. PiT1 et PiT2 permettent d'augmenter le phosphate intracellulaire important pour la synthèse de l'ATP et dans la stimulation de la respiration mitochondriale (Chande *et al.*, 2020).

C. Rôle des PiTs dans le cerveau

Rôle de PiT2 dans la croissance et la plasticité neuronale

Deux études montrent le rôle de PiT2 dans la croissance et la plasticité neuronale en lien avec sa capacité à médier des rôles spécifiques grâce à sa boucle intracellulaire en interagissant avec des partenaires protéiques (Ma *et al.*, 2017; Ramos-Brossier *et al.*, 2024).

Ma et ses collègues ont étudié le rôle de la boucle de PiT2 dans le système nerveux central (SNC) (Ma *et al.*, 2017). En transfectant un mutant de PiT2 sans sa

boucle intracellulaire (PiT2 Δ iLoop) dans des neuroblastes, les auteurs ont montré que la majorité du mutant PiT2 Δ iLoop était localisée dans le cytoplasme plutôt qu'à la membrane plasmique. La surexpression de cette forme mutée PiT2 Δ iLoop induit une diminution de la longueur des neurites suggérant que PiT2 participerait à la croissance et au développement des neurones. De manière intéressante, les auteurs ont montré que PiT2 se lie physiquement avec MAP1B (microtubule-associated protein 1B) qui joue un rôle important dans l'extension des neurites au cours de la différenciation neuronale. De plus, la surexpression des mutants de PiT2 avec sa boucle intracellulaire mais avec une fonction de transport de Pi déficiente, n'a pas affecté la croissance des neurites. Ces résultats suggèrent que PiT2 module la croissance des neurites indépendamment de sa fonction de transport de Pi et notamment grâce à son interaction avec MABP1.

Le groupe de Franck OURY a exploré le rôle de *Slc20a1*/PiT1 et *Slc20a2*/PiT2 dans l'hippocampe (Ramos-Brossier *et al.*, 2024). Les auteurs montrent que *Slc20a1* et *Slc20a2* sont les seuls co-transporteurs Na/Pi exprimés dans cet organe. De manière intéressante, dans l'hippocampe la distribution spatiale des Slc20a diffère suggérant des fonctions différentes (Figure 25).

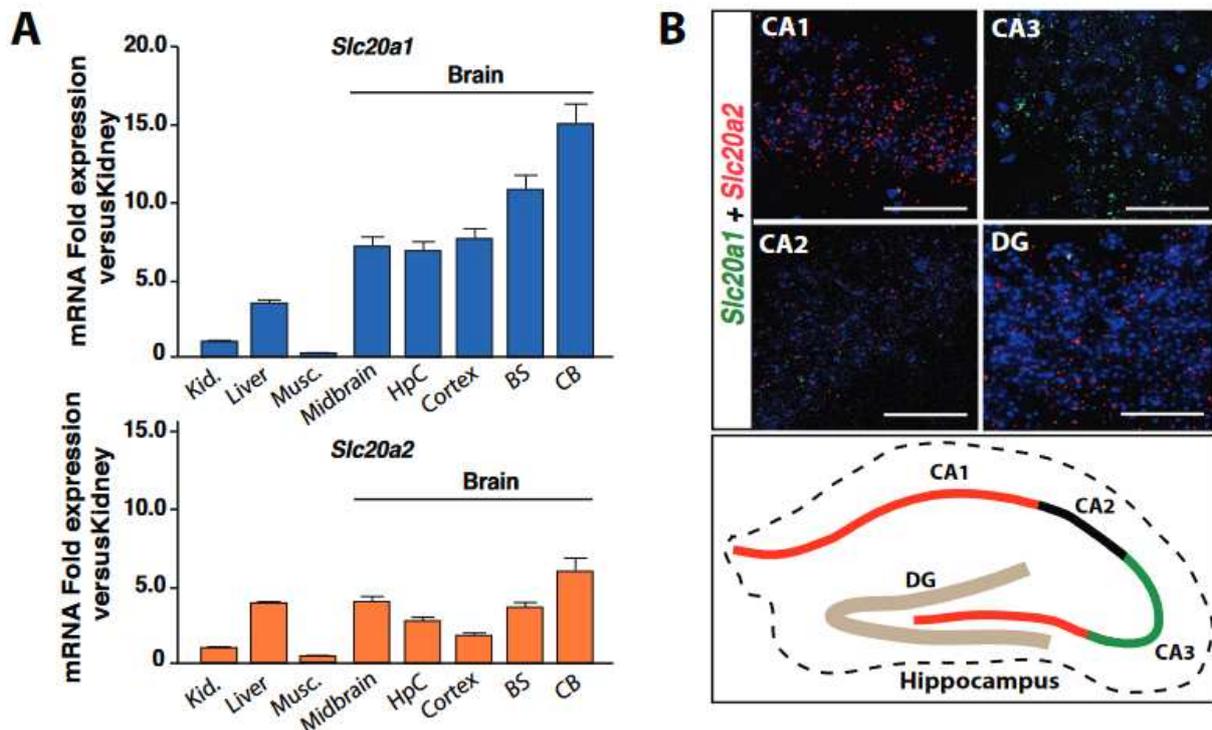


Figure 25 : Expression des *Slc20a* dans le cerveau chez la souris. A. Expression relative des gènes *Slc20a1* et *Slc20a2* dans les reins, le foie, les muscles et diverses parties du cerveau (mésencéphale, hippocampe (HpC), cortex, tronc cérébral (BS) et cervelet (CB)). **B.** Hybridation *in situ* des ARNm *Slc20a1* (vert) et *Slc20a2* (rouge) de coupes de cerveau hippocampique (barre d'échelle = 200 μ m) (Ramos-Brossier et al., 2024).

L'injection par stéréotaxie d'AAV-shPiT1 ou d'AAV-shPiT2 dans l'hippocampe entraîne un retard significatif dans l'apprentissage spatial et une altération de la mémoire épisodique. De manière intéressante, l'inactivation de PiT1 altère la mémoire contextuelle de la peur, tandis que l'inactivation de PiT2 altère les comportements d'exploration et d'anxiété. Ces résultats indiquent que PiT1 et PiT2 partagent des rôles dans l'hippocampe mais ont également des rôles distincts. En étudiant plus en détail le rôle de chacune de ces deux protéines dans l'hippocampe, les auteurs ont montré que l'inactivation de PiT2 induit une diminution du nombre de neurones matures accompagnée d'une inflammation neuronale et d'une augmentation de l'apoptose. Ces résultats démontrent que PiT2 est essentiel à la survie neuronale dans l'hippocampe et pourrait expliquer, au moins en partie, les phénotypes

comportementaux observés après la diminution de l'expression de PiT2 dans les cellules. De plus, le nombre, la longueur des dendrites et l'arborisation dendritique sont diminués suite à l'invalidation de PiT2, confirmant les travaux de Ma et ses collègues (Ma *et al.*, 2017). De manière intéressante, la surexpression de PiT1 ne permet pas de compenser le phénotype observé suite à la perte de PiT2 indiquant un rôle distinct de PiT2 dans l'hippocampe. A l'inverse, les auteurs ont montré que l'invalidation de PiT1 joue un rôle dans le maintien de la plasticité neuronale en influençant des acteurs importants de la transmission synaptique et de la plasticité, y compris des protéines impliquées dans la fusion des vésicules synaptiques et le trafic membranaire. De plus, la délétion de PiT1 modifie les gènes liés au système GABAergique, et module les niveaux d'expression d'Otoferline, une protéine impliquée dans la fusion et le trafic des vésicules synaptiques. Cette régulation est importante pour la formation d'une nouvelle mémoire dans l'hippocampe. Pour conclure, l'étude récente de Ramos-Brossier et ses collègues met en lumière des rôles distincts de PiT1 et PiT2 dans la régulation de la plasticité neuronale et de la cognition indépendamment de leur capacité à transporter le Pi (Ramos-Brossier *et al.*, 2024).

D. Rôle de PiT2 dans les tissus adipeux

Rôle de PiT2 dans la régulation du volume du tissu adipeux médullaire

En étudiant les souris invalidées pour PiT2 (*Slc20a2*^{-/-}), plusieurs équipes ont montré que ces souris présentent un retard de croissance, une diminution de la densité minérale osseuse ainsi qu'une diminution de la qualité et de la solidité osseuse (Jensen *et al.*, 2018; Yamada *et al.*, 2018; Beck-Cormier *et al.*, 2019). De manière intéressante, ce phénotype ne semble pas lié à une altération des cellules qui forment (ostéoblastes) ou résorbent (ostéoclastes) l'os (Beck-Cormier *et al.*, 2019). En effet, l'activité ostéoblastique et ostéoclastique *in vivo* ne sont pas modifiées. De plus, les tests de différenciation ostéoblastique à partir de SSC (Skeletal Stem Cell) de souris *Slc20a2*^{-/-}

ou de calcification à partir d'ostéoblastes primaires de souris *Slc20a2*^{-/-} ne montrent pas de différence avec les cellules contrôles.

Comme je l'ai présenté dans la première partie d'introduction, il existe un lien étroit entre le tissu osseux et le BMAT. Notre équipe a donc investigué le rôle de PiT2 dans le tissu adipeux médullaire (Frangi *et al.*, 2022). Les souris *Slc20a2*^{-/-} présentent une augmentation du volume de BMAT à l'âge de 3 semaines par rapport aux souris contrôles (Figure 26) alors qu'à l'inverse l'épaisseur de l'os cortical et du volume osseux trabéculaire sont diminués. Les SSC de la moelle provenant de tibias de jeunes souris *Slc20a2*^{-/-} ont été caractérisées par des analyses FACS et leur différenciation adipogénique a été évaluée *in vitro*. Pour les analyses FACS, les SSC ont été quantifiées grâce aux marqueurs Ter119⁻, CD45⁻, Sca1⁺, CD44⁺, CD105⁺ et les progéniteurs adipogéniques ont été quantifiés comme Ter119⁻, CD45⁻, CD31⁻, Sca1⁺, CD24⁻, préalablement choisis parmi les plus couramment utilisés dans la littérature (Boxall and Jones, 2012; Ambrosi *et al.*, 2017). Par ailleurs, la capacité des SSC à se différencier soit en ostéoblastes, soit en adipocytes n'est pas modifiée en absence de PiT2 indiquant que l'équilibre entre les voies de différenciation adipocytaire versus ostéoblastique des SSC à l'âge de 3 semaines n'est pas altéré. A ce jour, nous n'expliquons pas l'augmentation du volume de BMAT versus la diminution du volume osseux à cet âge. Cependant, alors que chez les souris contrôles le volume de BMAT augmente d'un facteur 10 entre 3 et 16 semaines, le volume d'adiposité médullaire reste stable chez les souris *Slc20a2*^{-/-} (Figure 26). La souris *Slc20a2*^{-/-} adulte ne présente donc pas de corrélation inverse entre son volume de BMAT et son volume de tissu osseux.

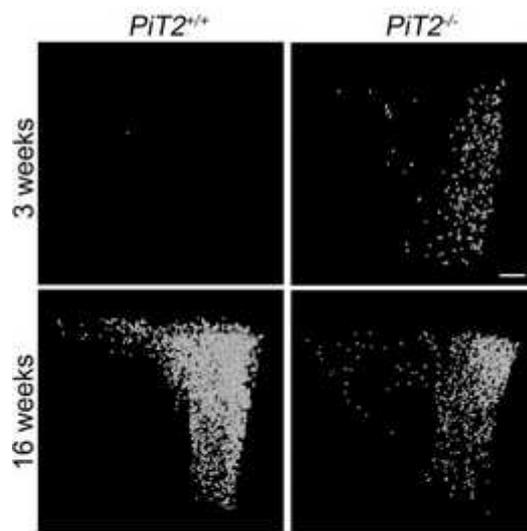
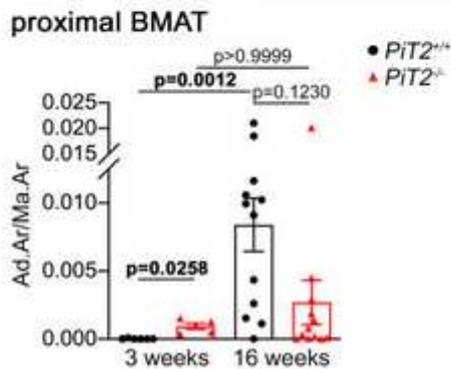


Figure 26 : Volume de BMAT chez les souris *Slc20a2*^{-/-}. Représentation en trois dimensions des adipocytes médullaire des souris contrôles et *Slc20a2*^{-/-} à l'âge de 3 et 16 semaines. Les graphiques, en dessous, sont la quantification du volume de ces adipocytes par rapport au volume de moelle osseuse (Frangi et al., 2022).



PiT2 est-il impliqué dans la thermogenèse ?

La découverte du rôle de PiT2 dans la régulation du volume de BMAT et le fait que la masse corporelle des souris *Slc20a2*^{-/-} est inférieure de 20% par rapport aux souris contrôles (Figure 27), nous amènent à étudier le rôle de PiT2 dans les tissus adipeux périphériques.

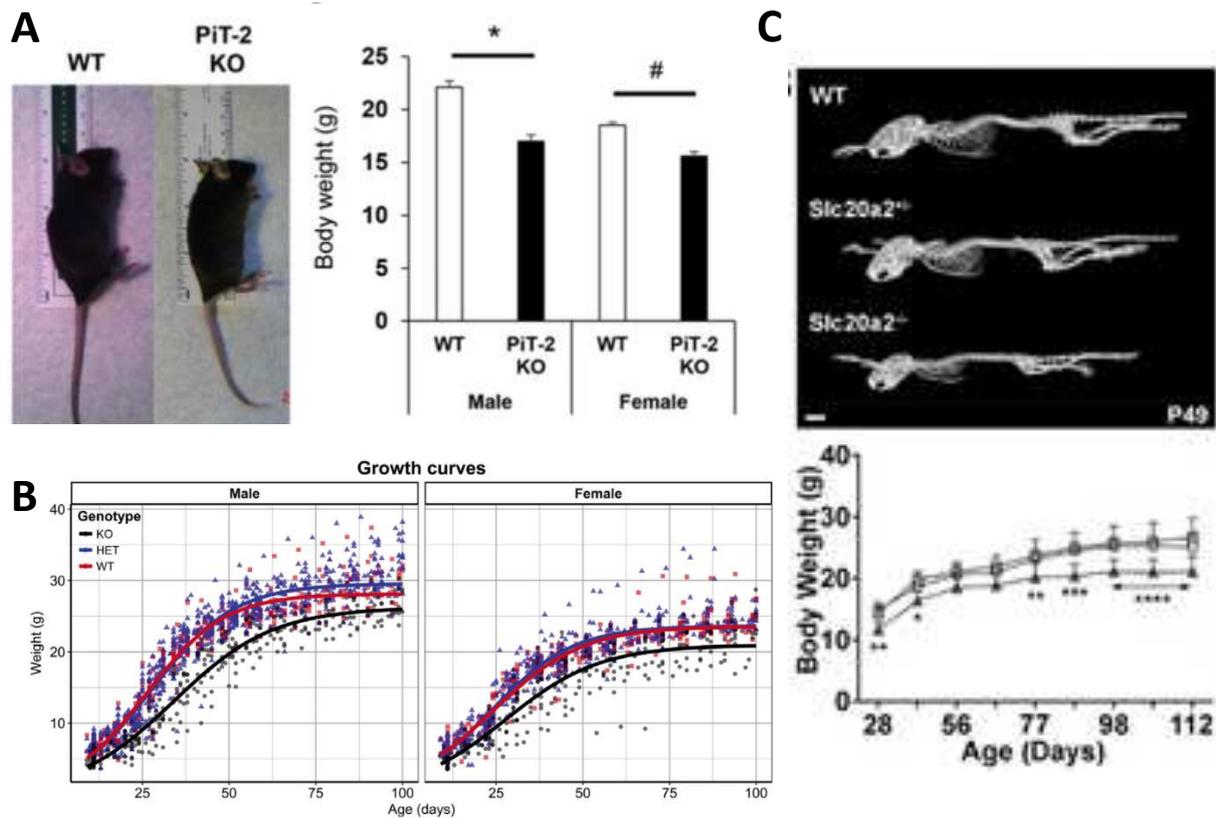


Figure 27 : Les souris *Slc20a2*^{-/-} présentent une diminution de leur masse corporelle. **A**. Figure extraite de Yamada et al., 2018 montrant une image des souris contrôles et *Slc20a2*^{-/-} à l'âge de 10 semaines et la masse corporelle associée. **B**. Figure extraite de Jensen et al., 2018 montrant les courbes de masse corporelle des souris mâles et femelles contrôles et *Slc20a2*^{-/-} à l'âge de 8 jours jusqu'à 100 jours. **C**. Figure extraite de Beck-Cormier et al., 2019 montrant une image des souris contrôles, *Slc20a2*^{+/-} et *Slc20a2*^{-/-} à l'âge de 49 jours et les courbes de masse corporelle des souris mâles contrôles et *Slc20a2*^{-/-} à l'âge de 28 jours jusqu'à 112 jours. (Jensen et al., 2018; Yamada et al., 2018; Beck-Cormier et al., 2019).

Mais que sait-on du rôle de PiT2 dans ces tissus ? Les ARNm *Slc20a2* sont détectés dans les adipocytes (https://singlecell.broadinstitute.org/single_cell/study/SCP1376/). De manière intéressante, Biagi et ses collaborateurs ont récemment mis en évidence l'expression de *Slc20a2* dans une sous-population d'adipocytes thermogéniques "Ad1highUCP1", qui ont un profil thermogénique canonique, grâce à une analyse SnRNAseq dans le WAT de souris (Biagi et al., 2021). L'analyse des données

de l'IMPC (IMPC, International Mouse Phenotyping Consortium) qui a effectué un phénotypage à grande échelle de plus de 2 000 souris mutantes place le gène *Slc20a2* dans la liste des gènes « Strong metabolic phenotype » (Rozman *et al.*, 2018, Supp data 2,). Dans la littérature, il existe deux articles du laboratoire dirigé par Leslie P.Kozak montrant une dérégulation de l'expression de *Slc20a2* dans des modèles murins invalidés pour des protéines impliquées dans la thermogenèse. En 2008, cette équipe a généré un modèle murin invalidé pour UCP1 et GDM (mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase) (*Ucp1^{-/-} ; Gdm^{-/-}*) afin d'étudier la thermogenèse indépendante d'UCP1 (Anunciado-Koza *et al.*, 2008). Les souris *Ucp1^{-/-} ; Gdm^{-/-}* présentent une résistance au régime riche en gras et une amélioration de la sensibilité à l'insuline. De manière intéressante, dans ce modèle, l'expression de *Slc20a2* est environ deux fois plus élevée dans le tissu adipeux blanc inguinal des souris *Ucp1^{-/-} ; Gdm^{-/-}* soumises à un régime riche en gras pendant 10 semaines à 20°C puis 10 semaines à 30°C (Anunciado-Koza *et al.*, 2008). En 2011, la même équipe a généré un modèle murin invalidé pour UCP1 (Uncoupling protein1) et la leptine (*Ucp1^{-/-} ; Lep^{-/-}*), ils montrent une augmentation de l'expression de PiT2 d'un facteur 2,4 dans les muscles des souris *Ucp1^{-/-} ; Lep^{-/-}* par rapport aux souris contrôles (Anunciado-Koza *et al.*, 2011). Ces résultats suggèrent que PiT2 pourrait jouer un rôle dans la thermogenèse indépendante d'UCP1. Cependant, les auteurs ne proposent aucune hypothèse sur le rôle de PiT2 dans ce contexte.

OBJECTIFS DE MON TRAVAIL DE THESE

Ce projet a émergé du travail de thèse du Dr. Giulia FRANGI, et auquel j'ai participé, montrant que PiT2 régule le volume de tissu adipeux médullaire en condition physiologique (Frangi *et al.*, 2022). En effet, les souris invalidées pour PiT2 présentent une inhibition de l'augmentation du volume de BMAT entre l'âge de 3 et 16 semaines. Mon projet de thèse a été d'évaluer l'effet de l'inactivation de PiT2 sur les tissus adipeux en conditions physiologique et physiopathologiques.

Au cours de ma thèse, j'ai étudié le rôle de PiT2 dans les tissus adipeux blancs et bruns dans un contexte physiologique, mais également dans différents contextes pathologiques tels que l'obésité, l'ostéoporose postménopause et dans un modèle de restriction calorique.

Le premier objectif de mon travail a été d'étudier le rôle de PiT2 dans la régulation du métabolisme énergétique en condition physiologique et dans un modèle d'obésité induite par régime riche en gras en utilisant les souris invalidées pour PiT2 (*Slc20a2*^{-/-}). Afin de déterminer les mécanismes d'action de PiT2 dans la régulation du métabolisme énergétique, nous avons généré un modèle murin d'inactivation de PiT2 spécifiquement dans les adipocytes (*Slc20a2*^{AdKO}) et un modèle murin d'inactivation de PiT2 spécifiquement dans l'hypothalamus (*AAV-shPiT2*) en collaboration avec le laboratoire du Dr Franck OURY (INEM, Paris).

Le second objectif de mon travail a été d'étudier l'impact de l'absence de PiT2 sur les volumes d'os et de BMAT dans différents contextes pathologiques que sont l'obésité, l'ostéoporose postménopause et dans un modèle de restriction calorique.

RESULTATS

I. Rôle de PiT2 dans le métabolisme énergétique

1. L'absence de PiT2 chez la souris entraîne une augmentation de l'activité du tissu adipeux brun

Contexte

Comme décrit dans l'introduction, les souris invalidées pour PiT2 présentent une inhibition de l'augmentation du volume de BMAT avec l'âge (Frangi *et al.*, 2022). A partir de cette observation, nous avons investigué la masse des tissus adipeux périphériques chez les souris *Slc20a2*^{-/-} en comparaison aux souris contrôles.

Les résultats de cette étude font l'objet d'un article soumis dans le journal *Molecular Metabolism* et inséré dans ce manuscrit. Nous proposons de résumer ci-dessous les matériels et méthodes utilisés lors de cette étude, les résultats obtenus référencés aux figures du papier (page 70-71) et la conclusion qui découle de ce travail.

Matériels et méthodes

La masse des tissus adipeux (iWAT, gWAT, BAT) a été mesurée chez les souris contrôles et *Slc20a2*^{-/-} mâles et femelles à 3, 16, 24 et 48 semaines. Le métabolisme énergétique des souris a été évalué par calorimétrie indirecte grâce à l'utilisation de cages métaboliques permettant de mesurer la prise alimentaire, la consommation d'oxygène (VO₂), la consommation de CO₂ (VCO₂), le rapport d'échange respiratoire (VCO₂/VO₂=RER) et la dépense énergétique (EE, EE=[3,941(VO₂) + 1,106(VCO₂)] *1,44). Les marqueurs adipogéniques et thermogéniques ont été analysés dans les tissus adipeux par RT-qPCR et western blot. La morphologie des tissus adipeux a été analysée par histomorphométrie. L'activité du tissu adipeux brun a été mesurée par analyse de l'utilisation du glucose grâce au ¹⁸F-FDG PET/CT et par analyse de la consommation d'oxygène en utilisant la technique Seahorse®. La lipolyse dans les tissus adipeux bruns et blancs a été analysée par western blot (ATGL, HSL, pHSL) et à partir des explants de tissus adipeux (dosage du relargage du glycérol et des NEFA).

Résultats

Les souris *Slc20a2*^{-/-} mâles et femelles présentent une diminution spécifique de la masse grasse périphérique à l'âge adulte (Figure 1B et S2A). De plus, la masse des tissus adipeux n'augmente pas avec l'âge entre 3 et 48 semaines (Figure 1C et S2B). Nous montrons que la diminution de la masse grasse n'est pas la conséquence d'une altération de la prise alimentaire (Figure 1D), de l'absorption des lipides (Figure 1E-G), de l'activité physique (Figure 1J) ou du métabolisme glucidique (Figure S1 et S2D-E). Les analyses de calorimétrie indirecte montrent que les souris *Slc20a2*^{-/-} mâles présentent une augmentation de la VO₂ et de la EE en comparaison aux souris contrôles (Figure 1H-I). L'augmentation de la dépense énergétique n'est pas la conséquence d'une différence de masse corporelle entre les génotypes car lorsqu'on rapporte la masse corporelle des souris à 25g les souris *Slc20a2*^{-/-} présentent une augmentation de la dépense énergétique (Figure 1K). Cette augmentation de la dépense énergétique est associée à une diminution du RER suggérant que les souris utilisent préférentiellement les lipides comme source d'énergie (Figure 1L).

Les analyses de l'activité du BAT en utilisant les techniques ¹⁸F-FDG PET/CT et Seahorse[®] montrent que celle-ci est augmentée en absence de PiT2 (Figure 2A-B). De plus, l'analyse histomorphométrique du BAT montre une diminution de la surface lipidique dans ce tissu (Figure 2C). En analysant la lipolyse dans le iWAT, nous montrons une diminution de la surface lipidique et une augmentation du relargage du glycérol et des NEFA à partir d'explants d'iWAT (Figure 2D-F) chez les souris *Slc20a2*^{-/-} en comparaison aux souris contrôles. L'augmentation de l'activité du tissu adipeux brun et de la lipolyse est observée à l'état basal mais pas après stimulation de la voie β₃ adrénergique (Figure S3A-C). En accord avec ces résultats, nous montrons qu'après exposition au froid de manière aiguë (5h), l'utilisation de glucose par le tissu adipeux brun ainsi que son volume métabolique actif sont identiques entre les souris *Slc20a2*^{+/+} et *Slc20a2*^{-/-} (Figure S3D-E).

De manière surprenante, l'augmentation de l'activité du BAT n'est pas accompagnée par une augmentation de l'expression d'UCP1 (Figure 2G). En plus du BAT, les adipocytes beiges de l'iWAT peuvent participer à l'augmentation de la dépense énergétique. L'analyse des marqueurs d'adipocytes bruns (Ucp1, Prdm16, Pgc1a, Cidea et Dio2) dans le iWAT ne montre pas d'augmentation chez les souris *Slc20a2*^{-/-} indiquant qu'il n'y a pas d'apparition de brunissement (Figure 2H). La thermogenèse peut être médiée par des voies indépendantes d'UCP1. L'analyse de l'expression des gènes impliqués dans les différentes voies indépendantes d'UCP1 que nous avons décrites dans l'introduction de ce manuscrit, à la fois par RT-qPCR et par bulk RNAseq à partir de BAT et d'iWAT, semble indiquer qu'aucune de ces voies n'est impliquées dans l'augmentation de l'activité du BAT chez les souris *Slc20a2*^{-/-} (Figure S3F).

Le facteur de croissance IGF-1 (Insulin-like growth factor 1) joue un rôle important dans la croissance mais également dans la différenciation des adipocytes, la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline (Blüher, Kratzsch and Kiess, 2005; Boucher *et al.*, 2012; Hong *et al.*, 2017; Fang *et al.*, 2022). Chez les souris *Slc20a2*^{-/-}, nous montrons une diminution des concentrations sériques d'IGF-1 de 35% à l'âge de 6 semaines et de 20% à l'âge de 6 mois chez les souris *Slc20a2*^{-/-} mâles (Figure 4).

Comme décrit dans l'introduction (page 44), l'hépatokine FGF21 agit sur le SNC afin de réguler la prise alimentaire et stimuler la thermogenèse dans le BAT et le brunissement dans le WAT (Chartoumpakis *et al.*, 2011; Fisher *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2017; Abu-Odeh *et al.*, 2021; Carbonetti, Almeida-Oliveira and Majerowicz, 2023). L'expression de FGF21 dans le foie est régulée par le facteur de transcription *Ppara*. Nous avons donc analysé les marqueurs régulés par *Ppara* et quantifié FGF21 dans le sérum des souris *Slc20a2*^{-/-}. Dans le foie, l'expression de *Fgf21* n'est pas différente entre les souris contrôles et les souris *Slc20a2*^{-/-} (Figure 28A). De plus, l'expression du facteur de transcription *Ppara* et de ses gènes cibles (*Cpt1a*, *Cyp4a14*, *Acox1*, *G6pase* et *Pdk4*) ne diffèrent pas entre les génotypes (Figure 28A). En accord avec l'expression hépatique de *Fgf21*, les concentrations de FGF21 dans le sérum des souris contrôles et *Slc20a2*^{-/-} âgées de 6 mois sont identiques (Figure 28B).

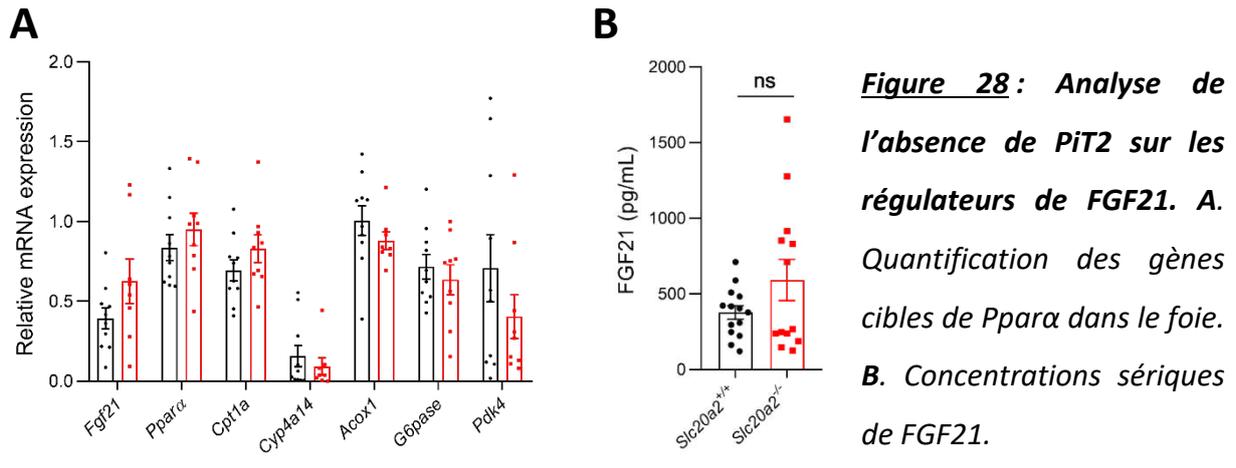


Figure 28: Analyse de l'absence de Pit2 sur les régulateurs de FGF21. **A.** Quantification des gènes cibles de Ppara dans le foie. **B.** Concentrations sériques de FGF21.

Conclusion

Dans cette étude, nous montrons qu'à l'instar du BMAT la masse grasse périphérique est également diminuée chez ces souris. Cette diminution peut s'expliquer par une augmentation de la dépense énergétique et de l'activité du tissu adipeux brun accompagnée d'une augmentation de la lipolyse dans le tissu adipeux blanc inguinal. De manière intéressante, nos analyses montrent que les souris ne présentent pas d'augmentation de la protéine UCP1 suggérant que l'augmentation de la dépense énergétique provient d'un mécanisme indépendant d'UCP1 qui reste à identifier.

Plusieurs études ont montré un rôle d'IGF-1 et de son récepteur (IGF-1R) dans le métabolisme énergétique. Par exemple, la double invalidation des gènes codant pour les récepteurs de l'insuline (IR) et d'IGF-1R spécifiquement dans les adipocytes (FiGiRKO) aboutit à une résistance à l'obésité ainsi qu'une augmentation de la dépense énergétique (Figure 5, Boucher *et al.*, 2012). Indépendamment du rôle d'IGF-1 dans le métabolisme, on peut également émettre l'hypothèse que la diminution d'IGF-1 est la conséquence de la régulation de l'axe GH (Growth hormone)/IGF-1. En effet, l'augmentation des concentrations d'IGF-1 diminue l'expression de la GH par sa boucle de rétrocontrôle (Figure 29). Si le retard de croissance des souris *Slc20a2*^{-/-} est lié à un défaut de GH, la diminution d'IGF-1 pourrait être un mécanisme pour augmenter la sécrétion de GH. Il serait donc intéressant de quantifier la GH dans notre modèle. Il

serait également intéressant d'administrer IGF-1 chez les souris *Slc20a2*^{-/-} afin d'observer l'impact sur le retard de croissance et le métabolisme énergétique.

L'expression des gènes impliqués dans la régulation de FGF21 ainsi que les concentrations sériques de FGF21 ne diffèrent pas entre les génotypes, excluant l'hypothèse d'un rôle de FGF21 dans l'augmentation de la dépense énergétique chez les souris *Slc20a2*^{-/-}.

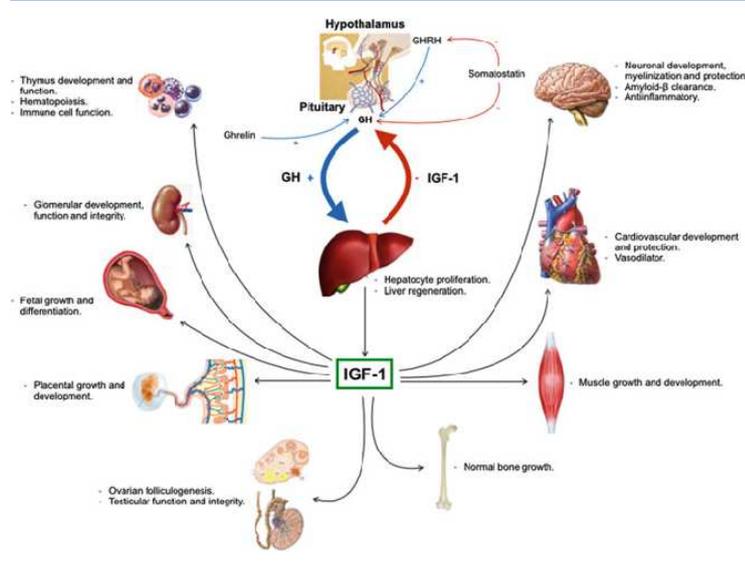


Figure 29 :

Régulation de l'axe GH/IGF-1 et impact sur les organes cibles (Martín-Estal, de la Garza and Castilla-Cortázar, 2016).

Molecular Metabolism

Loss of Slc20a2/PiT2 in mice leads to reduced fat mass through increased brown adipose tissue activity --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Short Communication
Keywords:	PiT2/Slc20a2; adipose tissue; energy metabolism; energy expenditure; lipid metabolism; brown adipose tissue
Corresponding Author:	Sarah Beck-Cormier, Ph.D. Inserm UMR 1087 Nantes, FRANCE
First Author:	Marie Guicheteau
Order of Authors:	Marie Guicheteau Stéphanie Moriceau, Ph.D. Marie Palard Gwendoline Boittelle Giulia Frangi Rola Shaaban Laurent Beck Xavier Prieur Sarah Beck-Cormier, Ph.D.
Abstract:	<p>Objective: Inorganic phosphate is involved in several cellular processes including ATP production, which is central for energy metabolism. We recently identified the sodium-phosphate co-transporter Slc20a2/PiT2 as a determinant of bone marrow adipocytes maintenance. Here, we investigated the role of PiT2 in extra-medullary adipose tissues and energy metabolism.</p> <p>Methods: The metabolic phenotype of Slc20a2^{-/-} mice was conducted by gene and protein expression analysis, measurements of serum adipokine levels, glucose and insulin tolerance tests and measurements of BAT activity using PET/CT and Seahorse technologies. Indirect calorimetry (O₂ consumption, CO₂ production, energy expenditure and respiratory exchange ratio), food and drink intake, and locomotor activity were measured using metabolic cages. Selective inactivation of the Slc20a2 gene in adipocytes was performed to determine the contribution of adipose tissues in the metabolic phenotype of Slc20a2^{-/-} mice.</p> <p>Results: We show that the absence of PiT2 leads to a decrease in fat mass with an increase in energy expenditure, while energy intake and locomotor activity remain unchanged. This phenotype is associated with increased BAT activity and increased basal lipolysis in the iWAT, without any upregulation of UCP1 expression. Finally, deletion of PiT2 in mature adipocytes is not sufficient to recapitulate the metabolic phenotype observed in Slc20a2^{-/-} mice. This suggests that the phenotype does not arise from an intrinsic adipocyte defect but from another organ or systemic dysregulation, as suggested by the reduction of serum IGF-1 levels in mutant mice.</p> <p>Conclusion: These results identify PiT2 as a novel protein important for energy metabolism through regulation of BAT activity.</p>
Suggested Reviewers:	Marthe Moldes, Ph.D. researcher, Centre de Recherche Saint-Antoine marthe.moldes@inserm.fr Marthe Moldes is an internationally recognized expert in the field of adipose tissues Audrey Carrière-Pazat, Ph.D. researcher, Université Paul Sabatier audrey.carriere-pazat@inserm.fr Audrey Carrière is an internationally recognized expert in the field of thermogenic

	<p>adipose tissues.</p> <p>Lene Pedersen, Ph.D. researcher, Aarhus Universitet lp@mbg.au.dk Lene Pedersen is an internationally recognized expert in the field of the biology of S1c20a proteins</p>
<p>Opposed Reviewers:</p>	<p>Carsten Wagner University of Zurich Carsten.Wagner@physiol.uzh.ch Considering major competing interests, we would prefer that the following researcher would be avoided as a choice for reviewing this work: Carsten A. Wagner, (Carsten.Wagner@physiol.uzh.ch), Institute of Physiology, University of Zurich, Zurich, Switzerland</p>

Loss of Slc20a2/PiT2 in mice leads to reduced fat mass through increased brown adipose tissue activity

Marie Guicheteau¹, Stéphanie Moriceau², Marie Palard¹, Gwendoline Boittelle¹, Giulia Frangi³, Rola Shaaban¹, Laurent Beck¹, Xavier Prieur¹ and Sarah Beck-Cormier^{1*}

¹Nantes Université, CNRS, Inserm, l'Institut du Thorax, F-44000 Nantes, France.

²Institut Imagine, Platform for Neurobehavioral and Metabolism, Structure Fédérative de Recherche Necker, 26 INSERM US24/CNRS UAR, 3633, F-75015 Paris, France.

³Nantes Université, Inserm, Regenerative Medicine and Skeleton, RMeS, UMR 1229, F-44000 Nantes, France.

*Corresponding author: sarah.beck@univ-nantes.fr (S. Beck-Cormier).

Keywords: PiT2/Slc20a2, adipose tissue, energy metabolism, energy expenditure, lipid metabolism, brown adipose tissue

Abstract

Objective: Inorganic phosphate is involved in several cellular processes including ATP production, which is central for energy metabolism. We recently identified the sodium-phosphate co-transporter Slc20a2/PiT2 as a determinant of bone marrow adipocytes maintenance. Here, we investigated the role of PiT2 in extra-medullar adipose tissues and energy metabolism.

Methods: The metabolic phenotype of *Slc20a2*^{-/-} mice was conducted by gene and protein expression analysis, measurements of serum adipokine levels, glucose and insulin tolerance tests and measurements of BAT activity using PET/CT and Seahorse technologies. Indirect calorimetry (O₂ consumption, CO₂ production, energy expenditure and respiratory exchange ratio), food and drink intake, and locomotor activity were measured using metabolic cages. Selective invalidation of the *Slc20a2* gene in adipocytes was performed to determine the contribution of adipose tissues in the metabolic phenotype of *Slc20a2*^{-/-} mice.

Results: We show that the absence of PiT2 leads to a decrease in fat mass with an increase in energy expenditure, while energy intake and locomotor activity remain unchanged. This phenotype is associated with increased BAT activity and increased basal lipolysis in the iWAT, without any upregulation of UCP1 expression. Finally, deletion of PiT2 in mature adipocytes is not sufficient to recapitulate the metabolic phenotype observed in *Slc20a2*^{-/-} mice. This suggests that the phenotype does not arise from an intrinsic adipocyte defect but from another organ or systemic dysregulation, as suggested by the reduction of serum IGF-1 levels in mutant mice.

Conclusion: These results identify PiT2 as a novel protein important for energy metabolism through regulation of BAT activity.

INTRODUCTION

1 Energy homeostasis results from a balance between energy intake and energy
2 expenditure. A chronic positive energy imbalance that favors energy intake at the
3 expense of energy expenditure leads to obesity. To address the increasing prevalence
4 of obesity worldwide, it is essential to gain a better understanding of the critical aspects
5 of the pathways that regulate energy metabolism.

6 The solute carrier (SLC) family includes hundreds of transmembrane proteins
7 that transport a wide variety of substances across cell membranes, playing a vital role
8 in cellular processes, including energy metabolism. At the heart of energy metabolism,
9 ATP production depends on a number of factors, first and foremost the entry of glucose
10 into the cell via the SLC2A4/ GLUT4 transporters [1], but also the translocation of ADP
11 into the mitochondria by the SLC25A4-5/ANT1-2 transporters [2] and the transport of
12 Pi from the intracellular space into the mitochondria by the SLC25A3/PiC transporter
13 [3]. Importantly, this mitochondrial Pi transport is itself dependent on the availability of
14 intracellular Pi, which depends in part on the uptake of Pi from the extracellular space.
15 In mammals, there are only two SLC families allowing the uptake of extracellular Pi
16 across the plasma membrane: the SLC34 family, whose expression is limited to a few
17 specific organs (kidney and liver mainly), and the SLC20 family, which is expressed in
18 a very wide variety of tissues.

19 The SLC20 family comprises SLC20A1/PiT1 and SLC20A2/PiT2. The two
20 related proteins and genes are very similar in sequence, structure and organization,
21 suggesting a common ancestor [4–6]. Although they were originally identified as
22 receptors for specific retroviruses, and then characterized as sodium-coupled Pi
23 transporters with very similar transport properties [7–9], numerous other functions have

24 been identified for these proteins over the past fifteen years. Interestingly, unlike the
25 Pi transport function, these additional functions are specific to one or the other PiT [10].

26 Surprisingly enough given the predominant role of Pi and its derivatives in
27 energy metabolism, there is little information on the role that plasma membrane Pi
28 transporters might play in regulating energy metabolism. A single study based on
29 phenotypic analysis of knockout mice for *Slc20a1* specifically in hepatocytes identified
30 PiT1 as a regulator of glucose metabolism and insulin signaling through its interaction
31 with the USP7 deubiquitinase [11]. On the other hand, analysis of data from the
32 International Mouse Phenotyping Consortium have identified several hundred genes
33 associated with a strong metabolic phenotype [12]. Interestingly, among these genes,
34 *Slc20a2* has been classified as an unexplored strong metabolic phenotype gene. In
35 our lab, we recently showed that PiT2 deficiency prevents the increase of bone marrow
36 adipose tissue during skeletal maturation, suggesting a putative role of PiT2 in the
37 regulation of lipid metabolism [13].

38 In this study, we explored the physiological consequences of PiT2 deficiency on
39 basal energy metabolism and identified PiT2 as a potent regulator of fat tissues through
40 modulation of BAT activity.

41 **Materials & Methods**

42 **Mice**

43 *Slc20a2*^{-/-} and *Slc20a2*^{+/+} mice were used as described [14]. Procedures were
44 performed in accordance with the principles and guidelines established by the EU
45 Directive 2010/63/EU for animal experiments. This study complied with ARRIVE
46 (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) guidelines and was approved by
47 the Animal Care Committee of Pays de la Loire (APAFIS agreements 02286.02,
48 14835-2020-05-13 and 22178-2019092614593965 v7).

49

50 **Blood chemistry and metabolic analyses**

51 Glucose, insulin, leptin, adiponectin, IGF-1 (Crystal Chem), non-esterified fatty acids
52 (NEFA) and cholesterol (FUJIFILM Wako Diagnostics) were analysed in serum.

53 Glucose and insulin tolerance tests were performed on mice after a 6-h fast. Mice were
54 injected *i.p.* with glucose (2 g/kg) or insulin (0,75 U/kg) and blood glucose levels
55 determined by a glucometer. For lipid tolerance test, 16-week-old mice were force-fed
56 olive oil (10 µl/g of body weight). Tyloxapol (0.5 g/kg-1) was administered after gavage
57 to inhibit lipoprotein metabolism. Triglycerides (TG) concentrations in serum were
58 measured at the indicated time points.

59

60 **TG and cholesterol concentration in feces**

61 Mice were placed in individual cages for 72 h, feces were collected every day between
62 8 and 9 am and then stored at -80°C. Feces were dehydrated 24 h before grinding in
63 liquid nitrogen. TG and cholesterol concentrations were calculated according to the
64 manufacturer's instructions (Sobioda).

65

66 **Indirect calorimetry**

67 Oxygen consumption (VO₂) and carbon dioxide production (VCO₂) were measured by
68 indirect calorimetry using TSE Labmaster systems. Mice were weighted before being
69 placed in individual cages during 7 days, the first 4 days being devoted to acclimation
70 and the last 3 days to measurements. During all the experiment, mice were fed ad
71 libitum with normal chow diet. VO₂ and VCO₂ were normalised to body weight.
72 Respiratory exchange ratio (RER) was calculated as the ratio between VCO₂ and
73 VO₂. Energy expenditure (EE) was calculated using the following formula:
74 $EE = [3.941(VO_2) + 1.106(VCO_2)] \times 1.44$. For the β 3-agonist study, mice were
75 anesthetized with ketamine/xylazine administered intraperitoneally, EE was measured
76 between t=0min and t=40min and removed from the cages, injected intraperitoneally
77 with norepinephrine (1 mg/kg), before returning to the cage for monitoring of EE
78 (t=40min to t=100min).

79

80 **¹⁸F-FDG PET/CT**

81 Mice were injected intraperitoneally with 3 MBq of [¹⁸F]-fluorodeoxyglucose ([¹⁸F]-FDG)
82 per 20 g of mice 1h before PET/CT. For cold exposure, mice were single housed at
83 4°C for 4 hours before [¹⁸F]-FDG injection and replaced at 4°C for 1 hour. PET/CT
84 acquisitions were obtained using an Iris PET/CT scanner (Inviscan). After anesthesia
85 with 5% isoflurane, mice were placed in 35°C imaging chambers for a 40 sec 80 kV
86 CT scan imaging and 10 min PET acquisition. Mice were placed back in groups of five
87 with free access to food and water at room temperature. After 3D reconstruction,
88 volumes of interest were drawn manually on the CT and brown adipose tissue was
89 analyzed by semi-automatic segmentation provided by Imalytics Preclinical with an

90 activity threshold of 3.2 SUV max to calculate BAT ¹⁸F-FDG uptake (SUV) and
91 metabolic volume (mm³).

92

93 **Measurement of the oxygen consumption rate in brown adipose tissue explants**

94 Brown adipose tissue (2 mg) was obtained and placed into XF24 Microplates and
95 incubated in assay medium (DMEM (Sigma D5030), 30 mM NaCl, pH7.4, 25 mM
96 glucose, 0.5 mM sodium pyruvate). Oxygen consumption rate was measured on a
97 Seahorse XF24 Flux analyser.

98

99 **Lipolysis analysis**

100 Small pieces of white adipose tissue (50 mg) were incubated in 300 µl of assay medium
101 (DMEM 1 g/l D-glucose (Gibco, 11880-028), 2% BSA (Sigma) with or without 1 mM
102 CL-316243 (ab144605) for 2 hours and shaken every 30 min. NEFA (FUJIFILM Wako
103 Diagnostic) and glycerol (Sigma) concentrations were quantified in the supernatant.

104

105 **Histological analysis**

106 Tissues were fixed with 4% paraformaldehyde in phosphate buffer saline
107 (ThermoFisher) during 24 hours before being embedded in paraffin. Staining of serial
108 5-mm thick sections with Harris' hematoxylin were carried out using standard
109 histological procedures.

110

111 **Gene expression analysis**

112 RNA isolation and cDNA synthesis were performed as previously described [13]. The
113 sequences of primers used are listed in Table S1.

114

115 **Western blot**

116 Tissues were lysed in ice-cold lysis buffer (50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 20 mM
117 EDTA, 0.5% Na deoxycholate and 1% NP40 and a protease inhibitor cocktail (Roche).
118 Protein concentration was measured using a BCA protein assay kit (Pierce). The
119 extracts were subjected to western blotting with primary anti-UCP1 antibody (Alpha
120 Diagnostic) overnight at 4°C and secondary horseradish peroxidase antibody for 1h at
121 room temperature. Total proteins were visualized using Stain free technology (Bio-
122 Rad). Blots were quantified using Image Lab 6.1.

123

124 **Statistics**

125 Statistical analyses were performed using the GraphPad 8.0 software. Data were
126 analyzed for normal distribution within each experimental group using the Shapiro–
127 Wilk normality test. Normally distributed data were analyzed by ANOVA or t tests, as
128 appropriate. Where the data were not normally distributed, non-parametric tests were
129 used. A p value of less than 0.05 was considered statistically significant (exact n and
130 p values are indicated in the figures or legends). Data are expressed as means ±
131 S.E.M.

132 RESULTS

133 Absence of PiT2 in male mice leads to decreased fat mass and increased energy 134 expenditure.

135 Invalidation of *Slc20a2* leads to reduced total body weight (Figure 1A), as
136 previously described [14,16]. Because fat tissues contribute for part of the body weight,
137 we measured masses of inguinal, gonadal and mesenteric white adipose tissues
138 (iWAT, gWAT and mWAT, respectively) and brown adipose tissue (BAT). We found a
139 severe reduction in the mass of all types of adipose tissues normalized to the body
140 weight of 24-weeks-old *Slc20a2*^{-/-} male mice, while the masses of others organs such
141 as liver and muscle were unchanged compared to controls (Figure 1B). In addition, the
142 age-induced fat mass gain observed in control mice between 3 and 48 weeks of age
143 was blunted in *Slc20a2*^{-/-} male mice compared with control mice (Figure 1C). Reduced
144 fat mass may be associated with altered adipose tissue function. We therefore
145 determined whether serum levels of adipokines such as leptin and adiponectin were
146 altered in *Slc20a2*^{-/-} mice. We found that serum leptin level was decreased while
147 adiponectin level was unchanged in *Slc20a2*^{-/-} compared to *Slc20a2*^{+/+} littermate
148 controls at 16 weeks (Figure S1A). In addition, expression of adipocyte markers in
149 iWAT is unchanged, with the exception of a decrease in *Pparγ* expression in *Slc20a2*^{-/-}
150 mice (Figure S1B). We next determined the impact of the absence of PiT2 on the
151 whole-body glucose and lipid homeostasis. We found that blood glucose and serum
152 insulin levels were reduced, and that glucose and insulin tolerance were similar in 6-h-
153 fasted *Slc20a2*^{-/-} mice compared to *Slc20a2*^{+/+} mice (Figure S1C-D). Finally, we
154 showed that serum NEFA and cholesterol levels were similar between *Slc20a2*^{+/+} and
155 *Slc20a2*^{-/-} mice (Figure S1E).

156 To evaluate a possible sex-specific phenotype, we examined fat mass,
157 adipokine levels and glucose homeostasis in females (Figure S2). As in males, total
158 body weight was reduced in *Slc20a2*^{-/-} female mice (Figure S2A). In contrast to male
159 mice, only gWAT mass was reduced in 24-weeks-old *Slc20a2*^{-/-} female mice compared
160 to control (Figure S2B). Despite this difference, the age-related increase in fat mass
161 gain was also attenuated in *Slc20a2*^{-/-} female mice compared with control mice (Figure
162 S2C). As *Slc20a2*^{-/-} male mice, *Slc20a2*^{-/-} female mice show hypoleptinemia and
163 unchanged adiponectin levels (Figure S2D). Analysis of glucose homeostasis showed
164 a trend towards a reduction in fasted glucose and insulin levels in *Slc20a2*^{-/-} female
165 mice and no differences in glucose tolerance and insulin sensitivity (Figure S2E-F).
166 These results show no major sex effect on fat mass and glucose metabolism.

167 Given the effect of PiT2 deficiency on fat mass, we assessed the effect of PiT2
168 deficiency on energy balance. We reported that food intake was similar in *Slc20a2*^{-/-}
169 compared to *Slc20a2*^{+/+} male mice (Figure 1D). We then questioned the ability of
170 *Slc20a2*^{-/-} mice to absorb the lipids by determining serum triglycerides (TG) level after
171 oil gavage while inhibiting the lipoprotein lipase using Tylopaxol. TG levels and faeces
172 lipid content were not affected by PiT2 deficiency (Figure 1E-G), indicating that the
173 reduced fat mass was not related to a decrease in lipid intake. Since energy balance
174 is regulated by energy intake and energy expenditure (EE), we then investigated EE
175 using indirect calorimetry. Oxygen consumption was significantly increased in *Slc20a2*^{-/-}
176 ^{-/-} mice as well as EE without any significant change in physical activity (Figure 1JH-).
177 Because mass-corrected EE can erroneously yield significant group effects [17], we
178 verified if the difference in EE between *Slc20a2*^{-/-} and control mice was dependent of
179 body weight. We performed regression analyses between the individual EE of each
180 mouse (kcal.h⁻¹) and their body weight (Figure 1K). *Slc20a2*^{-/-} and control mice fall on

181 separate regression lines, indicating that increased EE is independent of the reduced
182 body weight of *Slc20a2*^{-/-} mice. Furthermore, at a given body weight (25 g), the
183 deviation of data point from the regression lines showed that EE difference was mass-
184 independent with higher EE in *Slc20a2*^{-/-} compared to control mice (Figure 1K).
185 Depending on the nutritional status, either carbohydrates or lipids can be utilized as
186 fuel for EE. Analyses of respiratory exchange ratio (RER) showed a downward trend
187 in *Slc20a2*^{-/-} mice compared to controls, suggesting a preferential use of lipids as the
188 main source of energy (Figure 1L), which is consistent with the decreased fat mass. In
189 *Slc20a2*^{-/-} female mice, assessment of indirect calorimetry showed no differences in
190 VO₂, EE or RER (Figure S2G-I), indicating that the energy balance is differentially
191 regulated in males and females. In the remainder of our study, we focused on males
192 only.

193 Altogether, these results support that the decrease in body weight and reduced
194 fat mass in *Slc20a2*^{-/-} male mice may be explained by an increase in energy
195 expenditure.

196

197 ***Slc20a2* invalidation increases BAT activity and lipolysis in white adipose tissue**

198 Brown adipose tissue and beige adipocytes in iWAT are the major thermogenic
199 organs that participate to increased EE [18]. In order to assess BAT activity in *Slc20a2*^{-/-}
200 male mice, we first measured glucose utilisation by ¹⁸F-FDG PET/CT imaging. We
201 found an increase in BAT ¹⁸F-FDG uptake and metabolic volume in *Slc20a2*^{-/-} mice
202 compared to control mice, demonstrating that BAT activity was enhanced in *Slc20a2*^{-/-}
203 mice (Figure 2A). Consistently, we found that basal oxygen consumption rate in BAT
204 explants from Pit2-deficient mice (Figure 2B). In addition, histomorphological analyses
205 revealed that BAT of *Slc20a2*^{-/-} mice had a significant decrease in lipid area, consistent

206 with increased BAT activity (Figure 2C). The BAT dissipates energy by producing heat,
207 partly from the free fatty acids produced by lipolysis in the iWAT [19,20].
208 Histomorphometry of the iWAT revealed a significant decrease in adipocyte size in
209 *Slc20a2*^{-/-} mice compared to controls (Figure 2D). In addition, we showed an increase
210 in the release of glycerol and non-esterified fatty acids (NEFA) in the iWAT of *Slc20a2*^{-/-}
211 mice (Figure 2E-F). These results indicate that basal lipolysis in iWAT was increased
212 in PiT2-deficient adipose tissues. Collectively, these data showed that in the absence
213 of PiT2, BAT activity was increased in conjunction with enhanced lipolysis.

214

215 **Increased BAT activity in PiT2-deficient mice is not accompanied by increased**
216 **UCP1 expression or iWAT beiging.**

217 BAT-mediated energy expenditure is tightly regulated by the thermogenic
218 mitochondrial protein UCP1 activated by β 3 adrenergic pathway [21]. Despite the
219 significant increase in EE, we found that UCP1 expression in BAT was not increased
220 in *Slc20a2*^{-/-} mice (Figure 2G). In addition to BAT, beige adipocytes in the iWAT can
221 participate to the increase in EE. We thus analysed the expression profile of beige
222 markers (*Ucp1*, *Prdm16*, *Pgc1a*, *Cidea*, *Dio2*) by RT-qPCR. The expression of none of
223 these markers was increased, with the exception of the *Pgc1a* gene (Figure 2H). The
224 β 3 adrenergic pathway is a main inducer of BAT activity [22]. We analysed the level of
225 oxygen consumption in response to norepinephrine (NE) injection *in vivo* and β 3-
226 agonist (CL-316,243) treatment of BAT and WAT explants. We showed that the
227 increase in oxygen consumption after NE injection was similar in *Slc20a2*^{+/+} and
228 *Slc20a2*^{-/-} mice (Figure S3A), suggesting that this pathway was not altered in mutant.
229 Consistently, we showed that glycerol and NEFA secretion from iWAT or BAT explants
230 were induced both in *Slc20a2*^{+/+} and *Slc20a2*^{-/-} mice (Figure S3B-C). Furthermore, we

231 showed that acute exposure to cold (4°C) resulted in the same decrease in rectal
232 temperature and a similar BAT activation between *Slc20a2*^{+/+} and *Slc20a2*^{-/-} mice
233 (Figure S3E). These results indicate that the response to β3 adrenergic stimulation is
234 unaltered in BAT and WAT of *Slc20a2*^{+/+} and *Slc20a2*^{-/-} mice.

235 Additional futile cycles dependent on ATP synthesis and consumption are
236 known to promote energy dissipation in a UCP1-independent manner, such as the
237 futile lipids, creatine and calcium cycles [23]. We therefore analysed the expression
238 profile of some of the key genes involved in these pathways by RT-qPCR and bulk
239 RNA sequencing. None of these genes were deregulated in the BAT and iWAT of
240 *Slc20a2*^{-/-} mice (Figure 2I-J, Tables S2 and S3).

241

242 **The metabolic phenotype of *Slc20a2*^{-/-} mice is not adipocyte-autonomous**

243 To define the role of PiT2-expressed adipocytes in the metabolic phenotype of
244 *Slc20a2*^{-/-} mice, we invalidated *Slc20a2* specifically in mature adipocytes by crossing
245 conditional *Slc20a2*^{fllox/fllox} mice with AdipoQ-Cre transgenic mice to generate
246 *AdipoQ*^{Cre/+};*Slc20a2*^{fllox/fllox} (*Slc20a2*^{AdKO}) mutant mice. We confirmed that *Slc20a2*
247 mRNA level was successfully decreased in adipose tissues (Figure 3A). In contrast to
248 *Slc20a2*^{-/-} mice, we showed that body weight and fat mass were not modified in
249 *Slc20a2*^{AdKO} mice (Figure 3B-C). Of note, *Slc20a1* mRNA levels was unaltered in BAT
250 and slightly increase in WAT (Figure 3D). These results demonstrate that PiT2 deletion
251 in mature white or brown adipocytes is not sufficient to recapitulate the metabolic
252 phenotype observed in *Slc20a2*^{-/-} mice, and suggest that this phenotype originates
253 from another organ or from a systemic defect.

254

255 **PiT2 deficiency leads to decreased serum IGF-1 level.**

256 The Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) plays an important role not only in
257 growth, but also in adipocyte differentiation, lipolysis, glucose tolerance and insulin
258 sensitivity [24–27]. We therefore measured serum concentrations of IGF-1 in *Slc20a2*^{-/-}
259 ^{-/-} mice. We showed a 35% and 20% decrease in *Slc20a2*^{-/-} male mice at 6 and 16
260 weeks, respectively (Figure 4), and a 49% decrease in *Slc20a2*^{-/-} females at 6 weeks.
261 (Figure S2J).

262

263 **DISCUSSION**

264 This study demonstrates that the reduced total body weight previously described
265 in *Slc20a2*^{-/-} mice [14,16,28,29] is associated with a specific decrease in fat mass.
266 Metabolic phenotyping of *Slc20a2*^{-/-} mice indicates that energy expenditure is
267 increased, while energy intake and locomotor activity remain unchanged. We show
268 that this phenotype is associated with increase BAT activity, which likely uses fatty
269 acids from increased lipolysis in the iWAT as fuel. We show that the altered energy
270 metabolism observed in the absence of PiT2 is not the result of an intrinsic defect in
271 adipocytes, suggesting that the metabolic phenotype originates from another as yet
272 unidentified organ, or from a systemic dysregulation, as evidenced by the reduced
273 serum IGF-1 level in mutant mice.

274 Because sexual differences in the prevalence of metabolic disorders have long
275 been known [30,31], we performed metabolic phenotyping in *Slc20a2*^{-/-} of both sexes.
276 In males and females, we observed a comparable phenotype of fat mass reduction,
277 blunting of the age-induced fat gain and reduction in serum IGF-1 concentration.
278 However, only males show an increase in EE, suggesting that the mechanisms at work
279 may be different between the two sexes, and necessitating detailed metabolic
280 phenotyping in females.

281 Whole-body energy homeostasis is regulated by non-shivering thermogenesis,
282 which dissipates chemical energy as heat primarily through mitochondrial uncoupling
283 of oxygen consumption and ATP synthesis, through UCP1 in brown and beige
284 adipocytes [32]. Intriguingly, our results show that the increase in BAT activity
285 observed in the absence of PiT2 is not associated with an increase in UCP1
286 expression. In recent years, studies in UCP1-deficient mice have revealed several
287 alternative mechanisms that are independent of UCP1 and based on ATP consumption

288 [23]. In this study, we analyzed the expression profile of genes known to be involved
289 in these alternative processes without being able to highlight any difference. Bulk-RNA
290 sequencing analyses confirmed this result, invalidating the idea that they could be
291 involved, and calling for the need to investigate other avenues to decipher the
292 molecular events underlying the role of PiT2 in the regulation of BAT activity.

293 To investigate the cellular origin of the metabolic phenotype of the *Slc20a2*^{-/-} mouse,
294 we analyzed the phenotype of mice lacking PiT2 protein specifically in adipocytes. As
295 described, these mice do not recapitulate the phenotype of *Slc20a2*^{-/-} mice. In addition,
296 injection of β 3-agonist produces the same EE increase in *Slc20a2*^{-/-} as compare to
297 *Slc20a2*^{+/+}, suggesting that the increase in EE is not due to an intrinsic adipose tissues
298 modification but rather the consequence of inter-organ dialogue during embryonic
299 development and/or after birth. In this context, the decrease in serum IGF-1 levels
300 observed in *Slc20a2*^{-/-} mice is significant in view of the role of IGF-1 in adipose tissue
301 and metabolic homeostasis. The metabolic status of PiT2-deficient mice resembles
302 that under fasting conditions, in particular the low level of glycemia, hypoinsulinemia,
303 RER close to 0.7, increased EE without increased food intake, increased TG lipolysis
304 and absence of white adipose tissue dysfunction resulting in normal secretion of
305 adiponectin. Low level of IGF-1 during fasting or calorie restriction results in enhanced
306 Growth Hormone secretion, which induces lipolysis [27,33,34]. It is therefore tempting
307 to hypothesize that the absence of PiT2 leads to a reduction in hepatic IGF-1
308 production by mechanisms that are still unknown and need to be explored, resulting in
309 a phenotype similar to that of the fasting state. A mouse model with a specific PiT2
310 deletion in the liver or in organs involved in the hypothalamic-pituitary axis would
311 provide an answer to this possibility, and allow a better understanding of the role of
312 this pathway in the phenotype of PiT2-deficient mice.

313 Beyond their phosphate transport function, PiT1 and PiT2 are now described as
314 multifunctional proteins involved in a variety of cellular mechanisms and physiological
315 processes [6,10,11,14,35–40]. Interestingly, hepatocyte-specific invalidation of
316 *Slc20a1* in mice (*Slc20a1^{Alb-KO}*) show that PiT1 is involved in glucose tolerance and
317 insulin sensitivity [11]. The authors found that the physical interaction between PiT1
318 and USP7 prevents the latter from forming the USP7/IRS1 complex, allowing IRS1
319 degradation by the proteasome and leading to prolonged insulin signalling. It is
320 interesting to note that fat mass is reduced in *Slc20a1^{Alb-KO}*, but the causes of this
321 reduction are not yet clearly understood. Of note, *Slc20a1* expression levels remain
322 unchanged in BAT, iWAT or liver of *Slc20a2^{-/-}* mice (not shown), and thus the metabolic
323 phenotype observed in the absence of PiT2 cannot be attributed to a role for PiT1.
324 Given the functional and mechanistic similarities between PiT1 and PiT2, and the fact
325 that PiT2 is also able to bind protein partners [38], we hypothesize that the absence of
326 PiT2 could prevent the recruitment of an as yet unidentified protein partner, which
327 would be responsible for the metabolic phenotype of *Slc20a2* knockout mice.

328 Finally, we and others have previously shown that PiT2 plays an important role
329 in neuronal growth and certain cognitive functions such as memory and anxiety
330 [10,38,41]. As central nervous system is a main regulator of energy homeostasis,
331 determining the contribution of the brain-borne-PiT2 to the metabolic phenotype of
332 *Slc20a2^{-/-}* mice may provide the key to the mechanism of action of PiT2 in the control
333 of body energy.

334 In conclusion, we provide the first evidence that PiT2 is important for energy
335 metabolism *in vivo*. These results may provide a starting point for a better
336 understanding of the cellular and molecular actions of PiT2 in energy metabolism,

337 leading to the identification of new cellular and molecular pathways that are
338 deregulated in metabolic disorders or obesity.

339 **AUTHOR'S CONTRIBUTION**

340 M.G., S.B.C., and X.P. designed experiments, M.G., S.M., M.P., G.B., R.S., and G.F.
341 performed experiments, M.G., L.B., X.P. and S.B.C. analyzed data, M.G. and S.B.C.
342 wrote the manuscript, X.P., L.B. and S.B.C. made adjustments to the final paper
343 version. All authors reviewed the results and approved the final version of the
344 manuscript.

345

346 **ACKNOWLEDGEMENTS**

347 This work was supported by grants from Inserm, «Région des Pays de la Loire»
348 (AdipOS), Société française de rhumatologie (PITAMO and METABONE), and Société
349 Francophone du Diabète. Marie Guicheteau, Marie Palard, Rola Shaaban and Giulia
350 Frangi received a fellowship from the «Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la
351 Recherche et de l'Innovation». We gratefully thank the UTE IRS-UN animal facility and
352 MicroPiCell Imaging facility (UMS BioCore, Inserm US16/CNRS UAR3556) for expert
353 technical assistance. We are most grateful to the Genomics Core Facility GenoA,
354 member of Biogenouest and France Genomique and to the Bioinformatics Core
355 Facility BiRD, member of Biogenouest and Institut Français de Bioinformatique (IFB)
356 (ANR-11-INBS-0013) for the use of their resources and their technical support. The
357 authors gratefully acknowledge Séverine Marionneau-Lambot and Caroline Boursier-
358 Joppin (CIMA corefacility from UMR Inserm 1307/CNRS 6075) for technical help.

359 **LEGENDS**

360 **Figure 1: Decreased fat mass and increased energy expenditure in *Slc20a2*^{-/-}**
361 **male mice. A.** Total body weight from 24-week-old *Slc20a2*^{+/+} (*black circles*) and
362 *Slc20a2*^{-/-} (*red squares*) male mice. **B.** Organs weight relative to total body weight from
363 24-week-old *Slc20a2*^{+/+} (*black circles*) and *Slc20a2*^{-/-} (*red squares*) male mice. **C.**
364 White adipose tissue weight relative to total body weight from *Slc20a2*^{+/+} (*black circles*)
365 and *Slc20a2*^{-/-} (*red squares*) male mice from 3 to 48 weeks. **D.** Food intake reporting
366 to total body weight during a 3 days period of *Slc20a2*^{+/+} (*black circles*) and *Slc20a2*^{-/-}
367 (*red squares*). **E.** Analysis of lipid absorption in 16-week-old *Slc20a2*^{+/+} (n=7) or
368 *Slc20a2*^{-/-} (n=8) mice. Mice were injected with tylopaxol (0.5g/kg) to inhibited
369 lipoprotein lipase. Blood was collected at t=0h, t=1h and t=2h after oil gavage to
370 determinate serum triglycerides (TG) concentration. **F-G.** Concentration of TG (**F**) and
371 cholesterol (**G**) in faeces of *Slc20a2*^{+/+} (*black circles*) and *Slc20a2*^{-/-} (*red squares*). **H-I**
372 Whole body oxygen consumption (VO₂) (**H**) and energy expenditure (EE) (**I**) monitored
373 continuously over a 72-hour period on the left panels. Graphs show the average VO₂
374 and EE during 12 h light and 12 h dark periods (grey zones). **J.** Physical activity
375 monitored during 3 days in *Slc20a2*^{+/+} (*black circles*) and *Slc20a2*^{-/-} (*red squares*) mice.
376 **K.** Regression based analysis of absolute EE against body mass and ANCOVA
377 predicted EE at a given body mass of 25g. **L.** Whole body respiratory exchange ratio
378 (RER) monitored continuously over a 72-hour period on the left panels. Graphs show
379 the average RER during 12 h light and 12 h dark periods (grey zones). All data are
380 presented as mean ± SEM. Statistical analyses: two-way ANOVA test (E), ANCOVA
381 (K) and Mann-Whitney test (A, B, C, D, F, G, H, I, J and L). *p<0.05, **p<0.01 and
382 ****p<0.0001.

383

384

385 **Figure 2: PiT2 invalidation increases BAT activity and lipolysis in white adipose**
386 **tissues. A.** Representative ^{18}F -FDG PET/CT images of BAT recruitment around the
387 neck in *Slc20a2*^{+/+} and *Slc20a2*^{-/-} mice at room temperature (21°C). Quantitative graph
388 of BAT ^{18}F -FDG uptake and metabolic volume of *Slc20a2*^{+/+} (*black circles*) and
389 *Slc20a2*^{-/-} (*red squares*) mice at room temperature. **B.** Basal oxygen consumption rate
390 (OCR) measured in BAT explants from *Slc20a2*^{+/+} (*black circles*) and *Slc20a2*^{-/-} (*red*
391 *squares*) mice. **C.** Representative images of HES stained BAT sections from
392 *Slc20a2*^{+/+} (*black circles*) and *Slc20a2*^{-/-} (*red squares*) male mice is shown in the left
393 panel and quantification of lipid area in BAT from *Slc20a2*^{+/+} and *Slc20a2*^{-/-} mice on the
394 right panel. **D.** Representative images of HES stained iWAT sections from *Slc20a2*^{+/+}
395 (*black circles*) and *Slc20a2*^{-/-} (*red squares*) male mice is shown in the left panel and
396 adipocyte size quantification from iWAT of *Slc20a2*^{+/+} (*black circles*) and *Slc20a2*^{-/-} (*red*
397 *squares*) mice on the right panel. **E-F.** Glycerol (**E**) and non-esterified fatty acid (NEFA)
398 (**F**) concentration in iWAT explants supernatant from *Slc20a2*^{+/+} (*black circles*) and
399 *Slc20a2*^{-/-} (*red squares*) mice. **G.** Relative mRNA expression of *Ucp1* gene (left) and
400 UCP1 protein level in BAT from *Slc20a2*^{+/+} (*black circles*) and *Slc20a2*^{-/-} (*red squares*)
401 male mice. **H.** Relative mRNA expression of thermogenic markers of iWAT from
402 *Slc20a2*^{+/+} (*black circles*) and *Slc20a2*^{-/-} (*red squares*) male mice. **I.** Relative mRNA
403 expression of *Ucp1*-independent thermogenic markers in BAT from *Slc20a2*^{+/+} (*black*
404 *circles*) and *Slc20a2*^{-/-} (*red squares*) male mice. **J.** Relative mRNA expression of *Ucp1*-
405 independent thermogenic markers in iWAT from *Slc20a2*^{+/+} (*black circles*) and
406 *Slc20a2*^{-/-} (*red squares*) male mice. All data are presented as mean \pm SEM. Statistical
407 analyses: Mann-Whitney test (A, B, C and D). iWAT: inguinal white adipose tissue,
408 BAT: brown adipose tissue. All data are presented as mean \pm SEM. Statistical

409 analyses: Mann-Whitney test (A, B, C, D, E, F, G, H, I and J). *p<0.05, **p<0.01,
410 ***p<0.001 and ****p<0.0001.

411

412 **Figure 3: Metabolic phenotype of *Slc20a2*^{-/-} mice is not adipocyte-autonomous.**

413 **A.** Relative *Slc20a2* mRNA expression in inguinal white adipose tissue (iWAT) and
414 brown adipose tissue (BAT) of *Slc20a2*^{flox/flox} (blue circles) and *Slc20a2*^{AdKO} (purple
415 squares). **B.** Body weight surveys from *Slc20a2*^{flox/flox} (blue line) and *Slc20a2*^{AdKO}
416 (purple line). **C.** Masses of organs from 16-week-old *Slc20a2*^{flox/flox} (blue circles) and
417 *Slc20a2*^{AdKO} (purple squares). **D.** Relative *Slc20a1* mRNA expression in iWAT and BAT
418 of *Slc20a2*^{flox/flox} (blue circles) and *Slc20a2*^{AdKO} (purple squares). All data are presented
419 as mean ± SEM. Statistical analyses: Mann-Whitney test (A,C and D) and two-way
420 ANOVA (B).

421

422 **Figure 4: PiT2 deficiency leads to decreased serum IGF-1 level.** Serum IGF-1
423 levels from *Slc20a2*^{+/+} (black circles) and *Slc20a2*^{-/-} (red squares) male at 6 weeks and
424 6 months of age. All data are presented as mean ± SEM. Statistical analyses: Mann-
425 Whitney test. *p<0.05.

426

427 **Figure S1: Glucose and lipid homeostasis in *Slc20a2*^{-/-} male mice.** **A.** Serum leptin
428 and adiponectin levels from *Slc20a2*^{+/+} (black circles) and *Slc20a2*^{-/-} (red squares) male
429 mice. **B.** Relative mRNA expression of adipocytes markers of iWAT from *Slc20a2*^{+/+}
430 (black circles) and *Slc20a2*^{-/-} (red squares) male mice. **C-D.** Fasted (6h) blood glucose
431 levels and blood glucose was measured at t=0min, t=15min, t=30min, t=60min and
432 t=120min after glucose injection (2g/kg) (**C**) or insulin injection (0,75U/kg) (**D**) on
433 *Slc20a2*^{+/+} (n=5) and *Slc20a2*^{-/-} (n=5) male mice. **E.** Serum NEFA and cholesterol

434 levels from *Slc20a2*^{+/+} (*black circles*) and *Slc20a2*^{-/-} (*red squares*) male mice. All data
435 are presented as mean ± SEM. Statistical analyses: two-way ANOVA test (C and D)
436 and Mann-Whitney test (A, B, C, D and E). **p<0.01, ***p<0.001 and ****p<0.0001.

437

438 **Figure S2: Metabolic phenotype of *Slc20a2*^{-/-} female mice.** **A.** Total body weight
439 from 20-week-old *Slc20a2*^{+/+} (*black circles*) and *Slc20a2*^{-/-} (*red squares*) female mice.
440 **B.** Organs weight relative to total body weight from 20-week-old *Slc20a2*^{+/+} (*black*
441 *circles*) and *Slc20a2*^{-/-} (*red squares*) female mice. **C.** White adipose tissue weight
442 relative to total body weight from *Slc20a2*^{+/+} (*black circles*) and *Slc20a2*^{-/-} (*red squares*)
443 female mice from 3 to 48 weeks. **D.** Serum leptin and adiponectin levels from
444 *Slc20a2*^{+/+} (*black circles*) and *Slc20a2*^{-/-} (*red squares*) female mice. **E.** Fasted (6h)
445 blood glucose levels and blood glucose was measured at t=0min, t=15min, t=30min,
446 t=60min and t=120min after glucose injection (2g/kg) on *Slc20a2*^{+/+} (n=10) and
447 *Slc20a2*^{-/-} (n=10) female mice. **F.** Fasted (6h) serum insulin levels and blood glucose
448 was measured at t=0min, t=15min, t=30min, t=60min and t=120min after insulin
449 injection (0,75U/kg) on *Slc20a2*^{+/+} (n=8) and *Slc20a2*^{-/-} (n=10) female mice. **G-I**
450 Average oxygen consumption (VO₂) (**G**), energy expenditure (EE) (**H**) and respiratory
451 exchange ratio (RER) (**I**) over a 72-hour period during 12 h light and 12 h dark periods.
452 **J.** Serum IGF-1 levels from *Slc20a2*^{+/+} (*black circles*) and *Slc20a2*^{-/-} (*red squares*)
453 female at 6 weeks of age. All data are presented as mean ± SEM. Statistical analyses:
454 two-way ANOVA test (D, E) and Mann-Whitney test (A, B, and C). *p<0.05, **p<0.01
455 and ***p<0.001.

456

457 **Figure S3: Response to β3-adrenergic stimulation is unchanged in *Slc20a2*^{-/-}**
458 **mice.** **A.** VO₂ was measured using metabolic cages in *Slc20a2*^{+/+} and *Slc20a2*^{-/-} male

459 mice before (t 0–40 min) and after (t 40–100 min) norepinephrine injection. **B.** Relative
460 glycerol and NEFA levels in iWAT explants supernatant from *Slc20a2*^{+/+} (*black circles*)
461 and *Slc20a2*^{-/-} (*red squares*) mice with the β 3 agonist (CL-316,243) treatment for 2 h.
462 **C.** Glycerol and NEFA concentration in BAT explants supernatant from *Slc20a2*^{+/+}
463 (*black circles*) and *Slc20a2*^{-/-} (*red squares*) mice at basal state or stimulated for 2 h
464 with the β 3 agonist (CL-316,243). **D.** Rectal temperature monitoring for 5 hours at 4°C
465 from *Slc20a2*^{+/+} (*black circles*) and *Slc20a2*^{-/-} (*red squares*) mice. **E.** Representative
466 ¹⁸F-FDG PET/CT images of BAT activity around the scapulae in *Slc20a2*^{+/+} (*black*
467 *circles*) and *Slc20a2*^{-/-} (*red squares*) mice after 5 h at 4°C. Quantitative graph of ¹⁸F-
468 FDG uptake in BAT and metabolic volume in *Slc20a2*^{+/+} (*black circles*) and *Slc20a2*^{-/-}
469 (*red squares*) mice. All data are presented as mean \pm SEM. Statistical analyses: two-
470 way ANOVA (A, C, and D) and Mann-Whitney test (B, E). *p<0.05, **p<0.01 and
471 ***p<0.001.

472

473 **Table S1:** List of primers for RT-qPCR.

474

475 **Table S2: Differentially-expressed genes in BAT of *Slc20a2*^{+/+} and *Slc20a2*^{-/-} mice.**

476 Differentially-expressed genes obtained by 3'seq-RNA Profiling approach (ratio of
477 *Slc20a2*^{+/+} to *Slc20a2*^{-/-}). Upregulated genes are highlighted in red and downregulated
478 genes in blue in the logFC column.

479

480 **Table S3: Differentially-expressed genes in iWAT of *Slc20a2*^{+/+} and *Slc20a2*^{-/-}**

481 **mice.** Differentially-expressed genes obtained by 3'seq-RNA Profiling approach (ratio
482 of *Slc20a2*^{+/+} to *Slc20a2*^{-/-}). Upregulated genes are highlighted in red and
483 downregulated genes in blue in the logFC column.

484 **Supplementary Table S1:** List of primers for RT-qPCR

Gene	Forward 5'- 3'	Reverse 5'- 3'
<i>AdipoQ</i>	TCTCCTGTTCTCTTAATCCTGCC	CATCTCCTTTCTCTCCCTTCTCTC
<i>Adrb3</i>	AGGCACAGGAATGCCACTCCAA	GCTTAGCCACAACGAACACTCG
<i>Atgl</i>	CAAGGGGTGCGCTCTGTGGATGG	AGGCGGTAGAGATTGCGAAGGTTG
<i>Atp2a2</i>	GTGAAGTGCCATCAGTATGACGG	GTGAGAGCAGTCTCGGTAGCTT
<i>Cidea</i>	AATGGACACCGGGTAGTAAGT	CAGCCTGTATAGGTCGAAGGT
<i>Dgat1</i>	TGGCCAGGACAGGAGTATTTTTGA	CTCGGGCATCGTAGTTGAGCA
<i>Dgat2</i>	TGCCCTACTCCAAGCCCATCACC	TCAGTTCACCTCCAGCACCTCAGTCTC
<i>Dio2</i>	CAGTGTGGTGCACGTCTCCAATC	TGAACCAAAGTTGACCACCAG
<i>Glut4</i>	GTGACTGGAACACTGGTCCTA	CCAGCCACGTTGCATTGTAG
<i>Hsl</i>	GCTGGGCTGTCAAGCACTGT	GTAACCTGGGTAGGCTGCCAT
<i>Mgl1</i>	TGATTTACCTCTGGTCCTTG	GTCAACCTCCGACTTGTTCC
<i>Pgc1a</i>	TTCTGGGTGGATTGAAGTGGTG	TGTCAGTGCATCAAATGAGGGC
<i>Slc20a1</i>	CGTGCGTTCATCCTCCGTAAG	TCAAAGCCCAGCAACGGTG
<i>Slc20a2</i>	CCATCGGCTTCTCACTCGT	AAACCAGGAGGCGACAATCT
<i>Pnn</i>	ACCTGGAAGGGGCAGTCAGTA	ATCATCGTCTTCTGGGTCGCT
<i>Pparγ</i>	AATGCGAGTGGTCTTCCATCAC	GATGCACTGCCTATGAGCACTTC
<i>Prdm16</i>	ATCCACAGCACGGTGAAGCCAT	ACATCTGCCACAGTCCTTGCA
<i>Tbp</i>	GAAGCTGCGGTACAATTCCAG	CCCCTTGTACCCTTCACCAAT
<i>Ucp1</i>	AGCATTGTAGGTCCCCGTGTAGCG	GGAGGTGTGGCAGTGTTTCATTGG

485

486

487

488 **Supplementary Table S2: Differentially-expressed genes in BAT of *Slc20a2*^{+/+}**
 489 **and *Slc20a2*^{-/-} mice.** Differentially-expressed genes obtained by 3' seq-RNA Profiling
 490 approach (ratio of *Slc20a2*^{+/+} to *Slc20a2*^{-/-}). Upregulated genes are highlighted in red
 491 and downregulated genes in blue in the logFC column.

Gene name	logFC	logCPM	p value	FDR
Slc66a1	-1,4169285	3,20022398	1,41E-05	0,02015986
Isyna1	-1,2216656	3,31615197	3,24E-05	0,03478182
Hsd11b1	-1,149443	7,88652227	4,66E-10	6,12E-06
Gpx8	-1,0581093	7,53327732	4,29E-08	0,00023049
Gpx3	-0,8880009	9,88952989	8,74E-08	0,00037577
Fmo1	-0,6580866	8,0622186	1,23E-06	0,00379061
Tuba1a	0,86559265	7,33474561	2,03E-05	0,02566533
Fabp3	0,94923323	11,1205421	1,68E-05	0,0225243
Apol6	0,96117621	5,83274822	3,03E-06	0,00723761
Sncg	1,18046742	8,10484042	8,87E-06	0,01588402
Smyd4	1,18384129	4,81166346	5,74E-06	0,01205008
S100b	1,27193791	7,309781	2,48E-07	0,00088764
Dusp1	1,36425497	5,82611261	1,21E-05	0,01858299
Npr3	1,47409903	5,69939758	4,17E-08	0,00023049
Lbp	1,50413003	3,66491863	1,20E-05	0,01858299
Trabd2b	1,68383868	2,87119263	2,66E-05	0,03014068
Slc20a2	1,82680253	2,94707058	6,17E-06	0,01205118
Lep	2,25430014	6,84096018	5,70E-10	6,12E-06
Ptgds	2,78315238	5,2213351	2,62E-06	0,00705007
C1qtnf2	4,56192991	1,15284034	2,47E-05	0,02947699

506

507

508

509

510

511

512

513

514

515

516
517
518
519

Supplementary Table S3: Differentially-expressed genes in iWAT of *Slc20a2*^{+/+} and *Slc20a2*^{-/-} mice. Differentially-expressed genes obtained by 3'seq-RNA Profiling approach (ratio of *Slc20a2*^{+/+} to *Slc20a2*^{-/-}). Upregulated genes are highlighted in red and downregulated genes in blue in the logFC column.

Gene name	logFC	logCPM	p value	FDR
Cela2a	-8,5848226	5,97229577	9,41E-06	0,00228289
Try4	-8,4975682	5,31133975	2,93E-05	0,00542676
Prss2	-7,8082199	5,62679441	3,75E-05	0,0065476
Ctrb1	-7,7672849	5,59097183	3,98E-05	0,00679386
Pnlip	-7,2839226	4,26856148	0,00018456	0,02087399
Cpb1	-7,2428281	4,15157165	0,000228	0,02449764
Cpa1	-7,1876273	4,38003589	8,04E-05	0,0110056
Ctrl	-7,1555879	4,56485296	0,00010914	0,01371545
Sycn	-7,0579981	3,98604225	0,00030954	0,0300927
Cela3b	-6,610316	4,0803416	0,00026438	0,02718297
Try5	-6,5786401	4,13224497	0,0002384	0,02536107
2210010C04Rik	-6,47564	4,18484483	0,00047428	0,04126214
Rnase1	-6,3060313	4,22065531	0,00041287	0,03680017
Clps	-6,2733712	4,85400074	0,00041443	0,03680017
Cel	-6,0222674	4,126281	0,00012402	0,01505722
Mup2	-2,3131334	5,91925157	4,67E-05	0,00765856
Cyp2f2	-1,9990705	7,61059119	3,71E-14	2,65E-10
Bcl11b	-1,861205	2,92179594	6,60E-06	0,00177292
Slc9a7	-1,7534851	2,8392059	6,01E-05	0,00903443
Kcna1	-1,6570883	2,9455065	1,54E-05	0,00334316
Apoc3	-1,6258534	2,99176877	7,78E-05	0,01077946
2010016I18Rik	-1,5893787	5,82585998	5,63E-08	5,26E-05
Fam13a	-1,505544	6,81412691	1,93E-06	0,00079957
Glycam1	-1,4245083	5,40786924	0,00028064	0,02809318
Rsph9	-1,4046813	2,83769694	0,00036579	0,0337356
Slc43a1	-1,3894942	4,24207392	1,72E-05	0,00358202
Zbtb16	-1,3857441	5,00362164	3,81E-07	0,00022752
Elovl6	-1,3183719	6,62824114	0,00024446	0,02570063
Tst	-1,2694655	6,27877961	3,02E-09	3,61E-06
Rorc	-1,242338	3,77435085	0,00013898	0,01650028
Parm1	-1,2349667	3,79276591	5,22E-05	0,00818854
Cr2	-1,1876491	3,5263796	7,18E-05	0,01022412
Rgs2	-1,1647266	4,952963	0,00010698	0,01365854
Nat8l	-1,1034386	5,60199215	1,46E-05	0,00320406
Rhou	-1,1031755	3,74895714	0,00049679	0,04283851
Cfd	-1,1021887	14,3402942	1,09E-05	0,00255226
Hcar2	-1,0912618	4,95373823	1,08E-05	0,00255226
Zbtb5	-1,0902479	3,85835644	5,18E-05	0,00818854

Cyp2e1	-1,0846172	10,9409967	3,22E-06	0,00111731
Adrb3	-1,0621468	6,31201734	1,56E-05	0,00334316
Gpx3	-1,0294235	8,81447646	2,70E-06	0,00098359
Cd27	-1,0241326	3,80005385	0,0003889	0,03541148
Chst1	-1,002868	5,84512518	0,00012016	0,01480963
H2-Q10	-1,0009589	6,33040825	0,00030683	0,02997066
Ganc	-0,9887982	3,81450922	0,00041078	0,03680017
Acaca	-0,9531757	8,06870965	0,00034278	0,03244921
St3gal4	-0,9520279	4,48925063	0,00011311	0,01405018
Slc25a1	-0,9385512	8,57505853	3,91E-06	0,00118364
Trim30a	-0,9308261	5,02119993	6,84E-05	0,00987104
Net1	-0,9233912	7,35988353	0,00025648	0,02662537
2610005L07Rik	-0,9093595	3,88730528	0,00026244	0,02711314
Chchd10	-0,8882442	7,0104167	0,00054753	0,04508031
Kmt2a	-0,8832745	4,87647675	7,49E-05	0,01051321
Hcar1	-0,8819671	5,76600035	0,00010137	0,01315048
Ifi47	-0,8753104	5,4527279	0,0001608	0,01857759
Fyb	-0,8663752	5,2367261	0,00057917	0,0471179
Ifi205	-0,851206	5,3377384	5,96E-05	0,0090225
Vcam1	-0,8454747	5,34231042	9,16E-06	0,00228289
Fasn	-0,8442494	9,63095571	0,00023785	0,02536107
Dnase2a	-0,8117647	4,87017339	0,00031322	0,03018283
Nrip1	-0,7928664	6,33467338	5,22E-05	0,00818854
Slc1a3	-0,7842686	6,74357908	0,00021243	0,02317162
Rsrp1	-0,7559959	6,95290513	0,00014152	0,01670909
Sfxn1	-0,7424548	7,32865455	0,00035266	0,03268438
Bcat2	-0,7356052	7,42262268	7,51E-07	0,00038422
Gpx8	-0,7286957	7,15620329	7,80E-06	0,00199472
Pnlsr	-0,7249153	6,024856	3,10E-05	0,00559923
Tkt	-0,7229012	9,92345227	8,64E-05	0,01167336
C3	-0,7194563	9,24975754	3,78E-06	0,00117576
Pcx	-0,6860159	8,68620307	5,86E-06	0,00163647
Cp	-0,6756954	6,72114039	9,81E-05	0,0129028
Prpf38b	-0,6713348	5,52547572	0,00040487	0,03655582
H2-Ke6	-0,6362908	5,81888716	0,00031605	0,03031964
Dgat1	-0,6296771	7,08483181	2,39E-05	0,00471662
Apod	-0,5916932	7,43341334	0,0005993	0,04823381
Ufm1	0,45039921	6,96674454	0,00054395	0,0450795
Hprt	0,48732406	7,79313666	0,00037088	0,03405933
Steap4	0,52897915	8,12406106	2,09E-05	0,0042382
Scfd1	0,55155813	5,96440007	0,00039649	0,03595009
Ccser2	0,56145927	6,8653406	0,00033059	0,03157385

Pqlc3	0,56439456	5,69643619	0,00054306	0,0450795
Plgrkt	0,57882054	6,01364646	0,00027923	0,02809318
1810058I24Rik	0,58441282	8,21460836	0,00052154	0,04412349
Pak1ip1	0,58738211	5,94690244	0,0002426	0,02568099
Reep5	0,59175354	9,70346582	0,00052885	0,04439282
Itgb1bp1	0,59586533	5,83795846	0,00012329	0,01505366
Mfge8	0,61363434	8,9682502	0,00010911	0,01371545
Acyp2	0,62136617	7,34861224	5,59E-05	0,00864081
Ctsl	0,62679814	9,72818651	0,00013271	0,01584385
Smim4	0,63087067	7,05122302	0,00043187	0,03787977
Dusp3	0,63334482	6,90362231	0,00060442	0,04846404
Vim	0,63506238	9,57598883	2,44E-05	0,00473325
Lxn	0,63578627	5,21872861	0,00041189	0,03680017
Phlda3	0,63672839	7,35309327	0,00012678	0,01530543
Crip2	0,63798152	7,45062367	5,71E-05	0,00876642
Itih5	0,63836621	8,1526009	0,00056863	0,04663847
Tuba1b	0,639145	9,83782928	7,38E-05	0,0104363
Dpt	0,64724129	9,80657031	4,47E-05	0,00744744
Fkbp7	0,65195512	6,33199821	0,00024637	0,02570063
Gcsh	0,65534759	7,32171455	7,53E-05	0,01051321
Lgals1	0,65960031	13,2512439	2,54E-05	0,00488296
Sgcd	0,66078404	6,33110171	0,00037993	0,03474183
Mxra8	0,6659736	5,82071234	0,00051537	0,04377402
Dap	0,66984361	7,17729335	3,94E-05	0,00676935
A530053G22Rik	0,68425124	6,73181252	0,00018092	0,02079071
Anxa6	0,68734192	9,03943907	3,62E-05	0,00638039
C130074G19Rik	0,68822348	6,07621062	0,00042149	0,03719763
Fzd4	0,69620571	6,55548204	0,00022204	0,02399551
Rps4l	0,6996006	6,08844668	0,00018791	0,02103128
Prxl2b	0,70741083	7,37465895	3,89E-06	0,00118364
Gatb	0,70793272	5,55902505	0,00058105	0,04711179
Slc48a1	0,71129439	7,24994178	3,44E-06	0,00113943
Palmd	0,71588683	7,12298318	0,00052551	0,0442849
Mturn	0,72349038	5,94920472	9,85E-05	0,0129028
Cd59a	0,7271903	8,50583915	0,0003499	0,03268438
Nrep	0,73194244	5,96303621	7,08E-05	0,01014988
Ankfy1	0,74035149	7,2269751	0,00028179	0,02809318
Slc5a3	0,74859721	5,87608524	0,00020508	0,02248448
Eva1b	0,75442895	4,47982991	0,00024625	0,02570063
Adamts2	0,7583474	6,22023738	9,72E-05	0,01289202
Akirin1	0,75901246	4,97890989	0,00010159	0,01315048
Sod3	0,76097239	7,27402478	5,19E-05	0,00818854

Maged2	0,76365453	5,25314057	3,06E-05	0,00559136
Anxa1	0,771759	9,56986361	8,20E-08	6,61E-05
Atp6v0e2	0,77334683	5,14801056	0,00019208	0,02131072
Palld	0,77350567	5,75752153	5,98E-06	0,00163792
Gamt	0,77572712	4,86767099	0,00061633	0,04923534
Trarg1	0,7790172	7,83902651	6,66E-05	0,00973215
Aspn	0,78068109	5,92864015	1,74E-05	0,00360164
Cav1	0,7873949	10,3740683	5,18E-06	0,00149461
Cd1d1	0,79164653	8,44436609	5,49E-05	0,00854415
H2bc4	0,79441538	7,32254272	9,48E-05	0,0126571
Sc5d	0,79533274	7,13593239	0,00010659	0,01365854
Septin4	0,8118066	5,23284957	0,00031088	0,0300927
Fhl1	0,812971	7,36556376	9,44E-07	0,00046085
Serpina3n	0,81381337	7,85598112	3,33E-06	0,00113735
Cav2	0,82818064	9,04170892	2,63E-07	0,00017113
Pdgfd	0,83649862	4,20729256	0,00027894	0,02809318
Nnmt	0,84833971	9,28771939	2,14E-06	0,00086871
Hp	0,84904251	11,8738553	0,00059171	0,04780147
S100a11	0,86969789	10,5060573	4,61E-07	0,00026097
Pkp2	0,87773438	4,43230791	0,00019239	0,02131072
Lrg1	0,88012446	7,88820332	1,14E-05	0,00257273
Gng11	0,88137406	7,40592231	5,89E-05	0,00897235
Fads3	0,88518509	6,75070073	3,18E-06	0,00111731
Slc22a4	0,88972573	4,99547668	4,90E-05	0,00792426
Mycbp2	0,89505634	7,30879621	1,16E-06	0,00052891
Cystm1	0,90201668	6,57756577	4,61E-07	0,00026097
Gm14295	0,91191825	5,62767078	2,74E-05	0,00521559
Hspa2	0,91329357	3,78626403	0,00034885	0,03268438
Mylk	0,92208933	5,18678303	1,14E-05	0,00257273
Rasl12	0,92805004	5,78059508	0,00011049	0,01380432
Pam	0,9322716	6,24394467	2,47E-06	0,00094666
Bmp3	0,93227387	5,14058228	6,44E-05	0,00948567
Mrps6	0,93649224	7,28652561	1,46E-06	0,00062836
Itga7	0,93968483	5,7495524	2,09E-05	0,0042382
Unc119	0,94034434	4,91370925	6,36E-05	0,00942829
Aldh1a1	0,94765044	7,06265099	7,38E-06	0,00193327
Acta2	0,95383955	7,35528483	1,96E-07	0,00013614
Gask1b	0,96066292	5,40034152	0,00022221	0,02399551
Serpina3c	0,96533757	6,5062074	1,41E-06	0,00061872
Hfe	0,96810028	6,81954889	9,35E-06	0,00228289
Eepd1	0,96917212	8,32650176	0,00028238	0,02809318
Fhit	0,96984103	3,69278147	0,00042237	0,03719763

Nedd9	0,971219	5,18818052	0,00018259	0,02086195
Trim16	0,9721705	4,41640118	4,79E-05	0,00780595
Olfm1	0,97930953	5,27144269	0,00034031	0,0323577
Gm34758	0,98246697	3,6620841	0,00034761	0,03268438
Mpp7	0,98279546	4,96398106	7,99E-06	0,00202067
Cryab	0,98625457	8,62978901	3,64E-06	0,00116591
Tspan17	0,99185159	4,74227413	0,00026877	0,02750319
Gm19705	1,01148923	3,62879229	0,00014364	0,01686693
Hspb2	1,01987559	5,34317095	1,37E-06	0,00061295
Adamts5	1,02324677	7,5949672	1,35E-05	0,0029814
Anxa2	1,03266497	10,8162201	3,00E-07	0,00018963
Emp1	1,03845878	6,92191076	3,53E-05	0,00632053
Mterf2	1,04963686	3,44793409	0,00028429	0,02815291
Myct1	1,05697994	4,44064895	4,74E-06	0,00141351
Rab38	1,05869675	3,61737877	0,00049838	0,04283851
Fmr1	1,0612099	6,78609708	1,83E-06	0,00077033
Nek6	1,07090565	4,60076255	2,69E-06	0,00098359
Dgat2	1,07836663	9,32760671	2,34E-06	0,00091364
Ppic	1,07907042	6,21289037	1,04E-07	7,78E-05
Gpc1	1,09073961	4,89202129	4,15E-05	0,00701818
2610016A17Rik	1,09730095	6,33468044	4,57E-05	0,00756219
Hmgcs1	1,10024332	7,55178937	1,01E-06	0,00048404
Bcar3	1,11457438	5,71663214	2,87E-05	0,0054047
Srpx2	1,13933267	5,79118671	2,86E-06	0,00102398
S100b	1,14652397	4,65942981	8,38E-05	0,01139686
Sparc	1,1465942	11,8541836	6,83E-11	1,83E-07
Lpgat1	1,14695791	8,35442298	1,88E-08	2,02E-05
Paqr7	1,16639914	4,71720926	2,11E-07	0,00014155
Abat	1,17974724	3,5852551	8,01E-05	0,0110056
Prelp	1,19283344	8,61045646	6,13E-08	5,49E-05
Grb14	1,19841246	5,41955294	9,71E-06	0,00231857
Gm5144	1,19865748	4,37459127	3,69E-06	0,00116713
Olfml3	1,21333588	5,26138812	0,0001287	0,01545051
Cdc42ep1	1,21855869	5,49755076	4,67E-10	9,12E-07
G0s2	1,23101245	7,65678312	6,73E-10	1,11E-06
Grtp1	1,23566813	4,41112421	0,00015564	0,01807874
Pmepa1	1,2513382	6,65336207	1,57E-05	0,0033505
Tmem45b	1,25393803	9,04928067	3,45E-06	0,00113943
Mpdz	1,25886278	5,81618535	4,49E-08	4,39E-05
Myom3	1,29324466	3,53988102	1,69E-05	0,00355434
D430019H16Rik	1,31195153	3,7200682	2,24E-05	0,00449908
Jpt2	1,31618418	4,18400853	2,39E-05	0,00471662

Trim67	1,31849492	3,48078489	0,00054543	0,0450795
Hilpda	1,32227643	5,43526799	9,12E-05	0,01224974
Angptl3	1,32631032	3,04863387	0,00030644	0,02997066
Aplnr	1,33530777	4,76290133	6,11E-07	0,00031999
Ppp1r3d	1,34918291	3,08000437	0,00020066	0,0221124
Rgs7bp	1,35897753	3,75827473	3,58E-05	0,00636077
Npr3	1,37868847	7,98880773	5,85E-07	0,00031445
Dnajb13	1,40777478	3,04223723	0,00050096	0,04288934
Trabd2b	1,40834657	4,83096421	1,10E-05	0,00255226
Map1a	1,47057886	2,94466951	0,0005721	0,04674493
Fgf13	1,47250574	3,97671726	5,00E-06	0,00147318
Prr32	1,49622614	4,93178953	2,43E-05	0,00473325
Slc6a13	1,52019759	5,92979547	3,02E-09	3,61E-06
Rbm28	1,54506311	6,24474319	2,88E-08	2,94E-05
Gm4876	1,54643895	3,52478757	6,02E-06	0,00163792
Plekhh2	1,56382973	3,09487419	0,00050839	0,04335211
Cavin3	1,58596399	7,57949576	5,86E-13	2,10E-09
Duoxa1	1,58875222	3,25293407	7,71E-06	0,00199472
Sfrp5	1,59040359	5,71372857	1,56E-15	3,35E-11
Slc16a12	1,59959828	3,60730835	2,93E-05	0,00542676
Trp53inp2	1,60055816	7,08058888	4,02E-09	4,54E-06
Mettl7b	1,60225536	3,62653843	7,61E-08	6,54E-05
Igfals	1,60592931	5,92331786	1,19E-09	1,71E-06
Myl4	1,61003199	5,12605081	1,26E-07	9,01E-05
Tfpi2	1,61750942	2,69043305	0,00053169	0,04445682
Lbp	1,620904	6,85200354	3,86E-10	8,29E-07
Nos2	1,71538397	2,48945256	6,09E-05	0,00908403
Map7	1,71802026	2,75723023	0,00010742	0,01365854
Ret	1,72490473	4,03631957	7,29E-06	0,00193306
Pla2g5	1,75456769	2,83468254	0,00018594	0,02091959
Ccdc9b	1,78558202	2,93410318	2,61E-06	0,00098262
Gsdma3	1,78981241	3,37799928	5,26E-06	0,00149461
Slc20a2	1,81306701	3,10013515	5,29E-06	0,00149461
Pcbd1	1,94646909	4,6110949	2,41E-10	5,75E-07
Crtac1	1,96491326	5,27381998	5,68E-13	2,10E-09
Kcnh2	2,0024773	2,12067497	0,00035287	0,03268438
Pla2g2e	2,0125739	3,33162652	0,00030511	0,02997066
Plppr4	2,02063404	3,33652694	4,34E-05	0,00729108
Bpifb6	2,07489986	3,17502387	0,00012061	0,01480963
Ptchd4	2,11854027	2,12750034	0,00043821	0,03827953
Fam20c	2,26044208	5,19471276	5,05E-07	0,00027809
Tuba1a	2,31172196	10,251835	3,39E-12	1,04E-08

Lamb3	2,34081626	2,22731733	0,00018348	0,02086195
AW822252	2,45473137	2,1754368	0,00015399	0,01798381
Lep	2,48492531	10,1188964	2,20E-13	1,18E-09
9030619P08Rik	2,52629397	3,09654327	1,15E-05	0,00257724
Oxtr	2,76036483	3,98249587	3,57E-07	0,00021899
2610020C07Rik	2,81871212	2,07304928	3,93E-05	0,00676935
Gm5627	3,08842457	2,44479715	2,23E-06	0,00088618
Gm36266	3,10611384	3,03238639	1,06E-06	0,00049366
Adamtsl2	3,13182094	2,0128837	3,53E-06	0,00115076
Fgf21	3,15932839	1,82387323	6,74E-05	0,00978003
Gabbr2	3,41882279	2,37762571	1,05E-07	7,78E-05
Fos	3,47050013	6,0971895	0,00028002	0,02809318
Mest	3,59076741	3,46646785	1,31E-09	1,75E-06
E130310I04Rik	3,71111705	1,86546364	9,45E-06	0,00228289
Slc5a7	3,76453284	3,30550826	9,12E-07	0,00045582
Atp1a4	3,7746652	4,24599599	5,93E-10	1,06E-06
1700047G03Rik	3,8710817	5,67417822	1,50E-14	1,61E-10
Apoc4	4,05492215	1,4200606	0,00048991	0,04245055
Klf14	4,43370322	1,56517545	3,07E-05	0,00559136
Lipf	4,6316974	3,07536377	1,01E-09	1,54E-06
Tph2	5,58340914	4,18894551	8,30E-08	6,61E-05

520

521

- 523 [1] Gibbs, E.M., Stock, J.L., McCoid, S.C., Stukenbrok, H.A., Pessin, J.E.,
524 Stevenson, R.W., et al., 1995. Glycemic improvement in diabetic db/db mice by
525 overexpression of the human insulin-regulatable glucose transporter (GLUT4).
526 *The Journal of Clinical Investigation* 95(4): 1512–8, Doi: 10.1172/JCI117823.
- 527 [2] Ruprecht, J.J., Kunji, E.R.S., 2020. The SLC25 Mitochondrial Carrier Family:
528 Structure and Mechanism. *Trends in Biochemical Sciences* 45(3): 244–58, Doi:
529 10.1016/j.tibs.2019.11.001.
- 530 [3] Mayr, J.A., Merkel, O., Kohlwein, S.D., Gebhardt, B.R., Böhles, H., Fötschl, U.,
531 et al., 2007. Mitochondrial phosphate-carrier deficiency: a novel disorder of
532 oxidative phosphorylation. *American Journal of Human Genetics* 80(3): 478–84,
533 Doi: 10.1086/511788.
- 534 [4] Farrell, K.B., Tusnady, G.E., Eiden, M.V., 2009. New structural arrangement of
535 the extracellular regions of the phosphate transporter SLC20A1, the receptor for
536 gibbon ape leukemia virus. *The Journal of Biological Chemistry* 284(43): 29979–
537 87, Doi: 10.1074/jbc.M109.022566.
- 538 [5] Specht, K., Richter, T., Müller, U., Walch, A., Werner, M., Höfler, H., 2001.
539 Quantitative gene expression analysis in microdissected archival formalin-fixed
540 and paraffin-embedded tumor tissue. *The American Journal of Pathology* 158(2):
541 419–29, Doi: 10.1016/S0002-9440(10)63985-5.
- 542 [6] Beck, L., Leroy, C., Salaün, C., Margall-Ducos, G., Desdouets, C., Friedlander,
543 G., 2009. Identification of a novel function of PiT1 critical for cell proliferation and
544 independent of its phosphate transport activity. *The Journal of Biological*
545 *Chemistry* 284(45): 31363–74, Doi: 10.1074/jbc.M109.053132.
- 546 [7] Kavanaugh, M.P., Miller, D.G., Zhang, W., Law, W., Kozak, S.L., Kabat, D., et
547 al., 1994. Cell-surface receptors for gibbon ape leukemia virus and amphotropic
548 murine retrovirus are inducible sodium-dependent phosphate symporters.
549 *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*
550 *America* 91(15): 7071–5, Doi: 10.1073/pnas.91.15.7071.
- 551 [8] Olah, Z., Lehel, C., Anderson, W.B., Eiden, M.V., Wilson, C.A., 1994. The
552 cellular receptor for gibbon ape leukemia virus is a novel high affinity sodium-
553 dependent phosphate transporter. *The Journal of Biological Chemistry* 269(41):
554 25426–31.
- 555 [9] Ravera, S., Virkki, L.V., Murer, H., Forster, I.C., 2007. Deciphering PiT transport
556 kinetics and substrate specificity using electrophysiology and flux
557 measurements. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 293(2): C606-
558 620, Doi: 10.1152/ajpcell.00064.2007.
- 559 [10] Ramos-Brossier, M., Romeo-Guitart, D., Lanté, F., Boitez, V., Mailliet, F., Saha,
560 S., et al., 2024. Slc20a1 and Slc20a2 regulate neuronal plasticity and cognition
561 independently of their phosphate transport ability. *Cell Death & Disease* 15(1):
562 20, Doi: 10.1038/s41419-023-06292-z.
- 563 [11] Forand, A., Koumakis, E., Rousseau, A., Sassier, Y., Journe, C., Merlin, J.-F., et
564 al., 2016. Disruption of the Phosphate Transporter Pit1 in Hepatocytes Improves
565 Glucose Metabolism and Insulin Signaling by Modulating the USP7/IRS1
566 Interaction. *Cell Reports* 16(10): 2736–48, Doi: 10.1016/j.celrep.2016.08.012.
- 567 [12] Rozman, J., Rathkolb, B., Oestereich, M.A., Schütt, C., Ravindranath, A.C.,
568 Leuchtenberger, S., et al., 2018. Identification of genetic elements in metabolism
569 by high-throughput mouse phenotyping. *Nature Communications* 9(1): 288, Doi:
570 10.1038/s41467-017-01995-2.

- 571 [13] Frangi, G., Guicheteau, M., Jacquot, F., Pyka, G., Kerckhofs, G., Feyeux, M., et
572 al., 2022. PiT2 deficiency prevents increase of bone marrow adipose tissue
573 during skeletal maturation but not in OVX-induced osteoporosis. *Frontiers in*
574 *Endocrinology* 13: 921073, Doi: 10.3389/fendo.2022.921073.
- 575 [14] Beck-Cormier, S., Lelliott, C.J., Logan, J.G., Lafont, D.T., Merametdjian, L.,
576 Leitch, V.D., et al., 2019. Slc20a2, Encoding the Phosphate Transporter PiT2, Is
577 an Important Genetic Determinant of Bone Quality and Strength. *Journal of*
578 *Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for*
579 *Bone and Mineral Research* 34(6): 1101–14, Doi: 10.1002/jbmr.3691.
- 580 [15] Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-
581 time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29(9): e45.
- 582 [16] Yamada, S., Wallingford, M.C., Borgeia, S., Cox, T.C., Giachelli, C.M., 2018.
583 Loss of PiT-2 results in abnormal bone development and decreased bone
584 mineral density and length in mice. *Biochemical and Biophysical Research*
585 *Communications* 495(1): 553–9, Doi: 10.1016/j.bbrc.2017.11.071.
- 586 [17] Müller, T.D., Klingenspor, M., Tschöp, M.H., 2021. Revisiting energy
587 expenditure: how to correct mouse metabolic rate for body mass. *Nature*
588 *Metabolism* 3(9): 1134–6, Doi: 10.1038/s42255-021-00451-2.
- 589 [18] Harms, M., Seale, P., 2013. Brown and beige fat: development, function and
590 therapeutic potential. *Nature Medicine* 19(10): 1252–63, Doi: 10.1038/nm.3361.
- 591 [19] Markussen, L.K., Rondini, E.A., Johansen, O.S., Madsen, J.G.S., Sustarsic,
592 E.G., Marcher, A.-B., et al., 2022. Lipolysis regulates major transcriptional
593 programs in brown adipocytes. *Nature Communications* 13(1): 3956, Doi:
594 10.1038/s41467-022-31525-8.
- 595 [20] Cero, C., Lea, H.J., Zhu, K.Y., Shamsi, F., Tseng, Y.-H., Cypess, A.M., 2021.
596 β 3-Adrenergic receptors regulate human brown/beige adipocyte lipolysis and
597 thermogenesis. *JCI Insight* 6(11): e139160, Doi: 10.1172/jci.insight.139160.
- 598 [21] Fedorenko, A., Lishko, P.V., Kirichok, Y., 2012. Mechanism of Fatty-Acid-
599 Dependent UCP1 Uncoupling in Brown Fat Mitochondria. *Cell* 151(2): 400–13,
600 Doi: 10.1016/j.cell.2012.09.010.
- 601 [22] Chernogubova, E., Cannon, B., Bengtsson, T., 2004. Norepinephrine Increases
602 Glucose Transport in Brown Adipocytes via β 3-Adrenoceptors through a cAMP,
603 PKA, and PI3-Kinase-Dependent Pathway Stimulating Conventional and Novel
604 PKCs. *Endocrinology* 145(1): 269–80, Doi: 10.1210/en.2003-0857.
- 605 [23] Brownstein, A.J., Veliova, M., Acin-Perez, R., Liesa, M., Shirihi, O.S., 2022.
606 ATP-consuming futile cycles as energy dissipating mechanisms to counteract
607 obesity. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* 23(1): 121–31, Doi:
608 10.1007/s11154-021-09690-w.
- 609 [24] Boucher, J., Mori, M.A., Lee, K.Y., Smyth, G., Liew, C.W., Macotela, Y., et al.,
610 2012. Impaired thermogenesis and adipose tissue development in mice with fat-
611 specific disruption of insulin and IGF-1 signalling. *Nature Communications* 3:
612 902, Doi: 10.1038/ncomms1905.
- 613 [25] Salmon, A.B., Lerner, C., Ikeno, Y., Motch Perrine, S.M., McCarter, R., Sell, C.,
614 2015. Altered metabolism and resistance to obesity in long-lived mice producing
615 reduced levels of IGF-I. *American Journal of Physiology - Endocrinology and*
616 *Metabolism* 308(7): E545–53, Doi: 10.1152/ajpendo.00558.2014.
- 617 [26] Hong, H., Cui, Z.-Z., Zhu, L., Fu, S.-P., Rossi, M., Cui, Y.-H., et al., 2017.
618 Central IGF1 improves glucose tolerance and insulin sensitivity in mice. *Nutrition*
619 *& Diabetes* 7(12): 2, Doi: 10.1038/s41387-017-0002-0.

- 620 [27] Fang, F., Goldstein, J.L., Shi, X., Liang, G., Brown, M.S., 2022. Unexpected role
621 for IGF-1 in starvation: Maintenance of blood glucose. *Proceedings of the*
622 *National Academy of Sciences of the United States of America* 119(32):
623 e2208855119, Doi: 10.1073/pnas.2208855119.
- 624 [28] Wallingford, M.C., Chia, J.J., Leaf, E.M., Borgeia, S., Chavkin, N.W.,
625 Sawangmake, C., et al., 2017. SLC20A2 Deficiency in Mice Leads to Elevated
626 Phosphate Levels in Cerebrospinal Fluid and Glymphatic Pathway-Associated
627 Arteriolar Calcification, and Recapitulates Human Idiopathic Basal Ganglia
628 Calcification. *Brain Pathology* 27(1): 64–76, Doi: 10.1111/bpa.12362.
- 629 [29] Jensen, N., Schrøder, H.D., Hejbøl, E.K., Thomsen, J.S., Brüel, A., Larsen, F.T.,
630 et al., 2018. Mice Knocked Out for the Primary Brain Calcification-Associated
631 Gene *Slc20a2* Show Unimpaired Prenatal Survival but Retarded Growth and
632 Nodules in the Brain that Grow and Calcify Over Time. *The American Journal of*
633 *Pathology* 188(8): 1865–81, Doi: 10.1016/j.ajpath.2018.04.010.
- 634 [30] Dearden, L., Bouret, S.G., Ozanne, S.E., 2018. Sex and gender differences in
635 developmental programming of metabolism. *Molecular Metabolism* 15: 8–19,
636 Doi: 10.1016/j.molmet.2018.04.007.
- 637 [31] Maggi, A., Della Torre, S., 2018. Sex, metabolism and health. *Molecular*
638 *Metabolism* 15: 3–7, Doi: 10.1016/j.molmet.2018.02.012.
- 639 [32] Betz, M.J., Enerbäck, S., 2018. Targeting thermogenesis in brown fat and
640 muscle to treat obesity and metabolic disease. *Nature Reviews. Endocrinology*
641 14(2): 77–87, Doi: 10.1038/nrendo.2017.132.
- 642 [33] Ohlsson, C., Mohan, S., Sjögren, K., Tivesten, Å., Isgaard, J., Isaksson, O., et
643 al., 2009. The Role of Liver-Derived Insulin-Like Growth Factor-I. *Endocrine*
644 *Reviews* 30(5): 494–535, Doi: 10.1210/er.2009-0010.
- 645 [34] Kopchick, J.J., Berryman, D.E., Puri, V., Lee, K.Y., Jorgensen, J.O.L., 2020. The
646 effects of growth hormone on adipose tissue: old observations, new
647 mechanisms. *Nature Reviews Endocrinology* 16(3): 135–46, Doi:
648 10.1038/s41574-019-0280-9.
- 649 [35] Beck, L., Leroy, C., Beck-Cormier, S., Forand, A., Salaün, C., Paris, N., et al.,
650 2010. The phosphate transporter PiT1 (*Slc20a1*) revealed as a new essential
651 gene for mouse liver development. *PloS One* 5(2): e9148, Doi:
652 10.1371/journal.pone.0009148.
- 653 [36] Salaün, C., Leroy, C., Rousseau, A., Boitez, V., Beck, L., Friedlander, G., 2010.
654 Identification of a novel transport-independent function of PiT1/SLC20A1 in the
655 regulation of TNF-induced apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*
656 285(45): 34408–18, Doi: 10.1074/jbc.M110.130989.
- 657 [37] Forand, A., Beck, L., Leroy, C., Rousseau, A., Boitez, V., Cohen, I., et al., 2013.
658 EKLF-driven PiT1 expression is critical for mouse erythroid maturation in vivo
659 and in vitro. *Blood* 121(4): 666–78, Doi: 10.1182/blood-2012-05-427302.
- 660 [38] Ma, X.-X., Li, X., Yi, P., Wang, C., Weng, J., Zhang, L., et al., 2017. PiT2
661 regulates neuronal outgrowth through interaction with microtubule-associated
662 protein 1B. *Scientific Reports* 7(1): 17850, Doi: 10.1038/s41598-017-17953-3.
- 663 [39] Yamada, S., Leaf, E.M., Chia, J.J., Cox, T.C., Speer, M.Y., Giachelli, C.M.,
664 2018. PiT-2, a type III sodium-dependent phosphate transporter, protects
665 against vascular calcification in mice with chronic kidney disease fed a high-
666 phosphate diet. *Kidney International* 94(4): 716–27, Doi:
667 10.1016/j.kint.2018.05.015.
- 668 [40] Couasnay, G., Bon, N., Devignes, C.-S., Sourice, S., Bianchi, A., Véziers, J., et
669 al., 2019. PiT1/*Slc20a1* Is Required for Endoplasmic Reticulum Homeostasis,

670 Chondrocyte Survival, and Skeletal Development. *Journal of Bone and Mineral*
671 *Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral*
672 *Research* 34(2): 387–98, Doi: 10.1002/jbmr.3609.
673 [41] Ren, Y., Shen, Y., Si, N., Fan, S., Zhang, Y., Xu, W., et al., 2021. Slc20a2-
674 Deficient Mice Exhibit Multisystem Abnormalities and Impaired Spatial Learning
675 Memory and Sensorimotor Gating but Normal Motor Coordination Abilities.
676 *Frontiers in Genetics* 12: 639935, Doi: 10.3389/fgene.2021.639935.
677

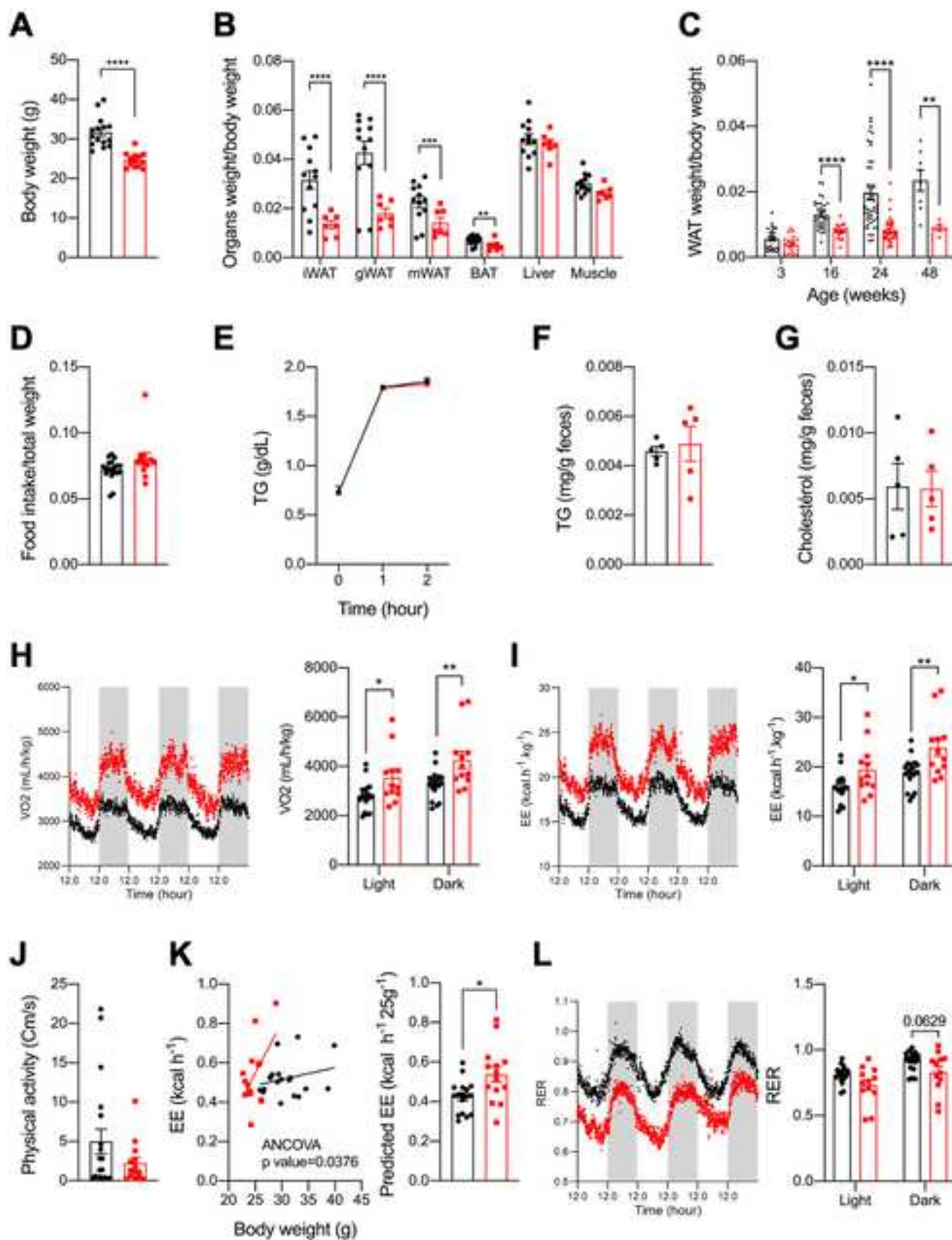
Figure 1

Figure 2

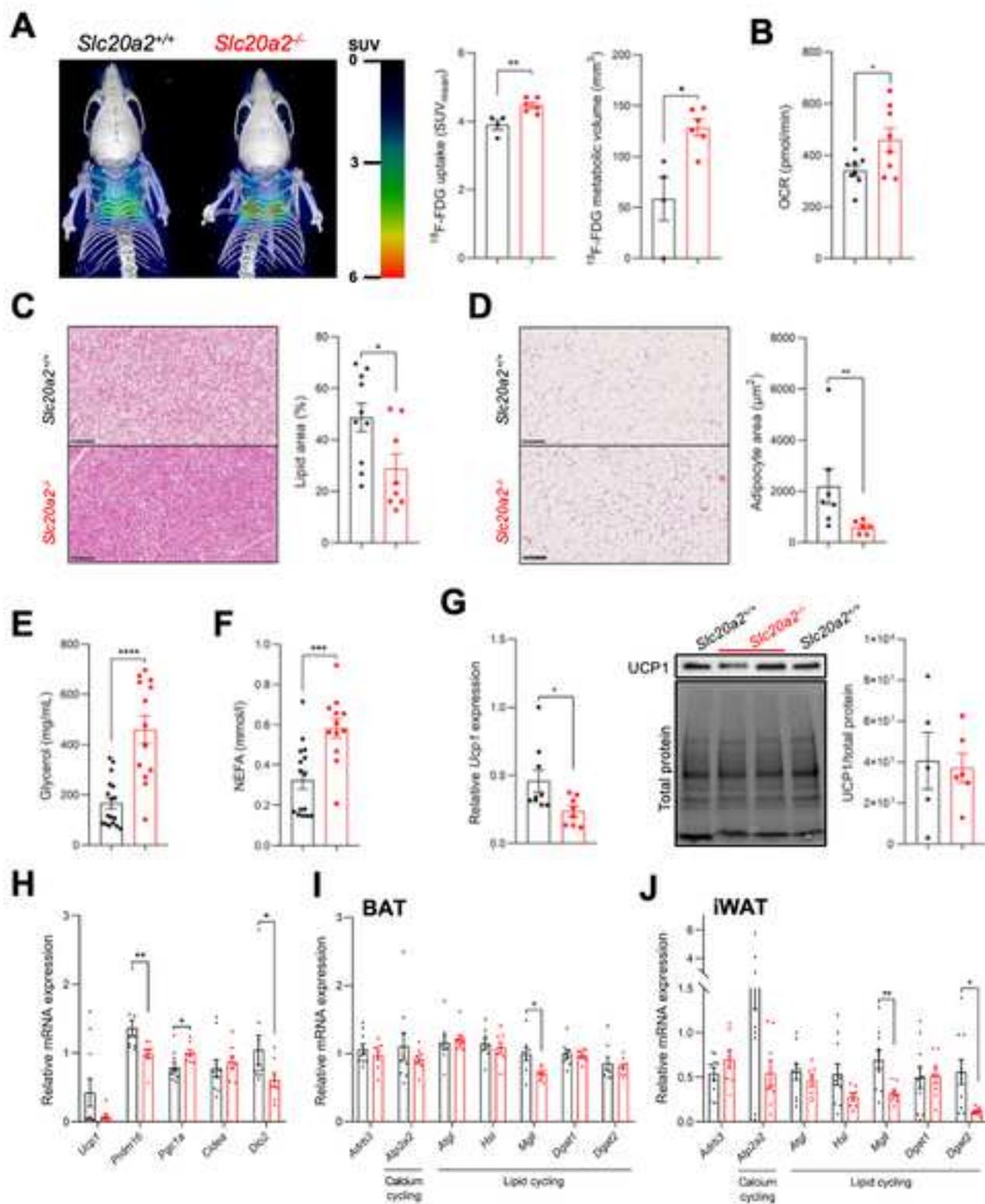


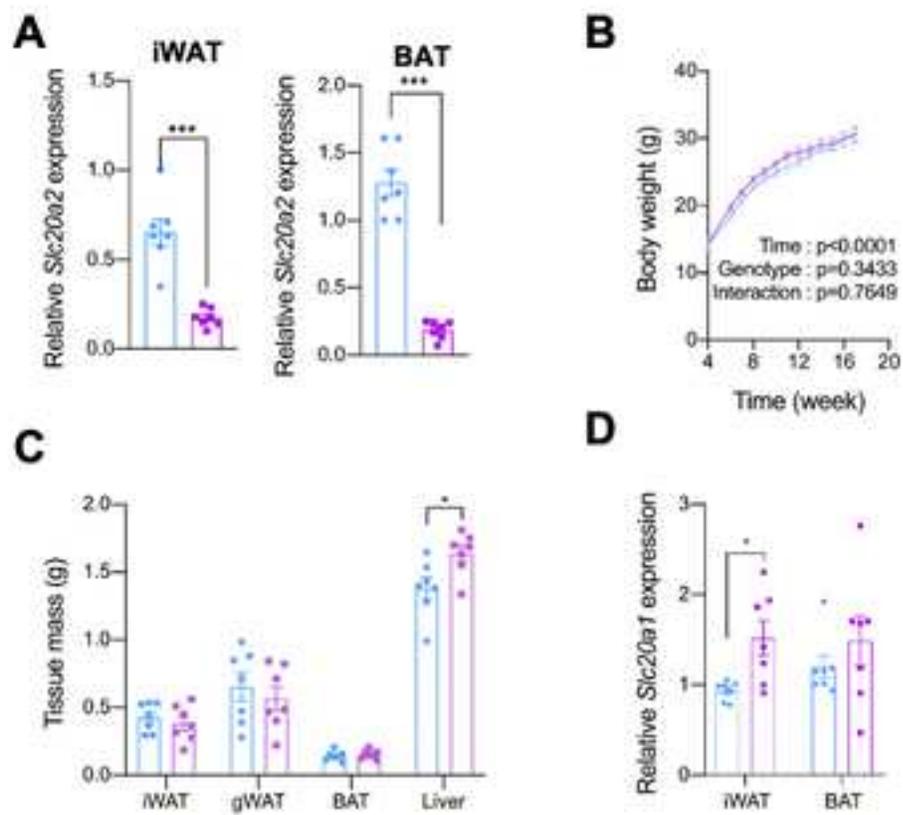
Figure 3

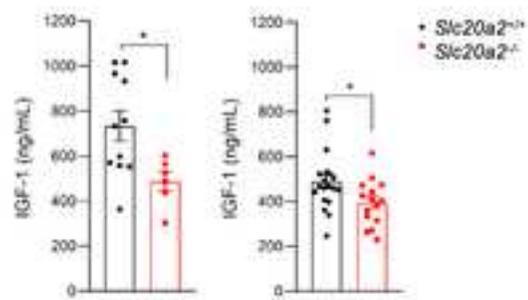
Figure 4

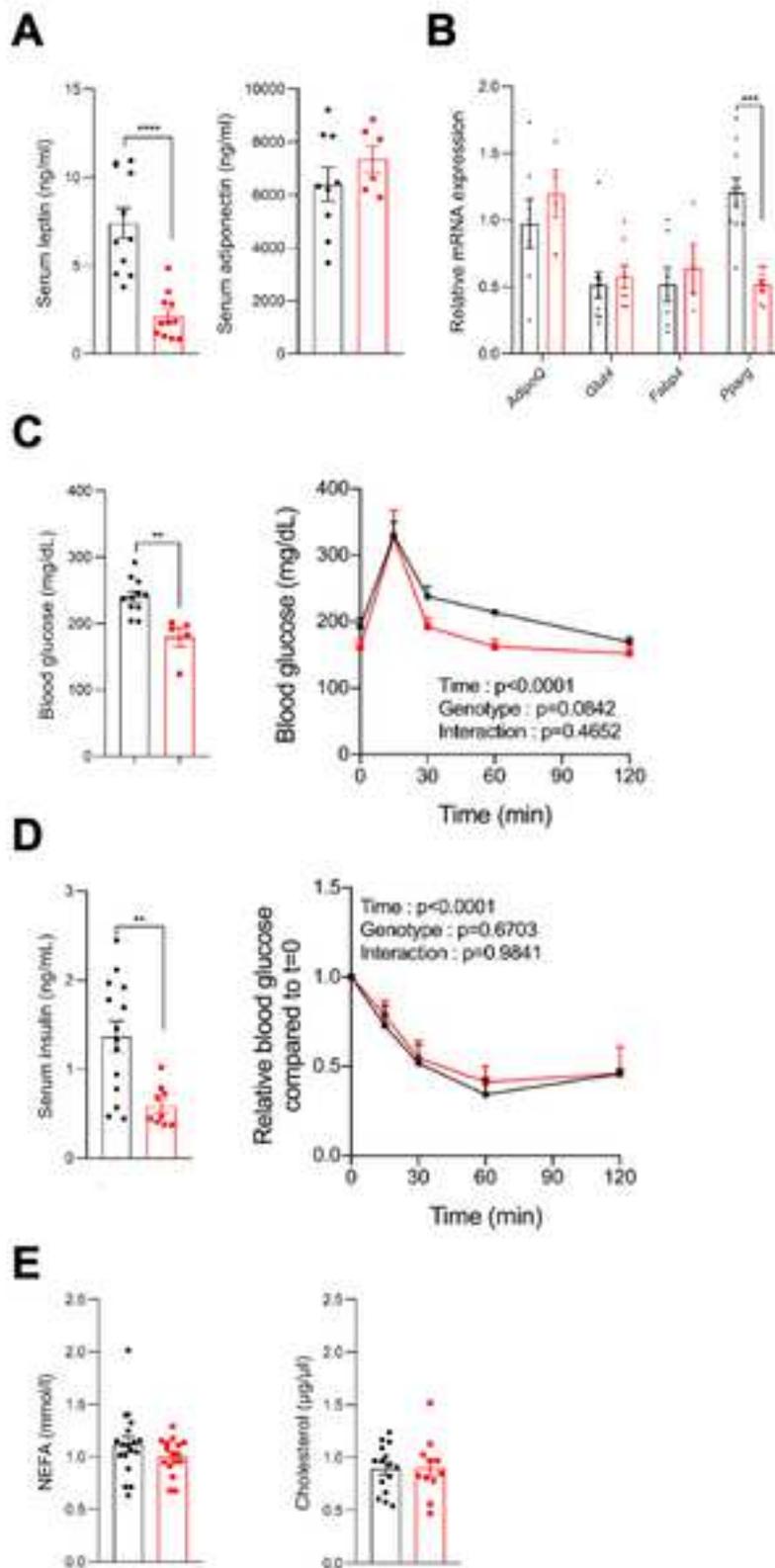
Figure S1

Figure S2

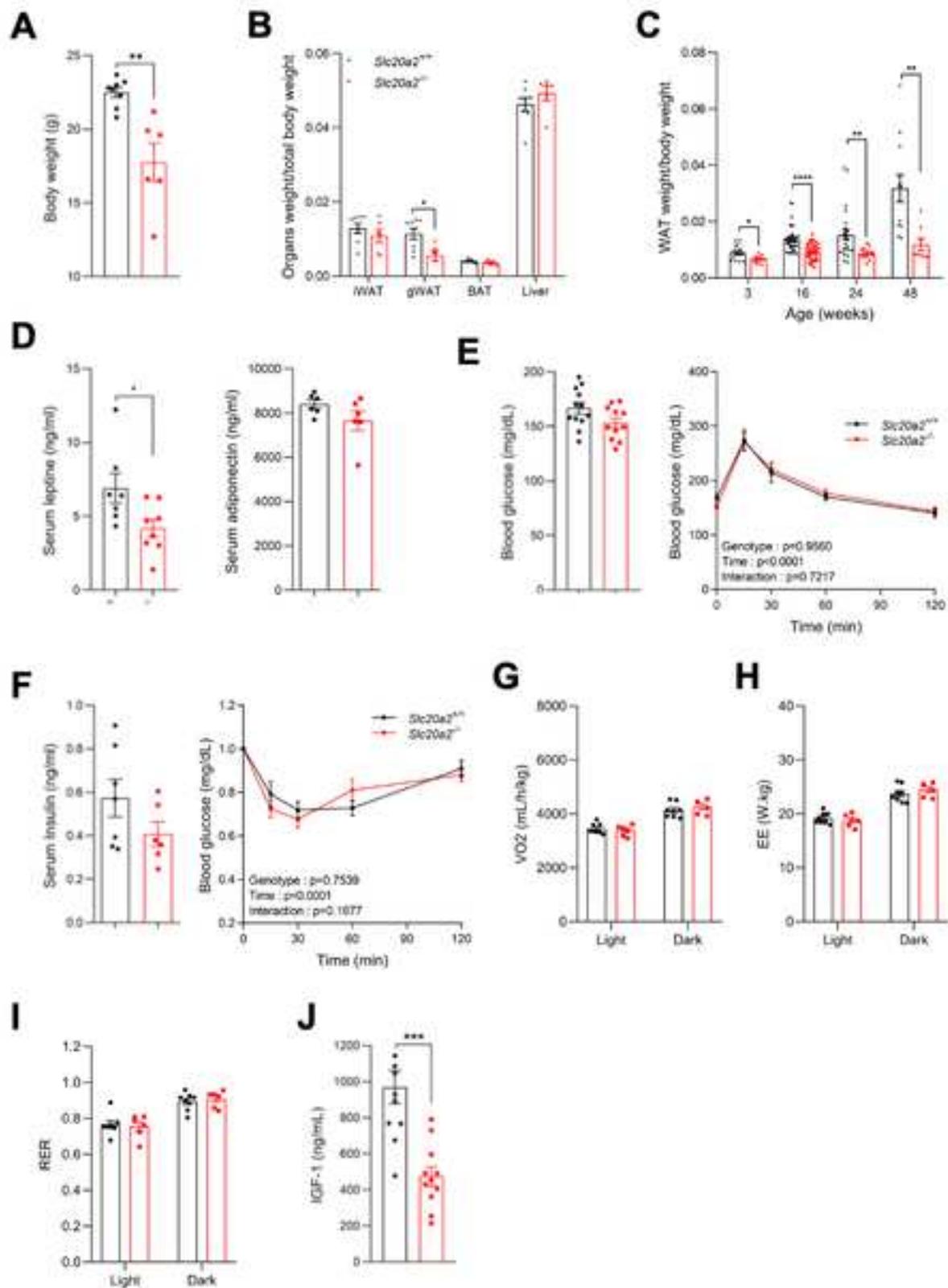
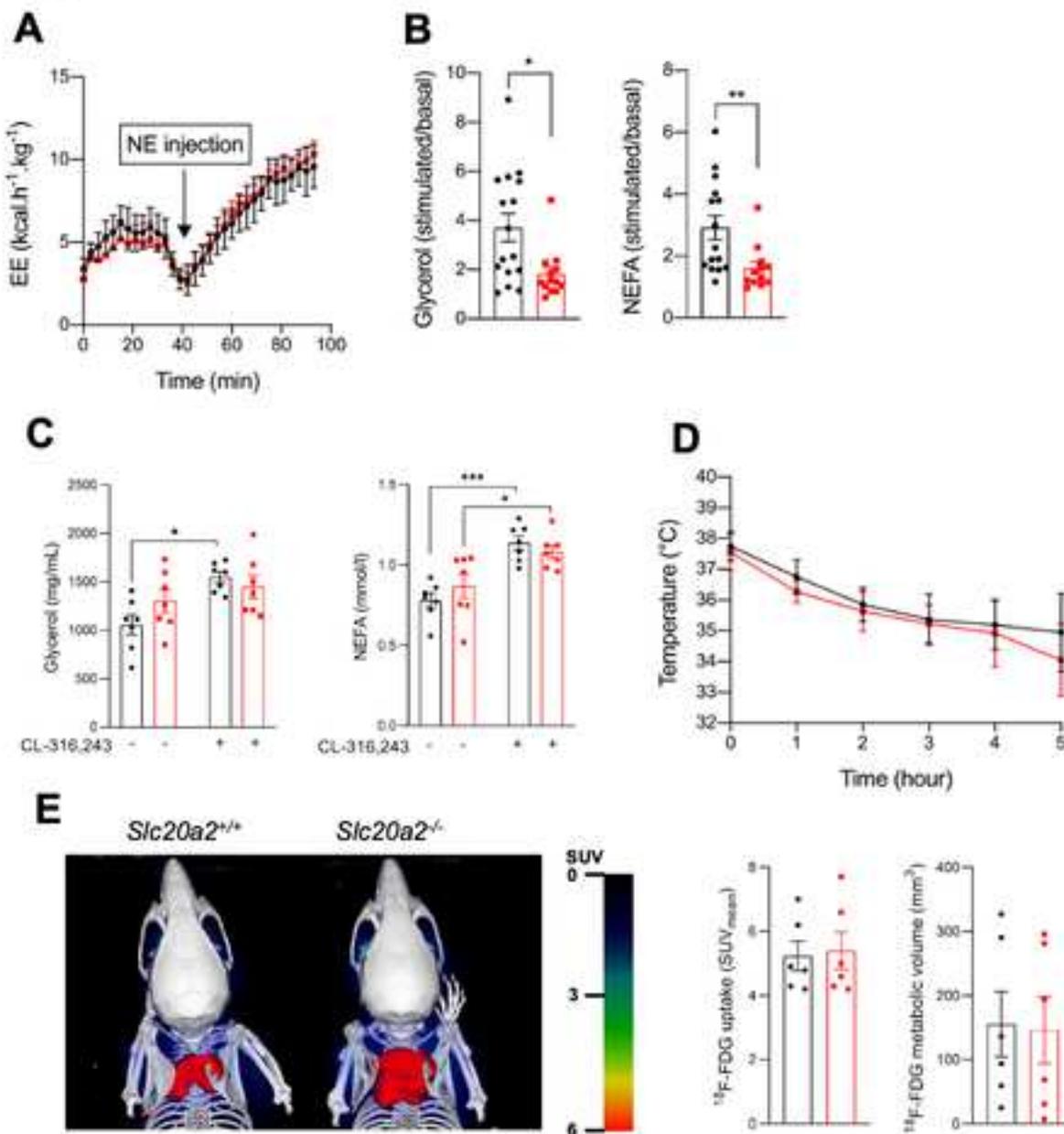


Figure S3

2. Effet de l'absence de PiT2 dans un modèle d'obésité induite

Contexte

Les souris *Slc20a2*^{-/-} ont une masse grasse diminuée accompagnée d'une augmentation de l'activité du BAT. De ce fait, nous nous sommes demandés si l'absence de PiT2 pouvait permettre de lutter contre l'obésité. Pour répondre à cette question, nous avons utilisé le modèle d'obésité induite par un régime riche en gras chez les souris *Slc20a2*^{+/+} et *Slc20a2*^{-/-}.

Matériels et méthodes

Les souris mâles *Slc20a2*^{-/-} et contrôles ont été soumises à un régime standard (NCD, pour « Normal Chow Diet ») ou riche en gras (HFD, pour « High Fat Diet ») à l'âge de 8 semaines pendant 8 ou 14 semaines à température ambiante ou à thermoneutralité (30°C). Une semaine avant la fin du protocole, des tests de tolérance au glucose et à l'insuline ont été effectués après 6 heures de mise à jeun. Les masses des tissus adipeux (iWAT, gWAT, BAT) et du foie ont été mesurées. Plusieurs lots d'animaux ont été analysés sur une période de 3 ans. Un lot (1) sur la période entre janvier et juin 2021 (n=5, *Slc20a2*^{+/+} NCD ; n=9, *Slc20a2*^{+/+} HFD ; n=5, *Slc20a2*^{-/-} NCD ; n=7, *Slc20a2*^{-/-} HFD), un lot (2) entre janvier et avril 2023 (n=15, *Slc20a2*^{+/+} HFD ; n=9, *Slc20a2*^{-/-} HFD), un lot (3) entre décembre 2023 et février 2024 (n=15, *Slc20a2*^{+/+} HFD ; n=19, *Slc20a2*^{-/-} HFD) (Figure 30).

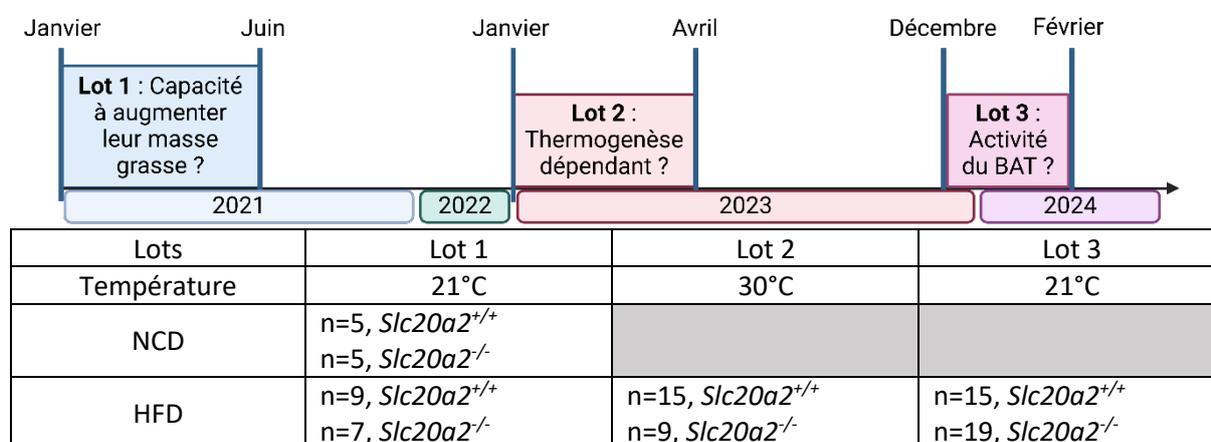


Figure 30 : Fresque chronologique des différents lots de souris soumises à un régime HFD. Les différents lots sont notés de 1 à 3. Les objectifs à atteindre pour chaque lot sont précisés ainsi que les conditions (température et nombre de souris par lot).

Résultats

Les résultats du lot 1 montrent que les souris *Slc20a2*^{-/-} soumises à un régime riche en gras présentent une résistance à la prise de masse corporelle (Figure 31A et 31B), une amélioration de la tolérance au glucose (Figure 31C, 31D et 31E) et à une résistance à la stéatose hépatique (Figure 31F et 31G). Pour comprendre si ce phénotype était dépendant de la thermogenèse, nous avons reproduit cette expérience à thermoneutralité (30°C) (lot 2). Nous montrons que les souris contrôles et *Slc20a2*^{-/-} ont une prise de masse corporelle similaire (Figure 32A et 32B), une intolérance au glucose (Figure 32C) et une apparition de stéatose hépatique (Figure 32D et 32E). Ces résultats montrent que les souris *Slc20a2*^{-/-} ne résistent pas au régime HFD à 30°C indiquant que la résistance à l'obésité est dépendante de la thermogenèse.

Pour aller plus loin dans la compréhension des mécanismes d'action de PIT2 dans ce contexte d'obésité induite et notamment l'analyse de l'activité du BAT et de la lipolyse, nous avons généré un nouveau lot de souris (lot 3). De manière surprenante, les souris contrôles et *Slc20a2*^{-/-} du lot 3 ont une prise de masse corporelle similaire (Figure 33A) ainsi qu'une apparition d'intolérance au glucose (Figure 33B) ne confirmant pas les données du premier lot.

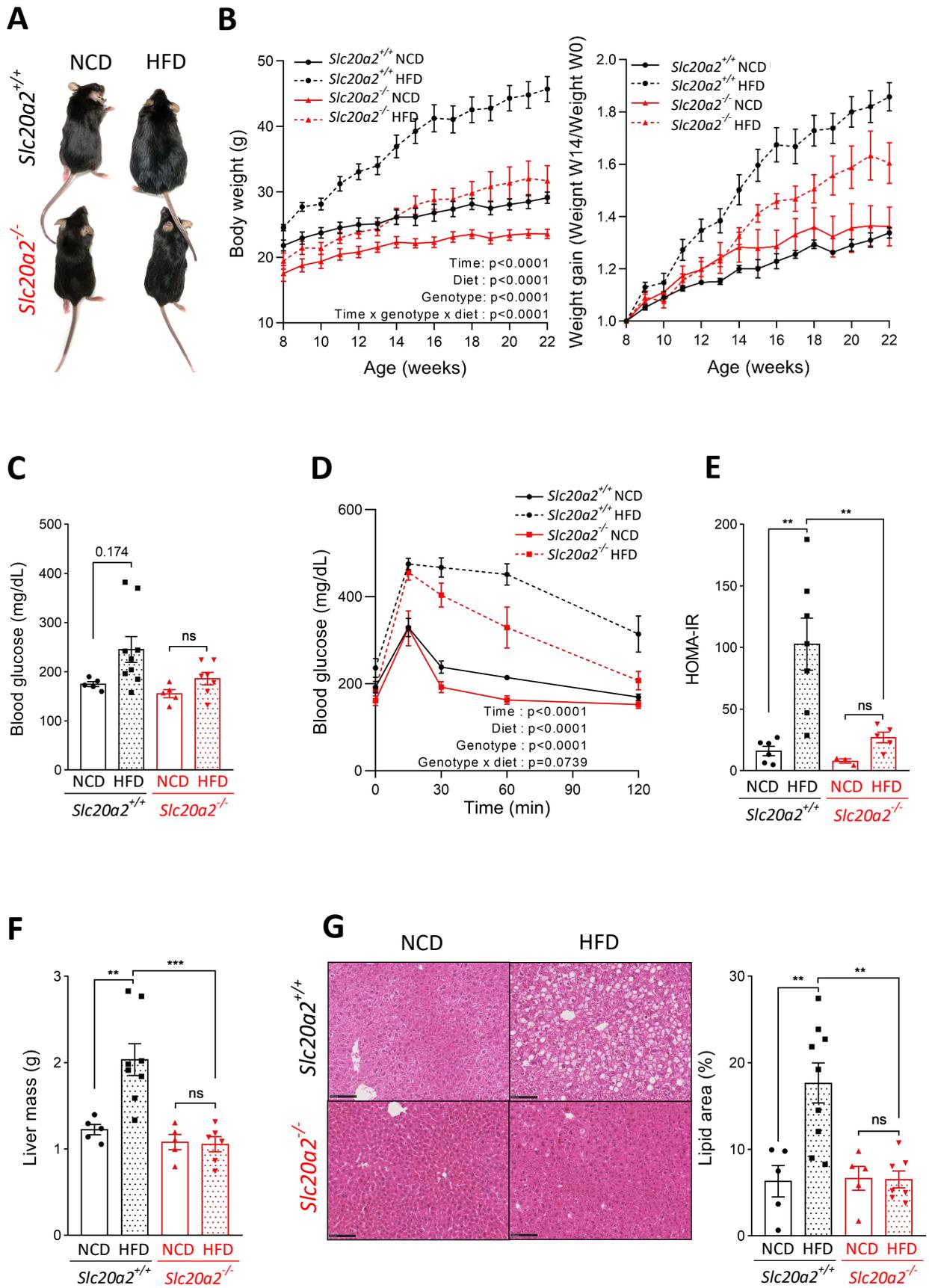


Figure 31 : L'inactivation de PiT2 protège contre l'obésité et la stéatose hépatique induites par le régime riche en gras chez les souris mâles. **A.** Images représentatives des souris *Slc20a2^{+/+}* and *Slc20a2^{-/-}* après 14 semaines de régime. **B.** Prise de masse corporelle et prise de masse corporelle relative au premier jour de régime des souris *Slc20a2^{+/+}* (n=5 NCD et n=9 HFD) et *Slc20a2^{-/-}* (n=5 NCD et n=7 HFD) sous régime NCD ou HFD pendant 14 semaines. **C.** Glycémie à jeun (6h) des souris *Slc20a2^{+/+}* et *Slc20a2^{-/-}* après 14 semaines de régime. **D.** La glycémie a été mesurée à t=0min, t=15min, t=30min, t=60min et t=120min après injection de glucose (2g/kg) chez des souris *Slc20a2^{+/+}* (n=5 NCD et 9 HFD) et *Slc20a2^{-/-}* (n=5 NCD et 7 HFD) après 12 semaines de régime. **E.** HOMA IR calculé à partir de la glycémie à jeun (6h) et de l'insulinémie de souris *Slc20a2^{+/+}* et *Slc20a2^{-/-}*. **F.** Masse du foie des souris *Slc20a2^{+/+}* et *Slc20a2^{-/-}* après 14 semaines de régime. **G.** Image représentatives de section de foie colorées HES de souris *Slc20a2^{+/+}* et *Slc20a2^{-/-}* après 14 semaines de régime est montré sur le panel de gauche et l'aire lipidique (%) des foies associés est montrée sur le panel de droite. Toutes les analyses montrent la moyenne \pm SEM. Analyses statistiques : test ANOVA à 2 voies (C, E, F and G) et test ANOVA à 3 voies (B and D). *p=0,05; **p=0,01 et ***p=0,001. Abbreviations: Normal chow diet (NCD), High Fat Diet (HFD).

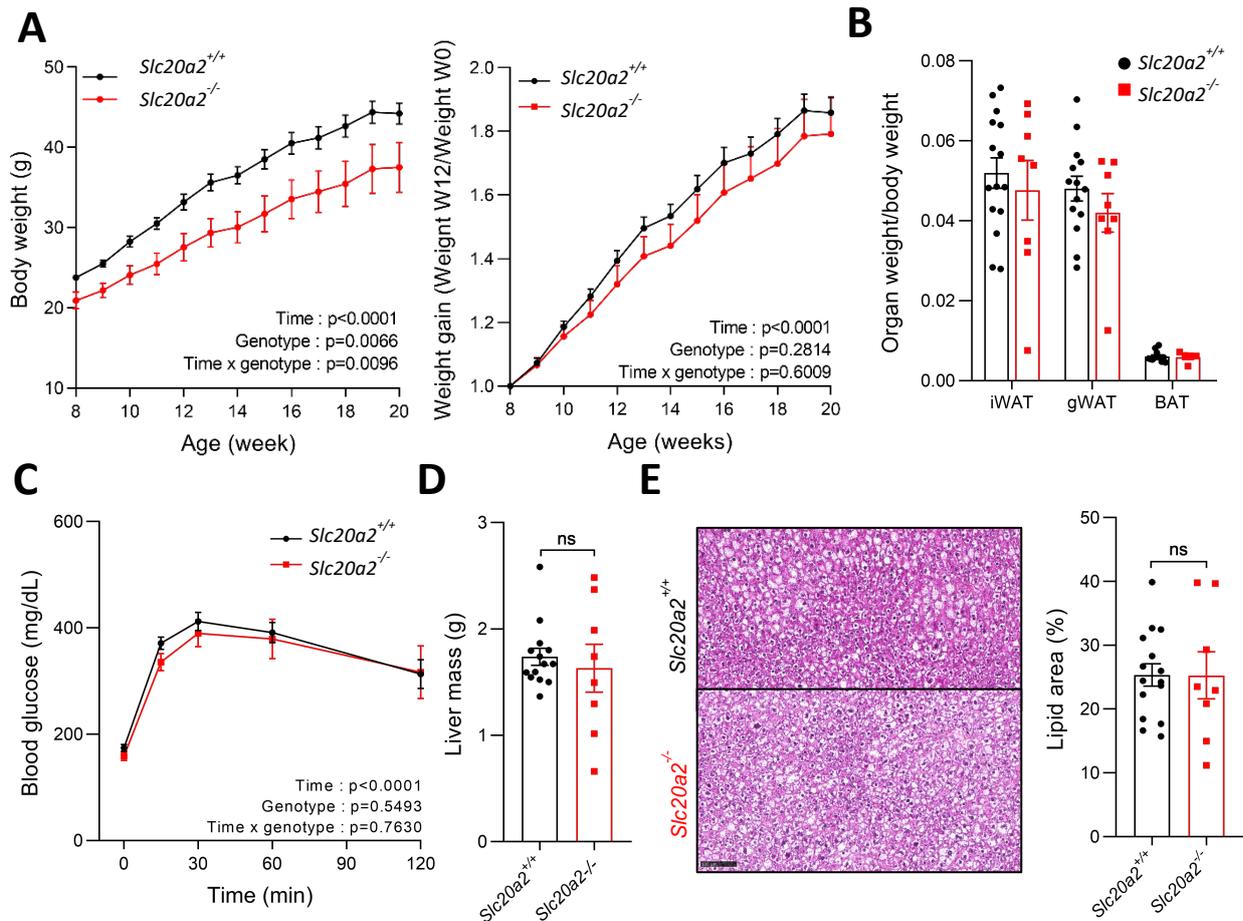


Figure 32 : La résistance à l'obésité est dépendante de la thermogenèse. **A**. Prise de masse corporelle et prise de masse corporelle relative au premier jour de régime des souris $Slc20a2^{+/+}$ ($n=15$) et $Slc20a2^{-/-}$ ($n=9$) hébergés à thermoneutralité ($30C^\circ$). **B**. Masse des organes relatifs à la masse totale des souris $Slc20a2^{+/+}$ and $Slc20a2^{-/-}$ hébergés à thermoneutralité ($30C^\circ$). **C**. La glycémie a été mesurée à $t=0min$, $t=15min$, $t=30min$, $t=60min$ et $t=120min$ après injection de glucose ($2g/kg$) chez des souris $Slc20a2^{+/+}$ ($n=15$) et $Slc20a2^{-/-}$ ($n=9$) après 12 semaines de régime à thermoneutralité. **D**. Masse des foies de souris $Slc20a2^{+/+}$ and $Slc20a2^{-/-}$ après 12 semaines de régime à thermoneutralité. **E**. Image représentatives de section de foie colorées HES de souris $Slc20a2^{+/+}$ et $Slc20a2^{-/-}$ après 12 semaines de régime est montré sur le panel de gauche et l'aire lipidique (%) des foies associés est montrée sur le panel de droite. Toutes les analyses montrent la moyenne \pm SEM. Analyses statistiques : ANOVA à voies (A, et C), test Mann-Whitney (D) et t-test (E). ns= non significatif.

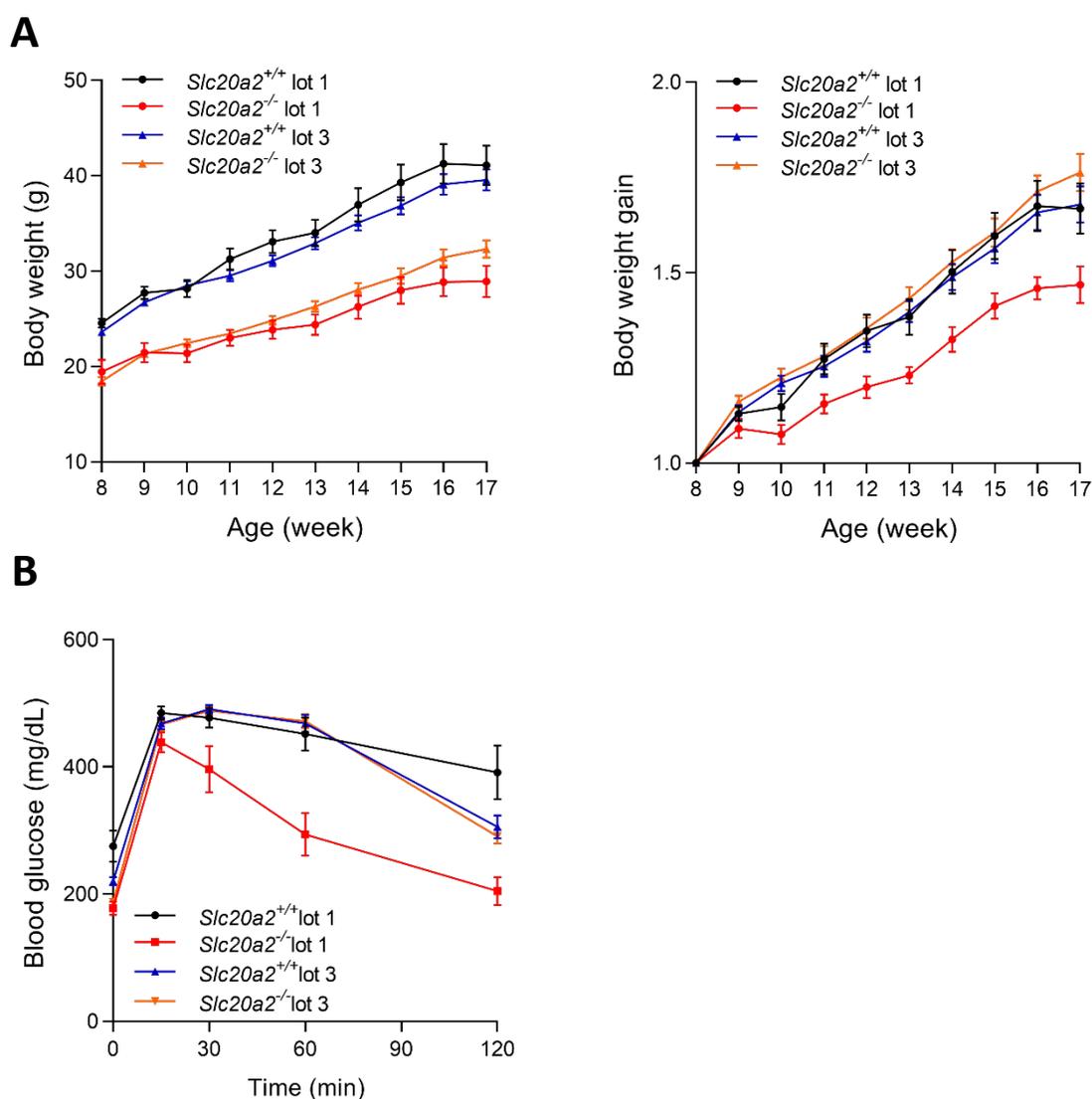


Figure 33 : Analyse du lot 3 de souris soumises à un régime riche en gras. A. Prise de masse corporelle et prise de masse corporelle relative au premier jour de régime riche en gras des souris *Slc20a2*^{+/+} lot 2024 (n=15) ; *Slc20a2*^{-/-} lot 2024 (n=19) ; *Slc20a2*^{+/+} lot 2021 (n=9) et *Slc20a2*^{-/-} lot 2021 (n=7). **B.** La glycémie a été mesurée à t=0min, t=15min, t=30min, t=60min et t=120min après injection de glucose (2g/kg) chez des souris *Slc20a2*^{+/+} (n=15) et *Slc20a2*^{-/-} (n=19) après 8 semaines de régime riche en gras. Toutes les analyses montrent la moyenne ± SEM. Analyses statistiques : ANOVA à 3 voies.

Conclusion

La différence de réponse au régime riche en gras entre les lots n°1 et n°3 ne nous permet pas de conclure sur le rôle de PiT2 dans un modèle d'obésité. Nous avons vérifié plusieurs paramètres qui auraient pu expliquer ces résultats divergents :

- Température ambiante : La température de la pièce d'hébergement a été contrôlée et vérifiée entre 2021 et 2024 et nous n'avons pas observé de différence pendant cette période de 3 ans excluant l'hypothèse que la température de la pièce d'hébergement ait eu un impact sur le phénotype de nos souris sous régime riche en gras.
- Dérive génétique : Les souris *Slc20a2*^{+/-} sont élevées dans notre animalerie depuis 2012. Le fond génétique d'origine est C57Bl/6N et une réinjection de ce fond génétique a été réalisée plusieurs fois pour éviter la dérive génétique. De plus, le phénotype à température ambiante en régime standard (diminution de la masse grasse, augmentation de l'activité du BAT et de la lipolyse) est toujours observé entre 2021 et 2024. Ces données ne sont pas en faveur d'une dérive génétique de des souris *Slc20a2*^{+/-}.
- Grande variabilité inter-individuelle et nombre de souris par groupe insuffisant ? L'effet bénéfique de l'absence de PiT2 sur l'augmentation du poids corporel, la stéatose hépatique et la tolérance au glucose n'est plus visible du fait de l'augmentation du nombre de souris pour cette étude. En effet, le lot 1 (n=9, *Slc20a2*^{+/+} HFD ; n=7, *Slc20a2*^{-/-} HFD) comportait moins d'animaux que le lot 3 (n=15, *Slc20a2*^{+/+} HFD ; n=19, *Slc20a2*^{-/-} HFD). Cependant, l'analyse de la prise de poids en fonction du temps (Figure 32A) indique que les réponses des souris du lot 1 et du lot 3 sont vraiment différentes.
- Stress : Trois années se sont passées entre les analyses du lot 1 et celles du lot 3. Sur ce temps long, l'équipe animalière a connu un renouvellement important. Ce turn-over a entraîné une période d'adaptation pendant laquelle les nouveaux animaliers étaient formés à la manipulation des rongeurs. Ces changements ont pu générer un stress accru chez les souris lors des changes et impacté nos résultats

(Jene *et al.*, 2021). En effet, il est connu que le stress a une influence sur la prise alimentaire et le métabolisme énergétique.

II. Identification des mécanismes d'action de PiT2 dans la régulation du métabolisme énergétique

Nous avons montré que les souris *Slc20a2*^{-/-} présentent une diminution de la masse des tissus adipeux, une augmentation de la dépense énergétique et de l'activité du tissu adipeux brun mais l'origine de ce phénotype reste encore inconnue. Nos hypothèses sont les suivantes :

1. Le phénotype est d'origine développementale/systémique (voir page 68)
2. Le phénotype est la conséquence de la perte de PiT2 dans les tissus adipeux
3. Le phénotype est la conséquence de la perte de PiT2 dans l'hypothalamus

1. Effet de l'absence de PiT2 spécifiquement dans les adipocytes

Contexte

Dans le but de comprendre l'origine du phénotype des souris *Slc20a2*^{-/-}, nous avons investigué le rôle de PiT2 spécifiquement dans les tissus adipeux.

Matériels et méthodes

Nous avons généré un modèle de souris spécifiquement invalidées dans les adipocytes (*Slc20a2*^{AdKO}) en croisant les souris *Slc20a2*^{lox/lox} et les souris exprimant la recombinaison CRE sous le contrôle du promoteur de l'adiponectine (Eguchi *et al.*, 2011). Nous avons suivi ces souris soumises à un régime standard (NCD) ou un régime riche en gras (HFD). La masse des organes (iWAT, gWAT, BAT et foie) a été mesurée. L'analyse de l'expression de PiT2 et de PiT1 a été effectuée par RT-qPCR.

Résultats

Nous avons tout d'abord vérifié l'invalidation de PiT2 dans les tissus adipeux. Nous montrons une diminution de 70% de l'expression de *Slc20a2* dans le iWAT et le BAT des *Slc20a2*^{AdKO} âgées de 16 semaines par rapport aux souris contrôles (Figure 34A).

Les souris contrôles et *Slc20a2*^{AdKO} ont une prise de masse corporelle similaire en condition standard et d'obésité induite (Figure 34B). La masse des organes (iWAT, gWAT, BAT et foie) ne diffère pas entre les groupes (Figure 34C). Nous avons émis l'hypothèse que PiT1 pouvait compenser la perte de PiT2 dans les adipocytes, nous avons donc analysé l'expression de *Slc20a1* dans notre modèle. De manière intéressante, l'expression génique de *Slc20a1* est significativement (x1,62) augmentée dans le iWAT des souris *Slc20a2*^{AdKO} (Figure 34D).

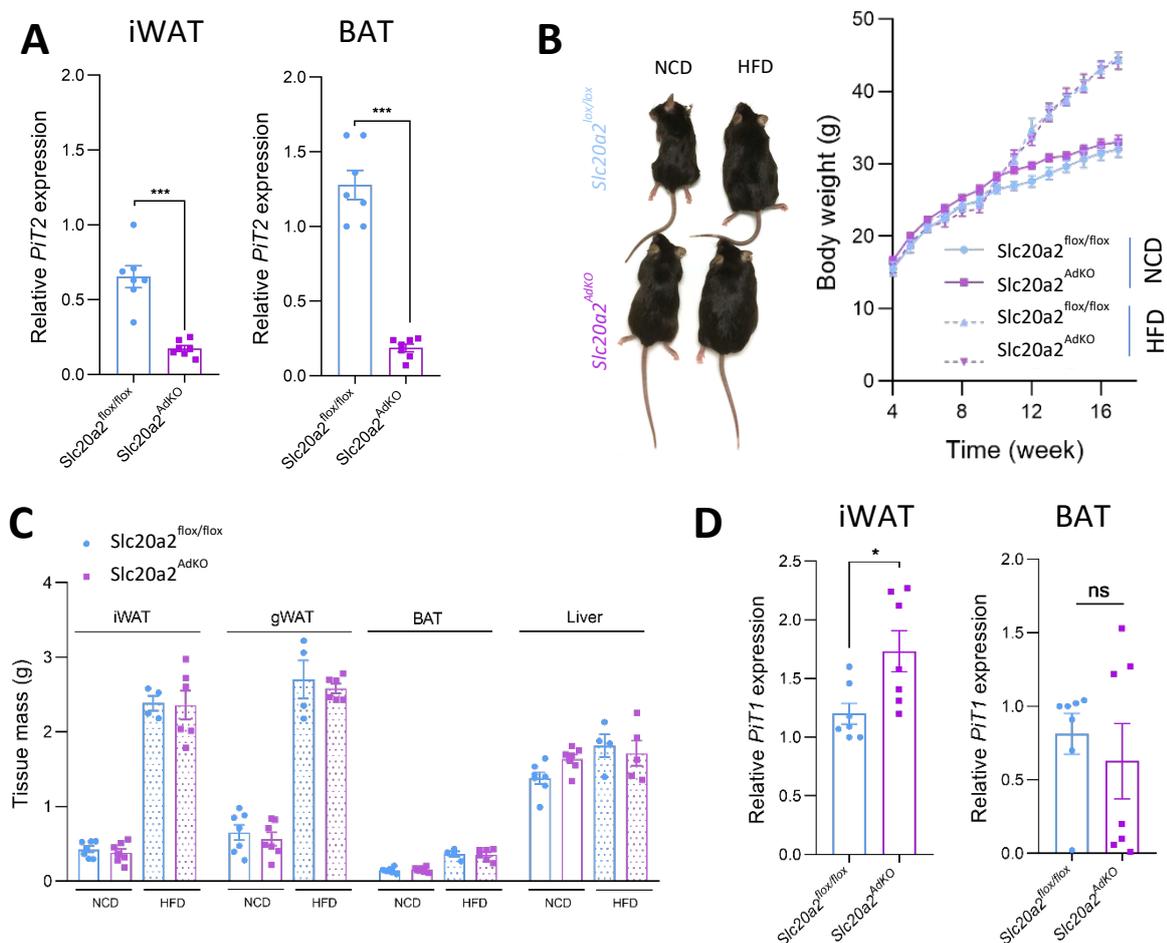


Figure 34 : Effet de l'absence de PiT2 spécifiquement dans les adipocytes. A. Expression relative de *Slc20a2*/*PiT2* dans le tissu adipeux blanc inguinal (iWAT) et tissu adipeux brun (BAT) en régime standard. **B.** Images représentatives des souris *Slc20a2*^{AdKO} et *Slc20a2*^{lox/lox} à la fin du protocole de régime standard (NCD) ou riche en gras (HFD) sur le panel de gauche. Suivi de la masse corporelle des souris *Slc20a2*^{AdKO} et *Slc20a2*^{lox/lox} pendant 8 semaines. **C.** Masses des tissus adipeux blancs inguinal (iWAT) et gonadique (gWAT), du tissu adipeux brun et du foie

des souris à la fin du protocole. **D.** Expression relative de *Slc20a1*/PiT1 dans le tissu adipeux blanc inguinal (iWAT) et tissu adipeux brun (BAT) en régime standard. Toutes les analyses montrent la moyenne \pm SEM. Analyses statistiques : Mann-Whitney (A).

Conclusion

Les souris *Slc20a2^{AdKO}* ne récapitulent pas le phénotype métabolique des souris *Slc20a2^{-/-}*. Une question qui se pose est le rôle du paralogue PiT1 dans ce résultat. En effet, chez les souris *Slc20a2^{-/-}*, les niveaux d'expression de PiT1 restent inchangés dans la BAT, l'iWAT ou le foie des souris *Slc20a2^{-/-}* adultes (non montré), et le phénotype observé ne peut donc pas être attribué à un rôle de PiT1. En revanche, chez les souris *Slc20a2^{AdKO}*, on observe une augmentation significative de l'expression de *Slc20a1* dans l'iWAT, ce qui soulève des questions sur la possibilité d'une compensation fonctionnelle de PiT2 par PiT1. Ces résultats restent à approfondir, mais cette hypothèse est intéressante puisque la délétion spécifique de *Slc20a1* dans les adipocytes est associée à une augmentation d'un facteur 1,8 de l'expression de *Slc20a2*, qui ne conduit pas non plus à une réduction de la masse grasse chez la souris (données personnelles de Nicolas Venteclef). Ces observations soulèvent la possibilité que le phénotype métabolique visible chez les souris *Slc20a2^{-/-}* ne puisse être récapitulé que lorsque les deux protéines PiT sont invalidées dans les adipocytes, ou que, alternativement, d'autres types de cellules que les adipocytes soient impliqués.

2. Rôle de PiT2 spécifiquement dans l'hypothalamus

Contexte

Le système nerveux central et notamment l'hypothalamus est le chef d'orchestre du métabolisme énergétique. Il intègre les changements métaboliques et envoie une réponse adaptée aux organes métaboliques comme les tissus adipeux (Figure 18). Nous savons également que PiT2 est exprimé dans l'hypothalamus et pourrait y jouer un rôle (Figure 35). De ce fait, nous avons émis l'hypothèse que la perte de PiT2 dans l'hypothalamus puisse être la cause de ce phénotype.

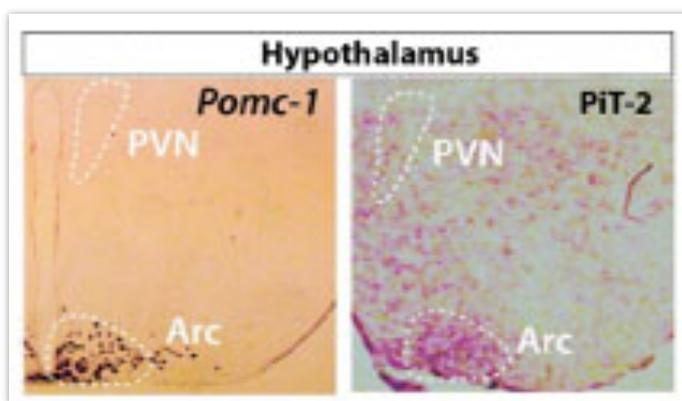


Figure 35 : Expression de PiT2 dans l'hypothalamus. Hybridation in situ de *Slc202/PiT2* dans la région Arcuée (Arc) de l'hypothalamus (*Pomc-1* comme marqueur moléculaire de l'Arc). Donnée obtenue dans le laboratoire de Franck OURY.

Nous avons donc initié une collaboration avec le laboratoire de Franck OURY et la plateforme de neuro-comportement dirigée par Stéphanie MORICEAU (SFR Necker) qui a effectué les injections stéréotaxiques d'un AAV-ShPiT2 dans l'hypothalamus.

Matériels et méthodes

L'invalidation de PiT2 spécifiquement dans l'hypothalamus a été réalisée par l'injection d'AAV-shPiT2 par stéréotaxie. Les souris contrôles ont reçues une injection par stéréotaxie d'AAV-shScramble. Trois semaines après injection, les souris ont été placées en cages métaboliques afin d'analyser leur dépense énergétique. Cinq semaines après injection, les souris ont été euthanasiées et l'invalidation de PiT2 dans l'hypothalamus a été vérifiée par RT-qPCR.

Résultats

A ce jour, l'inactivation de PiT2 dans l'hypothalamus a été validée et montre une diminution de l'expression de 35% (Figure 36).

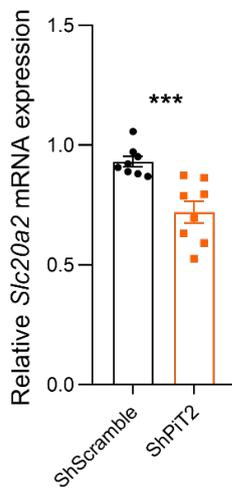


Figure 36 : Validation de l'inactivation de Slc20a2 dans l'hypothalamus. Expression relative de Slc20a2/PiT2 dans l'hypothalamus. Analyses statistiques : Mann-Whitney.

Conclusion

Nous avons validé notre modèle d'inactivation de PiT2 dans l'hypothalamus. Malheureusement, les lots suivants ont montré des problèmes d'injection ainsi que du stress et de l'anxiété en cage métabolique rendant nos résultats inexploitable. D'autres lots d'animaux vont être générés afin de répondre à la question du rôle de PiT2 dans l'hypothalamus.

III. Régulation des volumes osseux et adipeux des souris *Slc20a2*^{-/-} en conditions pathologiques

Au cours de mon travail de thèse, nous avons soumis nos souris *Slc20a2*^{-/-} à différentes conditions pathologiques. Pour aider à l'interprétation des résultats que nous avons obtenus, le tableau III indique comment sont régulés les volumes de tissus osseux et adipeux chez les souris contrôles en fonction de ces différentes conditions.

Tableau III : Tableau récapitulatif des variations des tissus adipeux périphériques et des volumes osseux et adipeux lors du vieillissement, de l'obésité, de la restriction calorique et de l'ostéoporose.

Conditions/pathologies	Vieillessement	Obésité	Restriction calorique	Ostéoporose
TA périphériques	↗ (1)	↗ (4)	↘ (8)	↗ (13)
Volume osseux	↘ (2, 3)	↘ (5, 6, 7)	↘ (épaisseur corticale seulement) (9, 10, 11)	↘ (14)
Volume BMAT	↗ (1, 3)	↗ (6, 7)	↗ (10, 12)	↗ (15)

1. (JafariNasabian *et al.*, 2017)
2. (Di Iorgi *et al.*, 2010)
3. (Wren *et al.*, 2011)
4. (Goossens, 2017)
5. (Doucette *et al.*, 2015)
6. (Tencerova *et al.*, 2018)
7. (Scheller *et al.*, 2016)
8. (Bertrand *et al.*, 1980)
9. (Bredella *et al.*, 2009)
10. (Devlin *et al.*, 2010)
11. (Hamrick *et al.*, 2008)
12. (Cawthorn *et al.*, 2014)
13. (Gavin *et al.*, 2018)
14. (Li *et al.*, 2020)
15. (Armas and Recker, 2012)

1. Effet de l'absence de PiT2 lors de déséquilibre de la balance énergétique

A. Effet de l'absence de PiT2 dans un modèle d'obésité induite

Contexte

L'obésité est également un contexte de perte osseuse et d'augmentation du volume de BMAT en plus de l'augmentation de la masse des tissus adipeux périphériques (Rendina-Ruedy *et al.*, 2015; Scheller *et al.*, 2016; Tencerova *et al.*, 2018). Par conséquent, nous avons profité du modèle d'obésité induite décrit précédemment pour analyser les effets de la perte de PiT2 dans ce contexte sur le volume des tissus osseux et adipeux intra-médullaire.

Matériels et méthodes

Les souris utilisées pour analyser ces paramètres sont les souris du lot 1 de régime riche en gras. Les souris mâles *Slc20a2*^{-/-} et contrôles ont été soumises à un régime standard (NCD, pour « Normal Chow Diet ») ou riche en gras (HFD, pour « High Fat Diet ») à l'âge de 8 semaines pendant 14 semaines à température ambiante. Les tibias ont été prélevés afin d'évaluer le volume de BMAT et de tissu osseux par microtomographie grâce à l'utilisation de l'agent de contraste, polyoxomélatate, comme utilisé dans l'article de Giulia FRANGI (Kerckhofs *et al.*, 2018; Frangi *et al.*, 2022).

Résultats

Contrairement aux résultats publiés par Tencerova et al et Scheller et al (Scheller *et al.*, 2016; Tencerova *et al.*, 2018), nous n'observons pas d'effet du régime HFD sur le volume osseux des souris contrôles. Chez les souris *Slc20a2*^{-/-} soumises à un régime riche en gras, le volume osseux trabéculaire ainsi que l'épaisseur de l'os cortical tendent à diminuer par rapport au souris *Slc20a2*^{-/-} en régime standard (Figure 37A-B), suggérant que les souris *Slc20a2*^{-/-} sont plus sensible à la perte osseuse que les souris contrôles. Concernant l'adiposité médullaire, comme attendu (Tableau III), nous observons une forte augmentation du volume de BMAT chez les souris contrôles

soumises à un régime riche en gras. Nous confirmons également la diminution du volume de BMAT chez les souris *Slc20a2*^{-/-} par rapport aux souris contrôles en régime standard (Figure 37C et (Frangi *et al.*, 2022). De manière intéressante, alors que les souris *Slc20a2*^{-/-} du lot 1 sont résistantes à la prise de masse corporelle et à la stéatose hépatique (Figure 31), le volume de BMAT est augmenté par rapport à un régime standard (Figure 37), suggérant que le pool de cellules progénitrices adipocytaires est mobilisable en absence de PiT2.

Conclusion

L'invalidation de PiT2 dans un modèle d'obésité induite par un régime riche en gras ne prévient pas de la perte osseuse ni de l'augmentation du volume de BMAT.

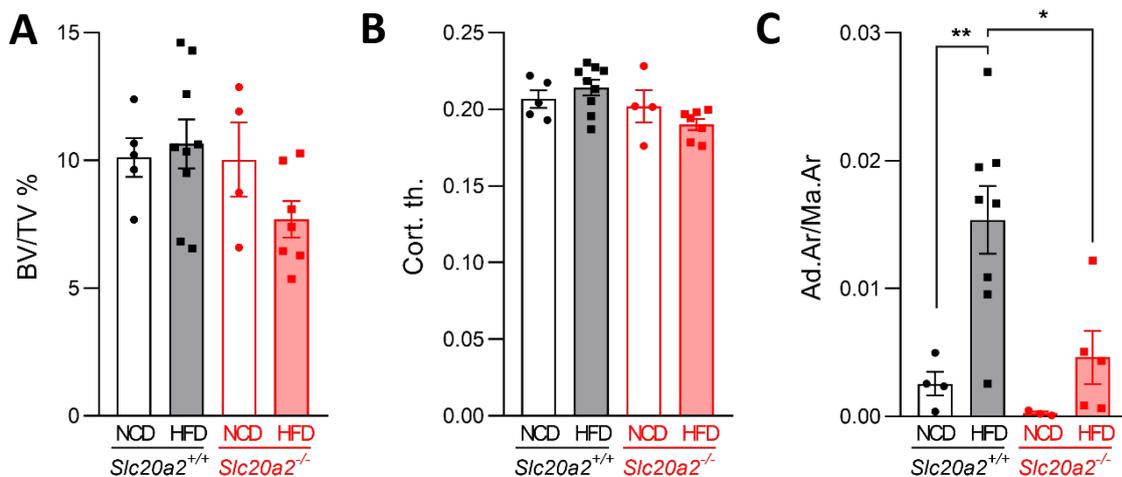


Figure 37 : Effet de l'absence de PiT2 sur les volumes osseux et adipeux dans un modèle d'obésité chez des souris mâles âgées de 22 semaines. **A.** Le volume osseux a été mesuré en pourcentage par rapport au volume total de l'os. **B.** L'épaisseur de l'os cortical a été mesurée. Schéma expérimental du modèle de restriction calorique. **C.** Le volume d'adiposité médullaire a été mesuré par rapport au volume de la moelle osseuse totale. Toutes les analyses montrent la moyenne \pm SEM. Analyses statistiques : ANOVA à 2 voies (C).

B. Effet de l'absence de PiT2 dans un modèle de restriction calorique

Contexte

Le volume de BMAT et les masses des tissus adipeux blancs périphériques sont diminués chez les souris *Slc20a2*^{-/-} adultes (Frangi et al., 2022 Guicheteau et al., 2024). Dans le modèle de restriction calorique, la régulation des volumes de tissus adipeux intra- et extra-médullaires est opposée : le volume de BMAT augmente alors que la masse grasse périphérique diminue. Nous avons donc analysé les effets de la perte de PiT2 sur les variations de ces deux types de tissus adipeux dans ce contexte.

Matériels et méthodes

Les souris contrôles et *Slc20a2*^{-/-} ont été placées dans des cages individuelles et soumises à un régime contrôle (AIN-93M, Research Diets D10012M) à l'âge de 6 semaines pendant 3 semaines afin de mesurer leur prise alimentaire et d'estimer la quantité de nourriture à donner pour obtenir 30% de restriction calorique. Après cette première phase, une partie des souris a été soumise à un régime de restriction calorique (Research Diets, 30% calorie-restricted, D0611231) pendant 6 semaines. La nourriture a été distribuée une seule fois dans la journée tous les matins à 8h. A la fin du protocole, des tests de tolérance au glucose et à l'insuline ont été effectués (Figure 38A). La masse grasse a été pesée et les tibias prélevés afin d'évaluer le volume de BMAT et de tissu osseux par microtomographie grâce à l'utilisation de l'agent de contraste, polyoxomélate, comme utilisé dans l'article de Giulia FRANGI (Kerckhofs et al., 2018; Frangi et al., 2022).

Résultats

Les souris sous restriction calorique présentent une perte de masse corporelle dès la deuxième semaine sous régime CR et stabilisent leur masse corporelle à partir de la troisième semaine (Figure 38B). Comme attendu, les souris *Slc20a2*^{+/+} contrôles présentent une amélioration de la tolérance au glucose et à l'insuline sous régime CR par rapport au régime contrôle (Figure 38C-E). En régime contrôle, les souris *Slc20a2*^{-/-}

présentent une amélioration de la tolérance au glucose et à l'insuline par rapport aux souris *Slc20a2^{+/+}* (Figure 38C-E). Ces résultats diffèrent de ceux obtenus chez les femelles *Slc20a2^{-/-}* en régime standard *ab libitum* (Guicheteau *et al.*, Figure S2). Ceci peut être expliqué par le protocole de CR où les croquettes contrôles ne sont pas les mêmes que celles disponibles à l'animalerie. Il est intéressant de noter que le fait de donner la nourriture une seule fois par jour (le matin), que ce soit pour le régime contrôle ou le régime CR, prolonge la condition de jeûne entre les repas (Pak *et al.*, 2021). Or, la mise à jeun, indépendamment de la restriction calorique, a un effet bénéfique sur la tolérance à l'insuline. Ces résultats suggèrent que les souris *Slc20a2^{-/-}* sont plus sensibles aux effets métaboliques de la mise à jeun (amélioration de la tolérance et de la sensibilité à l'insuline mesurée par l'indice HOMA-IR). Enfin, il est intéressant de noter, que la restriction calorique chez les souris *Slc20a2^{-/-}* n'améliore pas d'avantage leur tolérance au glucose et à l'insuline (Figure 38C-E).

L'analyse des effets de la restriction calorique sur les tissus adipeux périphériques montre que le régime CR diminue les masses du iWAT et du gWAT, aussi bien chez les souris contrôles et que chez les souris *Slc20a2^{-/-}* (Figure 38F).

Concernant le tissu osseux, nous confirmons les études précédentes montrant que l'épaisseur de l'os cortical et le volume d'os trabéculaire sont diminués chez les souris *Slc20a2^{-/-}* par rapport aux souris contrôles sous régime contrôle (Figure 38G-H et Yamada *et al.*, 2018; Beck-Cormier *et al.*, 2019). De manière inattendue, nos résultats ne montrent pas d'effet de la restriction calorique sur l'épaisseur corticale des tibias des souris *Slc20a2^{+/+}* (Figure 38H). Par contre, chez les souris *Slc20a2^{-/-}*, nous montrons une tendance à la diminution de l'épaisseur corticale (Figure 38H) sous régime CR par rapport au régime contrôle, suggérant là encore que les souris *Slc20a2^{-/-}* sont plus sensible à la perte osseuse que les souris contrôles.

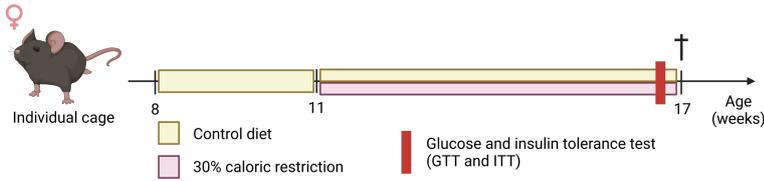
Enfin, la restriction calorique augmente de manière significative le volume du BMAT chez les souris contrôles (Figure 38I). Cette augmentation est également observée chez les souris *Slc20a2^{-/-}*, suggérant là encore que le pool de progéniteurs

adipocytaires est mobilisable en absence de PiT2. Cependant, contrairement aux travaux du groupe du docteur Will CAWTHORN, (Cawthorn *et al.*, 2014), cette augmentation ne modifie pas la concentration sérique d'adiponectine (Figure 38J).

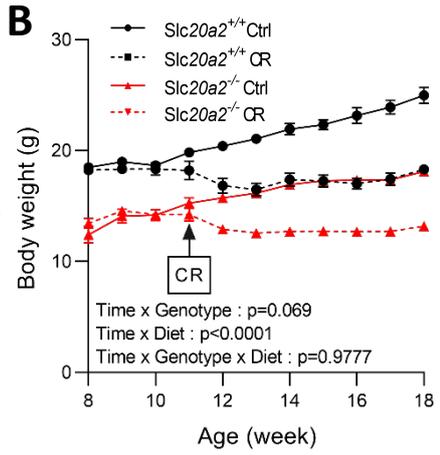
Conclusion

Dans cette étude, nous montrons que la délétion de PiT2 n'empêche pas de l'augmentation du volume de BMAT et de la diminution de la masse grasse périphérique dans un modèle de restriction calorique. De plus, la régulation des tissus adipeux intra- et extra-médullaires ne diffère pas entre les génotypes soumis à la restriction calorique indiquant que les souris *Slc20a2*^{-/-} sont capables de réguler ces tissus de la même manière que les souris *Slc20a2*^{+/+} dans cette condition. De manière intéressante, nous montrons que les souris *Slc20a2*^{-/-} en régime contrôle se comportent comme les souris sous restriction calorique en ce qui concerne leur métabolisme glucidique. L'effet de la restriction calorique sur l'amélioration de la sensibilité à l'insuline est dépendante de la mise à jeun (Pak *et al.*, 2021) suggérant que les souris *Slc20a2*^{-/-} présentent un phénotype métabolique similaire à une situation de jeun.

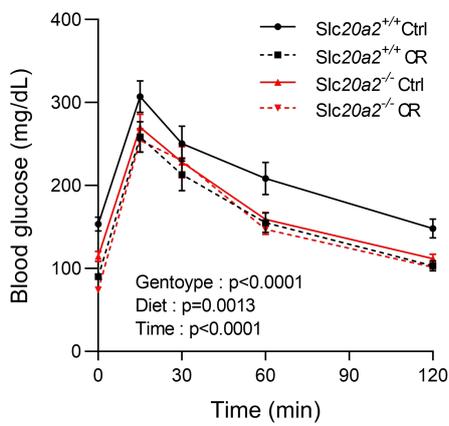
A



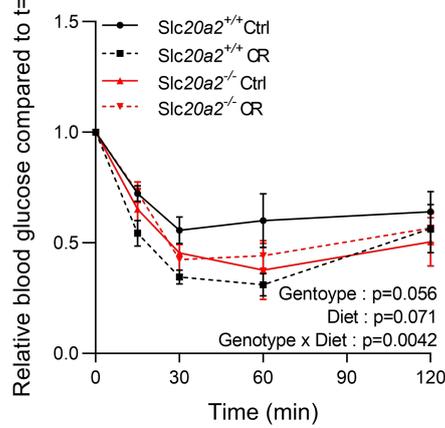
B



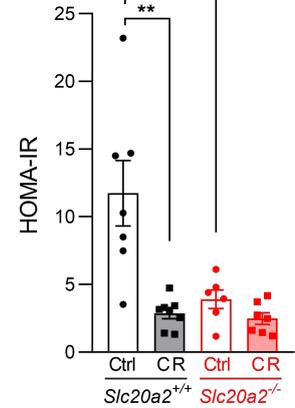
C



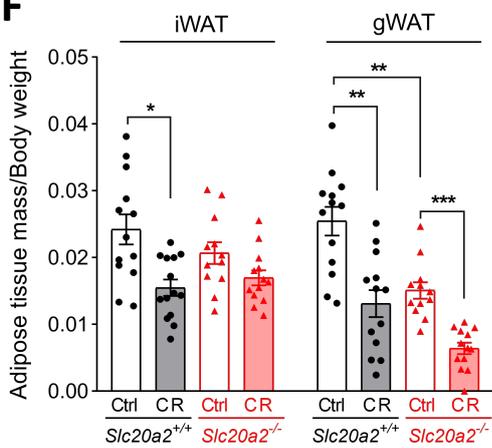
D



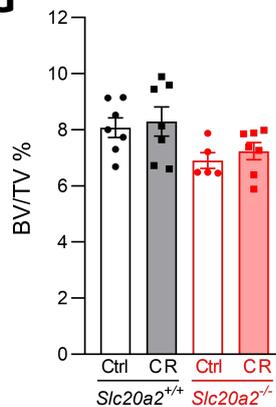
E



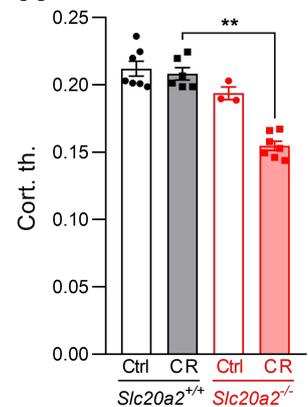
F



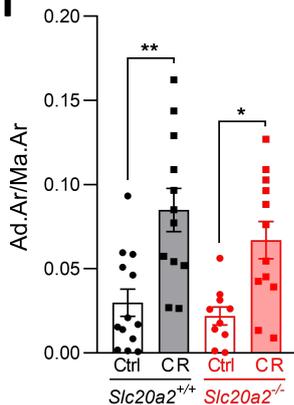
G



H



I



J

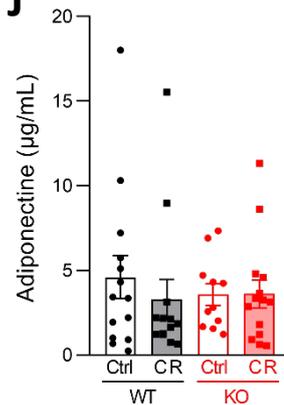


Figure 38 : Effet de l'absence de PiT2 dans un modèle de restriction calorique chez des souris femelles. **A.** Schéma expérimental du modèle de restriction calorique. **B.** Suivi de la masse corporelle des souris pendant 10 semaines. **C.** Le volume osseux a été mesuré en pourcentage par rapport au volume total de l'os. **D.** L'épaisseur de l'os cortical a été mesurée. **E.** Le volume d'adiposité médullaire a été mesuré par rapport au volume de la moelle osseuse totale. **F-G.** La glycémie à jeun (6h) et la glycémie à t=15min, t=30min, t=60min et t=120min ont été mesurées après l'injection de glucose (2g/kg) (**F**) et d'insuline (0,75U/kg) (**G**) sur des souris femelles *Slc20a2^{+/+}* et *Slc20a2^{-/-}* sous régime standard et de restriction calorique. **H.** HOMA-IR calculé à partir des taux de glucose et d'insuline à jeun (6 heures) chez les souris femelles *Slc20a2^{+/+}* et *Slc20a2^{-/-}* sous régime contrôles et de restriction calorique. **I.** Masses des tissus adipeux inguinal (iWAT) et gonadique (gWAT) des souris à la fin du protocole. **J.** Dosage sérique de la leptine. Toutes les analyses montrent la moyenne \pm SEM. Analyses statistiques : ANOVA à 3 voies (B, C et D) et ANVOA à 2 voies (E, F, G, H et I).

2. Effet de l'absence de PiT2 dans un modèle d'ostéopénie induite par ovariectomie

Le modèle d'ostéoporose que nous avons utilisé est le modèle de perte osseuse induite par ovariectomie (OVX). Les résultats montrant les effets de l'OVX sur le volume osseux et le volume de BMAT chez la souris *Slc20a2*^{-/-} ont été publiés dans un article dont je suis la deuxième autrice (Frangi *et al.*, 2022).

Contexte

Les souris invalidées pour PiT2 montrent un phénotype squelettique caractérisé par une diminution de la solidité et la qualité osseuse (Yamada *et al.*, 2018; Beck-Cormier *et al.*, 2019). De manière intéressante, ce phénotype ne provient pas d'une altération de l'activité des cellules formant l'os (ostéoblastes) et résorbant l'os (ostéoclastes). Le groupe de recherche dans lequel j'effectue ma thèse a émis l'hypothèse que ce phénotype était la conséquence de la perte de PiT2 dans un autre tissu en lien étroit avec le tissu osseux. Nous avons donc investigué le rôle de PiT2 dans les adipocytes de la moelle osseuse dans un contexte physiologique et dans un contexte pathologique d'ostéoporose post-ménopausique. Mon rôle dans ce travail a été d'analyser les volumes osseux et adipeux intra- et extra-médullaires dans ce contexte pathologique.

Matériels et méthodes

Les volumes osseux et d'adiposité médullaire ont été évalués par microtomographie après imprégnation d'un agent de contraste, le polyoxomélate, des tibias des souris invalidées pour PiT2 (*Slc20a2*^{-/-}) en conditions physiologiques et dans un modèle de perte osseuse induite par ovariectomie (OVX) (Kerckhofs *et al.*, 2018). L'ovariectomie a été réalisée sous anesthésie à l'isoflurane chez des souris femelles *Slc20a2*^{+/+} et *Slc20a2*^{-/-} âgées de 13 semaines puis ont été euthanasiées 5 semaines plus tard. La masse corporelle a été suivie pendant le protocole et la masse des tissus adipeux (iWAT et gWAT) a été mesurée à la fin du protocole.

Résultats

Chez les souris *Slc20a2*^{-/-} adultes, le volume de BMAT est diminué par rapport à celui mesuré chez les souris contrôles (Figure 1 de Frangi *et al.*, 2022). Après ovariectomie, le volume osseux trabéculaire tend à diminuer chez les souris contrôles et est significativement diminué chez les souris *Slc20a2*^{-/-} (Figure 3 de Frangi *et al.*, 2022). De plus, l'épaisseur de l'os corticale du tibia des souris contrôles et *Slc20a2*^{-/-} est diminué d'environ 15% (Figure 3A, Frangi *et al.*, 2022). Enfin, l'OVX augmente d'un facteur 3 le volume de BMAT chez les souris contrôles et les souris *Slc20a2*^{-/-} (Figure 3B, Frangi *et al.*, 2022). Ainsi, nous montrons que la délétion de Pit2 n'empêche pas l'augmentation du volume d'adiposité médullaire et de la perte osseuse dans un modèle d'ostéoporose.

La déficience en estrogènes induite par l'ovariectomie a pour conséquence l'augmentation de la masse grasse périphérique (Kuryłowicz, 2023). Le suivi de la masse corporelle des souris pendant le protocole montre une diminution de la prise de masse corporelle attendue après la chirurgie puis une augmentation de la prise de masse corporelle (Figure 39A). A la fin du protocole d'ovariectomie, les masses des tissus adipeux blancs inguinal (iWAT) et gonadique (gWAT) ont été mesurées et rapportées à la masse corporelle totale de la souris. De manière intéressante, alors que chez les souris contrôles (*Slc20a2*^{+/+}), la masse des tissus adipeux (iWAT et gWAT) a tendance à augmenter après ovariectomie (OVX), la masse des tissus adipeux iWAT et gWAT chez les souris *Slc20a2*^{-/-} n'augmente pas après ovariectomie (Figure 39B).

Conclusion

Nous avons montré que la délétion de Pit2 inhibe l'augmentation du BMAT avec l'âge mais n'inhibe pas l'augmentation de celui-ci dans un contexte pathologique qu'est l'ostéoporose. Dans la littérature, la perte osseuse est associée à une augmentation de l'activité des ostéoclastes (Föger-Samwald *et al.*, 2020) et à un déséquilibre de la balance de différenciation entre adipocytes et ostéoblastes en

faveur de la différenciation adipocytaire des SSC (Ambrosi *et al.*, 2017). Nos résultats montrent que la perte osseuse est identique chez les souris contrôles et *Slc20a2*^{-/-} indiquant que l'activité des ostéoclastes et la balance de différenciation ne sont pas altérés ce qui confirme nos précédents résultats (Beck-Cormier *et al.*, 2019; Frangi *et al.*, 2022). Enfin, l'ovariectomie n'induit pas d'augmentation de la masse des tissus adipeux périphériques chez les souris *Slc20a2*^{-/-} indiquant que le BMAT et les tissus adipeux périphériques sont régulés différemment dans ce contexte.

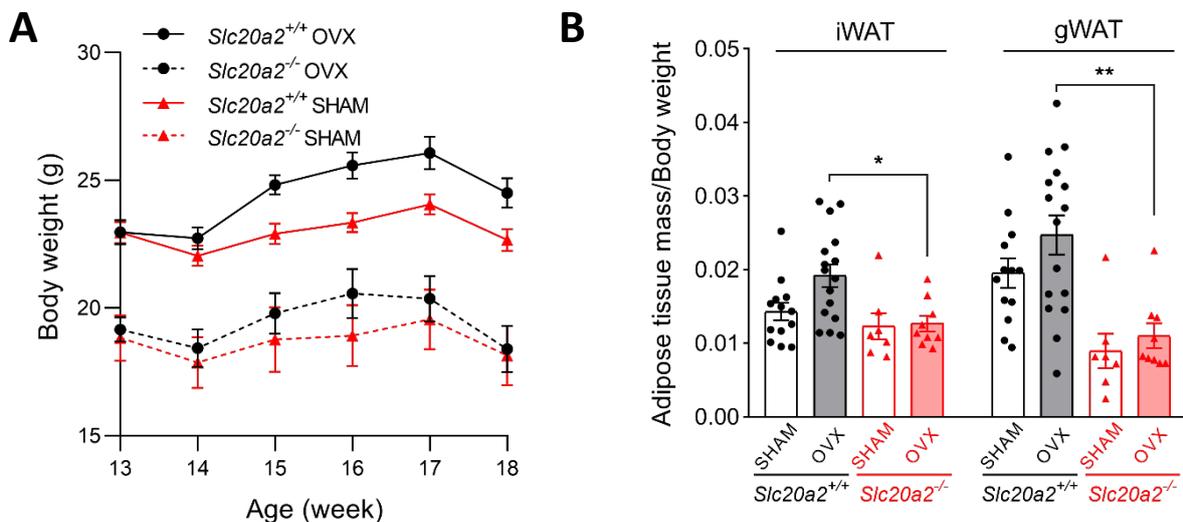
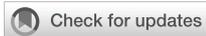


Figure 39 : Effet de l'absence de Pit2 sur les tissus adipeux périphériques dans un modèle d'ostéoporose post-ménauposale. **A**. Prise de masse corporelle des souris *Slc20a2*^{+/+} et *Slc20a2*^{-/-} sous OVX ou SHAM. **B**. Masse des tissus adipeux blancs inguinal (iWAT) et gonadique (gWAT) rapportés à la masse totale de la souris 6 semaines après chirurgie sans ablation des ovaires (SHAM) ou avec ablation des ovaires (OVX). Kruskal-Wallis.



OPEN ACCESS

EDITED BY

Jonathan H Tobias,
University of Bristol, United Kingdom

REVIEWED BY

William Peter Cawthorn,
University of Edinburgh,
United Kingdom
Nicola J Lee,
The University of Sydney, Australia

*CORRESPONDENCE

Sarah Beck-Cormier
sarah.beck@univ-nantes.fr

†PRESENT ADDRESSES

Marie Guicheteau,
Nantes Université, CNRS, INSERM,
l'institut du thorax, Nantes, France
Laurent Beck,
Nantes Université, CNRS, INSERM,
l'institut du thorax, Nantes, France
Sarah Beck-Cormier,
Nantes Université, CNRS, INSERM,
l'institut du thorax, Nantes, France

SPECIALTY SECTION

This article was submitted to
Bone Research,
a section of the journal
Frontiers in Endocrinology

RECEIVED 15 April 2022

ACCEPTED 24 October 2022

PUBLISHED 16 November 2022

CITATION

Frangi G, Guicheteau M, Jacquot F,
Pyka G, Kerckhofs G, Feyeux M,
Veziere J, Guihard P, Halgand B,
Sourice S, Guicheux J, Prieur X, Beck L
and Beck-Cormier S (2022) PiT2
deficiency prevents increase of
bone marrow adipose tissue during
skeletal maturation but not in
OVX-induced osteoporosis.
Front. Endocrinol. 13:921073.
doi: 10.3389/fendo.2022.921073

PiT2 deficiency prevents increase of bone marrow adipose tissue during skeletal maturation but not in OVX-induced osteoporosis

Giulia Frangi¹, Marie Guicheteau^{1†}, Frederic Jacquot², Grzegorz Pyka^{3,4}, Greet Kerckhofs^{3,4,5,6}, Magalie Feyeux⁷, Joëlle Veziere¹, Pierre Guihard¹, Boris Halgand¹, Sophie Sourice¹, Jérôme Guicheux¹, Xavier Prieur⁸, Laurent Beck^{1†} and Sarah Beck-Cormier^{1*†}

¹Nantes Université, Oniris, CHU Nantes, Inserm, Regenerative Medicine and Skeleton, RMeS, UMR 1229, SFR Bonamy, Nantes, France, ²Nantes Université, CHU Nantes, Inserm, CNRS, CRCI2NA, Nantes, France, ³Biomechanics lab, Institute of Mechanics, Materials, and Civil Engineering, UC Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium, ⁴Department of Materials Engineering, KU Leuven, Leuven, Belgium, ⁵IREC, Institute of Experimental and Clinical Research, UC Louvain, Woluwé-Saint-Lambert, Belgium, ⁶Prometheus, Division of Skeletal Tissue Engineering, KU Leuven, Leuven, Belgium, ⁷Nantes Université, CHU Nantes, CNRS, Inserm, BioCore, US16, SFR Bonamy, Nantes, France, ⁸Nantes Université, CNRS, Inserm, l'Institut du Thorax, Nantes, France

The common cellular origin between bone marrow adipocytes (BMADs) and osteoblasts contributes to the intimate link between bone marrow adipose tissue (BMAT) and skeletal health. An imbalance between the differentiation ability of BMSCs towards one of the two lineages occurs in conditions like aging or osteoporosis, where bone mass is decreased. Recently, we showed that the sodium-phosphate co-transporter PiT2/SLC20A2 is an important determinant for bone mineralization, strength and quality. Since bone mass is reduced in homozygous mutant mice, we investigated in this study whether the BMAT was also affected in *PiT2*^{-/-} mice by assessing the effect of the absence of PiT2 on BMAT volume between 3 and 16 weeks, as well as in an ovariectomy-induced bone loss model. Here we show that the absence of PiT2 in juveniles leads to an increase in the BMAT that does not originate from an increased adipogenic differentiation of bone marrow stromal cells. We show that although *PiT2*^{-/-} mice have higher BMAT volume than control *PiT2*^{+/+} mice at 3 weeks of age, BMAT volume do not increase from 3 to 16 weeks of age, leading to a lower BMAT volume in 16-week-old *PiT2*^{-/-} compared to *PiT2*^{+/+} mice. In contrast, the absence of PiT2 does not prevent the increase in BMAT volume in a model of ovariectomy-induced bone loss. Our data identify *SLC20a2/PiT2* as a novel

gene essential for the maintenance of the BMAd pool in adult mice, involving mechanisms of action that remain to be elucidated, but which appear to be independent of the balance between osteoblastic and adipogenic differentiation of BMSCs.

KEYWORDS

PiT2/Slc20a2, adipocytes, bone, post-menopausal osteoporotic mouse model, marrow

Introduction

Bone marrow adipose tissue (BMAT) is no longer considered a marrow space filler tissue as the increasing number of studies on its function in the past 20 years has highlighted its important roles in skeletal health or energetic metabolism. However, the underlying cellular and molecular mechanisms involved remain to be determined (1–3). In mice, bone marrow adipocytes (BMAds) first develop in the distal tibia at a very early postnatal age and then appear in the proximal tibia at around 3 months of age (3, 4). The volume of BMAT increases with age in humans and mice, turning the bone marrow from “red” to “yellow”. The proximal and distal BMAT are two distinct tissues mainly because the size and the lipidic components of the adipocytes are different, and both are differentially regulated (5). The proximal BMAT is also referred to as regulated BMAT (rBMAT) due to the observation that its volume is regulated by several physiopathological conditions (caloric restriction, cold exposure...), whereas the distal one is referred to as constitutive BMAT (cBMAT) because volume variations of this tissue are less frequently observed.

A growing interest in BMAT and its intimate relationship with skeletal health has emerged in recent years. Inverse correlation between BMAT volume and bone mass has been described in many situations (5) and also in some genetic mouse models (6–11). However, this negative correlation is not always observed and may even be controversial, as in the ovariectomy-induced osteoporosis model (7, 11). In healthy populations, BMAT increases with age both in men and women, with men generally having more BMAT (12, 13), and an inverse correlation between BMAT volume and bone mineral density (BMD) has been described (14–17). Nevertheless, during puberty, the amount of marrow fat is positively associated with total bone mineral content in girls (18) and, although men have more BMAT mass compared to women, they also have more bone mass (19). These observations highlight a complex relationship between BMAT and bone, which probably cannot be described in all circumstances as a simple inverse correlation.

Nonetheless, the relationship between BMAT and bone is based at least on the fact that osteoblasts and BMAds are both

derived from bone marrow stromal cells (BMSCs). The imbalance between the differentiation capacities of BMSCs towards one of the two lineages is at the origin of the increased bone marrow adiposity in conditions like aging, obesity and other pathologies where the bone mass is decreased (11, 20, 21) and a better knowledge of the underlying mechanisms would allow a better understanding of the balancing relationship between bone and BMAT.

PiT2 is a member of the Slc20 family of sodium (Na)-phosphate (Pi) co-transporters, encoded by the *Slc20a2* gene. In the last 10 years, numerous studies have revealed the multifunctionality of PiT1/SLC20A1 and PiT2/SLC20A2 in the regulation of cellular proliferation, differentiation or survival (22–30). In bone, our group and others have shown the involvement of PiT2 in bone quality, mineralization and strength (31, 32). Homozygous mutant mice were shown to exhibit severe reduction of bone mechanical properties (decreased yield load, maximum load, fracture load and stiffness), reduced bone mineral density and reduced bone mass (31, 32). Considering the deleterious effect of PiT2 deficiency in bone, we questioned whether the BMAT could also be affected in PiT2 knockout mice. In addition, we evaluated the effect of the absence of PiT2 on the regulation of bone and BMAT volumes between 3 and 16 weeks and in a model of ovariectomy-induced bone loss.

Materials & methods

Mice

C57BL/6NTac-Slc20a2tm11a (EUCOMM) Wtsi (*Slc20a2*^{+/-}, hereafter named *PiT2*^{+/-}) heterozygous mice were obtained from the European Mouse Mutant Archive (EMMA) and maintained and genotyped at Nantes Université. Experiments on mice were conducted according to the French and European regulations on care and protection of laboratory animals (EC Directive 86/609, French Law 2001-486 issued on June 6, 2001). This study complied with ARRIVE (Animal Research: Reporting of *In Vivo* Experiments) guidelines and was approved by the Animal Care

Committee of Pays de la Loire (APAFIS agreements 02286.02, 14835-2020-05-13 and 22178-2019092614593965 v7). Animal care and maintenance were provided through the Nantes Université accredited animal facility at the “Unité de Thérapeutique Expérimentale” (UTE). Mice were housed under specific pathogen-free conditions in open or individually ventilated cages, with wood shavings for bedding and nesting material, in groups of up to five. The mice had *ad libitum* access to tap water and standard rodent chow (A04-10; SAFE, France). Genotyping was performed by PCR as described (31). Wild-type ($PiT2^{+/+}$) and $PiT2^{-/-}$ littermate mice were analysed at 3 and 16 weeks. Three-week-old mice were used for *in vitro* experiments (adipogenic differentiation, flow cytometry). Ovariectomy (OVX) was performed under isoflurane anesthesia in 13-week-old female $PiT2^{+/+}$ and $PiT2^{-/-}$ littermate mice, which were euthanized 5 weeks later. $PiT2^{+/+}$ and $PiT2^{-/-}$ mice were randomly allocated to two groups: an OVX group and a sham group (mice were similarly incised but the ovaries were not removed). Mice were anesthetized with ketamine/xylazine administered intraperitoneally and were perfused transcardially with Phosphate Buffered Saline (PBS) and then 4% Paraformaldehyde (PFA; Sigma Aldrich, USA). Uterine aplasia was observed, confirming the successful ovariectomy. Right tibiae were removed and fixed in 4% PFA for 24 hours at 4°C and stored in PBS at 4°C for the subsequent CE-CT analyses.

Contrast-enhanced high resolution microfocus computed tomography

Before polyoxometalate-staining (33), the distal end of the bones was removed to allow better diffusion of the contrast agent into the bone marrow compartment. Samples were incubated in the staining solution during 48 hours at 4°C while shaking gently.

CE-CT acquisition and image processing were performed as previously described (33, 34). Briefly, samples were imaged using a Phoenix Nanotom S (GE Measurement and Control Solutions, Germany) and analysed using DataViewer (Bruker MicroCT, Belgium) for the reorientation of the CE-CT datasets and CTAn (Bruker MicroCT) for the assessment of the fat volume in the proximal and distal tibiae Ad.V relative to Ma.V (bone marrow without trabecular and cortical bones) was determined at 2- μ m resolution in a 2mm (proximal) or 4mm (distal) region beginning right underneath the growth plate. Segmentation and morphological assessment of adipocytes was performed as previously described (33).

For bone volume fraction (BV/TV %) and Cortical thickness (Ct.th. mm) analyses, we used an in-house developed semi-automated protocol. Volumes of interest around the trabecular bone region were drawn in the proximal metaphysis starting

directly underneath growth plate and covering a height of 1.2mm distal to the growth plate. Cortical thickness was determined in a mid-diaphyseal volume of interest starting 1mm proximal of the tibio-fibular junction, extending 1mm in the proximal direction.

BMSCs culture

BMSCs were harvested from tibiae of 3-week-old $PiT2^{-/-}$ and $PiT2^{+/+}$ mice. After removing the epiphyses, bones were flushed to isolate total bone marrow cells and BMSCs were expanded in growth media consisting of α -MEM (Eurobio, France) supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS), 100IU/mL penicillin, 100mg/mL streptomycin, 2mM glutamine. At confluence, BMSCs were cultured in adipogenic media consisting of α -MEM (Eurobio, France) supplemented with 15% FBS, 100IU/mL penicillin, 100mg/mL streptomycin, 2mM glutamine, 0.5 μ M 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), 0.5 μ M hydrocortisone and 60 μ M indomethacin (Sigma Aldrich).

Oil Red O staining and relative quantification

Cells were fixed in 2% PFA for 15min, washed with water, incubated with 60% isopropanol for 5min and stained with newly filtered Oil Red O solution for 10min at room temperature. To quantify staining, Oil Red O was extracted from the cells with isopropanol and absorbance of the solution was measured at a wavelength of 520nm to determine the relative amount of dye. Determination of the number of adipocytes (Oil Red O positive cells) and the number of total cells (Hoechst positive cells) was performed by using the High Content Screening Arrayscan (ThermoScientific). Image acquisitions (361 images per well) were performed using the Cellomics ArrayScan VTI/HCS Reader (ThermoScientific) using x5 magnification. Images analysis was performed with CellProfiler (35).

Flow cytometry

Flow cytometry was performed on a BD LSRFortessaTM (BD Biosciences), FACS data were collected using DIVA (Becton Dickinson) and analysed using FlowJo software (Tree Star). For flow cytometry analyses, BMSCs were isolated by flushing tibiae of P21 mice, flushed bones were crushed with a mortar and treated with collagenase for 20min at 37°C to retrieve any remaining BMSCs. The reaction was stopped by adding α -MEM complemented with 15% FBS and the cell suspension was passed through a 70 μ m cell strainer (BD Falcon, MA, USA)

to remove bone fragments. The cells were then added to the previously flushed bone marrow with isolated BMSCs. Cells were centrifuged at 1200rpm for 5min at RT, the pellet was resuspended in Red Blood Cell Lysis Buffer (Sigma, Product No. R 7757) to eliminate red blood cells and centrifuged again at 1200rpm for 5min at RT. The pellet was resuspended and the cells were counted. Five million cells were stained with antibodies (Supporting Table S1) for 30min on ice. Compensation was performed using OneComp™ eBeads Compensation Beads (ThermoFisher Scientific Inc.). BMSCs were analysed as Ter119⁻ CD45⁻ Sca1⁺ CD44⁺ CD105⁺ (36, 37) and adipogenic progenitors as Ter119⁻ CD45⁻ CD31⁻ Sca1⁺ CD24⁻ (38).

RNA isolation and RT-qPCR

Total RNA was prepared with TRIzol Reagent (ThermoFisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. The RNA was reverse transcribed and analysed on a Bio-Rad CFX96 detection system using SYBR Select Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK). mRNA levels were normalized relative to beta-glucuronidase (*GusB*) and Pinin (*Pnn*) expression and quantified using the $\Delta\Delta CT$ method (39). RT-qPCR primers were: Pinin Forward (Fw)-ACCTGG AAGGGGCAGTCAGTA and Reverse (Rv)-ATCATCGT CTTCTGGGTCGCT, *GusB* Fw-CTCTGGTGGCCTT ACCTGAT and Rv- CAGTTGTTGTACCTTCACCTC, *Pit1* Fw-TGTGGCAAATGGGCAGAAG and Rv-AGAAA GCAGCGGAGAGACGA, *Pit2* Fw-CCATCGGCT TCTCACTCGT and Rv AAACCAGGAGGCGACAATCT, *FABP4* Fw-GAATTCGATGAAATCACCGCA and Rv-CTCTTTATTGTGGTGCAGTTTCCA, *AdipoQ* Fw- TCTCCT GTTCCTCTTAATCCTGCC and Rv-CATCTCCTTT CTCTCCCTTCTCTC.

Statistics

Statistical analyses were performed using the GraphPad 8.0 software. Data were analysed for normal distribution within each experimental group using the Shapiro–Wilk normality test. Normally distributed data were analysed by ANOVA or t tests, as appropriate. Where data were not normally distributed, non-parametric tests were used. When appropriate, *p* values were adjusted for multiple comparisons as indicated in the figure legends. A *p* value of less than 0.05 was considered statistically significant (exact *n* and *p* values are indicated in the figures or legends). Data are expressed as means \pm S.E.M. Units and abbreviations are reported in accordance with recently published guidelines for research relating to BM adiposity (40).

Results

Proximal BMAT volume does not increase in *Pit2*^{-/-} mice between 3 and 16 weeks

Bone marrow adipose tissue was investigated by using Hf-POM-based CE-CT analysis on tibiae from 3- and 16-week-old *Pit2*^{+/+} and *Pit2*^{-/-} littermate mice. The 3D visualization and quantification of the bone marrow adipocytes showed an increase in BMAT volume within the proximal tibia of 3-week-old *Pit2*^{-/-} female (Figure 1A, Supplementary Figure 1) and male (Supplementary Figure 2A, Supplementary Figure 3) mice compared to *Pit2*^{+/+} mice, which is consistent with the increased mRNA gene expression of *Adiponectin* (*AdipoQ*) and *FABP4* (Figure 1B, Supplementary Figure 2B), two markers of mature adipocytes. The absence of *Pit2* mRNA expression was confirmed in whole tibia from *Pit2*^{-/-} mice by RT-qPCR (Figure 1B, Supplementary Figure 2B). Interestingly, no difference in the expression of the paralog *Pit1* mRNA expression was observed in *Pit2*^{-/-} whole tibia, making a possible *Pit1*-driven compensatory mechanism unlikely (Figure 1B, Supplementary Figure 2B).

In contrast to *Pit2*^{+/+} mice, CE-CT analyses showed that BMAT volumes did not increase between 3 and 16 weeks in the proximal tibia of *Pit2*^{-/-} mice, both in females (Figure 1A), and males, (Supplementary Figure 2A), leading to a downward trend in BMAT volume at 16 weeks in *Pit2*^{-/-} compared to wild-type mice. This illustrates the possibility that the absence of *Pit2* blunts the age-induced BMAT increase that is normally observed in the proximal tibiae of wild-type mice. Interestingly, in contrast to proximal tibiae, the increase in distal BMAT between 3 and 16 weeks was not affected by the absence of *Pit2* at least in female (Figure 1C, not determined in males), suggesting a specific role for *Pit2* in the proximal BMAT.

Lack of *Pit2* does not alter BMSCs adipogenic differentiation

BMAd originate from the adipogenic differentiation of bone marrow stromal cells. To investigate the ability of *Pit2*-deficient BMSC to differentiate into adipocytes, we first quantified the adipogenic progenitors and explored the adipogenic differentiation capacity of BMSCs. We quantified these cells as Ter119⁻ CD45⁻ Sca1⁺ CD44⁺ CD105⁺ cells by flow cytometry. The results showed no difference in the proportion of BMSCs in 3-week-old *Pit2*^{-/-} female samples compared to *Pit2*^{+/+} mice (Figure 2A). Moreover, similar to BMSCs, analyses of adipogenic progenitors sorted as Ter119⁻ CD45⁻ CD31⁻ Sca1⁺ CD24⁻ cells, showed that the proportion of adipogenic progenitors in *Pit2*^{-/-} female mice was equal to that of *Pit2*^{+/+} mice (Figure 2A).

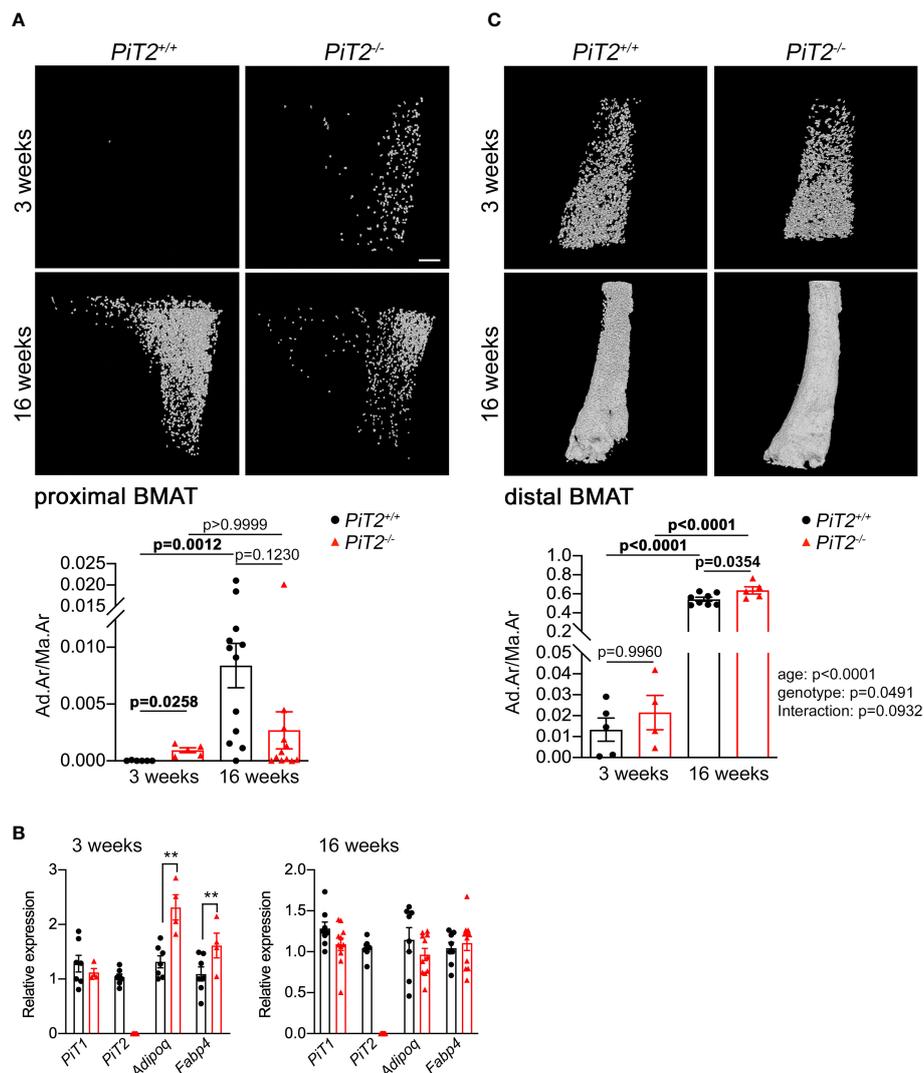


FIGURE 1

Deregulation of BMAT volume in *Pit2*^{-/-} female mice. **(A)** Upper - Representative 3D visualization, using Hf-POM-based CE-CT, of the adipocytes in the bone marrow compartment of the proximal tibia of 3- and 16-week-old *Pit2*^{+/+} and *Pit2*^{-/-} female mice. Scale bar = 250 μ m. Lower - Graphs showing quantification of the volume fraction of the adipocytes in the VOI of the proximal tibia (Ad.Ar/Ma.Ar: Adipocyte area/Marrow Area) of 3- and 16-week-old *Pit2*^{+/+} and *Pit2*^{-/-} mice (n=6 and 12 per genotype, respectively). Data are means \pm SEM, Bonferroni-corrected Mann-Whitney test. p values are indicated. **(B)** Relative *Pit1*, *Pit2*, *Adiponectin* and *FABP4* mRNA expression in the whole tibia from 3- (n=7 *Pit2*^{+/+} and n=4-6 *Pit2*^{-/-}) and 16- (n=8 *Pit2*^{+/+} and n=11 *Pit2*^{-/-}) week-old *Pit2*^{+/+} and *Pit2*^{-/-} female mice, as indicated. Data are means \pm SEM, Mann-Whitney test, ** $p < 0.01$. **(C)** Upper - Representative 3D visualization of the adipocytes in the bone marrow compartment of the distal tibia of 3- and 16-week-old *Pit2*^{+/+} and *Pit2*^{-/-} female mice. Lower - Graphs showing quantification of the volume fraction of the adipocytes in the VOI of the distal tibia of 3- and 16-week-old *Pit2*^{+/+} and *Pit2*^{-/-} mice (n=6 and 11 per genotype, respectively). Data are means \pm SEM, the influence of age or genotype, and interactions between these, was determined by two-way ANOVA, with p values shown to the right of the graph. p values from multiple comparisons are indicated on the graph.

Adipogenic differentiation analyses of BMSCs isolated from tibiae of 3-week-old *Pit2*^{-/-} and *Pit2*^{+/+} mice did not show differences between mutant and *Pit2*^{+/+} cells from female and male mice, neither by quantification of Oil Red O positive cells nor by *Adiponectin* and *FABP4* mRNA expression analyses (Figures 2B–D, Supplementary Figure 4). Similar to what is

observed *in vivo*, *Pit1* mRNA expression showed no differences between *Pit2*^{-/-} and *Pit2*^{+/+} cells (Figure 2D and Supplementary Figure 4B). Altogether, these results revealed that lack of *Pit2* expression did not alter BMSCs populations or adipogenic differentiation, despite aberrant regulation of proximal BMAT in mutant mice.

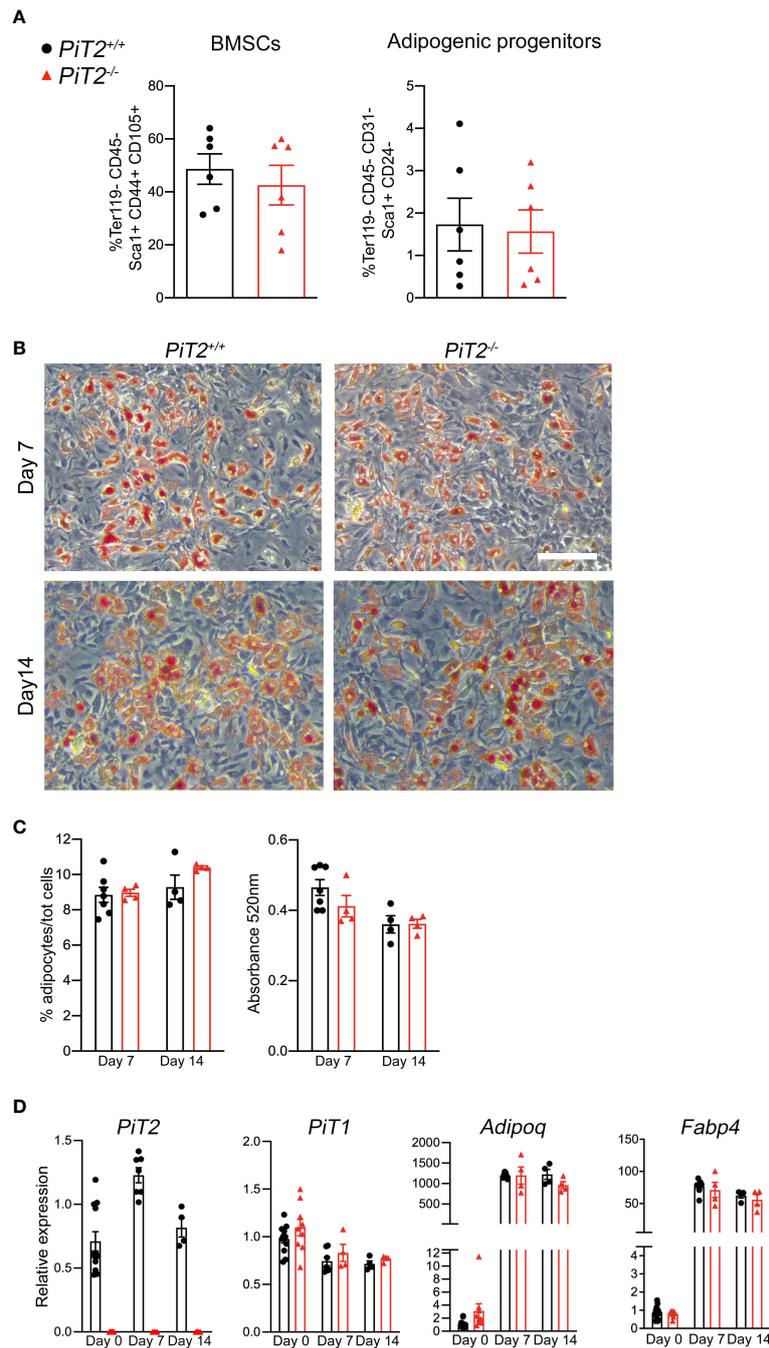


FIGURE 2

Characteristics of BMSCs in *Pit2*^{-/-} mice. **(A)** FACS quantification of BMSCs (Ter119⁻ CD45⁻ Sca1⁺ CD44⁺ CD105⁺) (Left) and adipogenic progenitors (Ter119⁻ CD45⁻ CD31⁻ Sca1⁺ CD24⁻) (Right) in the bone marrow of tibiae from 3-week-old *Pit2*^{+/+} and *Pit2*^{-/-} female mice (n=6 per genotype). Data are means ± SEM, Mann-Whitney test. **(B)** Representative images of oil-red O (ORO) positive cells after adipogenic differentiation of *Pit2*^{+/+} and *Pit2*^{-/-} BMSCs. Scale bar = 100μm. **(C)** Quantitative analysis of ORO+ cells: Left, percentage of ORO+ cells related to the total number of Hoechst-positive cells; right, ORO absorbance at 520nm **(D)** Relative *Pit2*, *Pit1*, *Adiponectin* and *FABP4* mRNA expression at 0 (n=12 *Pit2*^{+/+} and n=9 *Pit2*^{-/-}), 7 (n=7 *Pit2*^{+/+} and n=4 *Pit2*^{-/-}) and 14 (n=4 *Pit2*^{+/+} and n=4 *Pit2*^{-/-}) days of differentiation. N=3 independent experiments. Data are means ± SEM. Two-way ANOVA test.

Regulation of bone and BMAT volumes in *PiT2*^{-/-} mice after ovariectomy (OVX)

To evaluate the regulation of bone and BMAT volumes, 13-week-old *PiT2*^{-/-} female mice and their control littermate (*PiT2*^{+/+}) were subjected to OVX-induced osteoporosis. Five weeks after surgery, animals were analyzed for bone and BMAT volumes by CE-CT. Results show that sham-operated *PiT2*^{-/-} female mice have similar trabecular BV/TV as *PiT2*^{+/+} control mice, while cortical thickness was significantly reduced (Figure 3A), consistent with our previous study (31). In OVX mice, we showed a similar reduction in trabecular BV/TV and Ct.Th. in wild-type and *PiT2*^{-/-} mice (Figure 3A). This reduction in bone volume parallels an increase in BMAT volume observed both in ovariectomized *PiT2*^{+/+} and

PiT2^{-/-} mice compared with sham-operated controls (fold-change: 2.65 and 3.22, respectively; Figure 3B). Of note, sham-operated *PiT2*^{-/-} mice showed a reduced BMAT volume compared with sham-operated *PiT2*^{+/+} mice (Figure 3B), consistent with our observation in 16-week-old females (Figure 1A). These findings indicate that bone and BMAT volumes are inversely regulated in the model of ovariectomy-induced bone loss, and suggest that *PiT2*-deficient adipocytes retain the ability to be recruited after OVX.

Discussion

In the present study, we report for the first time a role for *PiT2* in the maintenance of bone marrow adipose tissue volume.

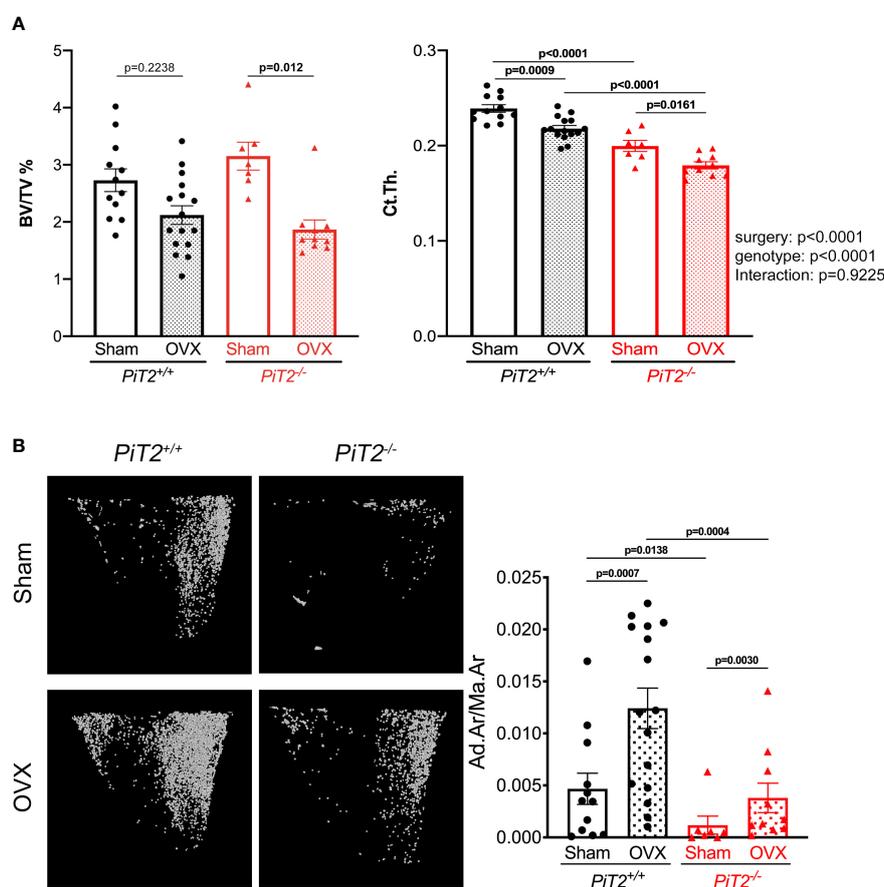


FIGURE 3

PiT2 deficiency does not prevent BMAT volume increase and bone mass loss after ovariectomy. (A) Bone volume/tissue volume (BV/TV, left) and cortical thickness (Ct.th., right) of tibia from sham operated mice (n=12 *PiT2*^{+/+} and n=7 *PiT2*^{-/-}) or after ovariectomy (OVX, n=16 *PiT2*^{+/+} and n=10 *PiT2*^{-/-}) quantified using CE-CT images. Data are means ± SEM, Bonferroni-corrected Mann-Whitney test (BV/TV) and two-way ANOVA test (Ct.Th.). For Ct.Th., the influence of surgery or genotype, and interactions between these, was determined by two-way ANOVA, with p values shown to the right of the graph. p values from multiple comparisons are indicated on the graphs (B) Left: representative 3D visualization, using Hf-POM-based CE-CT, of adipocytes in the bone marrow compartment of the proximal tibia (2mm height from the growth plate) of *PiT2*^{+/+} and *PiT2*^{-/-} female mice after ovariectomy (OVX). Right: graphs showing the quantification of the volume fraction of the adipocytes in the VOI of the proximal tibia (Ad.Ar/Ma.Ar: Adipocyte area/Marrow Area) in sham operated mice (n=12 *PiT2*^{+/+} and n=7 *PiT2*^{-/-}) or after ovariectomy (OVX, n=16 *PiT2*^{+/+} and n=10 *PiT2*^{-/-}). Data are means ± SEM, Bonferroni-corrected Mann-Whitney test.

We also show that BMSCs with or without PiT2 are able to differentiate into adipocytes in an identical manner, suggesting that the regulation of proximal BMAT volume by PiT2 does not involve cell autonomous mechanisms.

Increased BMAT volume in young $PiT2^{-/-}$ mice

An increase in marrow adipocytes which inversely parallels a loss of bone volume is observed in numerous genetic models (6, 8, 10). This link between bone and BMAT volumes cross-regulation is based on either the balance between osteo-adipogenic differentiation of BMSC or the secreted factors from bone cells or BMAdS which can act on the surrounding tissue (6, 8, 10, 41). Our previous work showed that bone mass in young (3-week-old) $PiT2^{-/-}$ mice was reduced compared to $PiT2^{+/+}$ mice (31), and we now show, conversely, that proximal BMAT volume is higher compared with wild-type mice. Although this is consistent with the expected inverse cross-regulation between bone and adipocyte volumes, we nevertheless show that adipogenic differentiation of PiT2-deficient BMSCs is not altered. However, the *in vitro* adipogenesis conditions used in our study may be so potent that they override any subtle differences in BMSC adipogenic potential that exist *in vivo*. In addition, the use of more sensitive technologies, such as single cell RNA sequencing, the use of other recently identified adipogenic progenitor markers could help to identify other *in vivo* stromal populations that modulate adipogenesis and whose expression may be abnormal in $PiT2^{-/-}$ mice (42–45). To date we have not identified which cellular or molecular mechanism affected by the loss of PiT2 deregulates adipocyte volume control. However, we interestingly observed that proximal BMAdS can be detected at least from 16 days of age (not shown) in the $PiT2^{-/-}$ mice, which is very early compared to the appearance of proximal BMAT in wild-type mice that can only be observed from 4 weeks of age in C57Bl/6 (46). This may therefore suggest that PiT2 deletion affects cellular or molecular pathways that occur during development or very early after birth and may provide an invaluable study model to identify them.

No inverse correlation between BMAT and bone volumes in adult $PiT2^{-/-}$ mice

In adult $PiT2^{-/-}$ mice, the reduced bone mass is not associated with an increased BMAT volume compared to $PiT2^{+/+}$ mice. As we have shown previously, the bone defects in mutant mice are independent of osteoblast or osteoclast number or activity (31), supporting the hypothesis that BMAT and bone defects in the absence of PiT2 are not generated by a coupling imbalance between adipocytes and osteoblasts differentiation.

BMAT volume is known to be regulated by several hormones (e.g., PTH, estrogen or FSH) (2, 3). However, we

have previously shown that serum PTH levels were similar between $PiT2^{+/+}$ and $PiT2^{-/-}$ mice, excluding its role in the genesis of the phenotype (47). In post-menopausal women, BMAT volume is highly increased and ovariectomy is now a commonly used approach to increase BMAT volume in animal models (7, 10, 34, 48, 49). Estrogen, in addition to be a negative regulator of BMAdS, is a positive regulator of the bone mass (48). These opposite effects of estrogen on bone and fat tissues may be explained by the imbalanced ability of BMSCs to differentiate into osteoblasts in favor of adipocytes, although no direct evidence has yet been obtained. In $PiT2^{-/-}$ mice, both bone and BMAT volumes are reduced and a similar phenotype is observed in males, ruling out the possibility that a defect in estrogen levels could explain the phenotype of these mutant mice. Hence, further studies will be needed to identify the possible systemic factor underlying the alterations in bone and marrow adipose tissues.

Bone and bone marrow adipose tissues are sensitive to estrogen depletion in $PiT2^{-/-}$ mice

The observation that BMAT volume does not increase between 3 and 16 weeks in $PiT2^{-/-}$ mice led us to question the regulation of bone and adipose tissue volumes in pathological conditions. In ovariectomized $PiT2^{-/-}$ mice, we showed that bone mass is decreased and that this is accompanied by BMAT accumulation similar to that in control mice. These results suggest that in the absence of PiT2 adipogenic differentiation is not affected and that the mechanisms that govern it are upstream of PiT2-dependent pathways. On the other hand, it is well documented that OVX-induced bone loss is primarily caused by induction of bone resorption. Here, we show that bone loss is similar in OVX- $PiT2^{+/+}$ mice and OVX- $PiT2^{-/-}$ mice, indicating that osteoclast formation and activity are not impaired, consistent with our previous findings that showed normal osteoclast activity in $PiT2^{-/-}$ mice (31). The lack of effect of PiT2 deletion on bone and fat phenotypes during ovariectomy is consistent with the fact that we do not observe differences in male and female mutant mice. As these results were obtained in adult mice, they may also support the idea that the role of PiT2 in the bone and BMAT phenotypic balance occurs earlier in the development or during the growth of the animal.

Could phosphate homeostasis explain the BMAT phenotype in $PiT2^{-/-}$ mice?

As one of the major cellular functions of PiT2 is to transport phosphate across the plasma membrane, it is reasonable to ask whether the observed phenotype of $PiT2^{-/-}$ mice may be phosphate-related. In the literature, a link between phosphate and adipose tissues is rarely reported, either in extra- or intra-

medullar adipose tissues. In humans, an inverse correlation between serum Pi levels and obesity has been observed, and an association between high phosphate diet and the suppression of lipogenesis in white adipose tissue has been described both in humans and rodents (50–57). Interestingly, acute phosphate restriction in mice decreases bone formation and results in an increase in BMAT due to defects in the commitment of BMSC preferentially towards the adipogenic lineage involving the Wnt signaling pathway (58, 59). It is therefore possible that a change in phosphate homeostasis may impact the balance between bone formation and BMAT. However, *PiT2*^{-/-} mice show no differences in serum phosphate levels and key markers of phosphate homeostasis regulation (31, 32, 60, 61), precluding a role for serum phosphate in the BMAT defects observed in the absence of PiT2. However, as we hypothesize for the dental defects in the *PiT2*^{-/-} mice (62), the local extracellular Pi level, rather than the serum Pi levels, may be responsible for the observed phenotype. Interestingly, invalidation of *Phospho1*, another phosphate-related gene, results in a reduction in bone volume and bone mineral density, along with an increase in BMAT volume (63, 64). Whether this phenotype is directly due to an abnormal local level of Pi within the skeleton or whether it is an indirect consequence of modified energy metabolism remains to be determined.

In summary, we have shown that loss of PiT2 leads to defects in bone and marrow adipose tissues, probably through a non-intrinsic defect of osteoblasts, osteoclasts and BMAds, leading to impaired bone quality and strength. Further identification is needed to decipher the underlying cellular mechanisms.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/[Supplementary Materials](#). Further inquiries can be directed to the corresponding author.

Ethics statement

Experiments on mice were conducted according to the French and European regulations on care and protection of laboratory animals (EC Directive 86/609, French Law 2001-486 issued on June 6, 2001). This study complied with ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) guidelines and was approved by the Animal Care Committee of Pays de la Loire (APAFIS agreements 02286.02, 14835-2020-05-13 and 22178-2019092614593965 v7).

Author contributions

Study design: GF, LB, and SB-C. Data collection: GF, MG, GP, PG, GK, MF, JV, BH, SS and SB-C. Data analysis and

interpretation: GF, MG, GP, GK, MF, XP, LB and SBC. Drafting manuscript: GF, LB and SB-C. Revising manuscript content: GF, MG, JG, XP, LB and SB-C. Approving final version of manuscript: all authors. SBC takes responsibility for the integrity of the data analysis.

Funding

This work was supported by grants from Inserm, Région des Pays de la Loire (AdipOs) and Société Française de Rhumatologie (PITAMO and METABONE). GF and MG received a doctoral fellowship from Nantes Université.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Experimental Health core facility (PES) and SC3M histology facility of the SFR Bonamy (Nantes, France) for their technical support, and MicroPiCell and Cytocell facilities (UMS BioCore, Inserm US16/CNRS UAR3556) for expert technical assistance. The authors gratefully acknowledge Carla Geeroms (Department of Materials Engineering, KU Leuven, Leuven, BELGIUM), Céline Menguy (Inserm U1087, Nantes, France) and Séverine Marionneau (Inserm U1232, Nantes) for technical help. The authors also gratefully acknowledge Dr Christophe Chauveau (MABLab, Boulogne-sur-mer, France) and Dr Céline Colnot (IMRB, Paris) for helpful discussions.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2022.921073/full#supplementary-material>

SUPPLEMENTARY FIGURE 1

Three-D visualization, using Hf-POM-based CE-CT, of the adipocytes in the bone marrow compartment of the proximal tibia of 3-week-old *PIT2^{+/+}* and *PIT2^{-/-}* female mice.

SUPPLEMENTARY FIGURE 2

Deregulation of BMAT volume in *PIT2^{-/-}* male mice. (A) Upper - Representative 3D visualization, using Hf-POM-based CE-CT, of the adipocytes in the bone marrow compartment of the proximal tibia (2mm height from the growth plate) of 3- and 16-week-old *PIT2^{+/+}* and *PIT2^{-/-}* male mice. Lower - Graph showing quantification of the volume fraction of the adipocytes in the proximal tibia *PIT2^{+/+}* and *PIT2^{-/-}* mice at 3 weeks (n=5 and 3, respectively) and 16 weeks (n=6 and 5, respectively). Data are means \pm SEM, Bonferroni-corrected Mann-Whitney test. (B) Relative *PIT1*, *PIT2*, *Adiponectin* and *FABP4* mRNA expression in the whole tibia from 3- (n=5 per genotype) and 16- (n= 7 *PIT2^{+/+}* and n= 5 *PIT2^{-/-}*)

week-old *PIT2^{+/+}* and *PIT2^{-/-}* male mice, as indicated. Data are means \pm SEM, Mann-Whitney test, **p*<0.05.

SUPPLEMENTARY FIGURE 3

Three-D visualization, using Hf-POM-based CE-CT, of the adipocytes in the bone marrow compartment of the proximal tibia of 3-week-old *PIT2^{+/+}* and *PIT2^{-/-}* male mice.

SUPPLEMENTARY FIGURE 4

Adipogenic differentiation of BMSCs from *PIT2^{-/-}* males. (A) Left - Representative images of *PIT2^{+/+}* and *PIT2^{-/-}* BMSCs after adipogenic differentiation and ORO staining. Scale bar = 100 μ m. Right - Graphs showing the percentage of oil-red O (ORO) positive cells related to the total number of Hoechst-positive cells (left) and ORO absorbance at 520nm (right). (B) Relative *PIT1*, *Adiponectin* and *FABP4* mRNA expression at 0 and 7 days of differentiation, n are indicated on graph bars. Data are means \pm SEM, Mann-Whitney test.

References

- de Paula FJA, Rosen CJ. Marrow adipocytes: Origin, structure, and function. *Annu Rev Physiol* (2020) 82:461–84. doi: 10.1146/annurev-physiol-021119-034513
- Li Z, Hardij J, Bagchi DP, Scheller EL, MacDougald OA. Development, regulation, metabolism and function of bone marrow adipose tissues. *Bone* (2018) 110:134–40. doi: 10.1016/j.bone.2018.01.008
- Sebo ZL, Rendina-Ruedy E, Ables GP, Lindskog DM, Rodeheffer MS, Fazeli PK, et al. Bone marrow adiposity: Basic and clinical implications. *Endocr Rev* (2019) 40:1187–206. doi: 10.1210/er.2018-00138
- Scheller EL, Cawthorn WP, Burr AA, Horowitz MC, MacDougald OA. Marrow adipose tissue: Trimming the fat. *Trends Endocrinol Metab* (2016) 27:392–403. doi: 10.1016/j.tem.2016.03.016
- Tratwal J, Labella R, Bravenboer N, Kerckhofs G, Douni E, Scheller EL, et al. Reporting guidelines, review of methodological standards, and challenges toward harmonization in bone marrow adiposity research. report of the methodologies working group of the international bone marrow adiposity society. *Front Endocrinol (Lausanne)* (2020) 11:65. doi: 10.3389/fendo.2020.00065
- Fan Y, Hanai JI, Le PT, Bi R, Maridas D, DeMambro V, et al. Parathyroid hormone directs bone marrow mesenchymal cell fate. *Cell Metab* (2017) 25:661–72. doi: 10.1016/j.cmet.2017.01.001
- Iwaniec UT, Turner RT. Failure to generate bone marrow adipocytes does not protect mice from ovariectomy-induced osteopenia. *Bone* (2013) 53:145–53. doi: 10.1016/j.bone.2012.11.034
- Matsumoto Y, La Rose J, Lim M, Adissu HA, Law N, Mao X, et al. Ubiquitin ligase RNF146 coordinates bone dynamics and energy metabolism. *J Clin Invest* (2017) 127:2612–25. doi: 10.1172/JCI92233
- Xiao Z, Baudry J, Cao L, Huang J, Chen H, Yates CR, et al. Polycystin-1 interacts with TAZ to stimulate osteoblastogenesis and inhibit adipogenesis. *J Clin Invest* (2018) 128:157–74. doi: 10.1172/JCI93725
- Yu B, Huo L, Liu Y, Deng P, Szymanski J, Li J, et al. PGC-1 α controls skeletal stem cell fate and bone-fat balance in osteoporosis and skeletal aging by inducing TAZ. *Cell Stem Cell* (2018) 23:193–209.e5. doi: 10.1016/j.stem.2018.06.009
- Zou W, Rohatgi N, Brestoff JR, Li Y, Barve RA, Tycksen E, et al. Ablation of fat cells in adult mice induces massive bone gain. *Cell Metab* (2020) 32:801–813.e6. doi: 10.1016/j.cmet.2020.09.011
- Baum T, Rohrmeier A, Syväri J, Diefenbach MN, Franz D, Dieckmeyer M, et al. Anatomical variation of age-related changes in vertebral bone marrow composition using chemical shift encoding-based water-fat magnetic resonance imaging. *Front Endocrinol (Lausanne)* (2018) 9:141. doi: 10.3389/fendo.2018.00141
- Justesen J, Stenderup K, Ebbesen EN, Mosekilde L, Steiniche T, Kassem M. Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis. *Biogerontology* (2001) 2:165–71. doi: 10.1023/a:1011513223894
- Di Iorgi N, Rosol M, Mittelman SD, Gilsanz V. Reciprocal relation between marrow adiposity and the amount of bone in the axial and appendicular skeleton of young adults. *J Clin Endocrinol Metab* (2008) 93:2281–6. doi: 10.1210/jc.2007-2691
- Shen W, Chen J, Punyanitya M, Shapses S, Heshka S, Heymsfield SB. MRI-Measured bone marrow adipose tissue is inversely related to DXA-measured bone mineral in Caucasian women. *Osteoporos Int* (2007) 18:641–7. doi: 10.1007/s00198-006-0285-9
- Shen W, Scherzer R, Gantz M, Chen J, Punyanitya M, Lewis CE, et al. Relationship between MRI-measured bone marrow adipose tissue and hip and spine bone mineral density in African-American and Caucasian participants: the CARDIA study. *J Clin Endocrinol Metab* (2012) 97:1337–46. doi: 10.1210/jc.2011-2605
- Wren TA, Chung SA, Dorey FJ, Bluml S, Adams GB, Gilsanz V. Bone marrow fat is inversely related to cortical bone in young and old subjects. *J Clin Endocrinol Metab* (2011) 96:782–6. doi: 10.1210/jc.2010-1922
- Newton AL, Hanks LJ, Davis M, Casazza K. The relationships among total body fat, bone mineral content and bone marrow adipose tissue in early-pubertal girls. *Bonekey Rep* (2013) 2:315. doi: 10.1038/bonekey.2013.49
- Griffith JF, Yeung DK, Ma HT, Leung JC, Kwok TC, Leung PC. Bone marrow fat content in the elderly: a reversal of sex difference seen in younger subjects. *J Magn Reson Imaging* (2012) 36:225–30. doi: 10.1002/jmri.23619
- Aaron N, Kraakman MJ, Zhou Q, Liu Q, Costa S, Yang J, et al. Adipsin promotes bone marrow adiposity by priming mesenchymal stem cells. *Elife* (2021) 10:e69209. doi: 10.7554/eLife.69209
- Tencerova M, Figeac F, Ditzel N, Taipaleenmäki H, Nielsen TK, Kassem M. High-fat diet-induced obesity promotes expansion of bone marrow adipose tissue and impairs skeletal stem cell functions in mice. *J Bone Miner Res* (2018) 33:1154–65. doi: 10.1002/jbmr.3408
- Beck L, Leroy C, Salaün C, Margall-Ducos G, Desdoutets C, Friedlander G. Identification of a novel function of PiT1 critical for cell proliferation and independent of its phosphate transport activity. *J Biol Chem* (2009) 284:31363–74. doi: 10.1074/jbc.M109.053132
- Beck L, Leroy C, Beck-Cormier S, Forand A, Salaün C, Paris N, et al. The phosphate transporter PiT1 (Slc20a1) revealed as a new essential gene for mouse liver development. *PLoS One* (2010) 5:e9148. doi: 10.1371/journal.pone.0009148
- Byskov K, Jensen N, Kongsfelt IB, Wielsøe M, Pedersen LE, Haldrup C, et al. Regulation of cell proliferation and cell density by the inorganic phosphate transporter PiT1. *Cell Div* (2012) 7:7. doi: 10.1186/1747-1028-7-7
- Couasnay G, Bon N, Devignes CS, Sourice S, Bianchi A, Véziers J, et al. PiT1/Slc20a1 is required for endoplasmic reticulum homeostasis, chondrocyte survival, and skeletal development. *J Bone Miner Res* (2019) 34:387–98. doi: 10.1002/jbmr.3609
- Forand A, Beck L, Leroy C, Rousseau A, Boitez V, Cohen I, et al. EKLf-driven PiT1 expression is critical for mouse erythroid maturation *in vivo* and *in vitro*. *Blood* (2013) 121:666–78. doi: 10.1182/blood-2012-05-427302
- Kongsfelt IB, Byskov K, Pedersen LE, Pedersen L. High levels of the type III inorganic phosphate transporter PiT1 (SLC20A1) can confer faster cell adhesion. *Exp Cell Res* (2014) 326:57–67. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.05.014
- Liu L, Sánchez-Bonilla M, Crouthamel M, Giachelli C, Keel S. Mice lacking the sodium-dependent phosphate import protein, PiT1 (SLC20A1), have a severe defect in terminal erythroid differentiation and early b cell development. *Exp Hematol* (2013) 41:432–43.e7. doi: 10.1016/j.exphem.2013.01.004
- Ma XX, Li X, Yi P, Wang C, Weng J, Zhang L, et al. PiT2 regulates neuronal outgrowth through interaction with microtubule-associated protein 1B. *Sci Rep* (2017) 7:17850. doi: 10.1038/s41598-017-17953-3

30. Salaün C, Leroy C, Rousseau A, Boitez V, Beck L, Friedlander G. Identification of a novel transport-independent function of Pit1/SLC20A1 in the regulation of TNF-induced apoptosis. *J Biol Chem* (2010) 285:34408–18. doi: 10.1074/jbc.M110.130989
31. Beck-Cormier S, Lelliott CJ, Logan JG, Lafont DT, Meramtdjian L, Leitch VD, et al. Slc20a2, encoding the phosphate transporter Pit2, is an important genetic determinant of bone quality and strength. *J Bone Miner Res* (2019) 34:1101–14. doi: 10.1002/jbmr.3691
32. Yamada S, Wallingford MC, Borgeia S, Cox TC, Giachelli CM. Loss of Pit-2 results in abnormal bone development and decreased bone mineral density and length in mice. *Biochem Biophys Res Commun* (2018) 495:553–9. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.11.071
33. Kerckhofs G, Stegen S, van Gestel N, Sap A, Falgayrac G, Penel G, et al. Simultaneous three-dimensional visualization of mineralized and soft skeletal tissues by a novel microCT contrast agent with polyoxometalate structure. *Biomaterials* (2018) 159:1–12. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.12.016
34. Beekman KM, Zwaagstra M, Veldhuis-Vlug AG, van Essen HW, den Heijer M, Maas M, et al. Ovariectomy increases RANKL protein expression in bone marrow adipocytes of C3H/HeJ mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (2019) 317: E1050–4. doi: 10.1152/ajpendo.00142.2019
35. Carpenter AE, Jones TR, Lamprecht MR, Clarke C, Kang IH, Friman O, et al. CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biol* (2006) 7:R100. doi: 10.1186/gb-2006-7-10-r100
36. Boxall SA, Jones E. Markers for characterization of bone marrow multipotential stromal cells. *Stem Cells Int* (2012) 2012:975871. doi: 10.1155/2012/975871
37. Rostovskaya M, Anastasiadis K. Differential expression of surface markers in mouse bone marrow mesenchymal stromal cell subpopulations with distinct lineage commitment. *PLoS One* (2012) 7:e51221. doi: 10.1371/journal.pone.0051221
38. Ambrosi TH, Scialdone A, Graja A, Gohlke S, Jank AM, Bocian C, et al. Adipocyte accumulation in the bone marrow during obesity and aging impairs stem cell-based hematopoietic and bone regeneration. *Cell Stem Cell* (2017) 20:771–784.e6. doi: 10.1016/j.stem.2017.02.009
39. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(delta delta C(T)) method. *Methods* (2001) 25:402–8. doi: 10.1006/meth.2001.1262
40. Bravenboer N, Bredella MA, Chauveau C, Corsi A, Douni E, Ferris WF, et al. Standardised nomenclature, abbreviations, and units for the study of bone marrow adiposity: Report of the nomenclature working group of the international bone marrow adiposity society. *Front Endocrinol (Lausanne)* (2019) 10:923. doi: 10.3389/fendo.2019.00923
41. Sulston RJ, Cawthorn WP. Bone marrow adipose tissue as an endocrine organ: close to the bone. *Horm Mol Biol Clin Investig* (2016) 28:21–38. doi: 10.1515/hmbci-2016-0012
42. Baryawno N, Przybylski D, Kowalczyk MS, Kfoury Y, Severe N, Gustafsson K, et al. A cellular taxonomy of the bone marrow stroma in homeostasis and leukemia. *Cell* (2019) 177:1915–1932.e16. doi: 10.1016/j.cell.2019.04.040
43. Helbling PM, Piñero-Yáñez E, Gerosa R, Boettcher S, Al-Shahrour F, Manz MG, et al. Global transcriptomic profiling of the bone marrow stromal microenvironment during postnatal development, aging, and inflammation. *Cell Rep* (2019) 29:3313–3330.e4. doi: 10.1016/j.celrep.2019.11.004
44. Schwalie PC, Dong H, Zachara M, Russeil J, Alpern D, Akchiche N, et al. A stromal cell population that inhibits adipogenesis in mammalian fat depots. *Nature* (2018) 559:103–8. doi: 10.1038/s41586-018-0226-8
45. Tikhonova AN, Dolgalev I, Hu H, Sivaraj KK, Hoxha E, Cuesta-Domínguez Á, et al. The bone marrow microenvironment at single-cell resolution. *Nature* (2019) 569:222–8. doi: 10.1038/s41586-019-1104-8
46. Scheller EL, Doucette CR, Learman BS, Cawthorn WP, Khandaker S, Schell B, et al. Region-specific variation in the properties of skeletal adipocytes reveals regulated and constitutive marrow adipose tissues. *Nat Commun* (2015) 6:7808. doi: 10.1038/ncomms8808
47. Bon N, Frangi G, Sourice S, Guicheux J, Beck-Cormier S, Beck L. Phosphate-dependent FGF23 secretion is modulated by Pit2/Slc20a2. *Mol Metab* (2018) 11:197–204. doi: 10.1016/j.molmet.2018.02.007
48. Lecka-Czernik B, Stechschulte LA, Czernik PJ, Sherman SB, Huang S, Krings A. Marrow adipose tissue: Skeletal location, sexual dimorphism, and response to sex steroid deficiency. *Front Endocrinol (Lausanne)* (2017) 8:188. doi: 10.3389/fendo.2017.00188
49. Wu Y, Xie L, Wang M, Xiong Q, Guo Y, Liang Y, et al. Mettl3-mediated m⁶A RNA methylation regulates the fate of bone marrow mesenchymal stem cells and osteoporosis. *Nat Commun* (2018) 9:4772. doi: 10.1038/s41467-018-06898-4
50. Abuduli M, Ohminami H, Otani T, Kubo H, Ueda H, Kawai Y, et al. Effects of dietary phosphate on glucose and lipid metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (2016) 310:E526–38. doi: 10.1152/ajpendo.00234.2015
51. Ayoub JJ, Samra MJ, Hlais SA, Bassil MS, Obeid OA. Effect of phosphorus supplementation on weight gain and waist circumference of overweight/obese adults: a randomized clinical trial. *Nutr Diabetes* (2015) 5:e189. doi: 10.1038/nutd.2015.38
52. Bassil MS, Obeid OA. Phosphorus supplementation recovers the blunted diet-induced thermogenesis of overweight and obese adults: A pilot study. *Nutrients* (2016) 8:E801. doi: 10.3390/nu8120801
53. Billington EO, Gamble GD, Bristow S, Reid IR. Serum phosphate is related to adiposity in healthy adults. *Eur J Clin Invest* (2017) 47:486–93. doi: 10.1111/eji.12769
54. Eller P, Eller K, Kirsch AH, Patsch JJ, Wolf AM, Tagwerker A, et al. A murine model of phosphate nephropathy. *Am J Pathol* (2011) 178:1999–2006. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.01.024
55. Imi Y, Yabiki N, Abuduli M, Masuda M, Yamanaka-Okumura H, Taketani Y. High phosphate diet suppresses lipogenesis in white adipose tissue. *J Clin Biochem Nutr* (2018) 63:181–91. doi: 10.3164/jcbn.17-141
56. Obeid OA. Low phosphorus status might contribute to the onset of obesity. *Obes Rev* (2013) 14:659–64. doi: 10.1111/obr.12039
57. Park W, Kim BS, Lee JE, Huh JK, Kim BJ, Sung KC, et al. Serum phosphate levels and the risk of cardiovascular disease and metabolic syndrome: a double-edged sword. *Diabetes Res Clin Pract* (2009) 83:119–25. doi: 10.1016/j.diabres.2008.08.018
58. Ko FC, Martins JS, Reddy P, Bragdon B, Hussein AI, Gerstenfeld LC, et al. Acute phosphate restriction impairs bone formation and increases marrow adipose tissue in growing mice. *J Bone Miner Res* (2016) 31:2204–14. doi: 10.1002/jbmr.2891
59. Ko FC, Kobelski MM, Zhang W, Grenga GM, Martins JS, Demay MB. Phosphate restriction impairs mTORC1 signaling leading to increased bone marrow adipose tissue and decreased bone in growing mice. *J Bone Miner Res* (2021) 36:1510–20. doi: 10.1002/jbmr.4312
60. Jensen N, Autzen JK, Pedersen L. Slc20a2 is critical for maintaining a physiologic inorganic phosphate level in cerebrospinal fluid. *Neurogenetics* (2016) 17:125–30. doi: 10.1007/s10048-015-0469-6
61. Wallingford MC, Gammill HS, Giachelli CM. Slc20a2 deficiency results in fetal growth restriction and placental calcification associated with thickened basement membranes and novel CD13 and laminin α 1 expressing cells. *Reprod Biol* (2016) 16:13–26. doi: 10.1016/j.repbio.2015.12.004
62. Meramtdjian L, Beck-Cormier S, Bon N, Couasnay G, Sourice S, Guicheux J, et al. Expression of phosphate transporters during dental mineralization. *J Dent Res* (2018) 97:209–17. doi: 10.1177/0022034517729811
63. Suchacki KJ, Morton NM, Vary C, Huesa C, Yadav MC, Thomas BJ, et al. PHOSPHO1 is a skeletal regulator of insulin resistance and obesity. *BMC Biol* (2020) 18:149. doi: 10.1186/s12915-020-00880-7
64. Yadav MC, Simão AM, Narisawa S, Huesa C, McKee MD, Farquharson C, et al. Loss of skeletal mineralization by the simultaneous ablation of PHOSPHO1 and alkaline phosphatase function: a unified model of the mechanisms of initiation of skeletal calcification. *J Bone Miner Res* (2011) 26:286–97. doi: 10.1002/jbmr.195

COPYRIGHT

© 2022 Frangi, Guicheteau, Jacquot, Pyka, Kerckhofs, Feyeux, Veziers, Guihard, Halgand, Sourice, Guicheux, Prieur, Beck and Beck-Cormier. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

DISCUSSION

Rôle de PiT2 dans la régulation des tissus adipeux intra- et extra-médullaires

Mon projet de recherche émerge des travaux de thèse de Giulia FRANGI qui a montré un rôle de PiT2 dans la régulation du volume de tissu adipeux médullaire. Nous avons ensuite eu la curiosité d'évaluer la régulation des tissus adipeux périphériques en l'absence de PiT2. Nous montrons que les souris invalidées pour PiT2 présentent une diminution de la masse grasse sans augmentation avec l'âge entre 3 et 48 semaines par rapport aux souris contrôles. En analysant le métabolisme énergétique, nous montrons une augmentation de la dépense énergétique accompagnée d'une augmentation de l'activité du tissu adipeux brun alimentée par une augmentation de la lipolyse dans le tissu adipeux blanc des souris *Slc20a2*^{-/-}.

Effet de l'augmentation de la dépense énergétique sur le BMAT ?

Nous expliquons la diminution de la masse grasse périphérique par une augmentation de la dépense énergétique et de l'activité du tissu adipeux brun chez les souris *Slc20a2*^{-/-}. Est-ce que l'augmentation de la dépense énergétique peut également expliquer la diminution du volume d'adiposité médullaire chez les souris *Slc20a2*^{-/-} ? Le BMAT a un métabolisme propre et présente une diminution de sa capacité à hydrolyser les TG par rapport au tissu adipeux blanc afin de préserver son volume et maintenir la niche de la moelle osseuse (Attané *et al.*, 2020). En effet, le BMAT est caractérisé par une diminution de l'expression protéique des enzymes clés de la lipolyse, ATGL et pHSL, ainsi qu'une diminution du relargage du glycérol (Scheller *et al.*, 2019) par rapport aux adipocytes de la graisse périphérique. Dans un challenge de stimulation au froid chez le lapin, l'activité du BAT, caractérisée par une augmentation de l'utilisation du glucose analysé avec le ¹⁸F-FDG PET/CT et une augmentation de l'expression d'*Ucp1*, alors que le BMAT n'utilise pas plus de glucose dans cette situation et ne surexprime pas *Ucp1* (Suchacki *et al.*, 2020). Compte-tenu de ces études, l'hypothèse

d'une augmentation de l'activité lipolytique dans le BMAT afin d'alimenter l'activité du BAT ne semble pas valide. D'autres études sont nécessaires afin de comprendre la diminution du volume de BMAT chez les souris en l'absence de Pit2.

Défaut de croissance, masse grasse et dépense énergétique

Compte-tenu du retard de croissance observé chez la souris *Slc20a2*^{-/-}, nous nous sommes longtemps posé la question de l'impact de la diminution de la taille et de la masse corporelle sur la dépense énergétique. En effet, le concept de « spécialiste métabolique » proposé par Polly PHILLIPS et James HEATH (Phillips and Heath, 1995) puis discuté par Christopher GORDON (Gordon, 2017), suggère qu'un petit mammifère comme la souris, avec un rapport surface corporelle/volume relativement élevé et une conductance thermique élevée, est contraint d'utiliser davantage la thermogenèse métabolique pour réguler sa température corporelle. Ainsi, le rapport « surface corporelle/masse corporelle » est un facteur important lorsqu'il s'agit de comparer la dépense énergétique entre deux mammifères de tailles très différentes. Ainsi, la souris dépense plus d'énergie relativement à l'homme. Mais une étude de June K CORRIGAN a montré que cette notion ne peut pas s'appliquer pour comparer deux individus de la même espèce si la différence entre leur masse corporelle n'est pas supérieure à 20% (Corrigan *et al.*, 2020). Lorsque cette limite est dépassée, l'utilisation d'un test ANCOVA est nécessaire afin d'éviter des résultats « faux positifs ». Il ne serait donc pas exact de dire que l'activité du BAT des souris *Slc20a2*^{-/-} est augmentée à cause de la réduction de 20% de son poids corporel.

En revanche, il existe un autre concept fondamental concernant la dépense énergétique chez deux mammifères d'une espèce donnée mais de masse corporelle différente. Chez une même espèce, il existe une diversité de masse corporelle, les masses corporelles les plus élevées demandant plus d'énergie pour se déplacer. Par exemple, une souris de 40 grammes (g) a besoin de plus d'énergie pour son activité

physique qu'une souris de 20g. Nous avons donc analysé la corrélation entre la masse corporelle et la dépense énergétique d'après l'étude de Timo D. MULLER (Müller et al., 2021) (Figure 1K, Guicheteau et al.). Contrairement à ce qui est connu dans la littérature, nous n'observons pas de corrélation positive chez les souris contrôles. Cependant, nous observons une corrélation positive significative (ANCOVA) entre la masse corporelle et la dépense énergétique chez la souris *Slc20a2*^{-/-}. Par extrapolation, nous avons comparé la dépense énergétique des souris contrôles et *Slc20a2*^{-/-} qui auraient toute une masse corporelle égale à 25g. De manière intéressante, pour une masse corporelle identique la dépense énergétique des souris *Slc20a2*^{-/-} serait plus élevée que celle des souris contrôles suggérant que la différence de masse corporelle n'explique pas l'augmentation de la dépense énergétique observée chez les souris *Slc20a2*^{-/-}.

Dans cette étude, nous avons montré une diminution des concentrations d'IGF-1 chez les souris *Slc20a2*^{-/-}. De manière intéressante, le groupe de recherche dans lequel j'effectue ma thèse a effectué un criblage double hybride et a identifié 37 partenaires protéiques de PiT2 (non publiés). Parmi les partenaires potentiels, nous avons identifié PAPP-A (Pregnancy-associated plasma protein-A) et confirmé son interaction physique avec la large boucle intracellulaire de PiT2 par co-immunoprécipitation (données personnelles non publiées). Il est intéressant de noter que PAPP-A se lie et clive les protéines de liaison à l'IGF (IGFBP, IGF Binding protein), ce qui entraîne une augmentation d'IGF-1 (Conover and Oxvig, 2023). L'un des mécanismes d'action potentiels de PiT2 sur le métabolisme énergétique pourrait donc impliquer la liaison de PAPP-A, la séquestration de son activité et la limitation de la dégradation des IGFBP, conduisant à une concentration sérique normale d'IGF-1. Une délétion de PiT2 déséquilibrerait le rapport PAPP-A/IGFBP, entraînant une dérégulation de la concentration d'IGF-1 et des conséquences métaboliques liées au phénotype observé. Les concentrations sériques réduites d'IGF-1 chez les souris mutantes peuvent également jouer un rôle dans le phénotype métabolique via l'axe de l'hormone de croissance (GH)/IGF-1. Cependant, nos données ne soutiennent pas

un rôle spécifique de la GH, mais plutôt de l'IGF-1. En effet, la GH est une hormone lipolytique, dont l'action conduit à une augmentation de la concentration d'acides gras libres circulants, à une résistance à l'insuline et à une diminution de la sécrétion d'adiponectine en inhibant la transcription du gène *AdipoQ*. Cependant, chez les souris *Slc20a2*^{-/-}, la concentration sérique acides gras libres et la tolérance à l'insuline ne sont pas altérées, ce qui ne suggère pas l'implication de la GH dans le phénotype de ces souris mutantes.

Origines du phénotype métabolique ?

Le muscle squelettique peut également participer à la dépense énergétique par le biais de la thermogénèse avec ou sans frissons. Nous n'avons jamais observé de frissons chez les souris *Slc20a2*^{-/-} ce qui suggérerait une augmentation de la thermogénèse avec frisson. Ensuite, l'analyse en cage métabolique des souris *Slc20a2*^{-/-} ne montre pas d'augmentation de l'activité physique pouvant expliquer l'augmentation de la dépense énergétique. Enfin, nous savons que les souris invalidées pour PiT2 spécifiquement dans les muscles striés, le cœur et le muscle squelettique ne présentent pas de phénotype (Chande *et al.*, 2020). Tous ces résultats indiquent que le muscle squelettique n'est probablement pas à l'origine de l'augmentation de la dépense énergétique en l'absence de PiT2.

L'absence de PiT2 spécifiquement dans les adipocytes n'induit pas de diminution de la masse grasse comme observé chez les souris *Slc20a2*^{-/-}. Ces résultats montrent que la seule perte de PiT2 dans les adipocytes n'est pas à l'origine du phénotype observé. De manière intéressante, nous montrons que la perte de PiT2 dans le tissu adipeux blanc inguinal augmente l'expression de PiT1 dans le modèle *Slc20a2*^{AdKO}. Nous pouvons émettre l'hypothèse que la perte de PiT2 est compensée par l'augmentation de l'expression de PiT1. Afin de connaître l'implication de ces deux protéines dans ce modèle, une double invalidation de PiT1 et de PiT2 pourrait nous apporter des réponses.

Si la perte de PiT2 dans les adipocytes n'est pas la cause directe du phénotype des souris *Slc20a2*^{-/-}, il est probable que la perte de PiT2 dans un autre organe ayant un impact sur les adipocytes en soit responsable. *Slc20a2* est fortement exprimé dans le cerveau (Ramos-Brossier *et al.*, 2024), nous avons donc émis l'hypothèse que PiT2 régule le métabolisme énergétique par son action dans le système nerveux central et particulièrement l'hypothalamus. Afin de valider notre hypothèse, nous avons commencé un travail collaboratif avec l'équipe de Franck OURY (INEM, Paris) et Stéphanie MORICEAU (SFR Necker, Paris), dans le but d'invalider PiT2 spécifiquement dans l'hypothalamus en injectant par stéréotaxie des AAV-shPiT2 ou des AAV contrôles (ShScramble). La caractérisation de ce modèle se poursuivra après ma thèse.

Phosphate, transport de phosphate et métabolisme énergétique

Dans notre étude, nous n'avons pas identifié les mécanismes d'action par lesquels PiT2 régule la masse des tissus adipeux et l'augmentation de l'activité du tissu adipeux brun. PiT2 est une protéine multifonctionnelle dont les fonctions sont dépendantes ou indépendantes du transport de Pi. Le phosphate est un élément essentiel dans la régulation du métabolisme énergétique, par exemple, il est indispensable pour la synthèse de l'ATP à partir d'ADP ou la phosphorylation globale dans la cellule. Une hypothèse mécanistique est que l'invalidation de PiT2 conduit à une diminution du transport de phosphate de l'extérieur vers l'intérieur des cellules aboutissant à une dérégulation de l'homéostasie intracellulaire du phosphate. La diminution du transport du phosphate dans les cellules pourrait dérégler la fonction mitochondriale ou la phosphorylation de protéines essentielles qui participent à la thermogénèse (Hunter, 2012). Cependant, nous montrons une augmentation de la phosphorylation de HSL dans les adipocytes bruns et un niveau similaire d'ATP dans le BAT et l'iWAT des souris *Slc20a2*^{-/-} par rapport aux souris contrôles (non montré), ce qui suggère que le phosphate intracellulaire n'est pas perturbé chez ces souris. En cohérence avec nos résultats, Lopez-Sanchez et ses collègues ont montré que

l'absorption et l'efflux de phosphate sont liés. En effet, la suppression de PiT2 dans les cellules HAP1 (HAP1-PiT2KO) entraîne une diminution compensatoire de l'efflux en réponse à la diminution de l'import de phosphate dans les cellules, ce qui permet de maintenir un niveau stable d'ATP intracellulaire (López-Sánchez *et al.*, 2020). Ces éléments ne sont pas en faveur d'une perturbation du phosphate intracellulaire chez les souris invalidées pour PiT2.

Rôle de PiT2 indépendant de sa capacité à transporter le phosphate ?

Une autre hypothèse mécanistique est l'interaction entre la large boucle intracellulaire de PiT2 et une protéine partenaire, de la même manière que l'interaction de PiT1 avec USP7 permet de réguler le métabolisme glucidique (Forand *et al.*, 2016). Le criblage double hybride a également permis d'identifier la protéine FHL2 (Four-and-a-Half LIM domain protein 2) comme partenaire protéique, dont nous avons ensuite validé l'interaction avec PiT2 par immunoprécipitation dans des cellules HEK293T. Au moins 3 articles décrivent le rôle de FHL2 dans le métabolisme énergétique. Premièrement, Marie CLEMENTE-OLIVO et ses collègues montrent que l'expression de FHL2 est augmentée dans les tissus adipeux des patients obèses en comparaison aux patients sains (Clemente-Olivo *et al.*, 2021). De plus, chez la souris, l'expression de FHL2 est positivement corrélée à la masse corporelle, aux concentrations de leptine sérique (Clemente-Olivo *et al.*, 2021) et d'hémoglobine glyquée (Habibe *et al.*, 2022) indiquant que FHL2 pourrait avoir un rôle dans l'obésité. Clemente-Olivo et ses collègues ont démontré que la délétion de FHL2 chez la souris induit une résistance à l'obésité induite par un régime riche en gras et une augmentation de la dépense énergétique. Dans leur étude, ils ont proposé l'implication de FHL2 en tant que facteur de co-régulation de PGC1 α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha), impliqué dans la biogenèse mitochondriale et les programmes thermogéniques. Cela suggère que la délétion de FHL2 induit une augmentation de l'expression de Pgc1 α . Il est intéressant de noter que,

dans notre modèle, nous avons également observé une augmentation de l'expression de Pgc1 α dans les tissus adipeux. Il est donc tentant d'émettre l'hypothèse que l'interaction de PiT2 et de FHL2 puisse réprimer la transcription de Pgc1 α . D'autant plus que la large boucle intracellulaire de PiT2 (iLoop2) contient un signal de localisation nucléaire (NLS) et que, lors d'un clivage potentiel, il pourrait être transloqué dans le noyau en complexe avec Fhl2 et avoir un effet transcriptionnel, notamment sur la régulation de la transcription de Pgc1 α . Des données non publiées de notre groupe ont en effet décrit une localisation nucléaire pour l'iLoop2 transfecté (Figure 40).

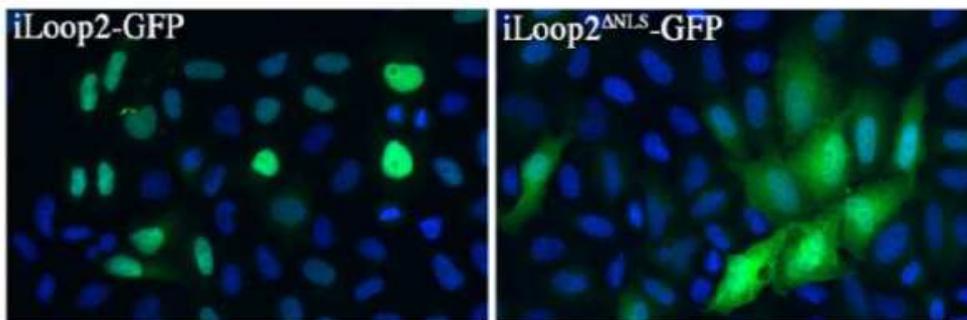


Figure 40 : Localisation de l'iLoop2 dans le noyau. Données non publiées de notre laboratoire montrant la localisation d'iLoop2 dans le noyau des cellules HEK293T.

Une autre étude, par le groupe de Hellerband, étudie le rôle de FHL2 dans le métabolisme énergétique et l'obésité (Sommer *et al.*, 2023). Tout d'abord, leur étude confirme la résistance à l'obésité observée dans l'étude de Clemente-Olivo quelques années plus tôt. Les auteurs montrent une augmentation de la dépense énergétique et de l'expression d'UCP1 chez les souris *FHL2*^{-/-} sous régime riche en gras. En inhibant FHL2 dans les cellules 3T3-L1 différenciées en adipocytes, les auteurs ne montrent pas de différence d'expression de marqueurs clés du métabolisme lipidique, incluant Ucp1, suggérant que l'inhibition de FHL2 dans les adipocytes n'est pas la cause du phénotype des souris *FHL2*^{-/-}. Ce résultat est à vérifier dans d'autres modèles cellulaires comme des adipocytes primaires de souris *FHL2*^{-/-}. Les auteurs montrent que la délétion de FHL2 dans les macrophages serait la cause de la résistance à l'obésité. L'inactivation de FHL2 dans les macrophages diminue l'expression de NPY et de MCP-1. NPY dans les

adipocytes diminue l'expression d'UCP1 et MCP-1 augmente le recrutement de monocytes et donc l'augmentation de l'inflammation dans les adipocytes induisant une dysfonction des tissus adipeux (Figure 41).

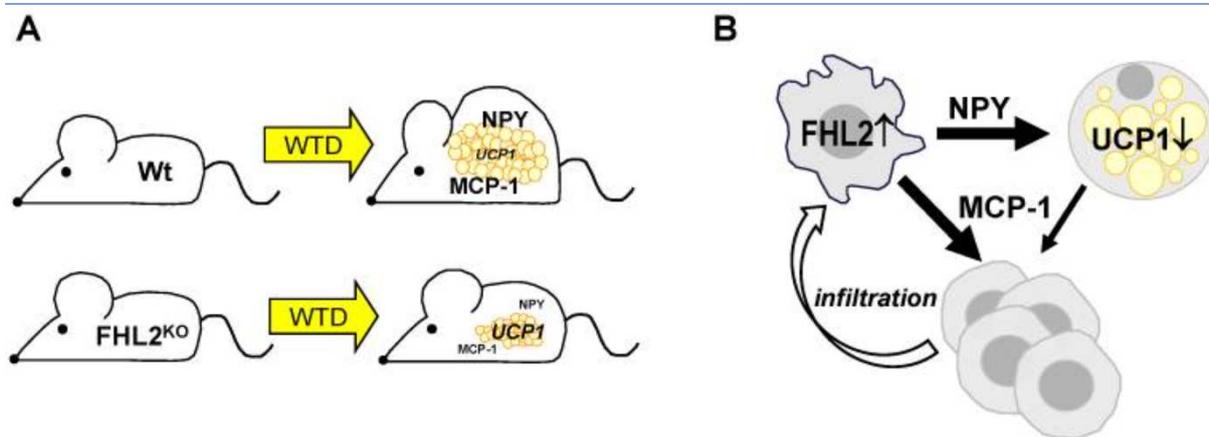


Figure 41 : Proposition de mécanismes sur l'effet de l'absence de FHL2 dans un modèle d'obésité. **A.** Les souris $FHL2^{-/-}$ sont protégées contre le régime obésogène (WTD) et présentent une expression réduite de NPY et de MCP-1 dans le tissu adipeux viscéral (VAT). De plus, les souris $FHL2^{-/-}$ présentent une augmentation de l'expression d'UCP1, et, en accord avec cela, une dépense énergétique augmentée. **B.** Les macrophages sont la source cellulaire de l'augmentation de l'expression de FHL2 dans le VAT. L'inactivation de FHL2 dans les macrophages réduit l'expression de NPY ainsi que de MCP-1. Dans les adipocytes, le NPY inhibe l'expression de l'UCP1 mais induit l'expression et la sécrétion de la MCP-1. Le MCP-1 des macrophages et des adipocytes peut contribuer au recrutement de monocytes dans le VAT. Figure extraite de l'article du groupe de Hellerband (Sommer et al., 2023).

Il est intéressant de noter que FHL2 est un interactant commun des boucles intracellulaires de PiT2 et PiT1. Dans la délétion globale de PiT2, il n'y a pas d'expression compensatoire de PiT1, mais nous avons observé une augmentation de l'expression de PiT1 dans les adipocytes des souris $Slc20a2^{AdKO}$. Une hypothèse dans ce modèle serait qu'il puisse exister un mécanisme compensatoire par lequel PiT1 prendrait le relais de PiT2 et interagirait avec FHL2. Ces hypothèses encourageantes sur le rôle de PiT1, PiT2 et FHL2 dans le métabolisme énergétique nécessitent d'autres études pour évaluer l'interaction entre ces protéines dans ce contexte.

CONCLUSION

Il n'est pas simple de résumer 3 années de thèse en quelques lignes. Un projet de thèse est semé d'embûches et pleins de surprises (et quelles surprises... !!). Ce projet a débuté comme un pari scientifique où nous montrons finalement un nouveau rôle de PiT2 dans le métabolisme et notamment l'activité du tissu adipeux brun. Ce résultat est d'autant plus intéressant que la stimulation de l'activité du tissu adipeux brun apparaît comme une nouvelle cible thérapeutique dans le traitement de l'obésité afin de rétablir une balance énergétique stable. Cependant, il reste encore de nombreuses questions en suspens notamment sur l'origine de ce phénotype et les mécanismes moléculaires impliqués. La découverte des mécanismes d'action est essentielle afin d'envisager PiT2 comme une solution thérapeutique dans le traitement de l'obésité. En effet, ses rôles multiples tels que la qualité et la solidité osseuse, la minéralisation de la dentine ou encore les calcifications vasculaires impliquent de développer des cibles thérapeutiques spécifiques. Par exemple, l'inhibition de l'interaction de PiT2 avec un partenaire protéique pourrait être une solution envisageable pour cibler spécifiquement l'activation du tissu adipeux brun et ainsi lutter contre l'obésité. Il est donc nécessaire d'élucider les mécanismes d'action mis en jeu dans ce contexte qui, j'espère de tout cœur, feront l'objet d'une prochaine étude.

Au-delà des résultats scientifiques, cette thèse, et particulièrement les personnes qui ont participé à ce travail, m'ont permis de grandir scientifiquement et personnellement et je leur en suis très reconnaissante. J'ai appris l'importance de la rigueur scientifique, de la démarche bibliographique, de la résilience mais surtout de l'importance de travailler en équipe et avec les bons collaborateurs. Parce qu'après tout, toute seule, rien n'aurait été possible.

LISTE DE PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publications :

Marie Guicheteau, Stéphanie Moriceau, Marie Palard, Gwendoline Boittelle, Giulia Frangi, Rola Shaaban, Laurent Beck, Xavier Prieur and Sarah Beck-Cormier. **Loss of *Slc20a2*/PiT2 in mice leads to reduced fat mass through increased brown adipose tissue activity.** En cours de soumission à Molecular Metabolism.

Frangi G, Guicheteau M, Jacquot F, Pyka G, Kerckhofs G, Feyeux M, Veziers J, Guihard P, Halgand B, Sourice S, Guicheux J, Prieur X, Beck L, Beck-Cormier S. **PiT2 deficiency prevents increase of bone marrow adipose tissue during skeletal maturation but not in OVX-induced osteoporosis.** Front Endocrinol (Lausanne). 2022 Nov

Communications orales :

M.Guicheteau, G. Frangi, Kerckhofs G, S. Sourice, L. Beck, X. Prieur, et S. Beck-Cormier. **PiT2 : cible thérapeutique potentielle dans le traitement de l'obésité ? Effets de l'absence de PiT2 sur le tissu osseux et les tissus adipeux dans deux modèles pathologiques chez la souris : obésité et restriction calorique.** 36ème congrès de la Société Française de Rhumatologie. 2023

Guicheteau M., Moriceau S., Palard M., Shaban G., Frangi G., Sourice S., Prieur X., Beck L. and Beck-Cormier S. **Rôle de *SLC20A2*/PiT2 dans le métabolisme énergétique et la thermogénèse.** Congrès annuel de la Société Francophone du Diabète. 2023

M. Guicheteau, S. Moriceau, G. Frangi, S. Sourice, X. Prieur, L. Beck et S. Beck-Cormier. **PiT2 : nouveau régulateur du métabolisme énergétique ?** 39èmes journées scientifiques de l'Association Française d'Etude et de Recherche sur l'Obésité. 2023. **Prix de la meilleure présentation orale.**

Guicheteau M., Moriceau S., Frangi G., Sourice S., Prieur X., Beck L. and Beck-Cormier S. **Invalidation of PiT2 in mice leads to an increase in energy expenditure through a UCP1-independent thermogenesis mechanism.** 38ème congrès de la Société Française d'Endocrinologie. 2022

Posters :

M.Guicheteau, S. Moriceau, M. Palard, R. Shaban, G. Frangi, S. Sourice, L. Beck, X. Prieur, et S. Beck-Cormier. **PiT2 : cible thérapeutique potentielle dans le traitement de l'obésité ?** 40èmes journées scientifiques de l'Association Française d'Etude et de Recherche sur l'Obésité. 2024

Vie associative :

Co-présidente de l'association Nan'thèse ADBS (2022-2024)

- Organisation d'événements scientifiques et de cohésion à destination des doctorants de l'école doctorale biologie santé
- Organisation de deux congrès pour les doctorants et master 2
- Présidence des réunion bureau
- Demande de financement

REFERENCES

- Abella, E. *et al.* (2002) 'Bone marrow changes in anorexia nervosa are correlated with the amount of weight loss and not with other clinical findings', *American Journal of Clinical Pathology*, 118(4), pp. 582–588. Available at: <https://doi.org/10.1309/2Y7X-YDXK-006B-XLT2>.
- Abu-Odeh, M. *et al.* (2021) 'FGF21 promotes thermogenic gene expression as an autocrine factor in adipocytes', *Cell Reports*, 35(13), p. 109331. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109331>.
- Achari, A.E. and Jain, S.K. (2017) 'Adiponectin, a Therapeutic Target for Obesity, Diabetes, and Endothelial Dysfunction', *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), p. 1321. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms18061321>.
- Adams, A.C. *et al.* (2012) 'The breadth of FGF21's metabolic actions are governed by FGFR1 in adipose tissue', *Molecular Metabolism*, 2(1), pp. 31–37. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2012.08.007>.
- Ahmad, B. *et al.* (2021) 'Brown/Beige adipose tissues and the emerging role of their secretory factors in improving metabolic health: The batokines', *Biochimie*, 184, pp. 26–39. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2021.01.015>.
- Ambrosi, T.H. *et al.* (2017) 'Adipocyte Accumulation in the Bone Marrow during Obesity and Aging Impairs Stem Cell-Based Hematopoietic and Bone Regeneration', *Cell Stem Cell*, 20(6), pp. 771–784.e6. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.02.009>.
- Ameer, F. *et al.* (2014) 'De novo lipogenesis in health and disease', *Metabolism*, 63(7), pp. 895–902. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.04.003>.
- Anunciado-Koza, R. *et al.* (2008) 'Inactivation of UCP1 and the Glycerol Phosphate Cycle Synergistically Increases Energy Expenditure to Resist Diet-induced Obesity', *Journal of Biological Chemistry*, 283(41), pp. 27688–27697. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M804268200>.
- Anunciado-Koza, R.P. *et al.* (2011) 'Inactivation of the Mitochondrial Carrier SLC25A25 (ATP-Mg²⁺/Pi Transporter) Reduces Physical Endurance and Metabolic Efficiency in Mice', *The Journal of Biological Chemistry*, 286(13), pp. 11659–11671. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.203000>.
- Arita, Y. *et al.* (1999) 'Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 257(1), pp. 79–83. Available at: <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0255>.
- Armas, L.A.G. and Recker, R.R. (2012) 'Pathophysiology of osteoporosis: new mechanistic insights', *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 41(3), pp. 475–486. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2012.04.006>.
- Arroyo-Johnson, C. and Mincey, K.D. (2016) 'Obesity Epidemiology Worldwide', *Gastroenterology Clinics of North America*, 45(4), pp. 571–579. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2016.07.012>.
- Attané, C. *et al.* (2020) 'Human Bone Marrow Is Comprised of Adipocytes with Specific Lipid Metabolism', *Cell Reports*, 30(4), pp. 949–958.e6. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.12.089>.

- Bachman, E.S. *et al.* (2002) 'βAR Signaling Required for Diet-Induced Thermogenesis and Obesity Resistance', *Science*, 297(5582), pp. 843–845. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1073160>.
- Bado, A. *et al.* (1998) 'The stomach is a source of leptin', *Nature*, 394(6695), pp. 790–793. Available at: <https://doi.org/10.1038/29547>.
- Banting, F.G. *et al.* (1922) 'Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus', *Canadian Medical Association Journal*, 12(3), pp. 141–146.
- Barbatelli, G. *et al.* (2010) 'The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation', *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 298(6), pp. E1244–1253. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00600.2009>.
- Bardova, K. *et al.* (2020) 'Additive Effects of Omega-3 Fatty Acids and Thiazolidinediones in Mice Fed a High-Fat Diet: Triacylglycerol/Fatty Acid Cycling in Adipose Tissue', *Nutrients*, 12(12), p. 3737. Available at: <https://doi.org/10.3390/nu12123737>.
- Beck, L. *et al.* (2009) 'Identification of a novel function of PiT1 critical for cell proliferation and independent of its phosphate transport activity', *The Journal of Biological Chemistry*, 284(45), pp. 31363–31374. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.053132>.
- Beck, L. *et al.* (2010) 'The phosphate transporter PiT1 (Slc20a1) revealed as a new essential gene for mouse liver development', *PloS One*, 5(2), p. e9148. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009148>.
- Beck-Cormier, S. *et al.* (2019) 'Slc20a2, Encoding the Phosphate Transporter PiT2, Is an Important Genetic Determinant of Bone Quality and Strength', *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 34(6), pp. 1101–1114. Available at: <https://doi.org/10.1002/jbmr.3691>.
- Bertholet, A.M. *et al.* (2017) 'Mitochondrial Patch Clamp of Beige Adipocytes Reveals UCP1-Positive and UCP1-Negative Cells Both Exhibiting Futile Creatine Cycling', *Cell Metabolism*, 25(4), pp. 811–822.e4. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.03.002>.
- Bertholet, A.M. *et al.* (2019) 'H⁺ Transport is an Integral Function of the Mitochondrial ADP/ATP Carrier', *Nature*, 571(7766), pp. 515–520. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1400-3>.
- Bertholet, A.M. and Kirichok, Y. (2017) 'UCP1: A transporter for H⁺ and fatty acid anions', *Biochimie*, 134, pp. 28–34. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.10.013>.
- Bertrand, H.A. *et al.* (1980) 'Changes in adipose mass and cellularity through the adult life of rats fed ad libitum or a life-prolonging restricted diet', *Journal of Gerontology*, 35(6), pp. 827–835. Available at: <https://doi.org/10.1093/geronj/35.6.827>.
- Biagi, C.A.O. *et al.* (2021) 'Multidimensional Single-Nuclei RNA-Seq Reconstruction of Adipose Tissue Reveals Adipocyte Plasticity Underlying Thermogenic Response', *Cells*, 10(11), p. 3073. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells10113073>.
- Billon, N. *et al.* (2007) 'The generation of adipocytes by the neural crest', *Development*, 134(12), pp. 2283–2292. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.002642>.

- Blondin, D.P. *et al.* (2020) 'Human Brown Adipocyte Thermogenesis Is Driven by β 2-AR Stimulation', *Cell Metabolism*, 32(2), pp. 287-300.e7. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.07.005>.
- Blüher, S., Kratzsch, J. and Kiess, W. (2005) 'Insulin-like growth factor I, growth hormone and insulin in white adipose tissue', *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, 19(4), pp. 577–587. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.beem.2005.07.011>.
- Boden, G. *et al.* (1996) 'Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 81(9), pp. 3419–3423. Available at: <https://doi.org/10.1210/jcem.81.9.8784108>.
- Bon, N., Couasnay, G., *et al.* (2018) 'Phosphate (Pi)-regulated heterodimerization of the high-affinity sodium-dependent Pi transporters PiT1/Slc20a1 and PiT2/Slc20a2 underlies extracellular Pi sensing independently of Pi uptake', *The Journal of Biological Chemistry*, 293(6), pp. 2102–2114. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.807339>.
- Bon, N., Frangi, G., *et al.* (2018) 'Phosphate-dependent FGF23 secretion is modulated by PiT2/Slc20a2', *Molecular Metabolism*, 11, pp. 197–204. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.02.007>.
- Bordicchia, M. *et al.* (2012) 'Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes', *The Journal of Clinical Investigation*, 122(3), pp. 1022–1036. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI59701>.
- Bornstein, S. *et al.* (2014) 'FGF-21 and skeletal remodeling during and after lactation in C57BL/6J mice', *Endocrinology*, 155(9), pp. 3516–3526. Available at: <https://doi.org/10.1210/en.2014-1083>.
- Bøttger, P. and Pedersen, L. (2011) 'Mapping of the minimal inorganic phosphate transporting unit of human PiT2 suggests a structure universal to PiT-related proteins from all kingdoms of life', *BMC Biochemistry*, 12, p. 21. Available at: <https://doi.org/10.1186/1471-2091-12-21>.
- Boucher, J. *et al.* (2012) 'Impaired thermogenesis and adipose tissue development in mice with fat-specific disruption of insulin and IGF-1 signalling', *Nature Communications*, 3, p. 902. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncomms1905>.
- Boulet, N. *et al.* (2022) 'The Sexual Dimorphism of Human Adipose Depots', *Biomedicines*, 10(10), p. 2615. Available at: <https://doi.org/10.3390/biomedicines10102615>.
- Boutant, M. *et al.* (2017) 'Mfn2 is critical for brown adipose tissue thermogenic function', *The EMBO Journal*, 36(11), pp. 1543–1558. Available at: <https://doi.org/10.15252/embj.201694914>.
- Boxall, S.A. and Jones, E. (2012) 'Markers for characterization of bone marrow multipotential stromal cells', *Stem Cells International*, 2012, p. 975871. Available at: <https://doi.org/10.1155/2012/975871>.
- Bredella, M.A. *et al.* (2009) 'Increased Bone Marrow Fat in Anorexia Nervosa', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 94(6), pp. 2129–2136. Available at: <https://doi.org/10.1210/jc.2008-2532>.
- Briolay, A., Bessueille, L. and Magne, D. (2021) 'TNAP: A New Multitask Enzyme in Energy Metabolism', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), p. 10470. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms221910470>.

- Brownstein, A.J. *et al.* (2022) 'ATP-consuming futile cycles as energy dissipating mechanisms to counteract obesity', *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, 23(1), pp. 121–131. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11154-021-09690-w>.
- Cannon, B. and Nedergaard, J. (2004) 'Brown adipose tissue: function and physiological significance', *Physiological Reviews*, 84(1), pp. 277–359. Available at: <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2003>.
- Cao, W. *et al.* (2004) 'p38 mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene', *Molecular and Cellular Biology*, 24(7), pp. 3057–3067. Available at: <https://doi.org/10.1128/MCB.24.7.3057-3067.2004>.
- Carbonetti, M.P., Almeida-Oliveira, F. and Majerowicz, D. (2023) 'Use of FGF21 analogs for the treatment of metabolic disorders: a systematic review and meta-analysis', *Archives of Endocrinology and Metabolism*, 68, p. e220493. Available at: <https://doi.org/10.20945/2359-4292-2022-0493>.
- Carper, D. *et al.* (2020) 'Atrial Natriuretic Peptide Orchestrates a Coordinated Physiological Response to Fuel Non-shivering Thermogenesis', *Cell Reports*, 32(8), p. 108075. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108075>.
- Castillo-Armengol, J., Fajas, L. and Lopez-Mejia, I.C. (2019) 'Inter-organ communication: a gatekeeper for metabolic health', *EMBO reports*, 20(9), p. e47903. Available at: <https://doi.org/10.15252/embr.201947903>.
- Cawthorn, W.P. *et al.* (2014) 'Bone marrow adipose tissue is an endocrine organ that contributes to increased circulating adiponectin during caloric restriction', *Cell Metabolism*, 20(2), pp. 368–375. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.06.003>.
- Cawthorn, W.P. *et al.* (2016) 'Expansion of Bone Marrow Adipose Tissue During Caloric Restriction Is Associated With Increased Circulating Glucocorticoids and Not With Hypoleptinemia', *Endocrinology*, 157(2), pp. 508–521. Available at: <https://doi.org/10.1210/en.2015-1477>.
- Chande, S. *et al.* (2020) 'Slc20a1/Pit1 and Slc20a2/Pit2 are essential for normal skeletal myofiber function and survival', *Scientific Reports*, 10(1), p. 3069. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59430-4>.
- Chartoumpakis, D.V. *et al.* (2011) 'Brown Adipose Tissue Responds to Cold and Adrenergic Stimulation by Induction of FGF21', *Molecular Medicine*, 17(7), pp. 736–740. Available at: <https://doi.org/10.2119/molmed.2011.00075>.
- Chavkin, N.W. *et al.* (2015) 'Phosphate uptake-independent signaling functions of the type III sodium-dependent phosphate transporter, PiT-1, in vascular smooth muscle cells', *Experimental Cell Research*, 333(1), pp. 39–48. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.02.002>.
- Chen, M.Z. *et al.* (2017) 'FGF21 mimetic antibody stimulates UCP1-independent brown fat thermogenesis via FGFR1/ β Klotho complex in non-adipocytes', *Molecular Metabolism*, 6(11), pp. 1454–1467. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.09.003>.
- Cheng, L. *et al.* (2021) 'Brown and beige adipose tissue: a novel therapeutic strategy for obesity and type 2 diabetes mellitus', *Adipocyte*, 10(1), pp. 48–65. Available at: <https://doi.org/10.1080/21623945.2020.1870060>.

- Cheng, X. *et al.* (2024) 'Astrocytes modulate brain phosphate homeostasis via polarized distribution of phosphate uptake transporter PiT2 and exporter XPR1', *Neuron*, pp. S0896-6273(24)00455-0. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2024.06.020>.
- Chougule, A. *et al.* (2023) 'Osteocytes contribute via nuclear receptor PPAR-alpha to maintenance of bone and systemic energy metabolism', *Frontiers in Endocrinology*, 14, p. 1145467. Available at: <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1145467>.
- Clemente-Olivo, M.P. *et al.* (2021) 'Four-and-a-half LIM domain protein 2 (FHL2) deficiency protects mice from diet-induced obesity and high FHL2 expression marks human obesity', *Metabolism: Clinical and Experimental*, 121, p. 154815. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2021.154815>.
- Collins, S., Yehuda-Shnaidman, E. and Wang, H. (2010) 'Positive and negative control of Ucp1 gene transcription and the role of β -adrenergic signaling networks', *International Journal of Obesity*, 34(1), pp. S28–S33. Available at: <https://doi.org/10.1038/ijo.2010.180>.
- Conover, C.A. and Oxvig, C. (2023) 'The Pregnancy-Associated Plasma Protein-A (PAPP-A) Story', *Endocrine Reviews*, 44(6), pp. 1012–1028. Available at: <https://doi.org/10.1210/endrev/bnad017>.
- Corrigan, J.K. *et al.* (2020) 'A big-data approach to understanding metabolic rate and response to obesity in laboratory mice', *eLife*, 9, p. e53560. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.53560>.
- Couasnay, G. *et al.* (2019) 'PiT1/Slc20a1 Is Required for Endoplasmic Reticulum Homeostasis, Chondrocyte Survival, and Skeletal Development', *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 34(2), pp. 387–398. Available at: <https://doi.org/10.1002/jbmr.3609>.
- Craft, C.S. *et al.* (2019) 'Bone marrow adipose tissue does not express UCP1 during development or adrenergic-induced remodeling', *Scientific Reports*, 9(1), p. 17427. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54036-x>.
- Crichton, P.G., Lee, Y. and Kunji, E.R.S. (2017) 'The molecular features of uncoupling protein 1 support a conventional mitochondrial carrier-like mechanism', *Biochimie*, 134, pp. 35–50. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.12.016>.
- Crouthamel, M.H. *et al.* (2013) 'Sodium-dependent phosphate cotransporters and phosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells: redundant roles for PiT-1 and PiT-2', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(11), pp. 2625–2632. Available at: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.302249>.
- Cypess, A.M. *et al.* (2009) 'Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans', *New England Journal of Medicine*, 360(15), pp. 1509–1517. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0810780>.
- Davis, T.R.A. *et al.* (1960) 'Regulation of shivering and nonshivering heat production during acclimation of rats', *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 198(3), pp. 471–475. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1960.198.3.471>.
- De Paula, F.J.A. and Rosen, C.J. (2020) 'Marrow Adipocytes: Origin, Structure, and Function', *Annual Review of Physiology*, 82(1), pp. 461–484. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021119-034513>.

- Devlin, M.J. *et al.* (2010) 'Caloric restriction leads to high marrow adiposity and low bone mass in growing mice', *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 25(9), pp. 2078–2088. Available at: <https://doi.org/10.1002/jbmr.82>.
- Di Iorgi, N. *et al.* (2010) 'Bone acquisition in healthy young females is reciprocally related to marrow adiposity', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 95(6), pp. 2977–2982. Available at: <https://doi.org/10.1210/jc.2009-2336>.
- Dimitriadis, G.D. *et al.* (2021) 'Regulation of Postabsorptive and Postprandial Glucose Metabolism by Insulin-Dependent and Insulin-Independent Mechanisms: An Integrative Approach', *Nutrients*, 13(1), p. 159. Available at: <https://doi.org/10.3390/nu13010159>.
- Ding, X. *et al.* (2012) ' β Klotho is required for fibroblast growth factor 21 effects on growth and metabolism', *Cell Metabolism*, 16(3), pp. 387–393. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.08.002>.
- DiPilato, L.M. *et al.* (2015) 'The Role of PDE3B Phosphorylation in the Inhibition of Lipolysis by Insulin', *Molecular and Cellular Biology*, 35(16), pp. 2752–2760. Available at: <https://doi.org/10.1128/MCB.00422-15>.
- Doucette, C.R. *et al.* (2015) 'A High Fat Diet Increases Bone Marrow Adipose Tissue (MAT) But Does Not Alter Trabecular or Cortical Bone Mass in C57BL/6J Mice', *Journal of Cellular Physiology*, 230(9), pp. 2032–2037. Available at: <https://doi.org/10.1002/jcp.24954>.
- Ducharme, N.A. and Bickel, P.E. (2008) 'Minireview: Lipid Droplets in Lipogenesis and Lipolysis', *Endocrinology*, 149(3), pp. 942–949. Available at: <https://doi.org/10.1210/en.2007-1713>.
- Eguchi, J. *et al.* (2011) 'Transcriptional control of adipose lipid handling by IRF4', *Cell metabolism*, 13(3), pp. 249–259. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.02.005>.
- Elia, M. *et al.* (1987) 'The energy cost of triglyceride-fatty acid recycling in nonobese subjects after an overnight fast and four days of starvation', *Metabolism*, 36(3), pp. 251–255. Available at: [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(87\)90184-3](https://doi.org/10.1016/0026-0495(87)90184-3).
- Emery, J.L. and Follett, G.F. (1964) 'REGRESSION OF BONE-MARROW HAEMOPOIESIS FROM THE TERMINAL DIGITS IN THE FOETUS AND INFANT', *British Journal of Haematology*, 10, pp. 485–489. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1964.tb00725.x>.
- Enerbäck, S. *et al.* (1997) 'Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese', *Nature*, 387(6628), pp. 90–94. Available at: <https://doi.org/10.1038/387090a0>.
- Fang, F. *et al.* (2022) 'Unexpected role for IGF-1 in starvation: Maintenance of blood glucose', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(32), p. e2208855119. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.2208855119>.
- Fang, H. and Judd, R.L. (2018) 'Adiponectin Regulation and Function', *Comprehensive Physiology*, 8(3), pp. 1031–1063. Available at: <https://doi.org/10.1002/cphy.c170046>.
- Farmer, S.R. (2006) 'Transcriptional control of adipocyte formation', *Cell Metabolism*, 4(4), pp. 263–273. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.07.001>.

- Farrag, M. *et al.* (2022) 'Asprosin in health and disease, a new glucose sensor with central and peripheral metabolic effects', *Frontiers in Endocrinology*, 13, p. 1101091. Available at: <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1101091>.
- Fedorenko, A., Lishko, P.V. and Kirichok, Y. (2012) 'Mechanism of Fatty-Acid-Dependent UCP1 Uncoupling in Brown Fat Mitochondria', *Cell*, 151(2), pp. 400–413. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.010>.
- Fisher, ffolliott M. *et al.* (2012) 'FGF21 regulates PGC-1 α and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis', *Genes & Development*, 26(3), pp. 271–281. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.177857.111>.
- Flachs, P. *et al.* (2017) 'Induction of lipogenesis in white fat during cold exposure in mice: link to lean phenotype', *International Journal of Obesity*, 41(3), pp. 372–380. Available at: <https://doi.org/10.1038/ijo.2016.228>.
- Föger-Samwald, U. *et al.* (2020) 'Osteoporosis: Pathophysiology and therapeutic options', *EXCLI Journal*, 19, pp. 1017–1037. Available at: <https://doi.org/10.17179/excli2020-2591>.
- Fontbonne, A. *et al.* (2023) 'Prevalence of Overweight and Obesity in France: The 2020 Obepi-Roche Study by the "Ligue Contre l'Obésité"', *Journal of Clinical Medicine*, 12(3), p. 925. Available at: <https://doi.org/10.3390/jcm12030925>.
- Forand, A. *et al.* (2013) 'EKLF-driven PIT1 expression is critical for mouse erythroid maturation in vivo and in vitro', *Blood*, 121(4), pp. 666–678. Available at: <https://doi.org/10.1182/blood-2012-05-427302>.
- Forand, A. *et al.* (2016) 'Disruption of the Phosphate Transporter Pit1 in Hepatocytes Improves Glucose Metabolism and Insulin Signaling by Modulating the USP7/IRS1 Interaction', *Cell Reports*, 16(10), pp. 2736–2748. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.08.012>.
- Forster, I.C. *et al.* (2013) 'Phosphate transporters of the SLC20 and SLC34 families', *Molecular Aspects of Medicine*, 34(2–3), pp. 386–395. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.007>.
- Frangi, G. *et al.* (2022) 'Pit2 deficiency prevents increase of bone marrow adipose tissue during skeletal maturation but not in OVX-induced osteoporosis', *Frontiers in Endocrinology*, 13, p. 921073. Available at: <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.921073>.
- Frederich, R.C. *et al.* (1995) 'Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action', *Nature Medicine*, 1(12), pp. 1311–1314. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm1295-1311>.
- Freychet, P., Roth, J. and Neville, D.M. (1971) 'Insulin Receptors in the Liver: Specific Binding of [125I]Insulin to the Plasma Membrane and Its Relation to Insulin Bioactivity', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68(8), pp. 1833–1837.
- Fried, S.K. *et al.* (1993) 'Lipoprotein lipase regulation by insulin and glucocorticoid in subcutaneous and omental adipose tissues of obese women and men.', *The Journal of Clinical Investigation*, 92(5), pp. 2191–2198. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI116821>.
- Frontini, A. and Cinti, S. (2010) 'Distribution and development of brown adipocytes in the murine and human adipose organ', *Cell Metabolism*, 11(4), pp. 253–256. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.03.004>.

- Gamu, D. and Tupling, A.R. (2017) 'Fattening the role of Ca²⁺ cycling in adaptive thermogenesis', *Nature Medicine*, 23(12), pp. 1403–1404. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm.4457>.
- Gavin, K.M. *et al.* (2018) 'Ovarian Hormones Regulate the Production of Adipocytes From Bone Marrow-Derived Cells', *Frontiers in Endocrinology*, 9. Available at: <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00276>.
- Geng, L., Lam, K.S.L. and Xu, A. (2020) 'The therapeutic potential of FGF21 in metabolic diseases: from bench to clinic', *Nature Reviews Endocrinology*, 16(11), pp. 654–667. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41574-020-0386-0>.
- Gimble, J.M. *et al.* (2006) 'Playing with bone and fat', *Journal of Cellular Biochemistry*, 98(2), pp. 251–266. Available at: <https://doi.org/10.1002/jcb.20777>.
- Gkika, D. *et al.* (2020) 'Testosterone-androgen receptor: The steroid link inhibiting TRPM8-mediated cold sensitivity', *The FASEB Journal*, 34(6), pp. 7483–7499. Available at: <https://doi.org/10.1096/fj.201902270R>.
- Glatz, J.F.C., Luiken, J.J.F.P. and Bonen, A. (2010) 'Membrane Fatty Acid Transporters as Regulators of Lipid Metabolism: Implications for Metabolic Disease', *Physiological Reviews*, 90(1), pp. 367–417. Available at: <https://doi.org/10.1152/physrev.00003.2009>.
- Golozoubova, V. *et al.* (2001) 'Only UCP1 can mediate adaptive nonshivering thermogenesis in the cold', *The FASEB Journal*, 15(11), pp. 2048–2050. Available at: <https://doi.org/10.1096/fj.00-0536fje>.
- Goossens, G.H. (2017) 'The Metabolic Phenotype in Obesity: Fat Mass, Body Fat Distribution, and Adipose Tissue Function', *Obesity Facts*, 10(3), pp. 207–215. Available at: <https://doi.org/10.1159/000471488>.
- Gordon, C.J. (2017) 'The mouse thermoregulatory system: Its impact on translating biomedical data to humans', *Physiology & Behavior*, 179, pp. 55–66. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.05.026>.
- Grabner, G.F. *et al.* (2021) 'Lipolysis: cellular mechanisms for lipid mobilization from fat stores', *Nature Metabolism*, 3(11), pp. 1445–1465. Available at: <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00493-6>.
- Granneman, J.G. *et al.* (2003) 'White adipose tissue contributes to UCP1-independent thermogenesis', *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 285(6), pp. E1230–E1236. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00197.2003>.
- Greenberg, A.S. *et al.* (2001) 'Stimulation of lipolysis and hormone-sensitive lipase via the extracellular signal-regulated kinase pathway', *The Journal of Biological Chemistry*, 276(48), pp. 45456–45461. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M104436200>.
- Griffith, J.F. *et al.* (2012) 'Bone marrow fat content in the elderly: a reversal of sex difference seen in younger subjects', *Journal of magnetic resonance imaging: JMRI*, 36(1), pp. 225–230. Available at: <https://doi.org/10.1002/jmri.23619>.
- Guan, H.-P. *et al.* (2002) 'A futile metabolic cycle activated in adipocytes by antidiabetic agents', *Nature Medicine*, 8(10), pp. 1122–1128. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm780>.
- Gutzwiller, J. *et al.* (1999) 'Glucagon-like peptide-1: a potent regulator of food intake in humans', *Gut*, 44(1), pp. 81–86.

- Habibe, J.J. *et al.* (2022) 'Glucose-mediated insulin secretion is improved in FHL2-deficient mice and elevated FHL2 expression in humans is associated with type 2 diabetes', *Diabetologia* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00125-022-05750-1>.
- Haeusler, R.A., McGraw, T.E. and Accili, D. (2018) 'Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling', *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 19(1), pp. 31–44. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.89>.
- Hagemann, C.A. *et al.* (2022) 'LEAP2 reduces postprandial glucose excursions and ad libitum food intake in healthy men', *Cell Reports. Medicine*, 3(4), p. 100582. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2022.100582>.
- Hamdy, O., Porrmatikul, S. and Al-Ozairi, E. (2006) 'Metabolic obesity: the paradox between visceral and subcutaneous fat', *Current Diabetes Reviews*, 2(4), pp. 367–373. Available at: <https://doi.org/10.2174/1573399810602040367>.
- Hammond, V.A. and Johnston, D.G. (1987) 'Substrate cycling between triglyceride and fatty acid in human adipocytes', *Metabolism: Clinical and Experimental*, 36(4), pp. 308–313. Available at: [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(87\)90199-5](https://doi.org/10.1016/0026-0495(87)90199-5).
- Hamrick, M.W. *et al.* (2008) 'Caloric Restriction Decreases Cortical Bone Mass but Spares Trabecular Bone in the Mouse Skeleton: Implications for the Regulation of Bone Mass by Body Weight*', *Journal of Bone and Mineral Research*, 23(6), pp. 870–878. Available at: <https://doi.org/10.1359/jbmr.080213>.
- Hankir, M.K. and Klingenspor, M. (2018) 'Brown adipocyte glucose metabolism: a heated subject', *EMBO reports*, 19(9), p. e46404. Available at: <https://doi.org/10.15252/embr.201846404>.
- Harman, S.M. *et al.* (2001) 'Longitudinal effects of aging on serum total and free testosterone levels in healthy men. Baltimore Longitudinal Study of Aging', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86(2), pp. 724–731. Available at: <https://doi.org/10.1210/jcem.86.2.7219>.
- Heck, A.M., Yanovski, J.A. and Calis, K.A. (2000) 'Orlistat, a new lipase inhibitor for the management of obesity', *Pharmacotherapy*, 20(3), pp. 270–279. Available at: <https://doi.org/10.1592/phco.20.4.270.34882>.
- Heeren, J. and Scheja, L. (2018) 'Brown adipose tissue and lipid metabolism', *Current Opinion in Lipidology*, 29(3), pp. 180–185. Available at: <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000504>.
- Henry, S.L. *et al.* (2012) 'White adipocytes: more than just fat depots', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44(3), pp. 435–440. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.12.011>.
- Hill, J.O., Wyatt, H.R. and Peters, J.C. (2012) 'Energy balance and obesity', *Circulation*, 126(1), pp. 126–132. Available at: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.087213>.
- Hoggard, N. *et al.* (1997) 'Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(20), pp. 11073–11078.
- Hong, H. *et al.* (2017) 'Central IGF1 improves glucose tolerance and insulin sensitivity in mice', *Nutrition & Diabetes*, 7(12), p. 2. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41387-017-0002-0>.

- Hritani, R. *et al.* (2023) 'Obesity management for cardiovascular disease prevention', *Obesity Pillars*, 7, p. 100069. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.obpill.2023.100069>.
- Hui, S. *et al.* (2020) 'Quantitative Fluxomics of Circulating Metabolites', *Cell Metabolism*, 32(4), pp. 676-688.e4. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.07.013>.
- Hunter, T. (2012) 'Why nature chose phosphate to modify proteins', *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 367(1602), pp. 2513–2516. Available at: <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0013>.
- Ibrahim, M.M. (2010) 'Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences', *Obesity Reviews*, 11(1), pp. 11–18. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2009.00623.x>.
- Ikeda, K. *et al.* (2017) 'UCP1-independent signaling involving SERCA2b-mediated calcium cycling regulates beige fat thermogenesis and systemic glucose homeostasis', *Nature medicine*, 23(12), pp. 1454–1465. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm.4429>.
- Itoh, N. (2014) 'FGF21 as a Hepatokine, Adipokine, and Myokine in Metabolism and Diseases', *Frontiers in Endocrinology*, 5, p. 107. Available at: <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00107>.
- JafariNasabian, P. *et al.* (2017) 'Aging human body: changes in bone, muscle and body fat with consequent changes in nutrient intake', *Journal of Endocrinology*, 234(1), pp. R37–R51. Available at: <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0603>.
- Jene, T. *et al.* (2021) 'Chronic social stress lessens the metabolic effects induced by a high-fat diet', *Journal of Endocrinology*, 249(1), pp. 19–30. Available at: <https://doi.org/10.1530/JOE-20-0633>.
- Jensen, N. *et al.* (2018) 'Mice Knocked Out for the Primary Brain Calcification-Associated Gene Slc20a2 Show Unimpaired Prenatal Survival but Retarded Growth and Nodules in the Brain that Grow and Calcify Over Time', *The American Journal of Pathology*, 188(8), pp. 1865–1881. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2018.04.010>.
- Ji, T. *et al.* (2023) 'Diet Change Improves Obesity and Lipid Deposition in High-Fat Diet-Induced Mice', *Nutrients*, 15(23), p. 4978. Available at: <https://doi.org/10.3390/nu15234978>.
- Justesen, J. *et al.* (2001) 'Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis'.
- Kalderon, B. *et al.* (2000) 'Fatty acid cycling in the fasting rat', *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 279(1), pp. E221–E227. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.2000.279.1.E221>.
- Kamerlin, S.C.L. *et al.* (2013) 'Why nature really chose phosphate', *Quarterly Reviews of Biophysics*, 46(1), pp. 1–132. Available at: <https://doi.org/10.1017/S0033583512000157>.
- Kavanaugh, M.P. *et al.* (1994) 'Cell-surface receptors for gibbon ape leukemia virus and amphotropic murine retrovirus are inducible sodium-dependent phosphate symporters', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(15), pp. 7071–7075. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.91.15.7071>.
- Kawai, T., Autieri, M.V. and Scalia, R. (2021) 'Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity', *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 320(3), pp. C375–C391. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00379.2020>.

- Kazak, L. *et al.* (2015) 'A Creatine-Driven Substrate Cycle Enhances Energy Expenditure and Thermogenesis in Beige Fat', *Cell*, 163(3), pp. 643–655. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.035>.
- Kazak, L. *et al.* (2017) 'Genetic depletion of adipocyte creatine metabolism inhibits diet-induced thermogenesis and drives obesity', *Cell metabolism*, 26(4), pp. 660-671.e3. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.08.009>.
- Kazak, L. *et al.* (2019) 'Ablation of adipocyte creatine transport impairs thermogenesis and causes diet-induced obesity', *Nature Metabolism*, 1(3), pp. 360–370. Available at: <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0035-x>.
- Keipert, S. *et al.* (2015) 'Genetic disruption of uncoupling protein 1 in mice renders brown adipose tissue a significant source of FGF21 secretion', *Molecular Metabolism*, 4(7), pp. 537–542. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2015.04.006>.
- Kerckhofs, G. *et al.* (2018) 'Simultaneous three-dimensional visualization of mineralized and soft skeletal tissues by a novel microCT contrast agent with polyoxometalate structure', *Biomaterials*, 159, pp. 1–12. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.12.016>.
- Kersten, S. (2014) 'Physiological regulation of lipoprotein lipase', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1841(7), pp. 919–933. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2014.03.013>.
- Khoshniat, S. *et al.* (2011) 'The emergence of phosphate as a specific signaling molecule in bone and other cell types in mammals', *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 68(2), pp. 205–218. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0527-z>.
- Kimmel, A.R. and Sztalryd, C. (2016) 'The Perilipins: Major Cytosolic Lipid Droplet-Associated Proteins and Their Roles in Cellular Lipid Storage, Mobilization, and Systemic Homeostasis', *Annual Review of Nutrition*, 36, pp. 471–509. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071813-105410>.
- Klingenberg, M. (2008) 'The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1778(10), pp. 1978–2021. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.04.011>.
- Krings, A. *et al.* (2012) 'Bone marrow fat has brown adipose tissue characteristics, which are attenuated with aging and diabetes', *Bone*, 50(2), pp. 546–552. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2011.06.016>.
- Kurosu, H. *et al.* (2007) 'Tissue-specific expression of betaKlotho and fibroblast growth factor (FGF) receptor isoforms determines metabolic activity of FGF19 and FGF21', *The Journal of Biological Chemistry*, 282(37), pp. 26687–26695. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M704165200>.
- Kuryłowicz, A. (2023) 'Estrogens in Adipose Tissue Physiology and Obesity-Related Dysfunction', *Biomedicines*, 11(3), p. 690. Available at: <https://doi.org/10.3390/biomedicines11030690>.
- Ladu, M.J., Kapsas, H. and Palmer, W.K. (1991) 'Regulation of lipoprotein lipase in adipose and muscle tissues during fasting', *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 260(5), pp. R953–R959. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1991.260.5.R953>.
- Lecka-Czernik, B. *et al.* (2017) 'Marrow Adipose Tissue: Skeletal Location, Sexual Dimorphism, and Response to Sex Steroid Deficiency', *Frontiers in Endocrinology*, 8. Available at: <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00188>.

- Lee, S. and Dong, H.H. (2017) 'FoxO integration of insulin signaling with glucose and lipid metabolism', *The Journal of Endocrinology*, 233(2), pp. R67–R79. Available at: <https://doi.org/10.1530/JOE-17-0002>.
- Lepper, C. and Fan, C.-M. (2010) 'Inducible lineage tracing of Pax7-descendant cells reveals embryonic origin of adult satellite cells', *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, 48(7), pp. 424–436. Available at: <https://doi.org/10.1002/dvg.20630>.
- Levine, R. *et al.* (1950) 'Action of insulin on the "permeability" of cells to free hexoses, as studied by its effect on the distribution of galactose', *The American Journal of Physiology*, 163(1), pp. 70–76. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1950.163.1.70>.
- Li, H. *et al.* (2021) 'Skeletal muscle non-shivering thermogenesis as an attractive strategy to combat obesity', *Life Sciences*, 269, p. 119024. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119024>.
- Li, J. *et al.* (2020) 'The relationship between bone marrow adipose tissue and bone metabolism in postmenopausal osteoporosis', *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 52, pp. 88–98. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2020.02.003>.
- Li, Y. *et al.* (2014) 'Taking control over intracellular fatty acid levels is essential for the analysis of thermogenic function in cultured primary brown and brite/beige adipocytes', *EMBO reports*, 15(10), pp. 1069–1076. Available at: <https://doi.org/10.15252/embr.201438775>.
- Li, Y. *et al.* (2018) 'Secretin-Activated Brown Fat Mediates Prandial Thermogenesis to Induce Satiation', *Cell*, 175(6), pp. 1561-1574.e12. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.016>.
- Li, Z. *et al.* (2018) 'Development, regulation, metabolism and function of bone marrow adipose tissues', *Bone*, 110, pp. 134–140. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.01.008>.
- Li, Z. *et al.* (2019) 'G-CSF partially mediates effects of sleeve gastrectomy on the bone marrow niche', *The Journal of Clinical Investigation*, 129(6), pp. 2404–2416. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI126173>.
- Lichtenbelt, W.D. van M. *et al.* (2009) 'Cold-Activated Brown Adipose Tissue in Healthy Men', *New England Journal of Medicine*, 360(15), pp. 1500–1508. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0808718>.
- Licinio, J. *et al.* (1997) 'Human leptin levels are pulsatile and inversely related to pituitary–adrenal function', *Nature Medicine*, 3(5), pp. 575–579. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm0597-575>.
- Lim, S. *et al.* (2012) 'Cold-induced activation of brown adipose tissue and adipose angiogenesis in mice', *Nature Protocols*, 7(3), pp. 606–615. Available at: <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.013>.
- Lin, Z. *et al.* (2013) 'Adiponectin Mediates the Metabolic Effects of FGF21 on Glucose Homeostasis and Insulin Sensitivity in Mice', *Cell Metabolism*, 17(5), pp. 779–789. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.04.005>.
- Liu, X. *et al.* (2003) 'Paradoxical resistance to diet-induced obesity in UCP1-deficient mice', *Journal of Clinical Investigation*, 111(3), pp. 399–407. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI200315737>.
- López-Sánchez, U. *et al.* (2020) 'Interplay between primary familial brain calcification-associated SLC20A2 and XPR1 phosphate transporters requires inositol polyphosphates for control of cellular phosphate homeostasis', *The Journal of Biological Chemistry*, 295(28), pp. 9366–9378. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.011376>.

- Ma, X.-X. *et al.* (2017) 'PiT2 regulates neuronal outgrowth through interaction with microtubule-associated protein 1B', *Scientific Reports*, 7(1), p. 17850. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17953-3>.
- Marinelli Busilacchi, E., Morsia, E. and Poloni, A. (2024) 'Bone Marrow Adipose Tissue', *Cells*, 13(9), p. 724. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells13090724>.
- Matschinsky, F.M. and Wilson, D.F. (2019) 'The Central Role of Glucokinase in Glucose Homeostasis: A Perspective 50 Years After Demonstrating the Presence of the Enzyme in Islets of Langerhans', *Frontiers in Physiology*, 10, p. 148. Available at: <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00148>.
- Matsushita, Y., Ono, W. and Ono, N. (2022) 'Toward Marrow Adipocytes: Adipogenic Trajectory of the Bone Marrow Stromal Cell Lineage', *Frontiers in Endocrinology*, 13, p. 882297. Available at: <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.882297>.
- Meister, B. (2000) 'Control of food intake via leptin receptors in the hypothalamus', *Vitamins and Hormones*, 59, pp. 265–304. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0083-6729\(00\)59010-4](https://doi.org/10.1016/s0083-6729(00)59010-4).
- Meunier, P. *et al.* (1971) 'Osteoporosis and the replacement of cell populations of the marrow by adipose tissue. A quantitative study of 84 iliac bone biopsies', *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 80, pp. 147–154. Available at: <https://doi.org/10.1097/00003086-197110000-00021>.
- Miller, D.G. and Miller, A.D. (1994) 'A family of retroviruses that utilize related phosphate transporters for cell entry', *Journal of Virology*, 68(12), pp. 8270–8276. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.68.12.8270-8276.1994>.
- Mottillo, E.P. *et al.* (2014) 'Coupling of lipolysis and de novo lipogenesis in brown, beige, and white adipose tissues during chronic β 3-adrenergic receptor activation', *Journal of Lipid Research*, 55(11), pp. 2276–2286. Available at: <https://doi.org/10.1194/jlr.M050005>.
- Mottillo, E.P., Ramseyer, V.D. and Granneman, J.G. (2018) 'SERCA2b Cycles Its Way to UCP1-Independent Thermogenesis in Beige Fat', *Cell Metabolism*, 27(1), pp. 7–9. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.12.015>.
- Müller, T.D., Klingenspor, M. and Tschöp, M.H. (2021) 'Revisiting energy expenditure: how to correct mouse metabolic rate for body mass', *Nature Metabolism*, 3(9), pp. 1134–1136. Available at: <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00451-2>.
- Myers, M.G. *et al.* (2021) 'Central nervous system regulation of organismal energy and glucose homeostasis', *Nature Metabolism*, 3(6), pp. 737–750. Available at: <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00408-5>.
- Myers, M.G. and Olson, D.P. (2012) 'Central nervous system control of metabolism', *Nature*, 491(7424), pp. 357–363. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature11705>.
- Nasrallah, C.M. and Horvath, T.L. (2014) 'Mitochondrial dynamics in the central regulation of metabolism', *Nature Reviews Endocrinology*, 10(11), pp. 650–658. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrendo.2014.160>.
- Naveiras, O. *et al.* (2009) 'Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment', *Nature*, 460(7252), pp. 259–263. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature08099>.

- Nedergaard, J. and Cannon, B. (2022) 'Diet-Induced Thermogenesis: Principles and Pitfalls', in D.A. Guertin and C. Wolfrum (eds) *Brown Adipose Tissue: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer US (Methods in Molecular Biology), pp. 177–202. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2087-8_12.
- Neff, E.P. (2020) 'A point on thermoneutrality for mice', *Lab Animal*, 49(6), pp. 169–169. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41684-020-0560-y>.
- Nicholls, D.G. and Brand, M.D. (2023) 'A critical assessment of the role of creatine in brown adipose tissue thermogenesis', *Nature Metabolism*, 5(1), pp. 21–28. Available at: <https://doi.org/10.1038/s42255-022-00718-2>.
- Nicholls, D.G. and Locke, R.M. (1984) 'Thermogenic mechanisms in brown fat', *Physiological Reviews*, 64(1), pp. 1–64. Available at: <https://doi.org/10.1152/physrev.1984.64.1.1>.
- Nishimura, M. and Naito, S. (2008) 'Tissue-specific mRNA expression profiles of human solute carrier transporter superfamilies', *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 23(1), pp. 22–44. Available at: <https://doi.org/10.2133/dmpk.23.22>.
- Oeckl, J. *et al.* (2022) 'Loss of UCP1 function augments recruitment of futile lipid cycling for thermogenesis in murine brown fat', *Molecular Metabolism*, 61, p. 101499. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101499>.
- Ogawa, Y. *et al.* (2007) 'BetaKlotho is required for metabolic activity of fibroblast growth factor 21', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(18), pp. 7432–7437. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0701600104>.
- Oguro, H. (2019) 'The roles of cholesterol and its metabolites in normal and malignant hematopoiesis', *Frontiers in Endocrinology*, 10(APR). Available at: <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00204>.
- O'Hara, B. *et al.* (1990) 'Characterization of a human gene conferring sensitivity to infection by gibbon ape leukemia virus', *Cell Growth & Differentiation*, 1(3), p. 119.
- Olah, Z. *et al.* (1994) 'The cellular receptor for gibbon ape leukemia virus is a novel high affinity sodium-dependent phosphate transporter', *The Journal of Biological Chemistry*, 269(41), pp. 25426–25431.
- Pak, H.H. *et al.* (2021) 'Fasting drives the metabolic, molecular and geroprotective effects of a calorie-restricted diet in mice', *Nature Metabolism*, 3(10), pp. 1327–1341. Available at: <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00466-9>.
- Parker, N. *et al.* (2009) 'Uncoupling protein-1 (UCP1) contributes to the basal proton conductance of brown adipose tissue mitochondria', *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 41(4), pp. 335–342. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10863-009-9232-8>.
- Patel, D. and Kalhan, S. (1992) 'Glycerol Metabolism and Triglyceride-Fatty Acid Cycling in the Human Newborn: Effect of Maternal Diabetes and Intrauterine Growth Retardation', *Pediatric Research*, 31(1), pp. 52–58. Available at: <https://doi.org/10.1203/00006450-199201000-00010>.
- Pedersen, L. *et al.* (1995) 'Chimeras of receptors for gibbon ape leukemia virus/feline leukemia virus B and amphotropic murine leukemia virus reveal different modes of receptor recognition by retrovirus', *Journal of Virology*, 69(4), pp. 2401–2405. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.69.4.2401-2405.1995>.

- Pedersen, L. *et al.* (1997) 'Fungal phosphate transporter serves as a receptor backbone for gibbon ape leukemia virus', *Journal of Virology*, 71(10), pp. 7619–7622. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.71.10.7619-7622.1997>.
- Pei, L. and Tontonoz, P. (2004) 'Fat's loss is bone's gain', *Journal of Clinical Investigation*, 113(6), pp. 805–806. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI200421311>.
- Peier, A.M. *et al.* (2002) 'A TRP Channel that Senses Cold Stimuli and Menthol', *Cell*, 108(5), pp. 705–715. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00652-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00652-9).
- Peirce, V., Carobbio, S. and Vidal-Puig, A. (2014) 'The different shades of fat', *Nature*, 510(7503), pp. 76–83. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature13477>.
- Peng, Y. *et al.* (2024) 'Plasticity of Adipose Tissues: Interconversion among White, Brown, and Beige Fat and Its Role in Energy Homeostasis', *Biomolecules*, 14(4), p. 483. Available at: <https://doi.org/10.3390/biom14040483>.
- Petersen, M.C. and Shulman, G.I. (2018) 'Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance', *Physiological Reviews*, 98(4), pp. 2133–2223. Available at: <https://doi.org/10.1152/physrev.00063.2017>.
- Pfeifer, A. and Hoffmann, L.S. (2015) 'Brown, Beige, and White: The New Color Code of Fat and Its Pharmacological Implications', *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 55(Volume 55, 2015), pp. 207–227. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010814-124346>.
- Phelps, N.H. *et al.* (2024) 'Worldwide trends in underweight and obesity from 1990 to 2022: a pooled analysis of 3663 population-representative studies with 222 million children, adolescents, and adults', *The Lancet*, 403(10431), pp. 1027–1050. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)02750-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)02750-2).
- Phillips, P.K. and Heath, J.E. (1995) 'Dependency of surface temperature regulation on body size in terrestrial mammals', *Journal of Thermal Biology*, 20(3), pp. 281–289. Available at: [https://doi.org/10.1016/0306-4565\(94\)00061-M](https://doi.org/10.1016/0306-4565(94)00061-M).
- Poher, A.-L., Tschöp, M.H. and Müller, T.D. (2018) 'Ghrelin regulation of glucose metabolism', *Peptides*, 100, pp. 236–242. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.12.015>.
- Rahbani, J.F. *et al.* (2021) 'Creatine kinase B controls futile creatine cycling in thermogenic fat', *Nature*, 590(7846), pp. 480–485. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03221-y>.
- Ramos-Brossier, M. *et al.* (2024) 'Slc20a1 and Slc20a2 regulate neuronal plasticity and cognition independently of their phosphate transport ability', *Cell Death & Disease*, 15(1), p. 20. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41419-023-06292-z>.
- Reid, I.R., Baldock, P.A. and Cornish, J. (2018) 'Effects of Leptin on the Skeleton', *Endocrine Reviews*, 39(6), pp. 938–959. Available at: <https://doi.org/10.1210/er.2017-00226>.
- Reidy, S.P. and Weber, J.-M. (2002) 'Accelerated substrate cycling: a new energy-wasting role for leptin in vivo', *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 282(2), pp. E312–E317. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00037.2001>.

- Rendina-Ruedy, E. *et al.* (2015) 'A Comparative Study of the Metabolic and Skeletal Response of C57BL/6J and C57BL/6N Mice in a Diet-Induced Model of Type 2 Diabetes', *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2015, p. 758080. Available at: <https://doi.org/10.1155/2015/758080>.
- Ricquier, D. and Kader, J.-C. (1976) 'Mitochondrial protein alteration in active brown fat: A sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 73(3), pp. 577–583. Available at: [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(76\)90849-4](https://doi.org/10.1016/0006-291X(76)90849-4).
- Roesler, A. and Kazak, L. (2020) 'UCP1-independent thermogenesis', *Biochemical Journal*, 477(3), pp. 709–725. Available at: <https://doi.org/10.1042/BCJ20190463>.
- Rosen, C.J. and Horowitz, M.C. (2023) 'Nutrient regulation of bone marrow adipose tissue: skeletal implications of weight loss', *Nature reviews. Endocrinology*, 19(11), pp. 626–638. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41574-023-00879-4>.
- Rosen, E.D. and MacDougald, O.A. (2006) 'Adipocyte differentiation from the inside out', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(12), pp. 885–896. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrm2066>.
- Rothwell, N.J. and Stock, M.J. (1979) 'A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis', *Nature*, 281(5726), pp. 31–35. Available at: <https://doi.org/10.1038/281031a0>.
- Rozman, J. *et al.* (2018) 'Identification of genetic elements in metabolism by high-throughput mouse phenotyping', *Nature Communications*, 9(1), p. 288. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01995-2>.
- Sahu, B. and Bal, N.C. (2023) 'Adipokines from white adipose tissue in regulation of whole body energy homeostasis', *Biochimie*, 204, pp. 92–107. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2022.09.003>.
- Sakers, A. *et al.* (2022) 'Adipose-tissue plasticity in health and disease', *Cell*, 185(3), pp. 419–446. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.12.016>.
- Salaün, C. *et al.* (2010) 'Identification of a novel transport-independent function of PiT1/SLC20A1 in the regulation of TNF-induced apoptosis', *The Journal of Biological Chemistry*, 285(45), pp. 34408–34418. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.130989>.
- Salaün, C., Rodrigues, P. and Heard, J.M. (2001) 'Transmembrane topology of PiT-2, a phosphate transporter-retrovirus receptor', *Journal of Virology*, 75(12), pp. 5584–5592. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.75.12.5584-5592.2001>.
- Scheller, E.L. *et al.* (2015) 'Region-specific variation in the properties of skeletal adipocytes reveals regulated and constitutive marrow adipose tissues', *Nature Communications*, 6, p. 7808. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncomms8808>.
- Scheller, E.L. *et al.* (2016) 'Changes in Skeletal Integrity and Marrow Adiposity during High-Fat Diet and after Weight Loss', *Frontiers in Endocrinology*, 7. Available at: <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00102>.
- Scheller, E.L. *et al.* (2019) 'Bone marrow adipocytes resist lipolysis and remodeling in response to β -adrenergic stimulation', *Bone*, 118, pp. 32–41. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.01.016>.

- Scherer, P.E. *et al.* (1995) 'A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes', *The Journal of Biological Chemistry*, 270(45), pp. 26746–26749. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.270.45.26746>.
- Seale, P. *et al.* (2008) 'PRDM16 Controls a Brown Fat/Skeletal Muscle Switch', *Nature*, 454(7207), p. 961. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature07182>.
- Seoane-Collazo, P. *et al.* (2020) 'Incendiary Leptin', *Nutrients*, 12(2), p. 472. Available at: <https://doi.org/10.3390/nu12020472>.
- Sinha, M.K. *et al.* (1996) 'Nocturnal rise of leptin in lean, obese, and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects.', *The Journal of Clinical Investigation*, 97(5), pp. 1344–1347. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI118551>.
- Sommer, J. *et al.* (2023) 'Four-and-a-Half LIM-Domain Protein 2 (FHL2) Induces Neuropeptide Y (NPY) in Macrophages in Visceral Adipose Tissue and Promotes Diet-Induced Obesity', *International Journal of Molecular Sciences*, 24(19), p. 14943. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms241914943>.
- Song, Z., Xiaoli, A.M. and Yang, F. (2018) 'Regulation and Metabolic Significance of De Novo Lipogenesis in Adipose Tissues', *Nutrients*, 10(10), p. 1383. Available at: <https://doi.org/10.3390/nu10101383>.
- Speakman, J.R. and Mitchell, S.E. (2011) 'Caloric restriction', *Molecular Aspects of Medicine*, 32(3), pp. 159–221. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2011.07.001>.
- Straub, L.G. and Scherer, P.E. (2019) 'Metabolic Messengers: Adiponectin', *Nature Metabolism*, 1(3), pp. 334–339. Available at: <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0041-z>.
- Streijger, F. *et al.* (2009) 'Mice lacking brain-type creatine kinase activity show defective thermoregulation', *Physiology & Behavior*, 97(1), pp. 76–86. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.02.003>.
- Suchacki, K.J. *et al.* (2020) 'Bone marrow adipose tissue is a unique adipose subtype with distinct roles in glucose homeostasis', *Nature Communications*, 11, p. 3097. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16878-2>.
- Sulston, R.J. and Cawthorn, W.P. (2016) 'Bone marrow adipose tissue as an endocrine organ: close to the bone?', *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 28(1), pp. 21–38. Available at: <https://doi.org/10.1515/hmbci-2016-0012>.
- Sun, Y. *et al.* (2021) 'Mitochondrial TNAP Controls Thermogenesis by Hydrolysis of Phosphocreatine', *Nature*, 593(7860), pp. 580–585. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03533-z>.
- Sveidahl Johansen, O. *et al.* (2021) 'Lipolysis drives expression of the constitutively active receptor GPR3 to induce adipose thermogenesis', *Cell*, 184(13), pp. 3502–3518.e33. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.04.037>.
- Svensson, P.-A. *et al.* (2011) 'Gene expression in human brown adipose tissue', *International Journal of Molecular Medicine*, 27(2), pp. 227–232. Available at: <https://doi.org/10.3892/ijmm.2010.566>.
- Taipaleenmäki, H. *et al.* (2011) 'Wnt signalling mediates the cross-talk between bone marrow derived pre-adipocytic and pre-osteoblastic cell populations', *Experimental Cell Research*, 317(6), pp. 745–756. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.12.015>.

- Tardelli, M. and Stulnig, T.M. (2020) 'Chapter Four - Aquaporin regulation in metabolic organs', in G. Litwack (ed.) *Vitamins and Hormones*. Academic Press (Aquaporin Regulation), pp. 71–93. Available at: <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2019.09.002>.
- Tavassoli, M. (1976) 'Marrow adipose cells. Histochemical identification of labile and stable components', *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 100(1), pp. 16–18.
- Tencerova, M. *et al.* (2018) 'High-Fat Diet-Induced Obesity Promotes Expansion of Bone Marrow Adipose Tissue and Impairs Skeletal Stem Cell Functions in Mice', *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 33(6), pp. 1154–1165. Available at: <https://doi.org/10.1002/jbmr.3408>.
- Tencerova, M. and Kassem, M. (2016) 'The Bone Marrow-Derived Stromal Cells: Commitment and Regulation of Adipogenesis', *Frontiers in Endocrinology*, 7, p. 127. Available at: <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00127>.
- Tran, T.T. *et al.* (2008) 'Beneficial effects of subcutaneous fat transplantation on metabolism', *Cell Metabolism*, 7(5), pp. 410–420. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.04.004>.
- Tsai, J.-Y. *et al.* (2020) 'Structure of the sodium-dependent phosphate transporter reveals insights into human solute carrier SLC20', *Science Advances*, 6(32), p. eabb4024. Available at: <https://doi.org/10.1126/sciadv.abb4024>.
- Ukropec, J. *et al.* (2006) 'UCP1-independent Thermogenesis in White Adipose Tissue of Cold-acclimated Ucp1^{-/-} Mice', *Journal of Biological Chemistry*, 281(42), pp. 31894–31908. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)84104-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)84104-2).
- Vannucci, S.J. *et al.* (1989) 'A1-adenosine receptor-mediated inhibition of adipocyte adenylate cyclase and lipolysis in Zucker rats', *The American Journal of Physiology*, 257(6 Pt 1), pp. E871–878. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1989.257.6.E871>.
- Vaughan, M., Berger, J.E. and Steinberg, D. (1964) 'Hormone-sensitive Lipase and Monoglyceride Lipase Activities in Adipose Tissue', *Journal of Biological Chemistry*, 239(2), pp. 401–409. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)51692-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)51692-6).
- Veliova, M. *et al.* (2020) 'Blocking mitochondrial pyruvate import in brown adipocytes induces energy wasting via lipid cycling', *EMBO Reports*, 21(12), p. e49634. Available at: <https://doi.org/10.15252/embr.201949634>.
- Vernooy, J.H.J. *et al.* (2009) 'Enhanced pulmonary leptin expression in patients with severe COPD and asymptomatic smokers', *Thorax*, 64(1), pp. 26–32. Available at: <https://doi.org/10.1136/thx.2007.085423>.
- Villareal, D.T. *et al.* (2016) 'Effect of Two-Year Caloric Restriction on Bone Metabolism and Bone Mineral Density in Non-obese Younger Adults: a Randomized Clinical Trial', *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 31(1), pp. 40–51. Available at: <https://doi.org/10.1002/jbmr.2701>.
- Virkki, L.V. *et al.* (2007) 'Phosphate transporters: a tale of two solute carrier families', *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 293(3), pp. F643–654. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00228.2007>.

- Wade, T.D. *et al.* (2000) 'Anorexia nervosa and major depression: shared genetic and environmental risk factors', *The American Journal of Psychiatry*, 157(3), pp. 469–471. Available at: <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.157.3.469>.
- Wang, C. *et al.* (2012) 'Mutations in SLC20A2 link familial idiopathic basal ganglia calcification with phosphate homeostasis', *Nature Genetics*, 44(3), pp. 254–256. Available at: <https://doi.org/10.1038/ng.1077>.
- Wiesner, G. *et al.* (1999) 'Leptin is released from the human brain: influence of adiposity and gender', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84(7), pp. 2270–2274. Available at: <https://doi.org/10.1210/jcem.84.7.5854>.
- Wilbon, S.S. and Kolonin, M.G. (2023) 'GLP1 Receptor Agonists—Effects beyond Obesity and Diabetes', *Cells*, 13(1), p. 65. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells13010065>.
- Winter, E.M. *et al.* (2020) 'Pregnancy and lactation, a challenge for the skeleton', *Endocrine Connections*, 9(6), pp. R143–R157. Available at: <https://doi.org/10.1530/EC-20-0055>.
- Wolfe Robert R. *et al.* (1987) 'Effect of Severe Burn Injury on Substrate Cycling by Glucose and Fatty Acids', *New England Journal of Medicine*, 317(7), pp. 403–408. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJM198708133170702>.
- Wren, T.A.L. *et al.* (2011) 'Bone marrow fat is inversely related to cortical bone in young and old subjects', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96(3), pp. 782–786. Available at: <https://doi.org/10.1210/jc.2010-1922>.
- Yamada, S. *et al.* (2018) 'Loss of Pit-2 results in abnormal bone development and decreased bone mineral density and length in mice', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 495(1), pp. 553–559. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.071>.
- Ye, R. and Scherer, P.E. (2013) 'Adiponectin, driver or passenger on the road to insulin sensitivity?', *Molecular Metabolism*, 2(3), pp. 133–141. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2013.04.001>.
- Young, S.G. and Zechner, R. (2013) 'Biochemistry and pathophysiology of intravascular and intracellular lipolysis', *Genes & Development*, 27(5), pp. 459–484. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.209296.112>.
- Zeigerer, A. *et al.* (2021) 'Glucagon's Metabolic Action in Health and Disease', *Comprehensive Physiology*, 11(2), pp. 1759–1783. Available at: <https://doi.org/10.1002/cphy.c200013>.
- van Zeijl, M. *et al.* (1994) 'A human amphotropic retrovirus receptor is a second member of the gibbon ape leukemia virus receptor family', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(3), pp. 1168–1172. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.91.3.1168>.
- Zhang, Y. *et al.* (1994) 'Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue', *Nature*, 372(6505), pp. 425–432. Available at: <https://doi.org/10.1038/372425a0>.
- Zhao, M. *et al.* (2024) 'Antisense oligonucleotides enhance SLC20A2 expression and suppress brain calcification in a humanized mouse model', *Neuron*, pp. S0896-6273(24)00535-X. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2024.07.013>.

Zhou, B.O. *et al.* (2017) 'Bone marrow adipocytes promote the regeneration of stem cells and haematopoiesis by secreting SCF', *Nature Cell Biology*, 19(8), pp. 891–903. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncb3570>.

Zimmermann, R. *et al.* (2004) 'Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase', *Science (New York, N.Y.)*, 306(5700), pp. 1383–1386. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1100747>.

Titre : Etude du rôle de PiT2 dans le métabolisme énergétique

Mots clés : PiT2, métabolisme énergétique, dépense énergétique, tissus adipeux, thermogénèse

Résumé : L'objectif de mon travail était d'étudier le rôle de Slc20a2/PiT2 dans la régulation du métabolisme énergétique. L'analyse du phénotype métabolique des souris *Slc20a2*^{-/-} montre qu'elles présentent une diminution du volume de la masse grasse par rapport aux souris contrôles, associée à une augmentation de la dépense énergétique, mais sans modification de la prise alimentaire, de l'activité physique ou de l'absorption intestinale des lipides. Nous montrons que l'augmentation de la dépense énergétique est associée à une augmentation de l'activité du tissu adipeux brun (BAT). L'augmentation de la lipolyse dans le BAT et le tissu adipeux blanc (WAT) suggère en outre que les acides gras libérés servent de substrat pour l'activité du BAT. De façon inattendue, l'augmentation de l'activité du BAT n'est pas associée à une augmentation de l'expression d'UCP1 ou des gènes impliqués

dans des voies alternatives indépendantes d'UCP1, ni à un brunissement du WAT chez les souris *Slc20a2*^{-/-}. En pathologie, l'augmentation de l'activité du BAT peut servir à lutter contre l'excès d'apport énergétique. Nous avons donc soumis les souris *Slc20a2*^{-/-} à un régime riche en gras. Alors que nos premiers résultats montraient une résistance à l'obésité des souris *Slc20a2*^{-/-}, nous n'avons pas confirmé ces résultats à la fin de ma thèse. Enfin, l'invalidation de Slc20a2 spécifiquement dans les adipocytes suggère que le phénotype métabolique des souris *Slc20a2*^{-/-} est la conséquence de la perte de PiT2 dans un autre organe. Ces travaux de thèse ont permis d'identifier PiT2 comme un régulateur important du métabolisme énergétique, dont les modes d'actions restent encore largement à explorer.

Title: Investigating the role of PiT2 in energy metabolism

Keywords : PiT2, energy metabolism, energy expenditure, adipose tissues, thermogenesis

Abstract : The aim of my thesis was to investigate the role of Slc20a2/PiT2 in the regulation of energy metabolism. Analysis of the metabolic phenotype of *Slc20a2*^{-/-} mice shows that they have a reduction in fat mass volume compared to control mice, which is associated with an increase in energy expenditure, but no change in food intake, physical activity or intestinal absorption of lipids. We show that the increase in energy expenditure is associated with an increase in brown adipose tissue (BAT) activity. The increase in lipolysis in BAT and white adipose tissue (WAT) further suggests that the fatty acids released serve as a substrate for BAT activity. Unexpectedly, increased BAT activity was not associated with increased expression of UCP1 or genes

involved in alternative UCP1-independent pathways, nor with browning of WAT in *Slc20a2*^{-/-} mice. In pathology, increased BAT activity may be used to counteract excessive energy intake. We therefore subjected *Slc20a2*^{-/-} mice to a high-fat diet. Although our initial results showed that *Slc20a2*^{-/-} mice were resistant to obesity, at the end of my thesis we could not confirm these results. Finally, the invalidation of Slc20a2 specifically in adipocytes suggests that the metabolic phenotype of *Slc20a2*^{-/-} mice is the consequence of the loss of PiT2 in another organ. This work has identified PiT2 as an important regulator of energy metabolism whose mechanisms of action remain largely unexplored.