



ANNEE 2009 THESE : 09 – TOU 3–4048

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA REGULATION DE L'EXPRESSION DU GENE HUMAIN UCP3 DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE DE SOURIS

ETUDE EXPERIMENTALE

THESE

pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2009
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Amandine GIROUSSE
Née le 19 juin 1982 à Nanterre

Directeur de thèse : Mme le Professeur Lydie BRET-BENNIS

JURY

PRESIDENT :
M. Thierry LEVADE

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :
Mme Lydie BRET-BENNIS
**Mme Christelle BOUCLAINVILLE-
CAMUS**

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de
TOULOUSE
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de
TOULOUSE

MEMBRE(S) INVITES(S) :
M. Dominique LANGIN
Mme Geneviève TAVERNIER

PUPH Nutrition et Biochimie médicale, DR1 INSERM
CR1 CNRS



A notre président de Thèse,

Monsieur le Professeur Thierry LEVADE
Professeur des Universités
Praticien hospitalier
Biochimie et Biologie moléculaire

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de Thèse
Hommage très respectueux.

A notre jury de Thèse,

Madame le Professeur Lydie BRET-BENNIS
De l'Ecole Nationale de Toulouse
Physique et Chimie biologiques et médicales

Qui a accepté avec enthousiasme de diriger cette thèse et qui a permis l'aboutissement de ce travail. (Auto)Qualifiée de « Mère Pinaille », vous m'avez fait travailler dur, mais ces remarques et corrections furent toujours bien fondées et très enrichissantes. Merci pour votre investissement et pour le regard neuf que vous m'avez amené à poser sur mon travail.

Remerciements sincères et respectueux.

Madame le Professeur Christelle BOUCLAINVILLE-CAMUS
De l'Ecole Nationale de Toulouse
Biologie cellulaire et moléculaire

Qui a accepté de participer à ce jury de thèse,
Sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur Dominique LANGIN
Directeur de l'Unité de recherche sur les Obésités, INSERM U858
PUPH, Nutrition et Biochimie Médicale
Et Vétérinaire aussi !

Qui m'a reçue au sein de son laboratoire, qui a encadré mes projets de recherche avec un soutien et un investissement dont je lui suis très reconnaissante. Merci de me faire confiance et de me permettre d'évoluer dans le monde de la recherche.

Qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude.

A Madame Geneviève TAVERNIER
Chercheur CNRS, INSERM U858

Qui m'a également encadrée durant ce travail. Sa motivation et son dévouement pour la « jeune génération » dont je fais partie est tout à son honneur. Merci pour ta vitalité, ta simplicité et ton accessibilité et pour toutes les choses que tu m'as apprises. Merci pour ton soutien dans les moments où la vie m'a joué des tours...

A Corinne, Cécile, Aline et toutes les personnes du laboratoire INSERM U858, ainsi que le personnel du service de Zootechnie de l'IFR 150,

Qui m'ont aidé et soutenu dans ce travail,
Tous mes remerciements

A mes amis « Poulot D1 » et « vrais » poulots, Pauline, Julien, Gaële, Nounours, Aumérine, Dumé, Sophie...et les autres,

Pour tous ces moments passés ensemble, pour toute votre affection, pour ces virées toulousaines, ces soirées à refaire le monde à la « Paillote », pour ces soirées de révisions...

Toute mon amitié.

A ma troupe montpelliéraine, Joël, Jonathan, Carl Stéphane, Justine, Damien... et les autres

Et à Audrey, la petite vache violette suisse,

Merci de votre présence même quand les kilomètres nous séparent. Merci d'avoir participé à ce que je suis.

Toute mon amitié.

A ma famille, et plus particulièrement à mes parents Annie et Michel, et à Yann,

Papa, j'aurais aimé que tu vois ce travail fini, la vie en a décidé autrement... j'espère que tu en aurais été fier.

Tout mon amour.

A Seb,

Pour tout ce que tu m'apportes, ton amour et ta confiance,

Pour ces moments de détente en montgolfière ou en DR400 quand le travail m'assomait... et pour les tiramisu(s) aux fruits rouges...

Tout mon amour.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	<i>p.9</i>
PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	<i>p.11</i>
Chapitre 1 : Métabolisme général des acides gras	<i>p.13</i>
1- Présentation des acides gras et leurs différentes formes	<i>p.13</i>
2- Synthèse des acides gras	<i>p.15</i>
3- Devenir des acides gras	<i>p.20</i>
3.1- Transport des acides gras	<i>p.20</i>
3.2- Stockage adipocytaire des acides gras et sécrétion	<i>p.26</i>
3.3- Catabolisme des acides gras	<i>p.28</i>
Chapitre 2 : Les protéines découplantes	<i>p.37</i>
1- Historique et phylogénie	<i>p.42</i>
2- Etude générale des protéines découplantes	<i>p.42</i>
2.1- Organisation génomique	<i>p.42</i>
2.2- UCP1 et UCP2 : données structurales	<i>p.45</i>
3- Cas particulier d'UCP3	<i>p.46</i>
3.1- Données structurales	<i>p.46</i>
3.2- Régulation de l'expression d'UCP3	<i>p.46</i>
3.2.1- Arguments expérimentaux	<i>p.46</i>
3.2.2- Etude du promoteur humain UCP3	<i>p.56</i>
3.3- Fonctions d'UCP3	<i>p.59</i>
3.3.1- Expression tissulaire	<i>p.59</i>
3.3.2- UCP3 et activité thermogénique	<i>p.63</i>
3.3.3- UCP3 et la production de ROS	<i>p.63</i>
3.3.4- UCP3 et le métabolisme des acides gras	<i>p.66</i>
3.3.5- UCP3, obésité et diabète sucré de type 2	<i>p.68</i>

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE *p.71*

CHAPITRE 1 : MATERIEL ET METHODES *p.73*

1- Souris *p.73*

2- Transgenèse *p.73*

2.1- Déroulement *p.73*

2.2- Constructions de transgenèse *p.74*

2.3- Génotypage ou criblage des souris transgénique et vérification de l'intégrité du transgène *p.79*

2.4- Analyse de l'expression du transgène *p.81*

2.4.1- Analyse des niveaux d'ARN messagers par RT PCT quantitative en temps réel *p.81*

2.4.2- Mesure de l'activité enzymatique de la protéine reporthrice CAT *p.81*

3- Protocoles expérimentaux *p.82*

Etude 1 : Caractérisation de l'expression d'UCP3 dans les muscles squelettiques *p.82*

Etude 2 : Manipulations nutritionnelles de jeûne chez l'adulte *p.83*

Etude 3 : Manipulations nutritionnelles de sevrage chez le souriceau et la femelle lactante *p.83*

4- Autres dosages réalisés *p.86*

4.1- Dosage de l'ARNm de mUCP3 *p.86*

4.2- Dosages biochimiques *p.86*

5- Statistiques *p.86*

CHAPITRE 2 : INFLUENCE DE LA PRISE ALIMENTAIRE SUR L'EXPRESSION MUSCULAIRE DE UCP3 *p.88*

Etude 1 : Caractérisation de l'expression d'UCP3 dans les muscles squelettiques *p.89*

1- Résultats *p.89*

1.1- Expression musculaire des différents fragments de transgénèse	p.89
1.2- Analyse informatique assistée du fragment A6	p.93
2- Discussion	p.95
2.1- Expression musculaire spécifique des fragments A, A1 et A6	p.95
2.2- Absence d'expression tissulaire de A5	p.95
2.3- Expression musculaire du transgène portant le fragment A6	p.96

Etude 2 : Régulation de l'expression d'UCP3 (murin ou gène CAT en totalité, 16 kb, ou en partie, fragments A ou A1) après une période de jeûne de 48 heures chez les souris adultes. p.98

1- Résultats	p.98
1.1- Expression de mUCP3	p.98
1.1.1- Chez les animaux contrôles négatifs (animaux nourris)	p.98
1.1.2- Chez les animaux mis à jeun pendant 48 heures	p.98
1.2- Expression de l'ARNm de hUCP3 (totale, fragment de 16 kb) ou de la CAT (fragments A et A1)	p.101
1.3- Variations des concentrations plasmatiques des acides gras	p.103
1.4- Recherche de corrélations entre les concentrations plasmatiques d'acides gras et l'expression des ARNm d'UCP3	p.105
2- Discussion	p.106
2.1- Cas de l'expression des ARNm de mUCP3	p.106
2.2- Cas de l'ARNm de hUCP3 ou du gène rapporteur CAT	p.107

Etude 3 : Influence du sevrage sur l'expression de l'ARNm d'UCP3 chez les femelles lactantes et les souriceaux p.110

1- Résultats	p.110
1.1- Cas des mères en lactation	p.110
1.1.1- Expression de l'ARNm de mUCP3	p.110
1.1.2- Expression de l'ARNm de CAT	p.110
1.1.3- Expression de la protéine CAT	p.110
1.1.4- Concentrations plasmatiques d'acides gras	p.111
1.2- Cas des souriceaux	p.113

1.2.1- Evolution pondérale et paramètres biochimiques plasmatiques	<i>p.113</i>
1.2.2- Expression d'UCP3 après un sevrage à 15 jours	<i>p.115</i>
1.2.3- Cas d'un sevrage réalisé à 20 jours	<i>p.117</i>
2- Discussion	<i>p.119</i>
2.1- Effets métaboliques du sevrage chez les femelles allaitantes	<i>p.119</i>
2.2- Effets métaboliques du sevrage chez les souriceaux	<i>p.120</i>
DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION	<i>p.123</i>
BIBLIOGRAPHIE	<i>p.129</i>
ANNEXE	<i>p.149</i>

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Les différentes formes des acides gras.	14
Figure 2 : Système citrate de transport du groupement acétyle vers le cytosol pour la synthèse des acides gras.	17
Figure 3 : Synthèse des acides gras.	19
Figure 4 : Transport des acides gras et du cholestérol dans l'organisme.	22
Figure 5 : Transport cellulaire des acides gras.	25
Figure 6: Synthèse des triglycérides, stockage adipocytaire des acides gras.	27
Figure 7: Activation des acides gras et transport du groupement acyle dans la matrice mitochondriale par la carnitine.	30
Figure 8: Séquence de réactions de la bêta-oxydation des acides gras.	32
Figure 9: Etapes de l' ω -oxydation.	34
Figure 10: Vue générale du métabolisme des acides gras.	36
Figure 11: Chaîne respiratoire mitochondriale.	38
Figure 12: Représentation schématique des gènes d'UCP1, UCP2 et UCP3.	44
Figure 13: Séquences de la région 5' du gène humain UCP3.	58
Figure 14: Implication d'UCP3 dans les mécanismes de translocation des AG (à gauche) et de leurs peroxydes (à droite).	65
Figure 15: Rôles physiologiques d'UCP3 dans le métabolisme mitochondrial des acides gras.	67
Figure 16: Constructions de transgénèse.	75
Figure 17: Préparation des fragments de transgénèse.	78
Figure 18: Positionnement des amorces de PCR pour la vérification de l'intégrité du transgène.	80
Figure 19: Protocoles d'étude (A) de l'expression d'UCP3 lors d'une situation de jeûne chez l'adulte sur différentes lignées de souris transgéniques B6D2 (B) de l'expression d'UCP3 lors du sevrage chez les souriceaux et les mères transgéniques pour le fragment A.	85
Figure 20: Vérification de l'intégrité du transgène contenant le fragment A5.	90
Figure 21: Profils d'expression musculaire d'hUCP3 chez les différentes lignées transgéniques.	92
Figure 22 : Analyse bio informatique, alignement du fragment A6 pour différentes espèces et positionnement des éléments régulateurs potentiels.	94
Figure 23 : Variations de l'expression de l'ARNm de mUCP3 (A), de l'ARNm du gène rapporteur CAT (B) et des concentrations plasmatiques d'acides gras libres (D) chez les mères transgéniques pour le fragment A (intron 1 de hUCP3).	112
Figure 24: Expression tissulaire de UCP3 chez les souriceaux transgéniques pour le fragment A (intron 1 de hUCP3) sevrés ou non à J15.	116
Figure 25: Concentrations plasmatiques des acides gras libres (A) puis expression tissulaire de la protéine CAT (protéine rapporteur sous l'influence du fragment A, intron 1 du gène hUCP3) (B) chez les souriceaux sevrés à J20 ou non.	118

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Expression tissulaire des différentes protéines découplantes.....	41
Tableau 2 : Localisation chromosomique des principales protéines découplantes chez la souris, le rat et l'Homme.....	44
Tableau 3: Régulation par le froid d'UCP3 (arguments expérimentaux).....	48
Tableau 4: Régulation par le jeûne d'UCP3 (arguments expérimentaux).....	52
Tableau 5 : Caractéristiques biochimiques des fibres musculaires.....	62
Tableau 6 : Activité CAT dans les tissus chez différentes lignées de souris transgéniques, portant un fragment intronique de taille variable.....	92
Tableau 7 : Expression tissulaire de l'ARNm de mUCP3 chez les souris portant le gène hUCP3 en entier (fragment de 16kb) ou en partie (fragment A, A1 ou A6) dans une construction promoteur-gène rapporteur et soumis ou non à un jeûne de 48 heures.....	100
Tableau 8 : Expression tissulaire de l'ARNm de hUCP3 ou du gène rapporteur CAT chez les souris portant le gène hUCP3 en entier (fragment de 16kb) ou en partie (fragment A ou A1) dans une construction promoteur-gène rapporteur et soumis ou non à un jeûne de 48 heures.....	102
Tableau 9 : Concentrations plasmatiques des acides gras chez les souris transgéniques pour les fragments de 16 kb, A, A1 et A6 après une période de jeûne de 48 heures ou nourries pendant cette période (contrôles négatifs).....	104
Tableau 10 : Evolution du poids vif et des paramètres biochimiques plasmatiques nutritionnels chez les souriceaux transgéniques pour le fragment A de hUCP3 (intron 1) sevrés à J15 ou non.	114

INTRODUCTION

L'obésité, caractérisée par un excès de masse grasse, représente un problème majeur de santé publique dans les pays industrialisés. Elle est devenue la première maladie non infectieuse de l'Histoire, si bien qu'on entend souvent parler d'épidémie à son égard. On dénombre en France environ 6 millions de personnes obèses. La prévalence de cette pathologie est passée de 8,2% à 11,3% entre 1997 et 2003 chez l'adulte. Elle est aujourd'hui de 12,4% en 2006 (Enquête ObEpi 2006). Les causes sont diverses, génétiques, endocrinologiques, environnementales et/ou comportementales. Les risques associés à l'obésité sont multiples. Les patients dont l'indice de masse corporelle (IMC) est supérieur à 30 présentent fréquemment les trois facteurs de risque vasculaires suivants : diabète non insulino-dépendant (ou de type 2), hypertension et dyslipidémies. L'obésité est aussi un facteur de risque pour le développement de certains cancers : endomètre, sein, prostate et colon (41). Il est frappant de constater que l'obésité atteint également nos animaux de compagnie. Ce problème fréquent est associé à de nombreuses co-morbidités telles que les maladies orthopédiques, le diabète de type 2, les dyslipidémies, les maladies cardiorespiratoires, les désordres urologiques et de reproduction et certains cancers (tumeurs mammaires, carcinomes des cellules transitionnelles) (50).

L'excès de poids est accompagné d'un ensemble d'anomalies métaboliques qui prédisposent au développement du diabète. Parmi les divers facteurs susceptibles d'être impliqués dans le développement du syndrome métabolique, les concentrations d'acides gras (AG) libres plasmatiques sont considérées comme acteurs majeurs dans la genèse des divers troubles. De nombreuses anomalies du métabolisme des AG sont à l'origine des concentrations élevées d'AG libres plasmatiques chez l'obèse et plus globalement du déséquilibre de la balance énergétique en faveur des apports alimentaires, au détriment des dépenses. Les dépenses énergétiques sont classiquement classées en trois groupes et rattachées aux états (i) de maintien du métabolisme de base, (ii) de thermogenèse adaptative et (iii) de thermogenèse induite lors d'un exercice. Si le lieu de stockage des lipides par excellence est le tissu adipeux (TA), l'un des organes importants de la dépense énergétique est le muscle squelettique.

Au sein de la cellule musculaire, la mitochondrie est le siège de l'oxydation des substrats et de la production d'énergie par le mécanisme de phosphorylation oxydative, assuré par l'ATP synthase au niveau de la membrane interne. En outre, la

membrane interne de la mitochondrie présente d'autres transporteurs protéiques potentiellement impliqués dans la régulation de la dépense énergétique.

Les protéines découplantes sont capables de dévier le flux de protons généré par la chaîne respiratoire, produisant ainsi de la chaleur à la place de l'ATP. La première protéine découplante, UCP1 (pour « uncoupling protein »), a été caractérisée dans le tissu adipeux brun de rongeurs, un site de thermogenèse adaptative jouant un rôle important dans le contrôle du poids et de la température corporelle. UCP2 et UCP3 sont deux autres protéines découplantes structurellement comparables à UCP1. UCP2 présente une expression ubiquitaire tandis qu'UCP3 est spécifique du muscle squelettique chez l'Homme. Ainsi, la protéine découplante UCP3 pourrait contribuer au contrôle de la dépense énergétique dans les muscles squelettiques chez l'homme.

Ce travail concerne l'étude de la régulation de l'expression génique de l'isoforme humaine de la protéine découplante UCP3. Différents laboratoires ont montré que l'expression d'UCP3 était régulée *in vivo* chez l'Homme par les AG. Les mécanismes moléculaires à l'origine de cette régulation sont étudiés afin de caractériser d'une part les séquences responsables de l'expression musculaire et d'autre part, celles responsables des variations d'expression d'UCP3 par les nutriments et les hormones.

Cette étude débutera par une partie bibliographique présentant les différentes étapes du métabolisme des AG ainsi que les données sur les protéines découplantes et en particulier UCP3 en matière de régulation d'expression.

Dans la partie expérimentale sur modèle murin, la caractérisation de l'expression d'UCP3 dans les muscles squelettiques a été entreprise dans une première étude puis les effets du jeûne ainsi que ceux de la lactation et du sevrage sur l'expression d'UCP3 ont été étudiés chez les jeunes et les adultes.

PREMIERE PARTIE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Dans ce chapitre le métabolisme des AG est rappelé dans une première partie puis une présentation générale des protéines découplantes ainsi qu'une étude spécifique d'UCP3 seront présentés.

La présentation du métabolisme des acides gras présentée ci-après s'appuie sur différentes sources bibliographiques (14, 36, 60, 147).

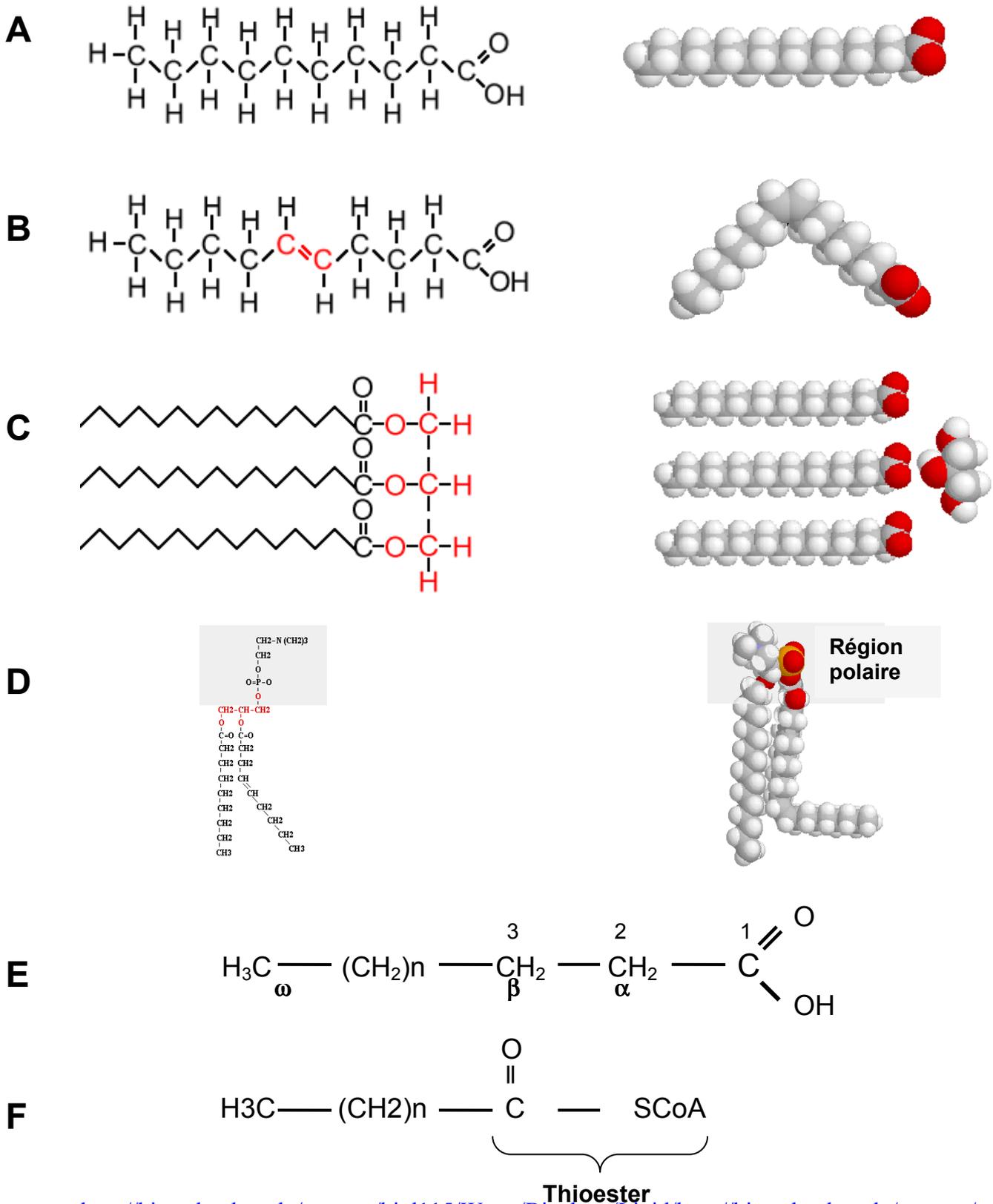
Métabolisme général des acides gras

1- Présentation des acides gras et leurs différentes formes

Les acides gras appartiennent à la famille des lipides, molécules organiques insolubles dans l'eau, qui sont des constituants essentiels de l'organisme. Les acides gras ont trois rôles physiologiques principaux. Ils sont tout d'abord des éléments importants des glycolipides et des phospholipides, ces molécules étant des composés constitutifs des membranes cellulaires. Deuxièmement, les dérivés d'acides gras sont les précurseurs d'hormones intervenant dans la messagerie inter et intra cellulaire. Enfin, les acides gras sont des molécules de stockage d'énergie sous forme de triacylglycérol.

Les acides gras se présentent sous plusieurs formes.

La forme la plus simple est dite **non estérifiée** ou **forme libre**. L'acide gras est composé d'un groupement terminal acide carboxylique et d'une chaîne aliphatique hydrophobe à nombre pair de carbones (cas général) dont la longueur varie de 4 à 30 atomes de carbone (Figure 1A). La chaîne carbonée est rarement ramifiée, elle peut être saturée ou présenter une ou plusieurs doubles liaisons (Figure 1B). La configuration des doubles liaisons dans les acides gras les moins insaturés est *cis*. Dans les acides gras polyinsaturés, les doubles liaisons sont séparées par un groupement méthylène. La longueur et le degré d'insaturation de la chaîne carbonée déterminent les propriétés des acides gras et des lipides qui en dérivent. Une courte longueur de chaîne et une insaturation augmentent la fluidité des acides gras et de leurs dérivés. Ainsi les acides gras à courte chaîne sont liquides à température ambiante, alors que les acides gras pourvus de 10 atomes de carbone ou plus tendent à être plus solides. Il existe 4 systèmes de nomenclature des acides gras. Le nom systématique provient du nom de l'hydrocarbure apparenté. Les autres nomenclatures reposent sur la numérotation des atomes de carbone (Figure 1E). Les atomes de carbone 2 et 3 sont souvent appelés respectivement α et β . Le carbone du méthyle situé à l'extrémité distale de la chaîne est appelé carbone ω . Etant donné leur caractère acide lié à la présence de la fonction carboxylique, au pH physiologique, les acides gras sont ionisés.



<http://bioweb.wku.edu/courses/biol115/Wyatt/Biochem/Lipid/http://bioweb.wku.edu/courses/biol115/Wyatt/Biochem/Lipid/http://bioweb.wku.edu/courses/biol115/Wyatt/Biochem/Lipid/>

Figure 1 : Les différentes formes des acides gras.

A gauche, structures chimiques ; à droite, représentation en trois dimensions. Les atomes d'oxygène, d'hydrogène et de carbone sont respectivement en rouge, blanc et gris. A, Acides gras saturé. B, Acides gras insaturé. C, Triacylglycérol. D, Phospholipide. E, structure et nomenclature d'un acide gras saturé. F, Formation d'un thioester de Coenzyme A. D'après www.cyberlipid.org (36)

Les acides gras peuvent également se présenter sous forme **estérifiée**. Les triglycérides ou triacylglycérols sont des triples esters d'acides gras et de glycérol (Figure 1C). Il s'agit de molécules très hydrophobes, constituant une forme hautement concentrée de mise en réserve de l'énergie car elles sont anhydres et réduites. Chez les mammifères, le site principal d'accumulation des triacylglycérols est la gouttelette lipidique, localisée dans le cytoplasme des adipocytes. Les acides gras se présentent également sous forme estérifiée dans les hétérolipides de type glycérophospholipides ou de types sphingolipides (Figure 1D).

Les acides gras peuvent aussi se présenter sous forme **activée**, liés au coenzyme A (CoA) par une liaison thioester. Cette réaction d'activation a lieu dans le cytoplasme, nécessite de l'ATP et fait intervenir l'acylCoA synthétase, enzyme de la membrane mitochondriale externe. Cette forme est absolument indispensable à l'utilisation métabolique des AG (β -oxydation mitochondriale, réactions d'estérification...).

Enfin, les acides gras peuvent être **peroxydés**. Les lipides des organismes vivants sont particulièrement sensibles à l'oxydation, surtout ceux formés d'acides gras polyinsaturés dans les membranes cellulaires. Les formes les plus réactives de l'oxygène peuvent initier directement la peroxydation lipidique. De nombreux produits sont générés lors de la peroxydation des lipides: diènes conjugués, peroxydes, aldéhydes, alcanes, dont la plupart sont cytotoxiques, athérogènes et mutagènes, par exemple le 4-hydroxy-2,3-trans-nonéanal (4HNE) impliqué dans l'activation des protéines découplantes (cf. infra). De manière générale, les produits de peroxydation des acides gras sont toxiques pour la cellule car ils induisent des lésions moléculaires de l'ADN et des protéines (enzymes) et déstabilisent l'organisation architecturale des membranes cellulaires (induction de lyse cellulaire).

2- Synthèse des acides gras

Les sites majeurs de la lipogenèse sont les cellules de la muqueuse intestinale, le foie, les tissus adipeux et, chez les mammifères allaitants, la glande mammaire. Chaque tissu a une fonction spécifique à cet égard. Les entérocytes traitent les acides gras provenant de l'alimentation, tandis que le foie a un rôle central d'épurateur, en capturant et estérifiant les acides gras du plasma et en synthétisant des acides gras *de novo*. Le tissu adipeux et la glande mammaire captent des acides gras plasmatiques mais sont également capables de synthèse *de novo*. Le principal

site de synthèse varie selon l'espèce. Chez les monogastriques, le foie en est le site principal pour les oiseaux et l'Homme, le tissu adipeux pour le porc, alors que chez le rat les deux sites sont importants. Chez les ruminants, le tissu adipeux est le site majeur de synthèse des acides gras (157).

La biosynthèse des acides gras répond à deux impératifs au niveau cellulaire : (i) la fourniture des acides gras nécessaires à la synthèse des lipides de structure et (ii) la mise en réserve de l'énergie. La synthèse des acides gras est entièrement cytosolique alors que leur dégradation est majoritairement intramitochondriale. Elle a lieu dans le foie, le tissu adipeux (TA), le système nerveux central et la glande mammaire.

Toute biosynthèse nécessite :

- de l'énergie apportée par l'ATP,
- du pouvoir réducteur, fourni sous forme de NADPH, H⁺, provenant essentiellement du fonctionnement de la voie des pentoses phosphates,
- un précurseur, l'acétylCoA.

L'acétylCoA provient de :

- la βoxydation des acides gras (mitochondriale)
- l'oxydation du pyruvate (mitochondriale)
- la dégradation oxydative des acides aminés céto-gènes.

L'acétylCoA, quelle que soit son origine est formé dans la mitochondrie. Pour servir de précurseur dans le cytosol à la synthèse des acides gras, il doit être transporté de la matrice mitochondriale vers le cytosol. Seul le radical acétyle est transporté à travers la membrane interne par une navette citrate / L-malate (Figure 2). Premièrement, l'acétylCoA est condensé sur l'oxaloacétate par la citrate synthase, dans la mitochondrie (première étape du cycle de Krebs). Puis, le citrate ainsi formé est exporté dans le cytosol, il est alors scindé en oxaloacétate par la citrate lyase et libère de l'acétylCoA. L'oxaloacétate est transformé en malate qui est utilisé par l'enzyme malique pour produire du pyruvate et du NADPH. Le pyruvate rentre dans la mitochondrie où il est transformé en acétylCoA (pyruvate déshydrogénase) ou en oxaloacétate (pyruvate carboxylase) qui permet à nouveau la synthèse du citrate. La quantité d'acétylCoA et donc de citrate exporté de la mitochondrie est indirectement reliée à l'entrée du pyruvate dans la mitochondrie par l'utilisation d'un symport pyruvate / H⁺.

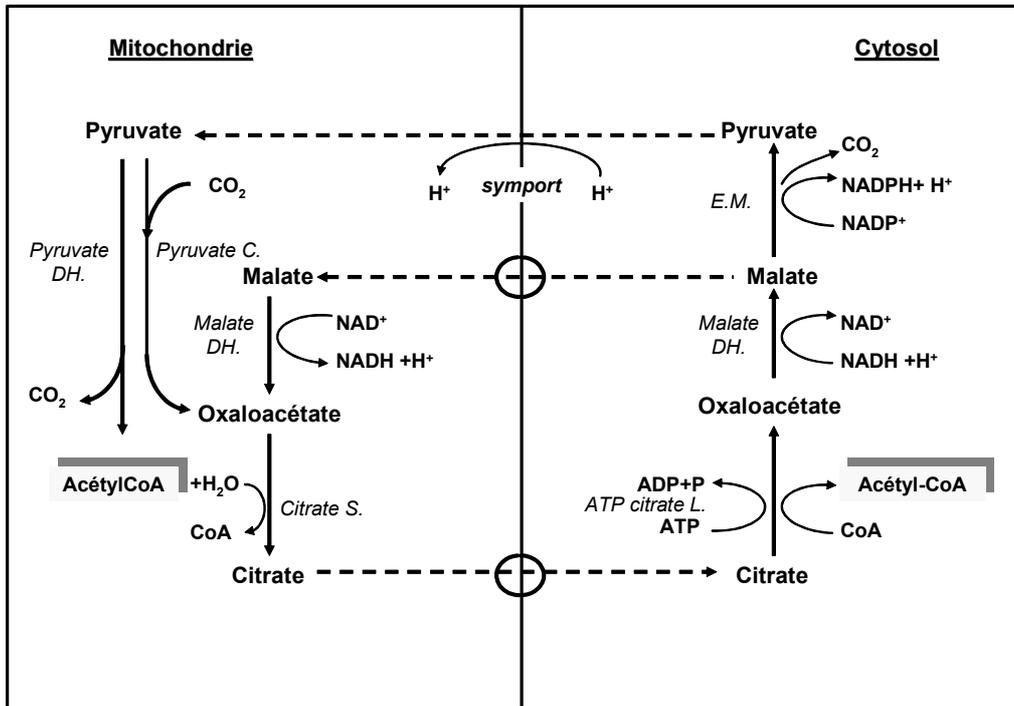


Figure 2 : Système citrate de transport du groupement acétyle vers le cytosol pour la synthèse des acides gras.

NADH: nicotinamide-adénine-dinucléotide (réduit), NADPH: nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate (réduit), CoA: coenzyme A, C. : carboxylase, DH. : déshydrogénase, S. : synthase, L. : lyase, E.M. : enzyme malique.

La synthèse des AG commence par la carboxylation de l'acétylCoA en malonylCoA, ATP dépendante, catalysée par l'*acétylCoA carboxylase*, une enzyme à biotine (Figure 3). Le citrate stimule de manière allostérique cette étape clé de la synthèse des acides gras. En période alimentaire, la synthèse des AG est stimulée ; l'afflux de glucose et les concentrations élevées d'insuline stimulent la formation de malonyl-CoA par l'acétyl-CoA-carboxylase, ouvrant ainsi la voie de synthèse des AG. En situation de jeûne, les faibles concentrations d'insuline et les concentrations élevées de glucagon inhibent l'activité de cette enzyme.

Les intermédiaires dans la synthèse des acides gras sont liés à une acyl carrier protein (ACP). Dans une première étape, un résidu acétyl est transféré sur le thiol d'une cystéine d'une des deux sous unités constitutives de l'AG synthase tandis que le malonyl obtenu est transféré sur le bras ACP (Acyl Carrier protein) de l'autre sous unité. Ce groupement prosthétique de l'enzyme est constitué par de la phosphopantéthéine reliée à la sérine 36 de la sous unité par une liaison phospho ester.

La décarboxylation spontanée du malonyl permet la condensation sur le résidu acétyl et la libération de la cystéine alors que le β cétobutyryl obtenu subit des réductions en β sur le bras ACP qui pivote progressivement autour de la sous unité. Les intermédiaires successivement obtenus sont le β hydroxybutyrate (réduction de la cétone) puis le fumaroyl (géométrie en trans de la double liaison) et après déshydratation, le butyryl ACP. A l'issue de ce premier tour, le groupement butyryl est à nouveau transféré sur le thiol de la cystéine, ce qui libère le bras ACP sur lequel un nouveau résidu malonyl va se greffer : par décarboxylation un groupement β cétoacyl à 6 carbones est obtenu sur le bras ACP qui subit à son tour les réactions de réduction et de déshydratation. L'acyl obtenu est à nouveau transféré sur le thiol de la cystéine. Ces cycles de condensation du malonyl par décarboxylation sur l'acyl en cours d'élongation et de β réductions se poursuivent jusqu'à l'obtention dans le cas général du palmitoyl. A ce moment, la thioestérase 1 sépare la molécule néoformée du complexe enzymatique de l'acide gras synthétase. Au total, la formation du palmitate (C16) a nécessité 7 tours de β réduction sur l'AG synthase donc 7 malonyles (soit 7 ATP) et 14 NADPH. Les cellules épithéliales mammaires des monogastriques (capables elles aussi de synthèse *de novo* d'acides gras) contiennent en revanche une thioestérase différente, par le fait qu'elle termine la synthèse de l'acide gras après l'addition de 8 à 14 carbones, libérant alors seulement des acides gras à chaîne moyenne.

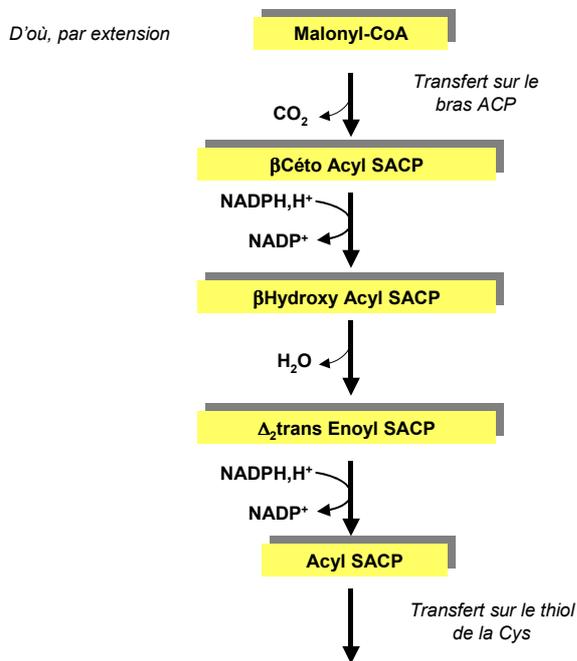
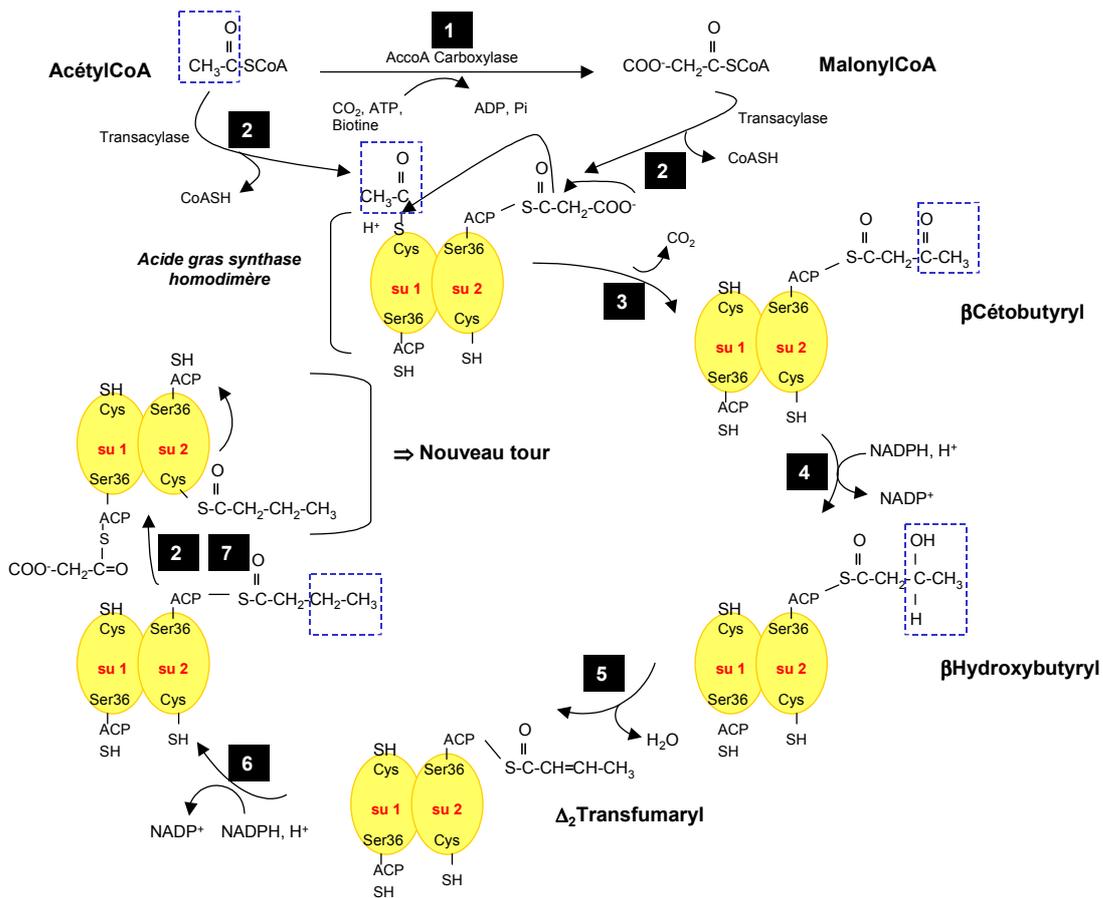


Figure 3 : Synthèse des acides gras.

ACP, acyl carrier protein, NADPH, H⁺ : nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphate (réduit), NADP⁺ : nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphate (oxydé), CoA : coenzyme A.

D'autres élongations et la formation de doubles liaisons sont assurées par d'autres systèmes enzymatiques localisés sur la face cytosolique des membranes du réticulum endoplasmique. Comme pour la synthèse du palmitate, les étapes d'élongation résultent de la condensation d'unités malonyles sur le carboxylate par décarboxylation suivie des étapes de réduction et de déshydratation, mais elles font intervenir des enzymes distinctes alors que l'AG synthase assure toutes les fonctions catalytiques. Des systèmes enzymatiques localisés dans les péroxysomes et les mitochondries assurent la formation de doubles liaisons dans les acyl-CoA à longue chaîne. Ces désaturases utilisent l'O₂ comme agent oxydant et une chaîne d'oxydoréduction composée de NAD(P)H / FAD(H₂) / cytochrome b et le couple Fe²⁺/Fe³⁺ de l'enzyme. La réduction préalable de O₂ en anion superoxyde permet d'arracher 2 H⁺ et deux électrons (e⁻) pour conduire à la formation d'un alcène en cis et à la libération de H₂O₂. Les mammifères ont perdu les enzymes permettant d'introduire des doubles liaisons aux atomes de carbone au delà de C9 dans une chaîne d'acide gras. Les acides gras qu'ils ne sont donc pas capables de synthétiser par voie endogène sont dits essentiels et doivent être apportés par l'alimentation.

3- Devenir des acides gras

3.1- Transport des acides gras

Transport des acides gras dans l'organisme

Qu'ils soient néoformés ou d'origine digestive, les acides gras sous leurs différentes formes sont principalement transportés dans le plasma sanguin et la lymphe sous forme de **lipoprotéines**. De structure globulaire, ces agrégats macromoléculaires sont constitués d'un cœur hydrophobe contenant essentiellement des triglycérides et des esters de cholestérol, enrobés d'une couche de lipides polaires constituée de phospholipides et de cholestérol libre. Des protéines spécifiques, nommées apoprotéines, à la surface des lipoprotéines assurent la stabilité de la macromolécule et en contrôlent le devenir métabolique. Initialement isolées en fonction de leur densité, chaque lipoprotéine se caractérise à la fois par la proportion des différents lipides qui la composent et par les apoprotéines qu'elle contient. Elles se groupent en plusieurs classes selon leur origine, leur composition chimique et propriétés physiques. Les lipoprotéines majeures sont :

- les chylomicrons synthétisés par les entérocytes

- les VLDL (very low density lipoproteins) synthétisées dans le foie
- les IDL (intermediate density lipoprotein) et les LDL (low density lipoproteins) obtenues dans le sang à partir des VLDL
- les HDL (high density lipoproteins) synthétisées par les cellules périphériques.

Les triglycérides sont transportés principalement par les chylomicrons et les VLDL. Le cholestérol et les phospholipides sont prépondérants dans les LDL et les HDL.

On appelle **voie exogène**, la voie de transport vers le foie des acides gras provenant de l'alimentation et absorbés dans l'intestin. Après avoir été hydrolysés par des lipases (lipase pancréatique et phospholipases) les lipides se retrouvent dans l'intestin sous forme de micelles mixtes contenant des acides gras et des 2-mono-acylglycérols (Figure 4). Ces micelles sont absorbées par les entérocytes. Dans la cellule, les acides gras sont pris en charge par un transporteur spécifique qui les achemine dans le réticulum endoplasmique lisse. Ils sont rejoints par les 2-mono-acylglycérols qui ont la capacité de traverser par diffusion passive. Les acides gras sont reestérifiés en triacylglycérol par les enzymes du réticulum endoplasmique et associés à des apolipoprotéines de type B48 pour former des chylomicrons libérés dans la veine porte et dans la lymphe. C'est sous la forme de triacylglycérol que les acides gras sont transportés vers le tissu adipeux et les tissus utilisateurs. Du cholestérol exogène peut également être associé aux chylomicrons en formation dans les entérocytes. Au sein de ces cellules, les triacylglycérols et le cholestérol sont couplés aux apoprotéines pour former des chylomicrons. La protéine de transfert microsomale des triglycérides est indispensable à cet « emballage ». Les chylomicrons quittent l'entérocyte par exocytose, pénètrent dans les chylifères des villosités intestinales et parviennent au sang par voie lymphatique. Une fois dans la circulation sanguine, ces lipoprotéines de grande taille constituées à 98% de lipides dont 90% de triglycérides, s'attachent progressivement à la paroi des capillaires où une lipoprotéine lipase les débarrasse de leurs triglycérides en les hydrolysant en acides gras et 2-mono-acylglycérols. Cette enzyme est régulée d'une part, par un activateur allostérique CII issu des HDL de la circulation générale et d'autre part, par les héparines (« facteurs clarifiants ») qui favorisent la migration extracellulaire de cette enzyme. Les chylomicrons résiduels (« remnant chylomicron ») retournent dans le flux sanguin et sont capturés par le foie. Les acides gras et quelques mono-glycérides pénètrent dans les cellules adjacentes (musculaire ou adipeuse) par diffusion grâce au gradient de concentration entre les deux compartiments ou avec l'aide de protéines spécialisées. Cette voie de transport concerne la majorité des

triglycérides, ceux constitués d'AG à chaîne longue (supérieure à 12 carbones) et les phospholipides. En revanche, les triglycérides constitués d'AG à chaîne courte (inférieure à 12 C) peuvent être absorbés intacts avec ou sans l'intervention de lipases. Dans l'entérocyte, ces AG ne sont ni réestérifiés, ni incorporés dans les chylomicrons, et passent directement dans le sang portal sous forme d'AG libres.

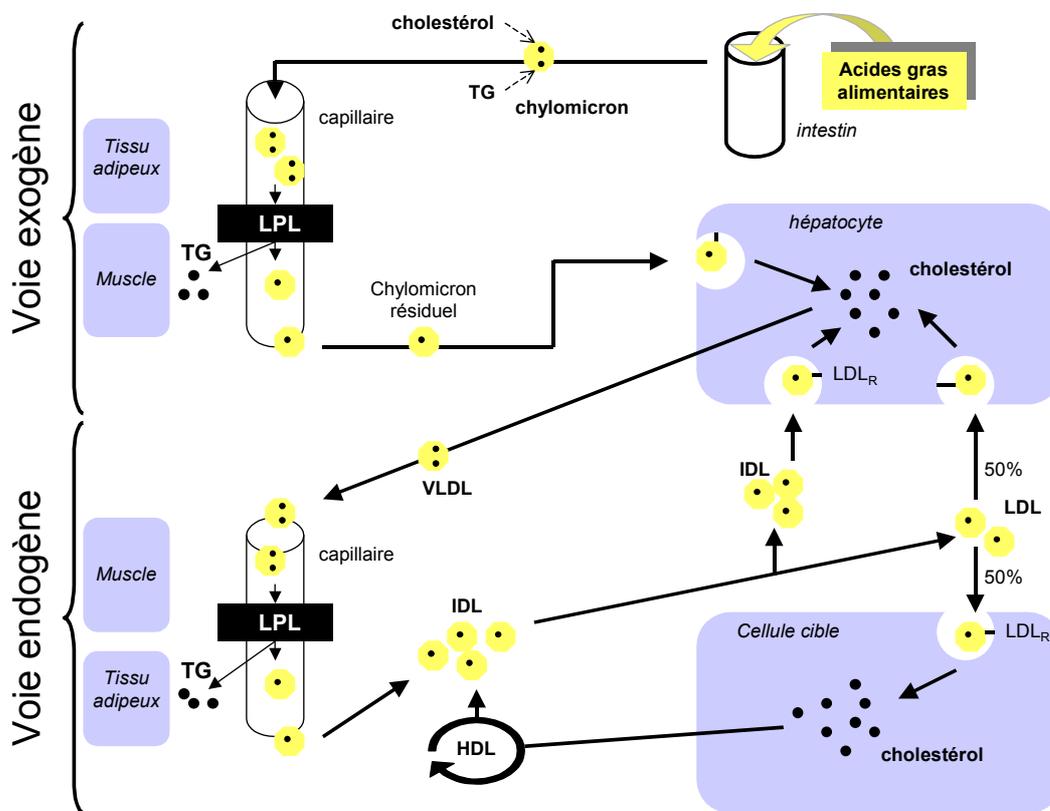


Figure 4 : Transport des acides gras et du cholestérol dans l'organisme.

TG : triglycéride, LPL : lipoprotéine lipase, VLDL : very low density lipoprotein, LDL : low density lipoprotein, LDL_R : récepteur au LDL, IDL : intermediary density lipoprotein, HDL : high density lipoprotein.

La seconde voie de transport des acides gras est dite **voie endogène** car elle concerne les différentes formes d'acides gras néoformés mais aussi le cholestérol. Le transport sanguin des lipides endogènes comporte deux circuits opposés :

- un circuit hépatofuge, transportant des TG et du cholestérol, du foie vers les tissus ; il est assuré par les lipoprotéines VLDL, IDL et LDL
- un circuit hépatopète ramenant le cholestérol excédentaire des tissus vers le foie ; il est assuré par les lipoprotéines HDL.

Dans le circuit hépatofuge, les VLDL natives, synthétisées dans le foie à partir de TG, de phospholipides et de cholestérol, et entourées d'Apo B (B100, synthétisées par le foie) sont sécrétées dans le sang par exocytose (Figure 4). Dans le sang, elles s'enrichissent en esters de cholestérol, apos C (C2, C3) et en ApoE venant des HDL. Dans les capillaires sanguins, les VLDL sont hydrolysées par la lipoprotéine lipase comme les chylomicrons. Les acides gras ainsi libérés sont destinés au stockage au sein du tissu adipeux et à la production d'énergie via la β -oxydation dans les muscles. En s'appauvrissant en TG, les VLDL se transforment en IDL. Les IDL se transforment à leur tour en LDL, en perdant des TG et gagnant des esters de cholestérol. Une fraction (environ 50%) des LDL se fixe sur des récepteurs spécifiques appelés « récepteurs des LDL » ou « récepteurs aux Apo B/E ». Elles pénètrent alors dans les cellules par endocytose où a lieu l'hydrolyse des stérides et la libération du cholestérol. Ce dernier participe à la structure des membranes cellulaires et des tissus nerveux. La fraction restante est recaptée par le foie.

Comme le circuit hépatopète concerne essentiellement le cholestérol, il ne sera pas décrit dans ce paragraphe.

Enfin, les acides gras synthétisés par le tissu adipeux ou relargués suite à la lipolyse sont transportés dans le sang liés à l'albumine.

Transport péri- et intra-cellulaire des acides gras à longue chaîne (AGLC)

Depuis la circulation sanguine les AGLC doivent traverser l'endothélium, l'espace interstitiel, la membrane plasmique et la membrane mitochondriale dans le cas de leur oxydation. Ce transport se fait de manière passive (flip-flop) ou par un mécanisme saturable, dépendant de protéines plus ou moins associées à des domaines membranaires spécifiques appelés « rafts lipidiques ». Plusieurs protéines liant les acides gras sont impliquées dans ce trafic :

- deux protéines de liaison des AG, la première sur la membrane plasmique, FABPpm (*plasma membrane-bound fatty acid binding protein*) et la seconde cytosolique, FABPc (*cytosolic fatty acid binding protein*)
- une translocase des acides gras, FAT/CD36 (*fatty acid translocase, FAT*)
- deux protéines de transport des acides gras : LBP (*lipid binding protein*) et FATP (*fatty acid transport protein*).
- une autre protéine de liaison cytoplasmique, ACBP (*cytoplasmic acyl-CoA binding protein*).

La translocase FAT/CD36 faciliterait le passage des AGLC à travers la membrane du capillaire sanguin (Figure 5). Les AGLC seraient alors directement transportés à travers la membrane plasmique par des complexes FATP ou alternativement, d'abord accumulés à la surface de la membrane par liaison avec FAT/CD36, qui les présenterait ensuite à FATP (146). Eehalt et al. (42) proposent également un modèle dans lequel les AGLC seraient captés et accumulés au niveau de la membrane plasmique par des molécules adaptatrices telles que FAT/CD36 et FABPpm. Par ces liaisons, ces complexes pourraient glisser au sein de rafts lipidiques où le processus de translocation aurait lieu. Cette diffusion facilitée pourrait faire intervenir d'autres protéines présentes dans cette structure membranaire particulière. Ces deux modèles postulent que les différents transporteurs opèrent en créant un environnement spécial autour de la membrane plasmique, favorable au transport du substrat.

Le transport intracellulaire des AGCL est assuré par FABPc et ACBP. Ces protéines empêchent les acides gras de se lier aux phospholipides membranaires et les orientent vers la mitochondrie. Enfin, le passage dans la mitochondrie peut être facilité par FAT/CD36, récemment découvert dans la membrane de l'organite (12). De manière générale, il pourrait exister des redondances entre ces différents transporteurs. Cependant il n'est pas exclu que leur action soit coordonnée ou coopérative.

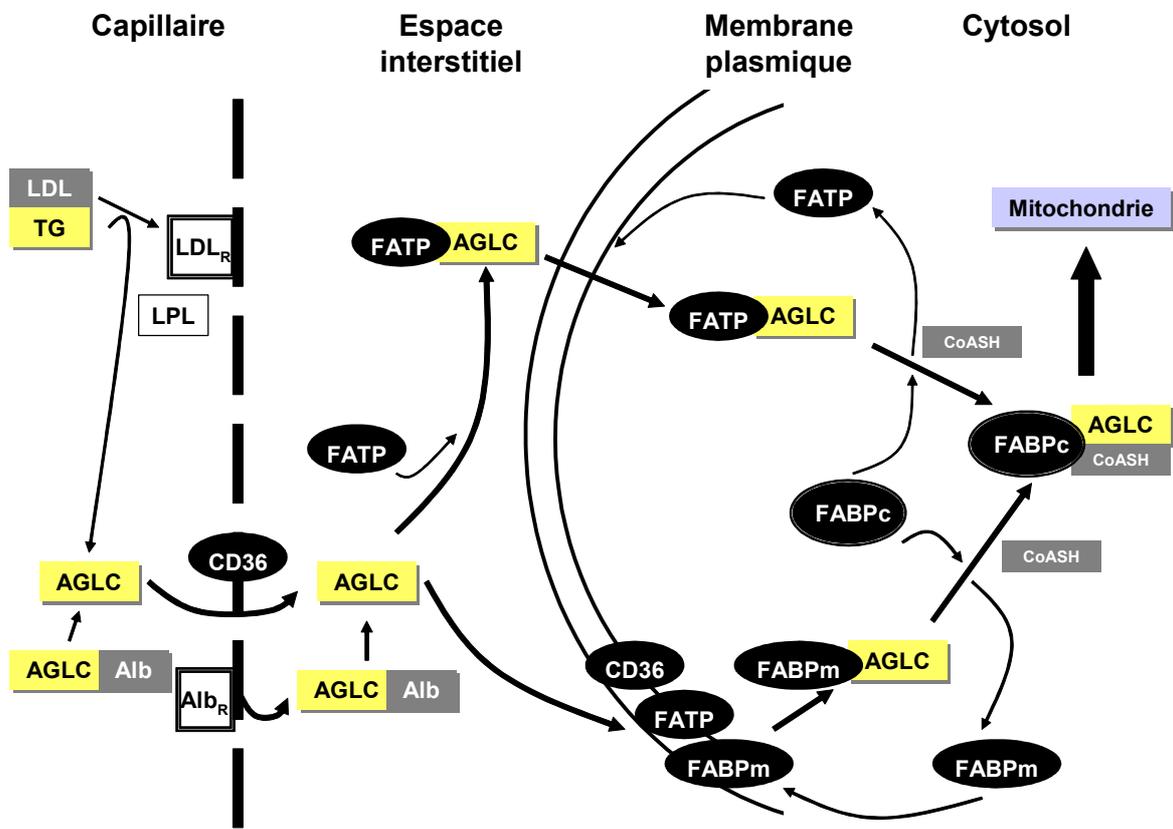


Figure 5 : Transport cellulaire des acides gras.

AGCL : acide gras à longue chaîne, VLDL : very low density lipoprotein, TG : triglycérides, LPL : lipoprotéine lipase, Alb : albumine, Alb_R : récepteur de l'albumine, CD36 : transporteur d'acides gras CD36, LBP : lipid binding protein, FATP : fatty acid transport protein, FABPm : membrane fatty acid binding protein, ACS : acyl-CoA synthétase, CoA : coenzyme A, ACBP : cytoplasmic acyl-CoA binding protein, FABPc : cytoplasmic fatty acid binding protein. D'après Bente Kiens (77).

3.2- Stockage adipocytaire des acides gras et sécrétion

Les triglycérides représentent la forme de stockage des acides gras. La biosynthèse des triglycérides a lieu au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (Figure 6). Ils sont fabriqués dans les cellules adipeuses mais également dans les hépatocytes et les entérocytes.

Dans le foie, le glycérol est phosphorylé en glycérol-3-phosphate par la glycérol-kinase. En revanche, le tissu adipeux n'exprime quasiment pas cette enzyme ; le glycérol-3-phosphate provient alors seulement de la réduction de la phosphodihydroxyacétone obtenue pendant la glycolyse anaérobie.

Les acides gras destinés au stockage proviennent des chylomicrons et des VLDL hydrolysés par la lipoprotéine lipase endothéliale. Dans le cytoplasme, les acides gras sont activés en acyle-CoA. La synthèse en elle même comporte trois étapes. Premièrement, deux acyles-CoA réagissent sur le glycérol-3-phosphate pour former un acide phosphatidique, ces réactions d'estérification étant catalysées par des acyl transférase. La troisième réaction d'estérification nécessite au préalable l'hydrolyse de l'ester phosphate en 3 par une phosphatase conduisant à la libération de l'alcool primaire ; le diacylglycérol (DAG) obtenu réagit ensuite avec un troisième acylCoA pour former un triglycéride (réaction catalysée par une troisième acyl transférase). Les triglycérides sont libérés dans le cytosol sous forme de gouttelette lipidique ou dans la lumière du réticulum endoplasmique. Dans les adipocytes, ces gouttelettes fusionnent et migrent vers les grands globules lipidiques centraux. Dans les cellules hépatiques et intestinales, les triglycérides sont enveloppés d'une couche de protéines.

Ce stockage est régulé. En période alimentaire, l'apport en nutriments et l'hyperinsulinémie amplifient les réactions d'estérification par activation des acyl transférase. En situation de jeûne, ces réactions sont inhibées.

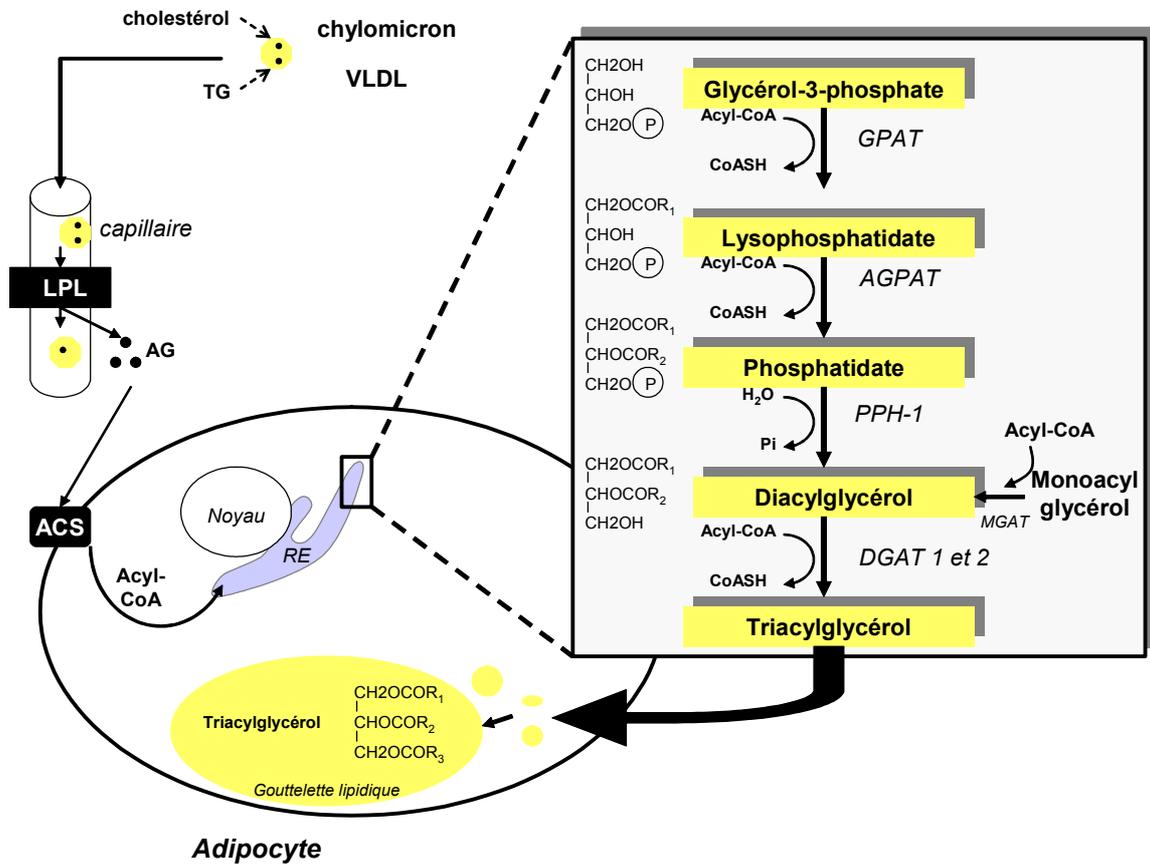


Figure 6: Synthèse des triglycérides, stockage adipocytaire des acides gras

VLDL : very low density lipoprotein, TG : triacylglycérol, LPL : lipoprotéine lipase, AG : acide gras, ACS : acyl-CoA synthétase, RE : réticulum endoplasmique, GPAT : glycérol-3-phosphate-acyl-transférase, AGPAT : lysophosphatidate acyl-transférase, PPH-1 : phosphatidate hydratase 1, DGAT : diacylglycérol-acyl-transférase, MGAT : monoacylglycérol-acyl-transférase.

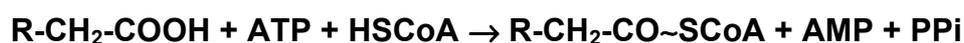
Le tissu mammaire peut extraire des acides gras depuis les capillaires sanguins qui serviront de précurseur pour la synthèse *de novo* d'autres acides gras ou pour leur estérification en triacylglycérol. Les acides gras prélevés proviennent de l'hydrolyse des triglycérides des chylomicrons ou VLDL par la *lipoprotéine lipase* localisée sur la paroi vasculaire et possiblement à la face basolatérale de la cellule épithéliale mammaire (137). Le transporteur FAT/CD36 serait impliqué dans ce transport (9). Au sein de la cellule épithéliale mammaire, les acides gras sont pris en charge par FABPc et ACBP. Ils sont ensuite activés et dirigés vers le réticulum endoplasmique. Ils y sont rejoints par le glycérol-3-phosphate pour être estérifiés en triacylglycérol. Ces derniers sont relargués dans le cytosol sous forme de petites gouttelettes lipidiques, qui après maturation, forment une gouttelette mature. Elle est sécrétée à la surface apicale de la cellule épithéliale mammaire par un procédé d'exocytose résultant d'une encapsulation par une membrane (la membrane du globule gras du lait) en partie dérivée de la membrane plasmique apicale (92).

3.3- Catabolisme des acides gras

L'oxydation des acides gras a lieu dans la mitochondrie et conduit à la formation d'acétyl-CoA et de coenzymes réduits NADH, H⁺ et FADH₂. Seuls le cerveau et les cellules glucodépendantes comme les globules rouges ne peuvent pas utiliser les acides gras. Leur passage dans la mitochondrie est un élément régulateur essentiel :

- ils doivent être activés en acyl-CoA
- les acyl-CoA à longue chaîne (>12C), qui sont les plus nombreux, nécessitent un système de transport enzymatique carnitine dépendant, alors que les acyl-CoA à courte et moyenne chaîne (<12C) pénètrent facilement dans la mitochondrie par simple diffusion.

Les acides gras sont activés par thioestérification avec le Coenzyme A (HSCoA). L'activation est catalysée par l'*acyl-CoA synthétase* localisée à la face interne de la membrane mitochondriale externe. La réaction est la suivante :



Au cours de la réaction, l'ATP subit une coupure libérant le pyrophosphate et l'AMP. Le pyrophosphate est hydrolysé par une pyrophosphatase pour apporter l'énergie complémentaire à la formation de la liaison thioester. L'AMP est ensuite rephosphorylé en ADP puis en ATP par l'*adénylate kinase*. Les acides gras à courte

et moyenne chaîne (<12C) peuvent être transportés directement dans la matrice et y subir leur activation par une *acyl-CoA synthétase* matricielle.

Sous la forme d'acyl-CoA, les acides gras à longue chaîne (>12C) ne peuvent traverser la membrane mitochondriale interne. Le transport mitochondrial de ces acyles s'effectue par l'intermédiaire de la carnitine, implique trois enzymes et permet de séparer physiquement les stocks cytoplasmiques et mitochondriaux de CoASH (Figure 7) :

- la *carnitine-acyl-CoA-transférase 1 (CAT1)* assure le transport des acyl-CoA. Elle transfère des acyles issus des esters de coenzyme A cytoplasmiques sur la fonction alcool de la carnitine. Elle est localisée sur le feuillet externe de la membrane interne mitochondriale ; c'est l'étape régulatrice : **carnitine + acyl-CoA → acyl-carnitine + HSCoA.**
- la *carnitine-acyl-CoA-translocase* assure le transport de l'acyl-carnitine au travers de la membrane interne mitochondriale et l'échange avec une carnitine libre.
- la *carnitine-acyl-CoA-transférase 2 (CAT2)*, localisée sur le feuillet interne de la membrane interne mitochondriale, transfère l'acyle de l'acyl carnitine sur le coenzyme A de la matrice mitochondriale: **acyl-carnitine + HSCoA → carnitine + acyl-CoA.**

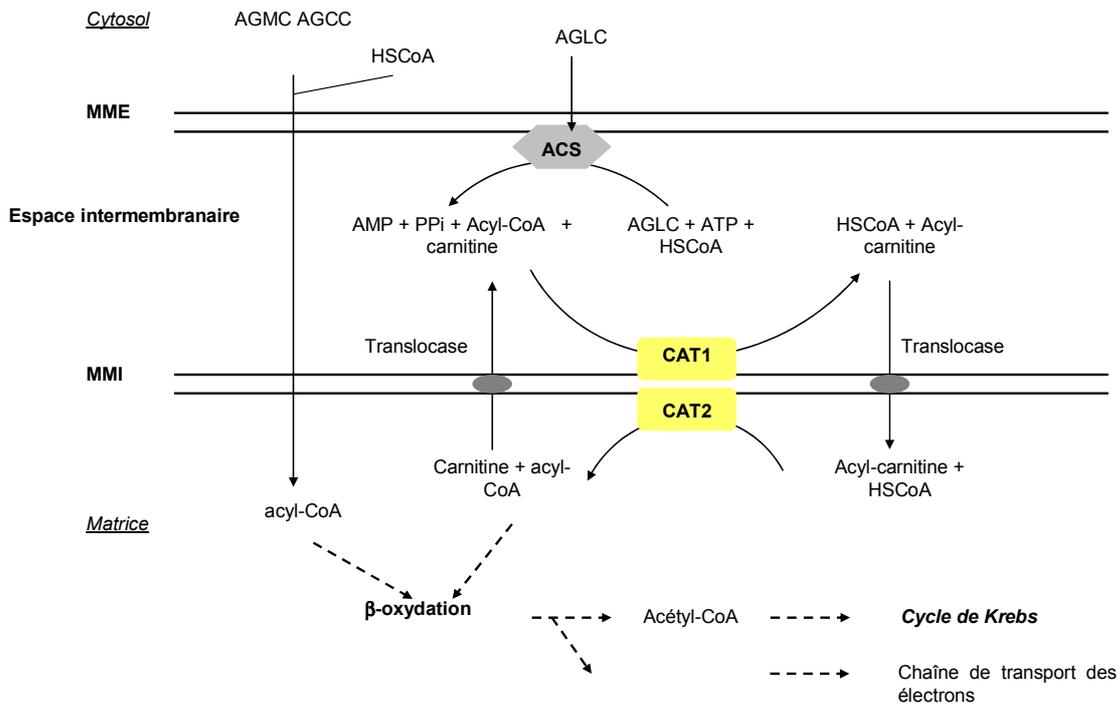


Figure 7: Activation des acides gras et transport du groupement acyle dans la matrice mitochondriale par la carnitine.

AGLC : acide gras à longue chaîne, AGMC : acide gras à moyenne chaîne, AGCC : acide gras à courte chaîne, ACS : acyl-CoA synthétase, CAT1 : carnitine-acyl-transférase 1, CAT2 : carnitine-acyl-transférase 2, AMP : adénosine mono phosphate, PPI : pyrophosphate, ATP : adénosine triphosphate, CoA : CoenzymeA, NADH : nicotinamide-adénine-dinucléotide (réduit), FADH₂ : flavine-adénine-dinucléotide (réduit).

Dans la majorité des cas, l'oxydation des acides gras se situe sur le carbone β ou carbone 3 de l'acide gras (Figure 2). La séquence des réactions d'oxydation des acides gras se déroule en quatre étapes, appelée tour, qui raccourcit l'acyl-CoA de deux carbones et libère un acétyl-CoA (Figure 8). Pour un acide gras à n carbones, (n-1) tours seront nécessaires pour son oxydation complète en n acétyl-CoA.

Les quatre étapes sont :

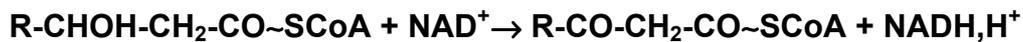
- première oxydation d'un acyl-CoA à nC par des *acyl-CoA-déshydrogénases* (flavoprotéines à FAD) produisant un dérivé insaturé, le Δ_2 trans-énoyl-CoA et un FADH₂ :



- hydratation de la double liaison par l'*énoyl-CoA-hydratase* produisant le β -hydroxy-acyl-CoA



- deuxième oxydation par la *β -hydroxy-acyl-CoA-déshydrogénase* qui produit un β -cétoacyl-CoA et un NADH,H⁺



- clivage du β -cétoacyl-CoA, après le carbone β , par la *thiolase* qui libère l'acyl-CoA raccourci (n-2) et un acétyl-CoA



Ce cycle se répète n fois, décrivant une hélice dite de Lynen. Chaque cycle d'oxydation libère une grande quantité d'énergie potentielle : 1 acétyl-CoA, 1 FADH₂ et 1 NADH,H⁺. Les acétyl-CoA sont oxydés dans le cycle de Krebs et les coenzymes réduites par la chaîne respiratoire.

Les rares acides gras à nombre impair de carbones sont oxydés par les mêmes enzymes, jusqu'à la formation du résidu restant à 3C, le propionyl-CoA, converti en succinylCoA qui rejoint le cycle de Krebs.

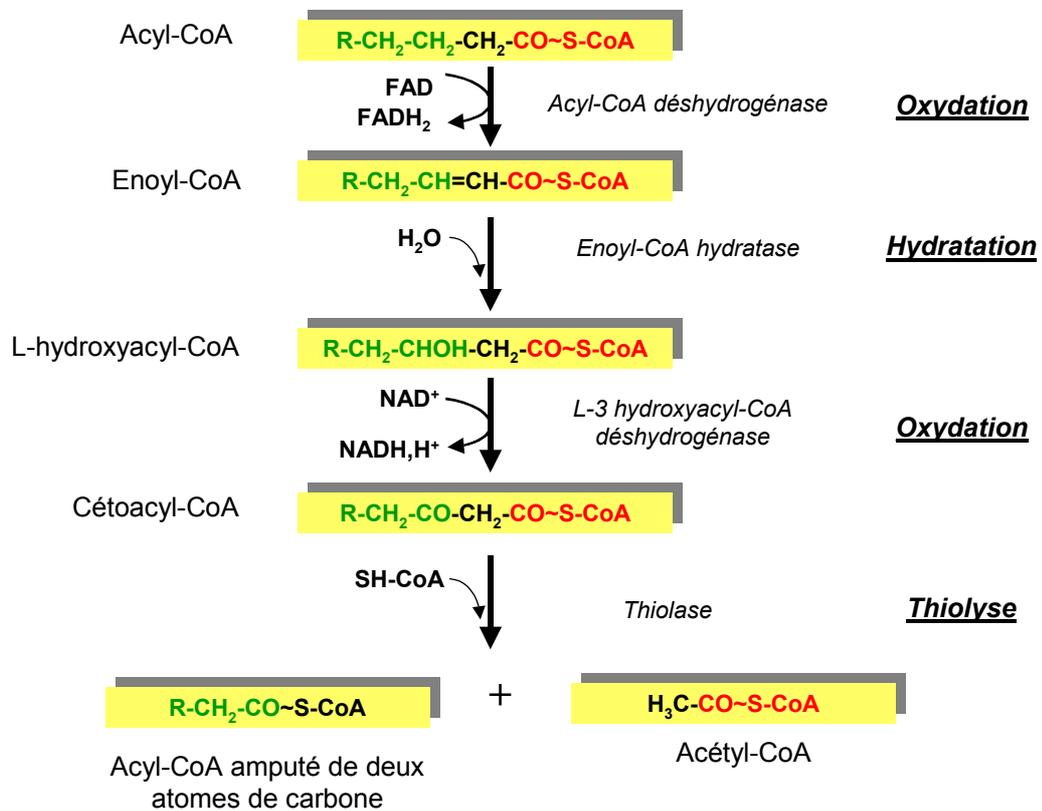


Figure 8: Séquence de réactions de la bêta-oxydation des acides gras.

CoA : Coenzyme A, FAD : flavine-adénine-dinucléotide (oxydé), $FADH_2$: flavine-adénine-dinucléotide (réduit), H_2O : eau, NAD^+ : nicotinamide-adénine-dinucléotide (oxydé), $NADH, H^+$: nicotinamide-adénine-dinucléotide (réduit)

Les acides gras insaturés sont dégradés de la même façon que les acides gras saturés après leur activation et leur liaison au coenzyme A. Cependant deux enzymes, une isomérase et une épimérase sont nécessaires pour l'oxydation complète de ces acides gras.

Pour les acides gras saturés à très longue chaîne (>18C), il existe une oxydation préalable dans les péroxysomes. La β -oxydation peroxysomale résulte également d'un relargage de deux groupes acétyls des acides gras. Bien que les enzymes impliquées soient différentes de celles de la mitochondrie, les transformations chimiques des acides gras sont les mêmes. La première différence entre oxydation mitochondriale et péroxysomale est la nature du substrat initial. Les acides gras oxydés dans le péroxysomes ont des chaînes bien plus longues que ceux oxydés dans la mitochondrie. Deuxièmement, aucun système de transport n'est requis par les acides gras à très longue chaîne pour entrer dans le péroxysome, ils y diffusent simplement. Dans les deux voies, les acides gras sont activés par liaison au coenzyme A. Dans la mitochondrie, la première réaction forme du FADH_2 qui apporte des électrons de haute énergie à la chaîne respiratoire, contribuant à la formation d'ATP. Dans le péroxysome, la première réaction utilise le FAD comme cofacteur mais ne produit pas de FADH_2 et ne contribue donc pas à la synthèse d'ATP. A la place, du peroxyde d'hydrogène est formé ; il est ensuite converti en eau et oxygène par des catalases. Les enzymes des réactions suivantes sont des protéines issues de gènes distincts bien qu'elles catalysent les mêmes réactions que dans la mitochondrie. Le NADH et l'acétyl-CoA produits dans le péroxysome sont exportés hors de l'organe alors que ces composés restent dans la matrice après l'oxydation mitochondriale. Ces acides gras raccourcis de 12 à 14C poursuivent alors leur oxydation dans la mitochondrie.

Alors que la voie majeure d'oxydation des acides gras se situe sur le carbone β , des voies métaboliques mineures telle l' **ω -oxydation** contribuent également au métabolisme des acides gras. L' ω -oxydation a lieu préférentiellement dans le réticulum endoplasmique plutôt que dans la mitochondrie, site de la β -oxydation. Dans l'acide gras, le carbone ω est celui de l'extrémité méthyle (Figure 9). Durant l' ω -oxydation, ce carbone est oxydé premièrement en un alcool primaire par une oxydase P450 dépendante puis l'alcool est à son tour oxydé soit par une double déshydrogénation en acide carboxylique grâce à une alcool déshydrogénase et une aldéhyde déshydrogénase soit par l'oxydase P450 dépendante. Si le substrat initial est un acide gras à longue chaîne, l'acide carboxylique résultant pourra entrer dans

la voie de β -oxydation pour être raccourci d'un résidu acétylCoA à chaque extrémité en même temps. Quand la β -oxydation est complète, le produit généré est un acide carboxylique à courte chaîne, type succinate ou adipate. Le succinate entre alors dans le cycle de Krebs tandis que l'adipate se retrouve dans la circulation sanguine.

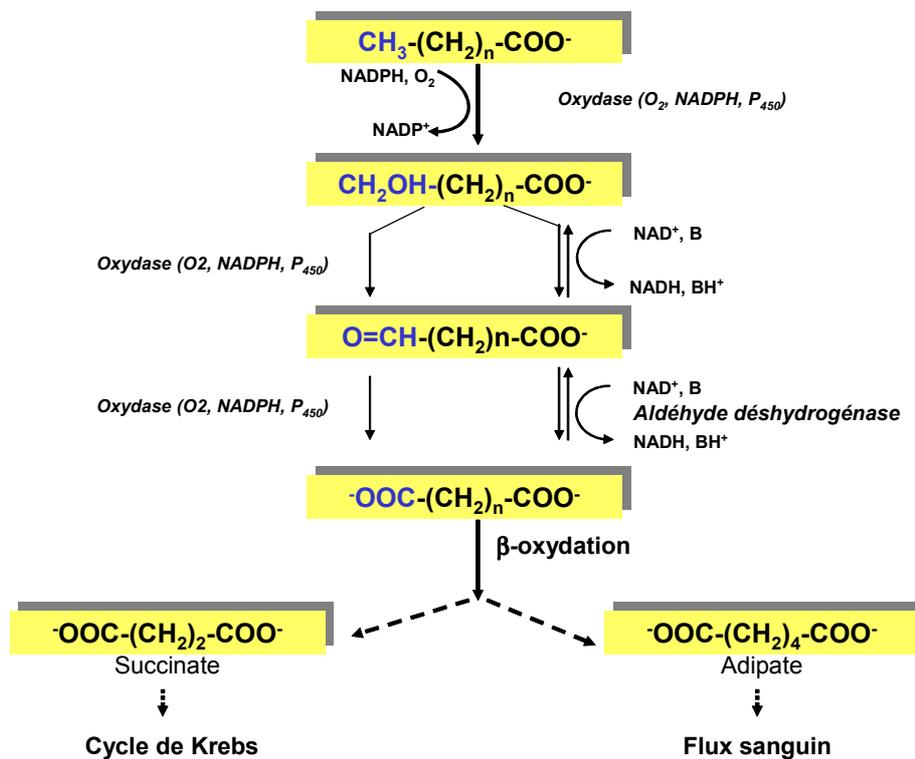


Figure 9: Etapes de l' ω oxydation.

NADPH : nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate (réduit), NADP^+ : nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate (oxydé), NAD^+ : nicotinamide-adénine-dinucléotide (oxydé), NADH : nicotinamide-adénine-dinucléotide (réduit). D'après Biocarta, www.biocarta.com.

L'origine des acides gras présents dans l'organisme est soit exogène (AG provenant de l'alimentation) soit endogène (synthèse *de novo* dans le foie, le tissu adipeux et la glande mammaire) (Figure10). Les AG d'origine exogène transitent dans la lymphe ou le sang veineux sous différentes formes de transport, associés à des protéines (chylomicrons, VLDL) avant d'être distribués aux différents organes via la circulation générale sous forme non estérifiée. Les AG endogènes sont également exportés sous forme non estérifiée (NEFA). Le tissu adipeux, les muscles et la glande mammaire en période de lactation représentent les organes utilisateurs d'AG. Au sein des muscles, les AG provenant du flux sanguin ou de la transformation des corps cétoniques (biosynthèse endogène) issus du foie sont alors utilisés pour fournir de l'énergie (β -oxydation), mais peuvent également être stockés sous forme de TG. Bien que les muscles puissent stocker des AG dans certaines conditions le lieu principal de stockage des AG demeure le tissu adipeux. L'acétate peut aussi être converti en AG dans le tissu adipeux et contribuer à la mise en réserve sous forme de TG. En période de lactation les AG plasmatiques sont exportés vers la glande mammaire ou ils rentrent dans la composition du lait.

En situation physiologique une « communication inter-organes » maintient l'équilibre entre les différentes formes d'AG (transport, stockage...) assurant ainsi l'homéostasie lipidique plasmatique. En revanche, l'obésité est caractérisée par un déséquilibre dans le métabolisme des AG. Ces derniers sont stockés de manière excessive au sein du TA et les sujets obèses présentent des concentrations élevées d'AG plasmatiques qui ont des conséquences physiopathologiques sur des organes comme le foie ou les muscles. Les capacités de métabolisation des AG par les muscles sont ainsi diminuées par rapport aux apports alimentaires.

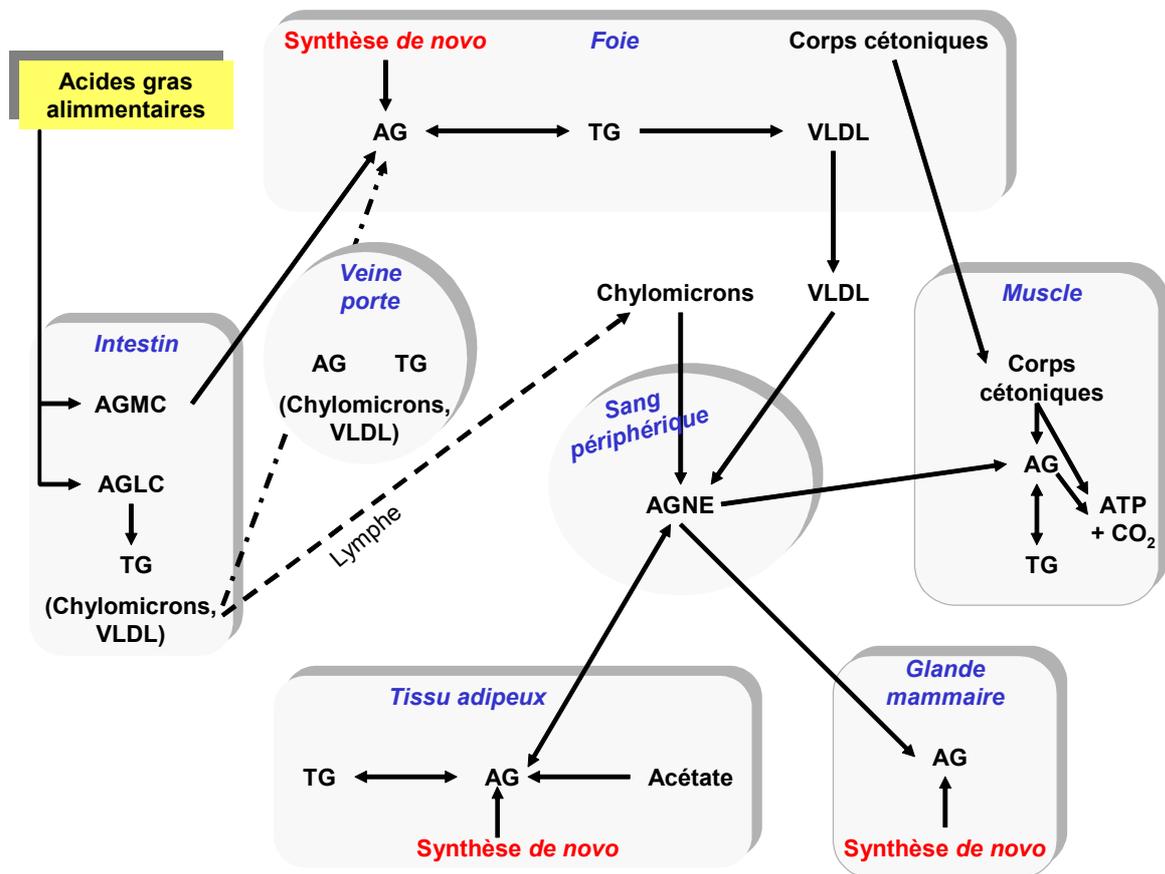


Figure 10: Vue générale du métabolisme des acides gras.

AG : acide gras, TG : triglycéride, AGMC : acide gras à moyenne chaîne, AGLC : acide gras à longue chaîne, VLDL : very low density lipoprotein, AGNE : acide gras non estérifié, ATP : adénosine triphosphate.

Les protéines découplantes

1- Historique et phylogénie

La synthèse mitochondriale d'ATP à partir d'ADP, issue du flux d'électrons depuis des substrats réduits (majoritairement le NADH) vers l'oxygène, définit la phosphorylation oxydative (Figure 11). Peter Mitchell a proposé un modèle dans lequel l'oxydation de la chaîne de transport des électrons est couplée au pompage de protons depuis la matrice mitochondriale, pour générer une force protomotrice (ou différence de potentiel électrochimique des protons) permettant le retour ultérieur des protons dans la matrice. La traversée de la membrane mitochondriale interne s'effectue de manière spécifique par la sous unité F₀, appelée « canal », de l'ATP synthase. La fixation d'un proton sur cette sous unité conduit non seulement au passage de l'ion mais aussi à l'activation des sous unités catalytiques F₁ qui catalysent la phosphorylation de l'ADP (102).

La production d'ATP est étroitement couplée à l'oxydation des métabolites énergétiques via la chaîne respiratoire et le gradient mitochondrial de protons. Le gradient de protons est régulé par le niveau d'activité de la chaîne respiratoire. Celle-ci est modulée par les concentrations en oxygène, en ADP et en coenzymes réduits (NADH, FADH₂). Une diminution des rapports NAD⁺/NADH et ATP/ADP active le fonctionnement de la chaîne respiratoire et donc la synthèse d'ATP. L'anoxie en revanche freine, voire bloque le métabolisme oxydatif mitochondrial. Quand le gradient de protons est élevé, il inhibe le pompage des protons par la chaîne respiratoire et diminue l'oxydation des substrats. Cependant, la mitochondrie consomme encore de l'oxygène quand la phosphorylation de l'ADP est inhibée, et cette observation démontre que le couplage de la respiration à la production d'ATP n'est pas parfait. En effet, l'ATP synthase n'est pas le seul moyen de dissiper le gradient de protons mitochondrial. La fuite de protons est un événement biophysique des bicouches protéolipidiques soumises à un gradient de protons élevé (19). Les protons peuvent retourner dans la matrice en court-circuitant l'ATP synthase, et en convertissant directement l'énergie de la force protomotrice en chaleur grâce à l'utilisation d'autres transporteurs tels que le symport pyruvate/H⁺ ou les protéines découplantes (UCP) (Figure 11). La fuite de protons représente jusqu'à 50% de la dépense énergétique de base pour des préparations de muscles squelettiques de rats perfusés (20, 117).

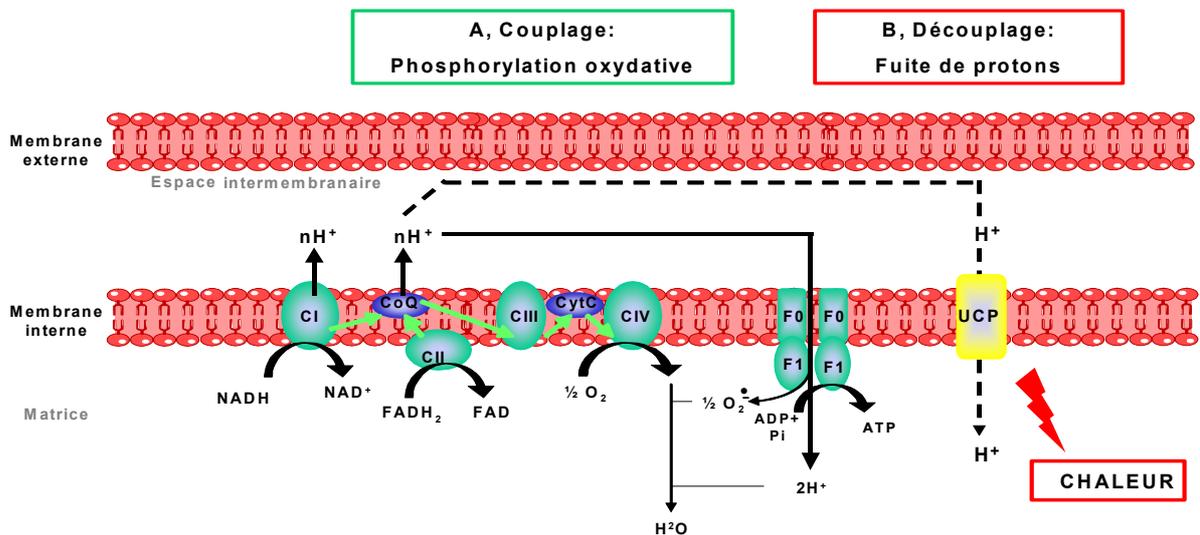


Figure 11: Chaîne respiratoire mitochondriale

A, principe de la phosphorylation oxydative. B, principe du découplage de la phosphorylation oxydative. En vert, trajet électronique ; en noir, trajet de protons ; en pointillés, fuite des protons. NADH,H⁺ : nicotinamide-adénine-dinucléotide (réduit), NAD : nicotinamide-adénine-dinucléotide (oxydé), FADH₂ : flavine-adénine-dinucléotide (réduit), FAD : flavine-adénine-dinucléotide (oxydé), ADP : adénosine diphosphate, Pi : phosphate inorganique, ATP : adénosine triphosphate, CI : complexe I formé par FMN/protéines FeS, CII : complexe II formé par la succinate déshydrogénase/protéines FeS, CIII : complexe III formé par les cytochromes b₂, b₅ et protéines FeS, CIV : complexe IV formé par les cytochromes a et a₃, CoQ : coenzyme Q, CytC : cytochrome C

L'étude de la graisse brune inter-scapulaire des rongeurs a conduit à l'identification d'UCP1, protéine découplante spécifique de la membrane interne mitochondriale (115, 117). Un engouement considérable au sein de la communauté scientifique est né pour UCP1. En effet, le découplage de la phosphorylation oxydative peut présenter des bénéfices physiologiques importants. Une conséquence majeure du découplage de la respiration est l'activation de l'oxydation des substrats et la dissipation de l'énergie de ces réactions sous forme de chaleur. En terme de physiologie, le découplage de la respiration et la dissipation d'énergie sous forme de chaleur sont des processus importants dans le système de balance énergétique et du contrôle du poids corporel, et représentent une ligne de recherche majeure pour les maladies métaboliques telle que l'obésité. Ces réactions sont précisément observées lors de l'activité d'UCP1 dans le tissu adipeux brun (TAB) chez les animaux exposés au froid, chez les mammifères nouveau-nés ou chez les mammifères sortant d'hibernation. On voyait en elle une cible idéale pour augmenter la dépense énergétique chez l'homme et traiter l'obésité. Cependant le corps scientifique a longtemps estimé que l'homme ne possédait pas à l'âge adulte de tissu adipeux brun et donc d'UCP1. La revue de littérature de Nedergaard en 2007 (101) ainsi que trois articles nouvellement publiés dans le *New England Journal of Medicine* amènent la preuve de la présence de tissu adipeux brun actif chez l'homme adulte, en bonne santé et ravive les espoirs des chercheurs quant à la modulation de la dépense énergétique chez les patients obèses (37, 156, 162).

En 1997, les protéines découplantes UCP2 et UCP3 homologues à la protéine UCP1 ont été clonées. UCP2 a été identifiée en recherchant dans des banques de données EST (expressed sequences tags) des séquences ayant une forte homologie avec UCP1. Le clonage a été réalisé à l'aide de banques d'ADNc issus de poumons, de muscles squelettiques (47) ou de rates (52). UCP3 a été clonée peu de temps après UCP2 (17, 161). Des ARN totaux de muscles squelettiques de rat ont été amplifiés par RT-PCR avec des amorces choisies dans des domaines conservés d'UCP1 de rat. Les fragments obtenus ont été séquencés, ce qui a permis l'identification d'UCP3. Ces ADNc ont ensuite été utilisés comme sondes afin de rechercher UCP3 dans une banque d'ADNc de muscles squelettiques humains (17). La protéine UCP2 est homologue à 59% à la protéine UCP1. La protéine UCP3 est homologue à 57% à la protéine UCP1 et à 73% à la protéine UCP2. Suite à l'identification d'UCP2 et d'UCP3, de nouvelles protéines découplantes ont rapidement été identifiées aussi bien chez les animaux que chez les plantes. En 1998, Sanchis et al. décrivent, dans le système nerveux central (SNC) mais aussi à un niveau moindre dans d'autres

tissus des rongeurs et de l'Homme, une nouvelle protéine découplante nommée BMCP1 (brain mitochondrial carrier protein 1) également appelée UCP5 (123). Cette protéine pourrait être impliquée dans la modulation du ratio ADP/ATP ou du niveau de radicaux réactifs de l'oxygène (ROS). Dans le même temps, une équipe américaine identifie et caractérise partiellement une nouvelle protéine mitochondriale spécifique du cerveau et qu'ils nomment UCP4 en raison de son homologie avec UCP3 et son activité découplante dans les cellules de mammifères. UCP4 pourrait être impliquée dans la thermorégulation au sein du cerveau, ou bien dans les phénomènes d'apoptose induits par les ROS (88). Cependant, une étude récente tend à réfuter l'implication des protéines découplantes du SNC (UCP2, UCP4 et BMCP1) dans les processus de thermogenèse de non-frisson (production de chaleur indépendante des contractions musculaires involontaires). Ces protéines, dont l'activité découplante ne serait pas constitutive comme UCP1, pourraient être activées par les ROS. Leur activité pourrait profondément moduler la fonction neuronale. En régulant la biogenèse mitochondriale (formation des mitochondries), les flux de Ca^{2+} et la production de ROS, les UCP neuronales influencent directement la neurotransmission, la plasticité synaptique et les processus de neurodégénérescence. Des travaux sont encore en cours pour préciser la régulation et la fonction de ces protéines dans le SNC (5). Mais l'existence des protéines découplantes n'est pas limitée aux mammifères et aux plantes. Deux nouvelles séquences d'UCP2 ont été trouvées chez des vertébrés ectothermiques, la carpe (*Ciprinus caprio*) et le poisson zèbre (*Danio rerio*) (148). Les oiseaux présentent également une UCP nommée AvianUCP (AvUCP) identique à 73% à la protéine UCP3 et restreinte au muscle squelettique (113, 158). L'UCP avaire pourrait être impliquée dans la thermogenèse adaptative (dépense énergétique provoquée par des changements environnementaux comme le froid, un excès de prise alimentaire, une infection bactérienne ou virale) (113, 158, 150). Une protéine découplante a également été découverte dans les mitochondries de *Acanthamoeba castellanii*, protozoaire terrestre amiboïde non photosynthétique (72). L'identification de la protéine CpUCP chez *Candida parapsilosis*, levure parasite, représente la première évidence de la présence de protéines découplantes au sein du règne des champignons (71). Enfin, des UCP ont également été retrouvées dans les trophozoïtes du parasite responsable de la malaria, *Plasmodium Berghei* (154). Le tableau I résume l'ensemble de ces données. La revue de Ricquier et Bouillaud présente également une vue globale des différentes protéines découplantes (114).

UCP	Espèces	Localisation tissulaire	Références
		Tissu adipeux brun	(26)
			(79)
UCP1	Mammifères	Thymocyte	(27)
			(2), (3)
		Cellule β pancréas	(120)
			(47)
UCP2	Mammifères	Ubiquitaire	(52)
	Poissons		(85)
			(17)
UCP3	Mammifères	Muscle	(17)
		Tissu adipeux brun	(161)
		Coeur	
			(123)
UCP4	Mammifères	Système nerveux central	(123)
		Préadipocyte	(88)
			(172)
			(123)
		Système nerveux central	(123)
		Muscles squelettiques	(170)
UCP5/ BMCP1	Mammifères	Estomac, poumon, testicules, utérus, rate, tissus adipeux, prostate, pancréas, glandes surrénales, thyroïde, foie	(78)
			(85)
			(64)
			(65)
AvUCP	Oiseaux	Muscles squelettiques	(113)
		Ubiquitaire	(46)
UCP6	Invertébrés		(141)
	Poissons		
Autres UCPs	Levures		
	Bactéries		(141)
	Plantes		

Tableau I: Expression tissulaire des différentes protéines découplantes.

D'un point de vue phylogénique, une étude menée par Hanak et Jezek en 2001 (58), basée sur la recherche de séquences communes propres aux UCPs mais non retrouvées chez les autres transporteurs mitochondriaux, a permis d'identifier plusieurs protéines potentielles dans les génomes de *Drosophila melanogaster* et *Caenorhabditis elegans*. L'analyse phylogénétique réalisée par ces auteurs suggère que les UCPs des invertébrés seraient plus proches d'UCP4 que d'UCP1, 2 ou 3. UCP4 représenterait la forme la plus ancienne d'une UCP ancestrale à toutes les autres UCP orthologues. Cependant, pour Sokolova et Sokolov, cette hypothèse est difficile à concilier avec la distribution tissulaire stricte d'UCP4 dans le cerveau (141). En effet, pour ces auteurs, cette spécificité d'expression serait plutôt le reflet d'une spécialisation au lieu d'une fonction ancestrale. Ces derniers auteurs ont recherché des homologues d'UCP2, UCP3 et UCP5 dans les génomes d'invertébrés. Leur analyse phylogénétique indique l'existence d'au moins trois classes d'UCP chez les invertébrés reliées respectivement aux UCP1, 2 et 3, UCP4 et UCP5 des vertébrés. Elle met aussi en évidence une divergence précoce dans l'évolution des UCPs, qui serait antérieure à la divergence entre protostomes et deutérostomes. L'UCP des invertébrés (nommée UCP6) serait potentiellement l'ancêtre d'UCP1, UCP2 et UCP3.

2- Etude générale des protéines découplantes

2.1- Organisation génomique

L'organisation génomique du gène UCP1 chez la souris, le rat et l'homme a été étudiée dans de nombreux laboratoires. La structure du gène UCP1 est hautement conservée chez les trois espèces. Le gène UCP1 est composé de six exons, chaque exon codant un domaine membranaire de la protéine (Figure 12).

La structure des gènes UCP2 et UCP3 est similaire à celle d'UCP1 en ce sens que la partie codante est également répartie en six exons. Cependant, les gènes UCP2 et UCP3 diffèrent du gène d'UCP1 par la présence d'un ou deux exons non traduits localisés à l'extrémité 5' des gènes UCP2 et UCP3 (56, 106, 142, 151, 169).

L'assignation chromosomique des gènes des différentes UCP chez l'Homme, le rat et la souris est présentée dans le Tableau II, et montre que les gènes codant pour UCP2 et UCP3 sont portés par le même chromosome. Lors du clonage initial des gènes UCP2 et UCP3, il a été observé que les deux gènes étaient distants l'un de

l'autre de moins de 100 kb. En réalité il a été démontré que les deux gènes étaient adjacents, le gène UCP2 étant en aval respectivement de seulement 7 ou 8 kb du gène UCP3 dans les génomes murin et humain. L'étroite juxtaposition d'UCP2 et UCP3 suggère fortement un événement de duplication à l'origine des deux gènes.

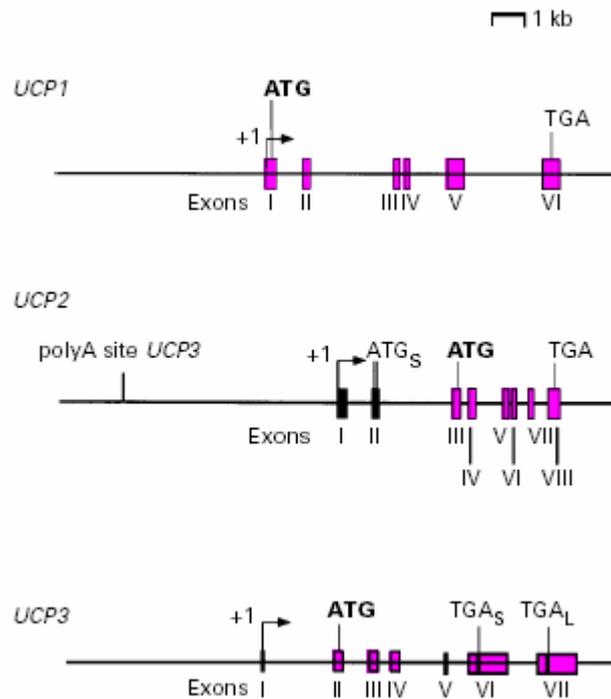


Figure 12: Représentation schématique des gènes d'UCP1, UCP2 et UCP3.

Les exons sont représentés par des boîtes roses (exons traduits) ou noires (exons non traduits) et numérotés en chiffres romains. UCP : protéine découplante, ATG : codon d'initiation de la traduction, TGA : codon de terminaison de la traduction, TGA_{S/L} : codon de terminaison de la traduction de la forme courte (small) ou longue (long) du transcrit, +1 : point de départ de la transcription.

Localisation chromosomique du gène	UCP1	UCP2	UCP3
<i>Souris</i>	8	7	7
<i>Rat</i>	19	1	1
<i>Homme</i>	4	11	11

Tableau II : Localisation chromosomique des principales protéines découplantes chez la souris, le rat et l'Homme.

2.2- UCP1 et UCP2 : données structurales

La protéine découplante UCP1 a été découverte simultanément par Ricquier et collaborateurs (115) et le groupe de Nicholls (59). Son ADNc a été cloné en 1985 (18, 69). C'est une protéine de 33 kDa, insérée dans la membrane interne mitochondriale. UCP1 est quasi exclusivement exprimée dans le tissu adipeux brun (TAB) des mammifères. La fonction primaire du tissu adipeux est de produire de la chaleur en réponse à une exposition au froid (62, 118). Le rôle d'UCP1 dans le découplage de la phosphorylation oxydative et la production de chaleur ont clairement été démontrés dans les expériences utilisant des souris transgéniques invalidées pour le gène UCP1 (« knock out » KO UCP1) (93). Les mitochondries du TAB des souris KO UCP1 ont présenté une intensité de thermogénèse inférieure à celle des souris sauvages.

D'un point de vue fonctionnel, cette protéine mitochondriale permet le passage des protons dans la membrane mitochondriale interne, qui peut être ouverte ou fermée selon les concentrations cellulaires d'ATP et d'acides gras. Il existe encore un débat sur le mode de transport des protons par UCP1 : transport direct de protons avec collaboration des acides gras ou transport d'acides gras anioniques couplé avec un flip-flop d'acides gras protonés.

UCP2 a été clonée en 1997 (47,52). Cette protéine de 33 kDa présente une expression ubiquiste (82). Son ARNm est exprimé dans de nombreux tissus mais la détection correspondante de la protéine s'est avérée difficile en raison du manque de sensibilité et de spécificité des anticorps disponibles. De nouvelles générations d'anticorps ont permis de détecter la protéine UCP2 dans la rate, l'estomac, l'intestin, le poumon et le tissu adipeux blanc (105). UCP2 est également présente dans les cellules β des îlots pancréatiques où elle pourrait constituer un régulateur négatif de la sécrétion d'insuline et par la même être impliquée dans la physiopathologie du diabète de type 2 (171, 28). Mais UCP2 pourrait également avoir un rôle dans la prévention de la production de radicaux oxygénés (ROS pour *reactive oxygen species*) et de leurs dérivés dans les cellules β pancréatiques comme le suggèrent les souris invalidées pour le gène UCP2 chez qui une élévation permanente des ROS peut être constatée (80). En dernier lieu, une implication d'UCP2 dans l'immunité est aussi proposé pour UCP2 (6).

3- Cas particulier d'UCP3

3.1- Données structurales

Le gène humain UCP3 mesure environ 8,7 kb et est localisé sur le chromosome 11q13. Il convient de rappeler que les gènes UCP2 et UCP3 sont positionnés sur le même chromosome et séparés seulement par 7 à 8 kb. Le gène UCP3 est composé de 7 exons et 6 introns. Le codon d'initiation de la traduction (ATG) est localisé dans l'exon 2, le premier exon étant non codant. Le gène UCP3 génère deux ARNm, UCP3_{small} et UCP3_{Long}, codant pour deux protéines UCP3, une courte et l'autre longue, différant seulement par l'absence de 37 résidus en partie C terminale. Ces 37 résidus sont codés par l'exon 7 qui est manquant dans UCP3s. L'intron 6 contient un signal de clivage et de polyadénylation ; le signal AATAAAs termine le message d'élongation dans 50% des cas, générant UCP3s. Quand ce signal est court-circuité, le message d'élongation continue jusqu'au signal AATAAA_L (localisé environ 1,1 kb en aval de l'exon 7), et forme UCP3_L.

Il est enfin important de noter que les gènes UCP2 et UCP3 se situent dans une région du chromosome 11 qui coïncide avec trois loci indépendants impliqués dans l'obésité. Des anomalies du gène UCP3 pourraient potentiellement être responsables d'obésité dans ces modèles.

UCP3 est une protéine de 32 kilodaltons (kDa), localisée dans la membrane interne mitochondriale. Elle est composée de 6 hélices α hydrophobes. La séquence humaine en acides α -aminés d'UCP3 présente 73% d'homologie avec celle d'UCP2 et 57% avec celle d'UCP1 (17). L'architecture générale d'UCP3 consiste en 6 domaines transmembranaires et 3 domaines portant la signature des transporteurs mitochondriaux.

3.2- Régulation de l'expression d'UCP3

3.2.1- Arguments expérimentaux

Exposition au froid

Contrairement à une régulation positive marquée d'UCP1 par le froid, UCP3 n'est que faiblement et transitoirement régulée dans les mêmes conditions. Différents travaux ont donné des résultats divergents : certaines études ont montré une augmentation de l'expression de l'ARNm d'UCP3 dans les muscles squelettiques après exposition au froid (86, 90, 164), d'autres n'ont pas révélé de modification de l'expression (16, 17, 84) tandis qu'une dernière étude a présenté une diminution de l'expression d'UCP3 par le froid (164). Au niveau protéique, UCP3 diminue ou n'est pas modifiée par l'exposition au froid (70, 135, 164). Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait qu'UCP3 serait requis uniquement lors d'une exposition aiguë au froid participant alors à la thermogenèse adaptative et serait ensuite régulée négativement dans un but d'économie d'énergie. Dans le TAB, différents travaux, sur rat et souris, ont montré une augmentation de l'expression de l'ARNm d'UCP3 (16, 38, 70, 84, 90, 168). En outre, les souris n'exprimant pas UCP1 (KO UCP1) présentent une très forte intolérance au froid : dans ce cas, UCP3 ne se substitue pas à UCP1 pour la thermogenèse de non-frisson induite par le froid (43). D'autre part, les souris KO UCP3 résistent bien à une exposition de 24 heures à 6°C (51, 52, 53). Chez l'Homme, dans les muscles squelettiques, une diminution de la température de 22°C à 16°C n'altère pas l'expression de la protéine UCP3, même si la production d'ARNm tend à diminuer (135). Bien que le froid ne semble pas être un stimulus majeur de la régulation de l'expression d'UCP3 dans les muscles squelettiques et dans le TAB, différents travaux (39, 40) ont montré que des agents physiologiques et pharmacologiques (superoxydes, alcènes...) s'avéraient thermogéniques *in vivo* et activaient en parallèle le découplage de la phosphorylation oxydative. Par ailleurs, les oiseaux réalisent une thermogenèse adaptative même s'ils n'expriment pas UCP1. L'UCP aviaire (Av UCP) identique à 70% à UCP3 des mammifères admet une expression tissulaire restreinte aux muscles squelettiques (113, 158).

L'exposition au froid entraîne une augmentation de l'expression des ARNm de AvUCP chez le colibri, le canard et le poulet (113, 150, 158). Ces observations confortent l'hypothèse d'un rôle majeur de l'AvUCP dans la thermogenèse chez les oiseaux.

Le tableau III présente une synthèse des différents travaux réalisés.

Auteurs	Conditions	Espèce	TAB	Muscles
(84)	4°C 10 jours	Rat	Aug. des ARNms	Pas de modification des ARNms
(17)	6°C 20 jours	Rat	ND	Pas de modification des ARNms (muscle tibial)
(16)	6°C 48 heures	Rat	Aug. des ARNms	Pas de modification des ARNms (muscle tibial)
(86)	6°C 6 à 24 heures 6°C après 6 jours	Rat	ND	Aug. des ARNms Dim. des ARNms
(38)	4°C 7 jours	Rat	Aug. des ARNms	ND
(168)	4°C 3, 24, 72h	Rat 10 à 14 semaines Rat 26 mois	Aug. des ARNms Dim. des ARNms	ND ND
(90)	4°C 12 et 24 heures	Souris	Aug. des ARNms	Aug. des ARNms (<i>soleus</i>)
(70)	5°C 7 jours	Rat	Aug. des ARNms Dim. de la protéine	Dim. de la protéine (muscle gastrocnémien)
(164)	5°C 24 heures	Rat	ND	Dim. des ARNms et de la protéine (<i>soleus</i>) Dim. des ARNms sans modification de la protéine (muscle gastrocnémien)
(135)	16°C 60 heures	Homme	ND	Dim. des ARNms et de la protéine (<i>soleus</i>) Dim. des ARNms sans modification de la protéine

Tableau III: Régulation par le froid d'UCP3 (arguments expérimentaux).

Aug. : Augmentation ; Dim. : Diminution ; ND : non détecté.

Exercice physique

L'exercice physique, de manière ponctuelle (« en aiguë ») ou régulière, joue un rôle important dans la prévention de l'obésité en augmentant soit le métabolisme énergétique soit l'oxydation des acides gras. C'est pourquoi l'effet de l'exercice physique sur la régulation de l'expression d'UCP3 a été largement étudié.

Chez les rongeurs, une activité physique intense de deux heures entraîne une augmentation des ARNm de 252% et 63% respectivement dans la partie glycolytique et dans la partie oxydative du *gastrocnemius* (34). Ce résultat est également retrouvé par Zhou et al. chez le rat (173). Ces travaux montrent aussi que l'augmentation des ARNm_s d'UCP3 est proportionnelle à la durée de l'exercice. Chez l'homme, un exercice de cyclisme d'une durée de 4 heures augmente l'activité transcriptionnelle d'UCP3 d'environ 600% (110). L'hypothèse la plus évidente qui découle de ces résultats est que l'exercice physique *per se* régule l'expression d'UCP3. Selon cette hypothèse, l'expression de la protéine UCP3 devrait également s'accroître. Or, la quantité d'UCP3 dans les muscles de rats hébergés dans des cages dotées de roues permettant une activité physique spontanée pendant 9 semaines, ne diffère pas significativement de celle de rats sédentaires (34). D'autre part, des rats soumis à 2 périodes d'entraînement de 4 semaines ont même présenté une diminution de l'expression de la protéine UCP3 dans le *soleus* et le *tibialis anterior* (15). La production d'ARNm codant pour UCP3 (134) et l'expression de la protéine UCP3 (119, 133) sont significativement réduites chez des sujets entraînés par rapport à des personnes non entraînés.

Ainsi, seulement un exercice réalisé de façon ponctuelle engendre une augmentation de la transcription du gène UCP3 alors que l'entraînement physique régulier conduit au contraire à une diminution de l'expression d'UCP3. Par conséquent, les mécanismes d'adaptation métabolique liés à un exercice physique régulier interviendraient de façon majeure dans la régulation de l'expression d'UCP3, plutôt qu'un facteur intrinsèque de l'exercice physique (ex : décharge de catécholamines). L'équipe de Schrauwen a montré que chez l'homme, après un exercice physique intense avec stabilisation des concentrations plasmatiques d'acides gras (AG) (au moyen d'apports de glucose avant, pendant et après l'exercice), l'expression d'UCP3 n'est pas modifiée. Ces auteurs concluent que l'augmentation d'ARNm d'UCP3 après un exercice physique ponctuel est liée à une augmentation prolongée des concentrations plasmatiques d'AG. La diminution d'expression d'UCP3 chez les sujets entraînés ou après un entraînement serait le résultat d'une adaptation

associée à l'amélioration de la production d'ATP aérobie en diminuant le découplage de la phosphorylation oxydative (61).

Restriction alimentaire et jeûne

Chez les rongeurs, une restriction alimentaire modérée (50%) sur une semaine, entraîne une diminution de l'expression des ARNm d'UCP3 de 81% dans les muscles (16). Ce résultat a également été retrouvé par Giacobino avec une restriction alimentaire de 40% sur une semaine dans le muscle *tibialis anterior* (51). Chez l'homme la restriction alimentaire régule également l'expression d'UCP3. Des sujets maigres et obèses soumis à un régime hypocalorique (1045 kJ/jour) présentent une augmentation marquée de l'expression des ARNm d'UCP3 dans le muscle *vastus lateralis* à l'inverse des résultats obtenus chez le rongeur (94, 95). La perte de poids entraîne quant à elle une diminution de l'expression d'UCP3 dans les muscles squelettiques (45).

Le jeûne est une des situations physiologiques induisant une régulation de l'expression d'UCP3 des plus marquées. Chez les rongeurs, un jeûne de 48 heures entraîne une augmentation de l'ARNm d'UCP3 dans le muscle *soleus* (x 2), le *gastrocnemius* et dans le *tibialis anterior* (x6) (121). L'équipe de Boss met même en évidence une augmentation supérieure des ARNm d'UCP3 dans le *soleus* (x 3 à 5) après un période de jeûne identique (16). De nombreux autres travaux montrent des résultats comparables pour l'expression d'UCP3 dans la muscle suite à un jeûne (55, 165, 25, 140, 74) tandis que les travaux de Jimenez ne mettent pas en évidence d'augmentation de l'expression des ARNm d'UCP3 dans le muscle après un jeûne (73). Au niveau protéique, l'expression d'UCP3 dans le muscle *gastrocnemius* n'est que modérément augmentée (x 1,5) par le jeûne (16). Des modulations de la transcription d'UCP3 ne sont donc pas nécessairement suivies d'une augmentation de la traduction. Des résultats similaires ont été obtenus par d'autres équipes de recherche chez les rongeurs (55, 165). D'autre part, les travaux de Weigle et al. (165) ont montré que l'augmentation de l'expression des ARNm d'UCP3 des muscles squelettiques de rats mis à jeun 24 à 72 heures pouvait être reproduite par une élévation des acides gras plasmatiques, alors que les autres réponses physiologiques qui ont lieu pendant le jeûne (chute de la leptine plasmatique, augmentation des concentrations de corticostérone) n'avaient pas d'effet sur l'expression des ARNm d'UCP3. Cette étude a permis d'affirmer que pendant le jeûne les concentrations plasmatiques d'acides gras sont corrélées avec l'expression

des ARNm d'UCP3 dans les muscles squelettiques des rongeurs et de l'Homme. Le travail de Brun et al. (23) confirme cette notion : chez la souris, le jeûne n'a d'effet sur l'expression d'UCP3 que lorsque le système lipolytique de l'animal est fonctionnel et que les concentrations plasmatiques d'acides gras varient.

Chez l'Homme, un jeûne de 15 ou 40 heures entraîne l'augmentation de l'expression des ARNm d'UCP3 dans le muscle *vastus lateralis* (153).

Le tableau IV résume les différents travaux cités ci-dessus.

Référence	Conditions	Espèce	TAB	Muscles
(51)	Restriction calorique	Rat	ND	Dim. des ARNms (dans le muscle <i>tibialis</i>)
(16)	Restriction calorique Jeûne 48h	Rat	ND	Dim. des ARNms Aug. des ARNms
(94)	Restriction sévère 5 jours	Homme	ND	Aug. des ARNms
(45)	Perte de poids	Homme	ND	Dim. des ARNms
(56)	Jeûne 48h	Rat	Dim. des ARNms	Aug. des ARNms
(121)	Jeûne 48h	Rat	ND	Aug. des ARNms (dans les muscles <i>gastrocnémien.</i> et <i>soleus</i>)
(16)	Jeûne 24 et 48 h	Rat	Dim. des ARNms	Aug. des ARNms (dans les muscles <i>tibialis</i> et <i>soleus</i>)
(165)	Jeûne 24, 48, 72h	Rat	ND	Aug. des ARNms (dans le muscle <i>gastrocnémien</i>)
(121)	Jeûne 46h	Rat	ND	Aug. des ARNms (dans les muscles <i>tibialis</i> , <i>gastrocnémien</i> et <i>soleus</i>)
(25)	Jeûne 24h	Rat	ND	Aug. des ARNms et de la protéine
(140)	Jeûne 48h	Rat	Dim. Des ARNm et protéines	Aug. des ARNms et de la protéine (dans le muscle <i>gastrocnémien</i>)
(74)	Jeûne 48h	Rat	ND	Aug. des ARNms et de la protéine (dans le muscle <i>gastrocnémien</i>)
(68)	Jeûne 24h	Rat	Aug. des ARNms	ND
(73)	Jeûne 24h	Souris	ND	Pas de modification des ARNms mais Aug. de la protéine (dans le muscle <i>gastrocnémien</i>)
(110)	Jeûne 20h	Homme	Aug. des ARNms	ND
(153)	Jeûne 15 et 40h	Homme	ND	Aug. ARNm (dans le muscle <i>vastus lateralis</i>)

Tableau IV : Régulation par le jeûne d'UCP3 (arguments expérimentaux).

Aug. : Augmentation ; Dim. : Diminution ; ND : non détecté.

Hormones

Cas des hormones thyroïdiennes iodées

Les hormones thyroïdiennes régulent le métabolisme énergétique en augmentant la respiration et la dépense énergétique et en diminuant le rendement métabolique. Elles exercent la majorité de leurs effets biologiques connus par la stimulation de la transcription de gènes, mais les gènes cibles des hormones thyroïdiennes impliqués dans le métabolisme énergétique ne sont pas encore complètement identifiés. La découverte d'UCP3, similaire à l'UCP thermogénique du TAB, UCP1, suggère que cette protéine est une cible potentielle des hormones thyroïdiennes et qu'elle pourrait être impliquée dans la dépense énergétique. Cette recherche a été particulièrement active après la découverte de l'extrême sensibilité de l'expression d'UCP3 à la T3 dans les muscles squelettiques des rongeurs. En effet, l'injection d'hormone thyroïdienne T3 à des rongeurs augmentait l'expression des ARNm d'UCP3 (x 4-6) dans les muscles squelettiques, ainsi que le niveau métabolique de base (55, 84, 91). Chez l'Homme, le doublement de la concentration plasmatique de T3, obtenue par administration orale de T3 à la dose de 75 µg/jour pendant 14 jours, entraîne une augmentation de l'expression des ARNms d'UCP3 (x 2, 4) dans les muscles squelettiques sans modification de l'expression des gènes de la chaîne respiratoire et sans modification des concentrations plasmatiques d'acides gras (8). De plus, UCP3 a été présenté comme un gène sensible aux hormones thyroïdiennes dans une étude de microarray exploitant des ADNc de muscle squelettique humain (31). Les résultats issus des cultures de cellules myogéniques de rongeurs indiquent un effet positif de la T3 sur la transcription du gène UCP3, suggérant une régulation directe par les hormones thyroïdiennes iodées de l'expression d'UCP3 (100). Dans les myotubes (cellules musculaires) humains différenciés en culture, l'expression des ARNm d'UCP3 est modérément augmentée (x 2,5) suite à l'exposition aux hormones thyroïdiennes (8).

Néanmoins, comme un traitement aigu par les hormones thyroïdiennes iodées exacerbe la lipolyse et modifie les concentrations plasmatiques d'acides gras, il est possible que l'expression d'UCP3 résulte indirectement des variations plasmatiques d'acides gras plutôt que de la régulation directe de T3 (et T4) du gène UCP3. Les travaux de Barbe et al. (8) ont cependant clairement démontré l'action directe *in vitro* de T3 sur l'expression d'UCP3 dans des cellules musculaires différenciées. Selon une première hypothèse, les effets génomiques de T3 sur UCP3 pourraient être reliés à une induction primaire des gènes de la chaîne respiratoire (cyclo-oxygénases

2 et 4) susceptibles de contrôler l'expression d'UCP3. Plus classiquement, T3 stimulerait la transcription d'UCP3 via l'hétérodimérisation du récepteur aux hormones thyroïdiennes avec le récepteur à l'acide rétinoïque 9 cis (RXR) sur un élément de réponse du promoteur d'UCP3 (152). Cette seconde hypothèse est confortée par plusieurs travaux : Acin et al. (1) ont mis en évidence par analyse informatique assistée de la région 5' du gène humain UCP3 un site de liaison possible du récepteur des hormones thyroïdiennes (TRE). Deux autres TRE ont été décrits lors d'une étude systématique des séquences promotrices du gène humain UCP3 (152). En 2005 le mécanisme d'action directe des hormones thyroïdiennes sur le promoteur du gène humain UCP3 a été décrit par l'équipe de Villarroya (142). *In vitro*, des transfections cellulaires par des plasmides comportant le promoteur UCP3 humain – gène rapporteur (Luciférase), ont permis de mettre en évidence l'implication directe des hormones thyroïdiennes via leur récepteur sur le promoteur d'UCP3 humain. La liaison du récepteur nucléaire sur le promoteur nécessite la présence de MyoD (facteur de transcription musculaire). Par analyse informatique assistée et délétions successives du promoteur en 5', un TRE a été individualisé. Ce TRE est en réalité inclus dans un élément de réponse multihormonal liant RXR et les récepteurs aux PPAR (péroxisome proliferated activated receptor).

Cas de la leptine

La leptine est également un régulateur positif de l'expression d'UCP3. La leptine peut activer la dépense énergétique probablement en activant les protéines découplantes UCP1 dans le TAB et /ou UCP3 dans les muscles squelettiques. L'administration de leptine augmente l'expression d'UCP3 dans le muscle squelettique chez le rongeur (35, 54, 55) en restriction calorique. De plus, chez la ratte en lactation, la diminution de la concentration plasmatique de leptine est associée à une diminution de l'expression d'UCP3 (166, 108) Cependant ces résultats ne permettent pas de déterminer si UCP3 est une cible directe de la leptine.

Acides gras

Plusieurs arguments expérimentaux démontrent l'implication des acides gras (AG) dans la régulation de l'expression d'UCP3. Un exercice physique aigu, condition connue pour être associée à une augmentation des concentrations plasmatiques d'AG, entraîne une induction de l'expression des ARNm d'UCP3 dans les muscles

squelettiques de rongeurs (34). L'augmentation de l'expression d'UCP3 chez la souris juste après la naissance est corrélée aux concentrations plasmatiques d'AG augmentées consécutivement à la tétée (22). Chez le rat, la transcription du gène UCP3 est accrue dans les muscles squelettiques (*extensor digitorum* et *soleus*) après perfusion d'acides gras. Un traitement à l'acide nicotinique (inhibiteur de la lipolyse) supprime l'augmentation plasmatique d'AG et prévient l'induction de l'expression d'UCP3 dans le muscle *soleus*, mais n'a que peu d'effet dans les muscles *gastrocnemius* et *tibialis anterior* (121). Cette même équipe s'est intéressée à l'implication des flux d'AG dans la régulation de l'expression d'UCP3. Un traitement à l'Etomoxir, un inhibiteur de la carnitine palmitoyl transférase contrôlant l'entrée des AG dans la mitochondrie, réduit la quantité d'ARNm d'UCP3 dans le *tibialis anterior* mais pas dans le *gastrocnemius* de rats nourris ou à jeun (122).

In vivo chez l'Homme, une restriction calorique sévère, caractérisée par une augmentation des AG plasmatiques conduit à une surexpression d'UCP3 (94, 95). Une corrélation positive entre les quantités d'ARNm d'UCP3 et les concentrations plasmatiques d'AG a été mise en évidence chez des sujets obèses (126), et chez des sujets obèses non diabétiques et des patients diabétiques (159). Enfin, chez les athlètes entraînés, un régime gras induit l'expression d'UCP3 (131).

Khalfallah et al. (76) ont démontré l'intervention directe des AG dans la régulation de l'expression d'UCP3 en perfusant pendant quelques heures une émulsion de triglycérides (TG) sur des volontaires sains (n = 14). L'augmentation des AG plasmatiques et de l'intensité de l'oxydation des lipides provoquées par la perfusion de triglycérides induit l'expression des ARNms des deux variants d'UCP3 dans le muscle squelettique.

Les travaux menés *in vitro* supportent également l'hypothèse d'un effet direct des AG ou de leurs dérivés sur l'expression du gène UCP3. Dans les myocytes C2C12 traités par une solution d'Intralipides (LiposynTM, ac. linoléique 54.5%, ac. oléique 22.4%, ac. palmitique 10.5%, ac. linoléique 8.3%, ac. stéarique 4.2%) pendant 24 heures, une augmentation marquée des quantités d'ARNm d'UCP3 est observée de manière temps-dépendante. L'exposition de ces mêmes cellules aux triglycérides, probablement hydrolysés en AG, active l'expression du gène UCP3. Afin de vérifier l'effet intrinsèque des AG, les cellules C2C12 ont été traitées par l'acide oléique. Cet AG induit l'expression d'UCP3 dans les myotubes de manière concentration et temps-dépendante (67).

Les AG et leurs métabolites sont des ligands connus des membres de la famille des PPAR. Les complexes PPAR/ligand sont capables de transactiver des gènes du

métabolisme des AG. Cinq éléments de réponse aux PPAR (PPRE) ont été identifiés par analyse informatique assistée dans la région promotrice du gène UCP3 (1, 152). *In vitro*, Hwang et al. (67) observent une activation de l'expression d'UCP3 après traitement des myocytes C2C12 par le BRL 49653, un agoniste de PPAR γ . *In vivo* chez les rongeurs, un traitement aigu par des fibrates, capables d'activer PPAR α ou PPAR α et PPAR δ , peut mimer les effets des AG sur l'expression d'UCP3 dans le muscle squelettique en période néonatale (22) et chez l'adulte (110). Des études sur le contrôle transcriptionnel du gène humain UCP3 ont montré que non seulement PPAR α mais aussi PPAR δ étaient capables d'activer la transcription d'UCP3 via un PPRE (143). Il n'y a pas de consensus sur le médiateur préférentiel de la réponse du gène UCP3 aux AG. *In vivo*, PPAR α paraît plus puissant pour activer UCP3 (145), cependant les myocytes restent très sensibles à PPAR δ *in vitro* (24). Les souris invalidées pour le gène PPAR α (KO PPAR α) et soumises à un jeûne, présentent une induction de l'expression d'UCP3 dans le muscle du même ordre que celle observée chez les souris sauvages (75). Différents travaux tendent à montrer l'existence de mécanismes compensatoires entre les PPAR (99, 109). PPAR δ est aujourd'hui considéré comme un véritable acteur de la régulation de l'expression d'UCP3.

Les différents types d'AG caractérisés par la longueur de la chaîne carbonée n'ont probablement pas le même effet sur la régulation de l'expression d'UCP3. Chez le rat, un régime enrichi en AG à moyenne chaîne (de 6 à 14 C) ne modifie pas la production d'ARNm d'UCP3 tandis qu'un régime enrichi en AG à longue chaîne (supérieure à 14 C) entraîne une induction de l'expression d'UCP3 dans le muscle squelettique (66). Ces résultats soulèvent la question de l'existence de ligands préférentiels des PPAR. Sur des cellules musculaires humaines, la régulation de l'expression d'UCP2 par les AG insaturés ω -6 semble prépondérante par rapport aux autres types d'AG (30). Ces données pourraient être extrapolables à UCP3 si l'on considère l'observation de variations coordonnées des deux gènes.

3.2.2- Etude du promoteur humain UCP3

Ce paragraphe ainsi que la Figure 13 ont pour objectif de présenter les différents éléments nécessaires à la transcription et à la régulation du gène humain UCP3 connus à ce jour.

Plusieurs équipes ont tenté de positionner précisément le point +1 d'initiation de la transcription. Acin et al. (1) le positionnent au nucléotide (nt) G, 764 nt en amont du site d'initiation de la traduction situé dans l'exon 2. Tu et al. (152) le situent au nt T, 187 pb en amont du site d'initiation de la traduction. Enfin Esterbauer et al. (44) ainsi que Solanes et al. (144) le situent dans une zone d'une vingtaine de nt, 200 nt en amont du site d'initiation de la traduction. Aujourd'hui encore, le point +1 de transcription n'est pas clairement défini. De plus, Esterbauer et al. (44) définissent des sites d'initiation de transcription tissus spécifiques. Leur étude a révélé que 2 sites de transcription pour chacun des deux tissus où UCP3 serait exprimé, TAB et muscle squelettique. Contrairement aux tissus humains, les tissus des rongeurs (TAB et muscle squelettique) présentent un site de transcription unique.

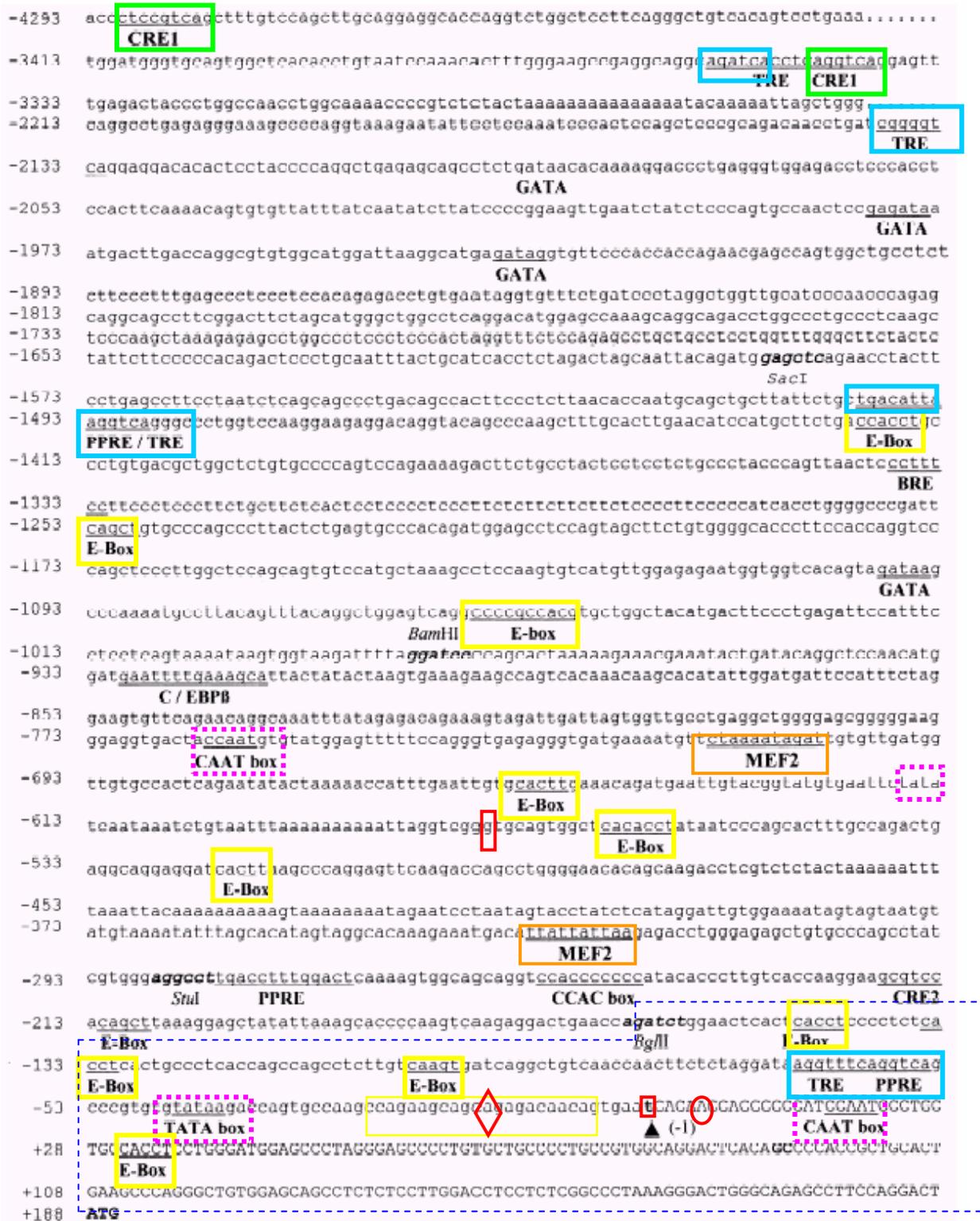


Figure 13: Séquence de la région 5' du gène humain UCP3.

La numérotation est basée sur le point +1 de Tu et al. (152). Les sites d'initiation de transcription sont visualisés en rouge ; le rectangle, le losange, le carré et le cercle correspondant respectivement aux emplacements proposés par Acin et al. (1), Esterbauer et al. (44), Tu et al. (152) et Solanes et al. (144). Les éléments classiques du promoteur sont encadrés en violet. En jaune et orange sont identifiés les éléments muscle spécifiques. En bleu sont représentés les PPRE et TRE, sites de liaison de récepteurs nucléaires. Les sites de liaison de l'AMPC sont encadrés de vert. En pointillés bleus est délimité le promoteur minimal identifié *in vitro* par Tu et al. (152) et *in vivo* par Riquet et al. (116) et Solanes et al. (143).

L'analyse informatique assistée du promoteur humain UCP3 a mis en évidence les éléments classiques de la machinerie transcriptionnelle : TATA box , CAAT box... mais aussi des séquences consensus pour différents éléments de réponse, lieu de fixation de récepteurs nucléaires. Le promoteur présente 4 TRE, sites de liaison des récepteurs aux hormones thyroïdiennes, 3 PPRE, sites de liaison des PPAR (*peroxisome proliferator activated receptor*) et un CRE, site de fixation de l'AMPc. Ces différents éléments sont positionnés sur la figure 14. Le PPRE et le TRE les plus proximaux forment en réalité un site de liaison multi hormonal où viennent se fixer en hétérodimère avec RXR (récepteur de l'acide rétinoïque 9 cis les récepteurs des hormones thyroïdiennes ou les PPAR) (142). La description de la région promotrice du gène UCP3 facilite la compréhension de son contrôle transcriptionnel. Une régulation par les hormones thyroïdiennes ou les acides gras peut légitimement être envisagée, conformément aux arguments expérimentaux présentés dans les paragraphes précédents.

D'autre part, plusieurs motifs muscle spécifiques, éléments nécessaires à l'expression musculaire ont été identifiés. Le promoteur présente de nombreux motifs (une douzaine) de liaison pour les facteurs de transcription musculaires de la famille MyoD, appelés Ebox (1, 152, 144). Les Ebox sont en général formées d'une séquence nucléotidique de type CANNTG. MyoD serait nécessaire à l'expression muscle spécifique *in vitro* (143) mais serait également nécessaire à la régulation par les PPAR lors de l'hétérodimérisation des ces derniers avec RXR sur leurs éléments de réponse (142).

3.3- Fonctions d'UCP3

3.3.1- Expression tissulaire

A l'inverse d'UCP1, l'ARNm d'UCP3 est préférentiellement exprimé dans les muscles squelettiques chez l'Homme et dans les muscles squelettiques, le TAB et le cœur chez les rongeurs. L'ARNm d'UCP3 est également faiblement détecté dans le muscle cardiaque, le tissu adipeux blanc, la thyroïde et la moelle osseuse de l'Homme, et dans le tissu adipeux blanc, le cerveau, les reins, le foie et le côlon des rongeurs (17). Dans les muscles squelettiques, l'expression d'UCP3 n'est pas uniforme. Elle varie selon la composition des fibres musculaires.

En effet, les muscles squelettiques présentent une grande diversité de performances et de spécialisation, liées principalement aux différents types de fibres qui les

composent (Tableau V). On peut classer les fibres (1) en fibres lentes ou rapides, selon la vitesse maximale de raccourcissement, et (2) en fibres oxydatives ou glycolytiques, selon la principale voie biochimique génératrice d'ATP. Les fibres lentes et rapides contiennent des isozymes de la myosine qui diffèrent par la vitesse maximale avec laquelle elles scindent l'ATP et entraînent le raccourcissement des fibres. Les fibres rapides contiennent une myosine dotée d'une activité ATPasique élevée et les fibres lentes contiennent une myosine dotée d'une activité ATPasique plus faible. L'autre critère de classification des fibres musculaires squelettiques est fondé sur la nature des enzymes disponibles pour la synthèse d'ATP. Certaines fibres contiennent de nombreuses mitochondries et possèdent par conséquent un grand pouvoir de phosphorylation oxydative. Ces fibres sont dites oxydatives. La majeure partie de l'ATP engendrée par ces fibres dépend de l'apport sanguin d'oxygène et de molécules de substrats énergétiques au muscle. Elles contiennent aussi de grandes quantités de myoglobine à l'origine de la couleur rouge foncé du muscle. C'est pourquoi on donnait aux fibres oxydatives le nom de fibres musculaires rouges. En revanche, les fibres glycolytiques possèdent peu de mitochondries, mais une grande concentration d'enzymes glycolytiques et des réserves importantes de glycogène. Elles contiennent peu de myoglobine et ont un faible besoin en oxygène. Leur pauvreté en myoglobine leur donne une couleur pâle, à l'origine de l'appellation fibres musculaires blanches. Sur la base de ces deux propriétés générales, on peut distinguer quatre types de fibres musculaires squelettiques :

- les fibres oxydatives lentes contenant une myosine dotée d'une faible activité ATPasique et possédant une capacité oxydative élevée,
- les fibres oxydatives rapides contenant une myosine dotée d'une forte activité ATPasique et possédant une activité oxydative élevée,
- les fibres oxydo-glycolytiques rapides contenant une myosine dotée d'une forte activité ATPasique et possédant une activité mixte,
- les fibres glycolytiques rapides contenant une myosine dotée d'une forte activité ATPasique et possédant une activité glycolytique élevée (Tableau V).

Ces quatre types de fibres se distinguent aussi par leur résistance à la fatigue. Les fibres glycolytiques rapides se fatiguent rapidement en raison de l'acidification produite par leur métabolisme, alors que les fibres oxydatives lentes sont très résistantes à la fatigue.

Chez la souris, l'expression d'UCP3 dans le muscle a été souvent étudiée au niveau des ARNm et finalement peu au niveau de la protéine. Jimenez et al. (73) ont étudié les quantités de la protéine UCP3 par western blot dans deux populations de

mitochondries (subsarcolemmale et intermyofibrillaire) au sein de différents types de muscles. Ils ont montré que la densité d'UCP3 par mg de protéine est supérieure dans les mitochondries subsarcolemmales par rapport aux mitochondries intermyofibrillaires. Ils ont également mis en évidence une densité supérieure d'UCP3 dans les muscles glycolytiques (*tibialis anterior* et *biceps femoris...*) par rapport aux muscles oxydatifs (*soleus*).

Chez l'Homme, les travaux de Hesselink et al. (61) ont concerné la distribution de la protéine UCP3 dans différents types de muscles. Ils ont montré, par immunofluorescence, une détection préférentielle de la protéine dans les fibres à contraction rapide et métabolisme glycolytique, puis dans les fibres à contraction rapide et métabolisme oxydatif et enfin dans les fibres à contraction lente et métabolisme oxydatif (Tableau V).

Le rôle physiologique d'UCP3 dans le muscle est encore mal compris. Lors de sa caractérisation en 1997, une homologie de structure avait été établie avec UCP1. Une homologie de fonction et donc un rôle dans la thermogénèse adaptative avait alors été proposé. Cependant, il semblerait aujourd'hui que cette protéine soit plutôt impliquée dans la défense contre la production de ROS et/ou le métabolisme des AG.

Vitesse de contraction des fibres	Lente		Rapide	
Type	<i>I</i>	<i>IIA</i>	<i>IIX ou IID</i>	<i>IIB</i>
Chaîne lourde de myosine	<i>I</i>	<i>Ila</i>	<i>IIX</i>	<i>Ilb</i>
Métabolisme	<i>Oxydatif</i>	<i>Oxydatif</i>	<i>Oxydo-glycolytique</i>	<i>Glycolytique</i>
Résistance à la fatigue	+++	++	+	+
Densité en mitochondries	+++	++	+	+
Quantité UCP3	-	+	++	+++
Exemple de muscle	<i>Soleus</i>		<i>Diaphragme</i>	<i>Tibialis anterior,</i> <i>Biceps femoris</i>

Tableau V : Caractéristiques biochimiques des fibres musculaires.

3.3.2-UCP3 et activité thermogénique

Par homologie avec UCP1 la première fonction proposée pour UCP3 a été un rôle dans la thermogénèse adaptative, par découplage de la phosphorylation oxydative. Les premiers travaux ont donc essayé de montrer les capacités découplantes d'UCP3 *in vitro*. Cependant aucun d'entre eux n'ont mis en évidence de fuite de protons en présence d'UCP3 (10, 25). D'autres travaux vont à l'encontre d'un rôle d'UCP3 dans la thermogénèse adaptative. L'injection de T3 ou d'un agoniste β_3 adrénergique augmente la consommation d'oxygène et la température de manière identique chez les animaux sauvages et invalidés pour le gène UCP3 (KO UCP3) (57) alors qu'elle est totalement inhibée chez les animaux KO UCP1. Dans le cadre de l'étude de l'hyperthermie liée à la prise d'amphétamines, le traitement de souris par de l'ecstasy augmente la température rectale et musculaire chez les animaux sauvages mais pas chez les souris KO UCP3 ; UCP3 a donc la capacité de produire de la chaleur *in vivo* (96). Cependant, cette situation reste supraphysiologique.

3.3.3- UCP3 et la production de ROS

La respiration cellulaire est associée à la production de ROS : en effet, les transferts électroniques entre les complexes mitochondriaux des crêtes conduisent à la réduction de O_2 en anion superoxyde puis en ion peroxy. Les anions ainsi obtenus peuvent réagir avec les H^+ transloqués dans la matrice pour former de l'eau, mais ces formes réactives de l' O_2 présentant un pouvoir oxydant élevé interviennent également dans de nombreuses réactions d'oxydation des AG, des protéines ou des acides nucléiques (ADN). Les lésions moléculaires engendrées peuvent conduire selon leur intensité à des mutations (lésions oxydatives de l'ADN non réparées) et à l'acquisition d'un génotype cancéreux ou à la mort de la cellule par nécrose ou apoptose. La mitochondrie est responsable d'une grande partie de la production totale de ROS de la cellule, notamment à travers l'activité des complexes I et III de la chaîne respiratoire (Figure 11). Les dommages provoqués par les ROS participeraient à la pathogénie de plusieurs maladies dégénératives dont le diabète, les maladies de Parkinson et d'Alzheimer et au vieillissement lui-même. La production de ROS est très sensible à la force proto-motrice générée à travers la membrane interne mitochondriale. Un découplage partiel, diminuant la respiration cellulaire mais n'abolissant pas entièrement la formation d'ATP, est connu pour diminuer la production de ROS par les complexes I et III.

UCP3 pourrait intervenir de deux manières dans la régulation de la production des ROS dans la mitochondrie. Premièrement, UCP3 interviendrait par sa fonction découplante. Les ions superoxydes attaquent les AG ω -6 polyinsaturés des membranes phospholipidiques, directement ou par l'intermédiaire de radicaux hydroxyles, et forment alors des radicaux d'AG « carbon-centered ». Ces derniers, rapidement peroxydés entraînent la production massive de 4 hydroxynonéal et d'autres alcènes réactifs capables d'activer UCP3. L'activation d'UCP3 permet un découplage partiel de la phosphorylation oxydative ayant pour conséquence la diminution de la force proto-motrice puisque le gradient de concentration des H^+ entre la matrice et l'espace intermembranaire tend alors à diminuer. On assiste enfin à la diminution de la production des ROS par un mécanisme de rétrocontrôle négatif local (21, 40, 138, 139, 160). Chez les KO UCP3, la production de ROS dans les muscles squelettiques est plus élevée (160) et les mitochondries de ces souris ont tendance à présenter plus de marqueurs des dommages oxydatifs (21). Mais le découplage de la phosphorylation oxydative n'est pas le seul mécanisme d'action d'UCP3 dans la diminution de la production de ROS.

Par ailleurs, UCP3 pourrait agir en tant qu'agent antioxydant en transloquant des anions d'AG peroxydés hors de la mitochondrie. Ces composés sont donc extraits du feuillet interne de la membrane interne mitochondriale vers le feuillet externe où ils s'accumulent. En raison de leur structure chimique ils ne peuvent pas revenir dans le feuillet interne par mécanisme de flip flop comme le font les AG intacts. L'évacuation des AG peroxydés préserve donc l'ADN mitochondrial et les enzymes matricielles de l'oxydation par les AG peroxydés (53) (Figure 14).

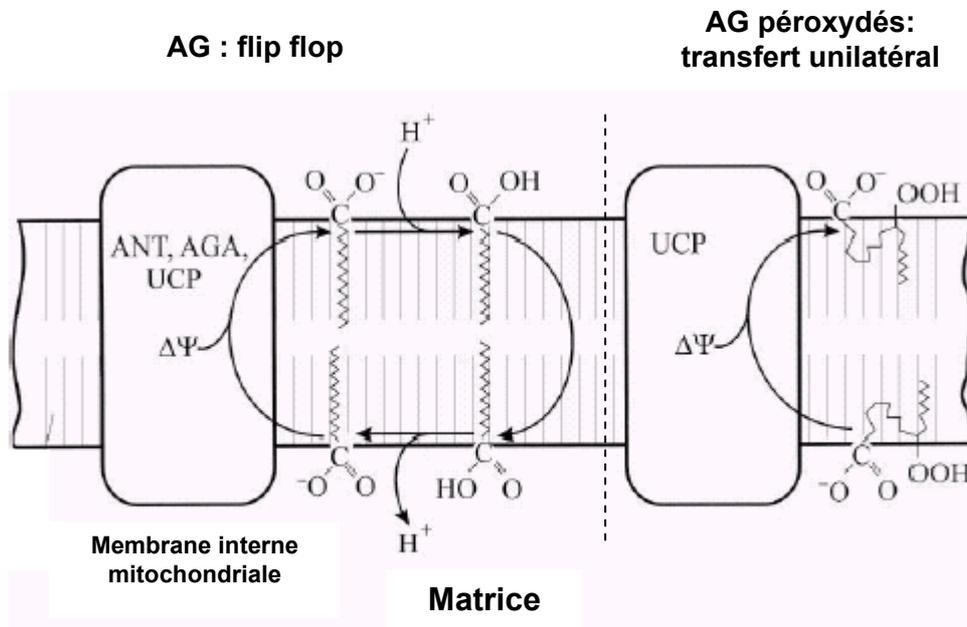


Figure 14: Implication d'UCP3 dans les mécanismes de translocation des AG (à gauche) et de leurs peroxydes (à droite).

Partie gauche, tous les transporteurs d'anions (ANT, AGA, UCP) sont capables d'évacuer, grâce au gradient électrochimique, les AG anioniques non oxydés depuis le feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane mitochondriale interne. Les AG anioniques évacués sont protonés par les ions H^+ de l'espace intermembranaire et retournent vers le feuillet interne par un mécanisme de flip flop. Les ions H^+ sont par conséquent relargués dans la matrice mitochondriale (cycle protonophore des AG). Partie droite, purification du feuillet interne de la membrane mitochondriale interne. Cette fonction paraît être spécifique des UCP par rapport aux autres transporteurs d'anions. Cette fonction antioxydante protège le matériel matriciel. D'après Goglia et Skulachev (53).

3.3.4- UCP3 et le métabolisme des acides gras

Les rôles exacts d'UCP3 dans le métabolisme des acides gras ne sont pas encore complètement élucidés. Deux hypothèses ont été formulées présentant UCP3 comme un transporteur d'AG anioniques.

Selon Schrauwen et al. (130), lorsque les capacités d'oxydation des acides gras de la mitochondrie sont dépassées, une quantité non négligeable d'AG cytoplasmiques non estérifiés peut traverser la membrane mitochondriale externe par un mécanisme de flip flop et diffuser ensuite à travers la membrane interne (Figure 15A). Le gradient de protons mitochondrial entraîne la déprotonation de ces AG qui s'accumulent alors dans la matrice. En raison de l'absence des acyl CoA synthases dans la mitochondrie, les anions ne sont pas activés sous forme de thioesters de coenzyme A et ne peuvent donc pas être oxydés ou retourner dans le cytosol. Cependant UCP3, par un mécanisme d'efflux, permettrait l'évacuation des AG sous forme anionique vers le cytosol, diminuant ainsi les effets délétères d'une accumulation d'AG non métabolisables dans la mitochondrie (127).

Dans le modèle proposé par Himms-Hagen et Harper (63) la mitochondrie est également dans un état d'excès d'AG, ses capacités d'oxydation étant dépassées par l'apport de substrat. Cet état est caractéristique des situations où les AG représentent la source majeure de substrat : jeûne, exercice physique, régime hyperlipidique... Une fois dans la matrice, tous les AG activés, sous forme d'esters, ne sont pas dirigés vers la β -oxydation (Figure 15B). Une partie est hydrolysée par une thioestérase mitochondriale (MTE1). Le CoASH issu de cette hydrolyse est redirigé vers différentes étapes de la β -oxydation et du Cycle de Krebs où il est considéré comme un cofacteur limitant lors de dépassement des capacités oxydatives de la mitochondrie. Ce cycle futile de recyclage des AG activés produit également des AG anioniques qu'UCP3 exporterait hors de la mitochondrie afin de limiter les effets de lipotoxicité. UCP3 et MTE1 agiraient de concert pour assurer des niveaux élevés d'oxydation des AG. Contrairement à Schrauwen et al. proposant un rôle strict d'exportateur d'AG, Himms-Hagen et Harper voient UCP3 comme un agent régulateur des capacités d'oxydation mitochondriale des AG. Plusieurs résultats plaident en faveur de cette hypothèse. Les souris surexprimant UCP3 présentent des quantités plus élevées d'ARNm de MTE1 (97).

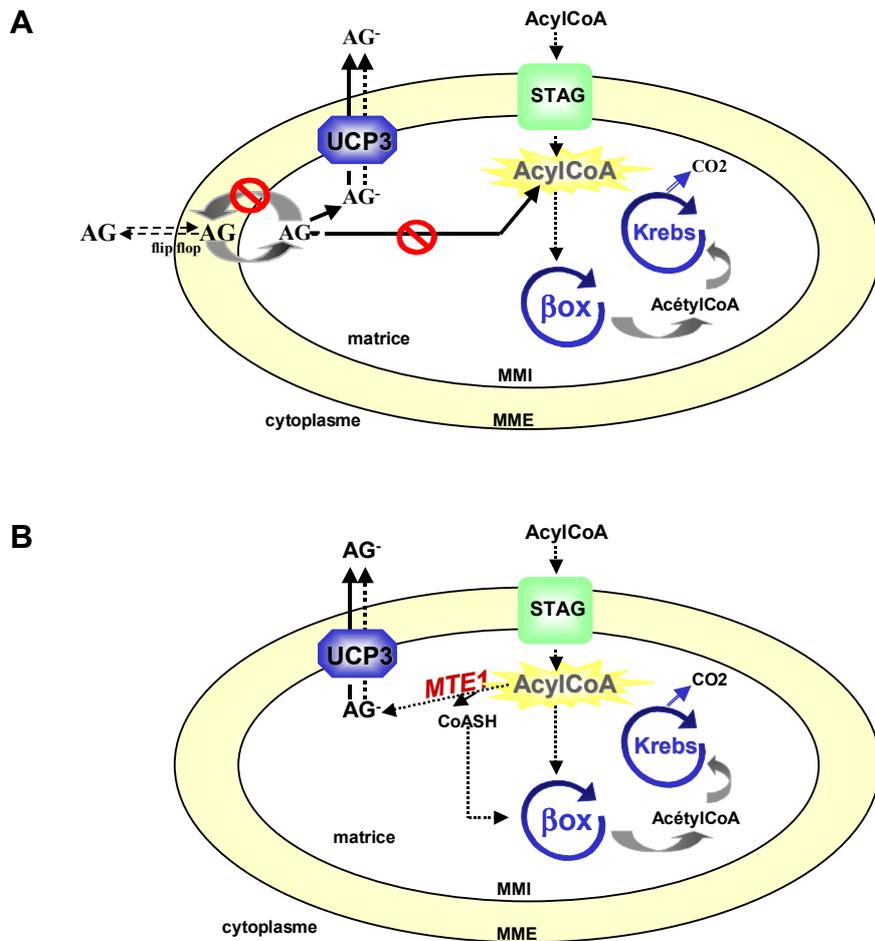


Figure 15: Rôles physiologiques d'UCP3 dans le métabolisme mitochondrial des acides gras.

A, hypothèse de Schrauwen et al.. B, Hypothèse de Himms-Hagen et Harper. AG : acides gras, β ox : cycle de β oxydation des acides gras, STAG : système de transport des acides gras, MME : membrane externe mitochondriale, MMI : membrane interne mitochondriale, MTE1 : thioestérase mitochondriale 1, CoASH : coenzyme A. D'après Schrauwen et al (130) et Himms-Hagen et Harper (63).

D'autre part, des souris transgéniques surexprimant de façon physiologique la forme humaine d'UCP3 présentent des capacités de transport et d'oxydation des AG plus élevées (11). Enfin, une corrélation étroite entre les niveaux d'expression et d'activité de MTE1 et UCP3 a été mise en évidence *in vivo* chez les rongeurs (98).

Cependant, la nature même des substrats transportés par UCP3 n'est pas totalement élucidée. En effet, aucune expérience ne montre qu'UCP3 transporte directement des AG ou des lipides oxydés.

3.3.5- UCP3, obésité et diabète sucré de type 2

L'expression d'UCP3 dans les mitochondries des muscles squelettiques associé au pouvoir thermogénique de cet organe a fait d'UCP3 une cible préférentielle dans les manipulations de dépense énergétique au sein du combat contre l'obésité et le diabète de type II.

Chez l'Homme, les quantités d'ARNm d'UCP3 mesurées chez les sujets obèses ne diffèrent pas de ceux des sujets « maigres » (95, 103). La proximité des gènes UCP2 et UCP3 sur la région du chromosome 11q13 rend difficile l'interprétation des études de « linkage » car les deux gènes sont transmis d'un bloc. De nombreux polymorphismes du gène UCP3 ont été décrits et étudiés sans pour autant être reliés de manière univoque à un phénotype d'obésité (32, 83, 163).

Certains variants (substitution -55 c/t) d'UCP3 ont été identifiés chez des sujets obèses de la tribu indienne Pima. Le phénotype c/c est associé avec une expression plus faible d'UCP3 dans le muscle squelettique des Indiens Pima (136) suggérant que l'allèle -55 t augmenterait l'expression d'UCP3 par rapport à l'allèle c. Chez les Indiens Pima, l'expression de l'ARNm d'UCP3 dans le muscle squelettique est étroitement corrélée au niveau métabolique de base pendant le sommeil. Cependant, aucune association n'a pu être faite entre l'expression d'ARNm d'UCP3 et l'indice de masse corporelle (correspondant au poids en kg divisé par la taille en m au carré). De récentes études dans des populations Espagnole et Caucasienne associent ce polymorphisme à une diminution du risque d'obésité (4, 87).

Chez l'Homme, les études cherchant à corréler les polymorphismes du gène UCP3 avec l'obésité ou l'IMC non pas fourni de conclusion évidente d'implication des mutations du gène UCP3 dans le développement de l'obésité.

Chez la souris, la sur-production physiologique d'UCP3 dans les muscles glycolytiques des animaux transgéniques confère une résistance à l'obésité induite

par un régime enrichi en graisses. Une amélioration de la sensibilité à l'insuline a été mise en évidence selon le sexe chez les animaux sur-exprimant UCP3 (149). Dans un autre modèle transgénique, la sur-expression physiologique d'UCP3 protège également de la prise de masse grasse induite par un régime enrichi en graisses (33). Ces études sur modèles animaux transgéniques semblent présenter UCP3 comme un acteur potentiel de la régulation de la prise de poids sous régime gras.

Le diabète de type II, ou diabète non insulino-résistant est une situation physiopathologique pendant laquelle l'expression d'UCP3 serait modifiée. Les études menées chez l'Homme sont contradictoires. Une diminution de 41% de l'expression des ARNm d'UCP3 a été observée dans le muscle squelettique de sujets diabétiques. D'autre part, cette même étude présente une corrélation positive entre l'expression d'UCP3 et la sensibilité à l'insuline (81). Cette diminution de l'expression d'UCP3 chez des patients diabétiques a également été confirmée au niveau protéique (128). Les sujets prédiabétiques (diminution de la tolérance au glucose) présentent aussi une diminution de la protéine UCP3 dans les muscles squelettiques (132).

Cependant, des résultats inverses ont été obtenus. Bao et al. (7) ont observé une augmentation de 85-170% des ARNm d'UCP3 dans les muscles squelettiques des patients diabétiques. De manière similaire, Vidal et al. (159) ont observé des niveaux d'ARNm d'UCP3 trois à quatre fois plus élevés chez les sujets diabétiques obèses comparés aux sujets obèses témoins.

Les différences d'expression d'UCP3 observées au cours du diabète de type II dans ces études pourraient trouver une explication dans l'hétérogénéité de la population diabétique. D'autre part, les divergences d'expression au niveau transcriptionnel et protéique sous-entendent peut-être une régulation post transcriptionnelle et post traductionnelle au cours du diabète de type II. Il est regrettable que l'expression d'UCP3 au niveau des ARNm et au niveau des protéines ne soit réalisée au sein d'une même étude afin de discriminer ce type de régulation.

Quelques grandes idées sont à retenir de cette partie bibliographique :

- L'implication des protéines découplantes dans la régulation du métabolisme énergétique, plus particulièrement dans la phosphorylation oxydative avec possibilité de découplage et de production de chaleur.
- L'implication d'UCP3 dans la régulation de l'utilisation catabolique des acides gras (production d'acétylCoA utilisé dans le cycle de Krebs ultérieurement).

- Le contrôle de l'utilisation des acides gras dans la mitochondrie par UCP3 en intervenant dans leur transfert mitochondrie / cytosol.
- L'expression musculaire d'UCP3 préférentiellement dans les fibres à métabolisme lent glycolytique.
- La régulation de l'expression d'UCP3 par les acides gras et les hormones thyroïdiennes.
- La probable implication d'UCP3 dans le diabète de type II.
- Le rôle potentiel d'UCP3 dans les systèmes anti oxydants de la cellule par la diminution de la production des ROS.

La revue très détaillée de Bézaire et al. synthétise les différents rôles proposés pour UCP3 et en discute la plausibilité (13).

Dans la partie expérimentale qui va suivre, l'expression musculaire d'UCP3 et sa régulation par les acides gras ainsi que l'influence de la prise alimentaire seront étudiés.

DEUXIEME PARTIE
ETUDE EXPERIMENTALE

CHAPITRE 1 : MATERIEL ET METHODES

1- Souris

L'élevage et les protocoles expérimentaux sont réalisés au sein du service de zootechnie de l'IFR 31 sous la responsabilité du Dr vétérinaire Yara Barreira en accord avec les règles en vigueur à l'INSERM quant à l'expérimentation animale. Les animaux, mâles et femelles, utilisés pour les protocoles nutritionnels appartiennent au fond génétique B6D2/F1 (Société Janvier, France). Ils sont élevés 4 à 5 par cage, soumis à un cycle jour-nuit 12h :12h, dans une pièce à lumière contrôlée. La température ambiante est maintenue constante à 21-22°C. Ils ont un accès libre à l'eau et sont nourris, selon le protocole, *ad libitum* avec le standard Harlan T2018 (18% de protéines, 5% de lipides et 57% d'hydrates de carbone).

2- Transgénèse

2.1- Déroulement

Les différentes étapes de transgénèse sont réalisées par le Dr Geneviève Tavernier, responsable de la plate-forme de transgénèse de l'IFR 150, au sein du service de zootechnie.

La transgénèse de surexpression implique deux substrats : le transgène, linéaire, purifié, en solution et l'ovocyte fécondé de souris de souche B6D2/F1.

L'objectif est de microinjecter le transgène dans un des deux pronuclei d'un ovocyte fécondé, après avoir collecté un nombre suffisant d'embryons et éliminé les cellules folliculaires. Afin de s'assurer de la collecte d'un nombre suffisant d'embryons, les souris B6D2/F1 donneuses subissent un traitement hormonal de super-ovulation par injection intrapéritonéale de *PMSG (pregnant mare serum gonadotrophin)* à J-3 et de *HCG (human chorionic gonadotrophin)* à J0. Durant la période induite d'ovulation d'environ 8 heures, les mâles sont introduits en vue de s'accoupler et de féconder les femelles 7 à 16 heures après l'administration d'HCG.

Les ovocytes des femelles donneuses sont collectés dans l'oviducte. Les cellules folliculaires sont éliminées mécaniquement ou par méthode enzymatique (hyaluronidase, 37°C ; cette enzyme est naturellement présente dans la tête des

spermatozoïdes). Ensuite ne sont sélectionnés que les ovocytes à pronuclei apparents. Les ovocytes isolés sont mis en culture en milieu de survie Brinster sous une couche d'huile de paraffine pendant 2 à 4 heures. La solution d'ADN est microinjectée à l'aide de micro-outils en verre étiré tandis que l'ovocyte est maintenu par aspiration contre l'extrémité arrondie d'une micro-pipette. Le pronucleus mâle est souvent préféré au pronucleus femelle pour la micro-injection en raison de sa plus grande taille. La micro-injection de quelques picolitres de solution d'ADN entraîne le gonflement du pronucleus. Ces derniers sont mis à incuber 16 heures à 37°C dans une solution de survie Brinster. Au sein du génome, le transgène s'insère de manière générale en plusieurs copies au niveau d'un seul site. Le profil d'insertion peut être vérifié par Southern Blot. Les embryons ayant atteint au moins le stade deux cellules sont sélectionnés pour la réimplantation dans l'utérus des mères porteuses. Les mères porteuses sont des femelles de fond génétique B6CBA/F1 accouplées avec des mâles vasectomisés. La transplantation des embryons est réalisée sous anesthésie générale. Une chirurgie sous loupe binoculaire est pratiquée pour extraire l'extrémité utérine et implanter 15 à 20 embryons dans une anse de l'oviducte. La première génération de souris transgénique est obtenue par croisement d'une souris fondatrice transgénique F0 avec une souris sauvage B6D2/F1. Les générations suivantes, F2, F3..., sont issues du croisement entre une souris transgénique hétérozygote et une souris sauvage B6D2/F1. Si les premières investigations sont envisageables 150 jours après la transgénèse, on considère qu'il faut attendre au moins la 4^{ème} génération de souris transgéniques avant toute caractérisation phénotypique ou protocole nutritionnel.

2.2- Constructions de transgénèse

L'étude de la régulation de l'expression du gène hUCP3 est réalisée grâce à une construction de type promoteur-gène rapporteur. Cette construction présente dans le sens 5'3' : 3,3 kb de séquences promotrices de hUCP3, l'exon 1, le gène rapporteur de la *chloramphénicol acétyl transférase* (CAT) et un fragment d'ADN génomique variable (Figure 16). Les fragments d'ADN génomique placés en aval du gène rapporteur sont issus du découpage d'une séquence de 16 kb comprenant la totalité des exons et des introns du gène hUCP3 (Figure 16). Trois fragments d'ADN génomique, nommés A à C et plus ou moins chevauchants, ont été générés. Une autre série de découpage du fragment A qui contient l'intron 1 complet et 204 pb de

l'exon 2 a été réalisée, conduisant à l'obtention de 6 fragments notés A1 à A6 (Figure 16).

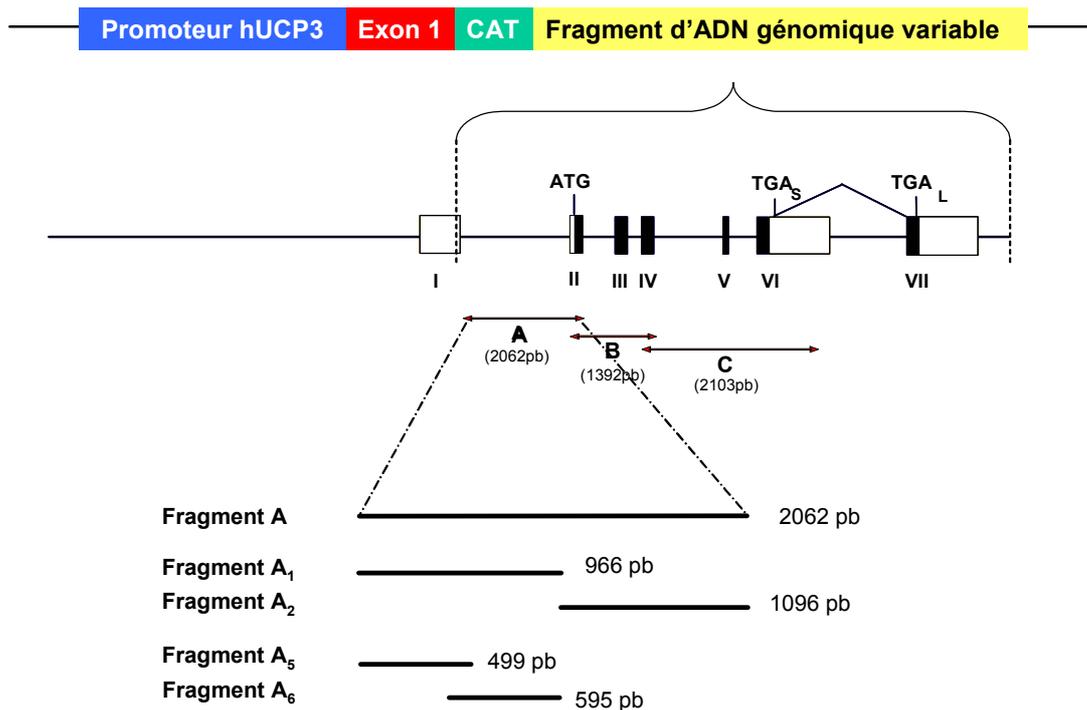


Figure 16: Constructions de transgénèse.

Construction promoteur-gène rapporteur présentant la séquence d'ADN génomique d'hUCP3 de 16 kb découpée en différentes parties exon-intron (les tailles des différents fragments sont notées entre parenthèses). En noir et en blanc sont respectivement représentées les parties codantes et non codantes. Les exons sont numérotés en chiffres romains. ATG marque le codon d'initiation de la traduction. TGA marque le codon de fin de traduction, formant les formes courtes d'UCP3 (TGA_S) ou la forme longue (TGA_L).

Production des fragments d'ADN génomique en aval du gène
rapporteur

L'ensemble de ces différents fragments a été obtenu à partir d'une matrice, nommée M358, séquence nucléotidique de 16023 pb comportant le promoteur ainsi que l'ensemble des séquences exons-introns du gène hUCP3. Le découpage a été réalisé par des enzymes de restriction.

Deux cas de figure se sont présentés selon que la zone à découper présente ou non des sites de restriction naturels. En cas d'absence de site de restriction à l'endroit désiré de découpage, ces derniers sont créés artificiellement par génie génétique (Figure 17). Des sites de restriction sont rajoutés par PCR. Pour un volume final de 50 μ L, 5 μ L de matrice (M 358 correspondant au gène hUCP 3 16 kb) sont mis en présence de 2 μ L de $MgSO_4$, 1 μ L de dNTP, 2 μ L d'amorces sens et anti sens comportant les sites de restriction (dont la concentration est augmentée en raison de la nature plasmidique du matériel à amplifier) et de 0,2 μ L de Taq Platinum High Fidelity (Invitrogen, Cergy, France). On applique à ce mélange le programme Biometra suivant : après dénaturation préliminaire à 96°C pendant 1 min, l'amplification est réalisée sur 30 cycles définis comme suit : 20 sec à 96°C, 30 sec à 58°C et 45 sec à 68°C. Après amplification, la taille des amplicons est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8 %. Les produits de PCR ont été purifiés grâce au kit QIA quick PCR (Qiagen, Courtaboeuf, France). Après dilution au 1/3, 2 μ L de fragment sont dosés par spectrophotométrie à 260 nm en micro-cuve. Un TA-clonage est ensuite réalisé. Chaque fragment est inséré par ligation dans le vecteur plasmidique pGEM-T Easy (Promega, Charbonnières, France). Avant ligation, une étape de « A tailing » est réalisée sur les inserts en vue d'insérer une queue polyadénylate. Pour un volume final de 10 μ L, 3 μ L de fragment est mis en présence de 0,6 μ L de $MgCl_2$, 0,2 μ L de dATP et 1 μ L d'enzyme Taq polymérase. Le mélange est ensuite mis au bain sec à 70°C pendant 20 min. Au final, 0,6 μ L de chaque insert sera prélevé et dilué dans 1,4 μ L d' H_2O . La ligation est réalisée avec un ratio vecteur/insert de 1/3. Pour un volume final de 10 μ L, les 2 μ L d'insert précédemment préparés sont mis en présence de 1 μ L de ligase et de 1 μ L de pGEM-T Easy. L'incubation dure une nuit à 4°C. Les plasmides obtenus sont ensuite insérés dans des bactéries *Escherichia coli* compétentes DH5 α (Invitrogen, Cergy, France). Pour chaque transformation, pour chaque insert, 50 μ L de bactéries sont mis en présence de 1 μ L de produit de ligation et chauffé au bain marie à 37°C pendant 20 sec. On

rajoute alors 950 μ L de milieu LB sans ampicilline et on met à incuber 1 heure à 37°C.

Ensuite, 10 % des bactéries transformées sont étalés sur une première boîte de Pétri et les 90 % restants sur une seconde boîte. Préalablement à l'ensemencement, les substrats de la β galactosidase sont répartis dans les boîtes de Pétri comme suit : 40 μ L d'IPTG (isopropyl β D-1-thiogalactopyranoside) et 32 μ L de X-gal (dérivé du galactose). Le clonage de l'insert au sein du pGEM-T Easy interrompt la séquence codant pour la β galactosidase. Les clones recombinants peuvent être visualisés car ils forment des colonies blanches alors que les autres colonies (non recombinantes) sont bleues. Vingt-quatre à 48 heures après, un repiquage est effectué à partir de 10 colonies pour chaque insert. Une digestion enzymatique est réalisée sur 6 colonies pour chaque fragment par des enzymes de restriction choisies afin de vérifier la bonne insertion de chaque insert. Elle est visualisée par électrophorèse sur gel d'agarose.

Les fragments présentant naturellement des sites de restriction sont générés et amplifiés par PCR à partir de la matrice M358, à l'aide d'amorces portant à leur extrémité 5' les sites de restriction pour leur clonage en aval du gène rapporteur CAT. Les fragments sont enfin purifiés par Qiaex (Qiagen, Courtaboeuf, France) avant d'être insérés dans un nouveau vecteur.

Les constructions sont générées à partir d'un vecteur pcDNA3 contenant la totalité de la région 5'-flanquante et la partie 5'-non traduite du gène hUCP3 (plasmide fourni par l'Institut de Recherche Servier) (Figure 17). Un fragment génomique de 6,2 kb est libéré par digestion enzymatique (KpnI / XhoI) et purifié par Qiaex (QIAGEN, Courtaboeuf, France). Ce fragment est cloné dans le vecteur plasmidique pCAT3basic (Promega, Charbonnières, France) permettant d'obtenir le plasmide hUCP3-pCAT3basic (Figure 17). Les séquences promotrices sont insérées dans un premier site de clonage du vecteur pCAT3basic à l'aide des enzymes de restriction KpnI/XhoI. Les fragments d'ADN intragénique à placer en aval du gène rapporteur sont insérés dans le deuxième site de clonage multiple du vecteur plasmidique hUCP3-pCAT3basic, à l'aide des enzymes de restriction AatII / SpeI. Enfin, la construction finale est libérée par digestion du vecteur par les enzymes de restriction ClaI/SalI.

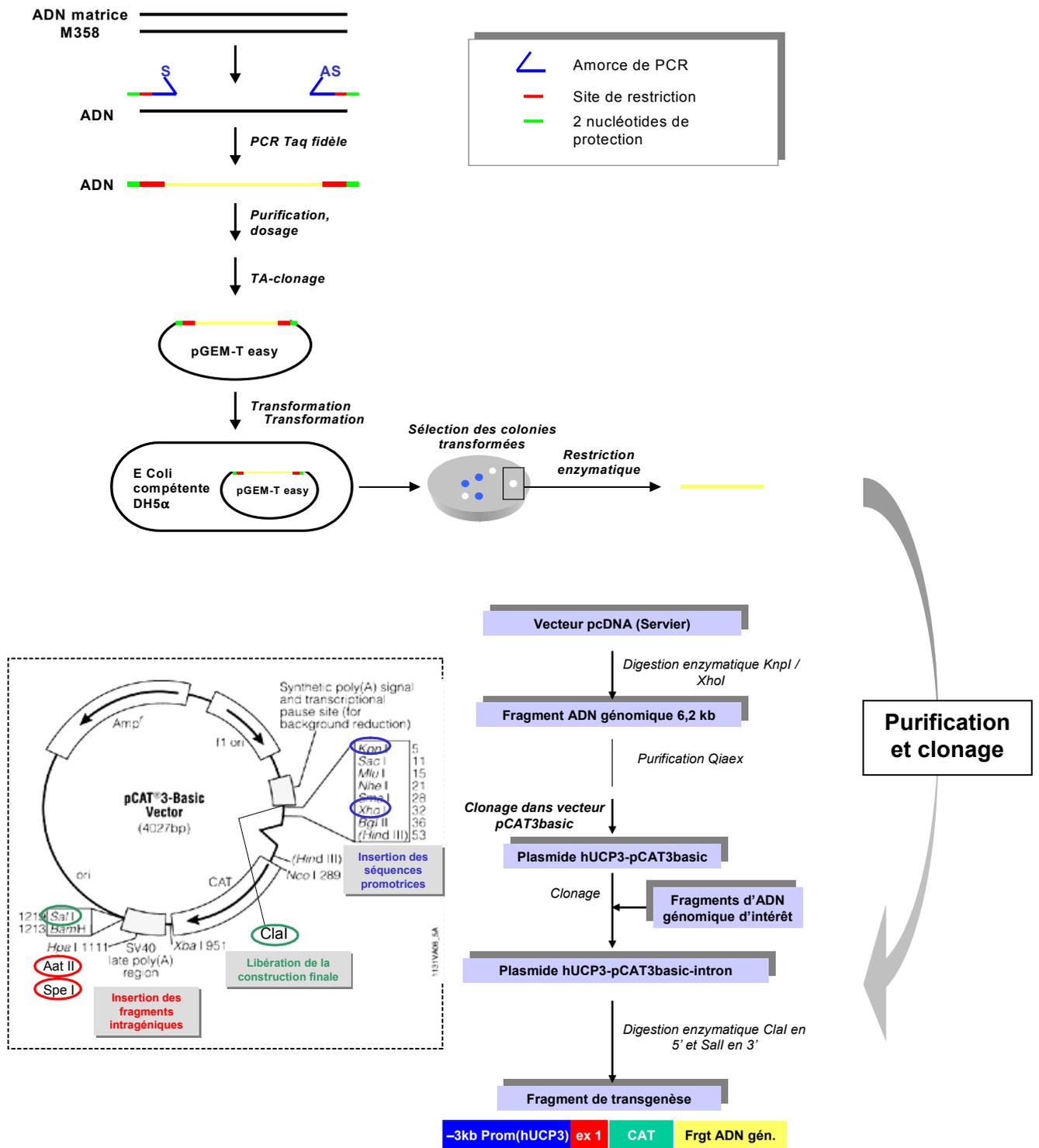


Figure 17: Préparation des fragments de transgène.

En haut, préparation des fragment d'ADN génomique à positionner en aval du gène rapporteur CAT dans la construction finale. En bas, différentes étapes de clonage dans le vecteur plasmidique pCAT3 basic (qui présente les enzymes de restriction nécessaires), PCR : polymérase chain réaction.

2.3- Génotypage ou criblage des souris transgénique et vérification de l'intégrité du transgène

Le criblage est réalisé à partir d'ADN génomique. Un bout de queue des souriceaux âgés de 10 jours est digéré à la protéinase K (10 mg/ml, 50°C), centrifugé 10 minutes à 7800 g à température ambiante. Le surnageant est mis à incuber au bain sec 10 min à 95°C. L'ADN génomique ainsi obtenu est amplifié par PCR. Pour un volume final de 50 µL, 2 µL d'ADN sont mis en présence de 0,2 mM de dNTP, 2,5 mM de MgCl₂, 0,3 mM d'amorces sens et antisens localisées dans la séquence du gène CAT et 0,04 U de Taq Polymérase (Promega, Charbonnières, France). Après une dénaturation préliminaire de 3 minutes à 94°C, l'amplification est réalisée sur 30 cycles (30 sec à 94°C, 45 sec à 55°C, 45 sec à 72°C) puis se termine par une élongation de 7 minutes à 72°C. La taille des amplicons (438 pb) est ensuite vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5%.

L'intégrité du transgène peut être vérifiée lorsqu'une nouvelle lignée de souris transgéniques n'exprime pas le gène rapporteur au niveau musculaire.

La construction d'ADN génomique présente ~3 kb de promoteur de hUCP3, l'exon 1, le gène rapporteur CAT et un fragment d'ADN génomique d'intérêt. Chacune des 4 parties de cette construction est amplifiée par PCR grâce à des couples d'amorces positionnés au sein de celle-ci comme figuré sur la Figure 18. L'intégrité du fragment de transgène comportant A5 par exemple est vérifiée chez un animal pour chacune des trois lignées obtenues. Un animal transgénique pour le fragment A1 (fragment d'ADN génomique contenant A5) est pris comme témoin positif. Un animal non transgénique pour hUCP3 est utilisé comme témoin négatif. Pour un volume final de 50 µl, 2 µl d'ADN génomique sont mis en présence de 10 mM de dNTP, 25 mM de MgCl₂, 10 µM d'amorces sens et antisens et 0,03U de Taq Polymérase (Promega, Charbonnières, France). Après une dénaturation préliminaire de 3 minutes à 94°C, l'amplification est réalisée sur 30 cycles (30 sec à 94°C, 45 sec à 58°C, 45 sec à 72°C) puis se termine par une élongation de 7 minutes à 72°C. La taille des amplicons pour chaque partie du transgène est ensuite vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5%.

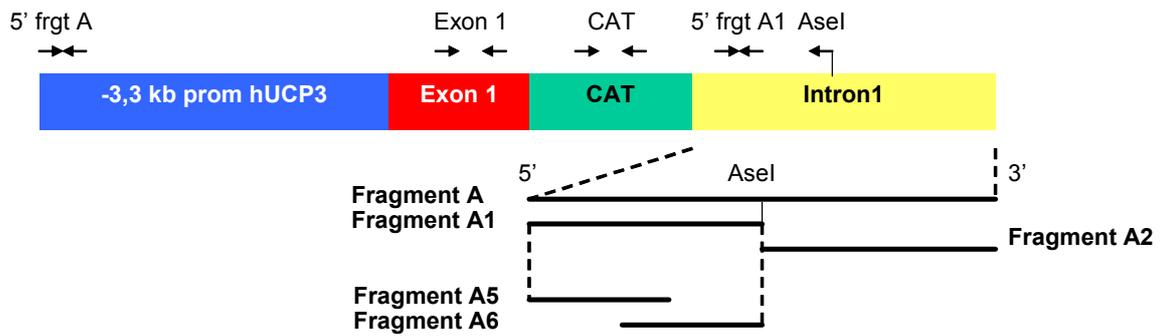


Figure 18: positionnement des amorces de PCR pour la vérification de l'intégrité du transgène.

PCR : polymerase chain reaction, frgt : fragment, prom hUCP3 : promoteur du gène humain UCP3, CAT : gène de la chloramphénicol acétyl transférase, AseI : enzyme de restriction.

2.4- Analyse de l'expression du transgène

2.4.1- Analyse des niveaux d'ARN messagers par RT PCT quantitative en temps réel

Les ARNs totaux des différents tissus sont extraits à l'aide de différents kits QIAGEN. La quantité d'ARNs extraits est évaluée par dosage spectrophotométrique au NANODROP sur 1 µL. Enfin, l'intégrité des ARNs est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8%.

1µg d'ARN total est traité à la DNase I (0,025 U/µl, Invitrogen, Cergy, France) pendant 15 minutes à température ambiante. L'inactivation de la DNase se fait par l'ajout d'EDTA (1 µl, 25 mM) et une incubation à 65°C pendant 10 minutes, dans un volume final de 11 µL. L'ARN est ensuite déstructuré à 65°C pendant 10 minutes en présence d'hexonucléotides aléatoires (1,5 µl, 50 ng/µl Amersham Biosciences, Orsay, France) et de dNTP (1 µl, 10 mM), puis transcrit de façon reverse par la Superscript II (0,5 µl, 200 U/µl Invitrogen, Cergy, France) en présence de DTT (2 µl, 0,1 M) et de RNase (0,5 µl, 40 U/µl) dans un volume final de 21µL selon les temps d'incubation suivants : 10 min à 25°C, 60 min à 42°C et 15 min à 70°C (thermocycleur Biometra, Goettingen, Allemagne). La PCR quantitative en temps réel est réalisée sur un appareil GeneAmp 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA) par la chimie Taqman ou SYBR Green (Applied Biosystems, Foster City, CA). Des contrôles négatifs (sans enzyme transcriptase reverse) sont inclus dans chaque expérience. Des duplicats sont réalisés pour chaque échantillon et la valeur moyenne du duplicat est utilisée pour calculer l'expression en ARNm du gène d'intérêt et du gène de référence (gène de ménage de l'ARN ribosomique 18s). Les niveaux d'expression d'ARNm sont quantifiés par la méthode de comparaison des Ct. Le Ct représente le seuil de nombre de cycles au niveau duquel le signal de fluorescence est augmenté de manière linéaire par rapport au bruit de fond. Les résultats sont normalisés par rapport à l'ARN ribosomal 18S à l'aide du kit « rRNA control Taqman Assay » (Applied Biosystems, Foster City, CA). Les résultats sont exprimés en $2^{-\Delta Ct}$.

2.4.2- Mesure de l'activité enzymatique de la protéine reportrice CAT

Pour quantifier l'activité de l'enzyme reportrice CAT, les tissus prélevés sont broyés à l'ultraturax dans 500 µl de tampon TED (250 mM Tris pH 7,6, 5 mM EDTA, 1 mM DTT). Les broyats sont mis à incuber à 65°C pendant 7 min 30 secondes et

centrifugés à 15300 g pendant 15 min à 4°C. Le surnageant, correspondant à la fraction protéique cytosolique débarrassée de la fraction membranaire, est stocké à -20°C jusqu'à la mesure d'activité CAT. La concentration en protéine totale est évaluée selon la méthode de Bradford (kit BioRad protein Assay), basée sur le changement de couleur du Bleu de Coomassie en présence de protéines. Le dosage est réalisé par comparaison avec une gamme étalon d'albumine bovine, par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 595 nm.

La mesure d'activité enzymatique est fondée sur l'utilisation d'un substrat portant un atome de carbone radiomarqué (^{14}C), sur lequel est transféré un groupement acétyl. Sur 30 μl d'extrait protéique, 15 μl de mélange réactionnel sont rajoutés (Tris 1 M pH 7.6, 5 μl , n-butyryl-CoA 5 mg/ml, 2,5 ml, ^{14}C Chloramphénicol 25 $\mu\text{Ci/ml}$, 2,5 ml) et mis à incuber 4 heures à 37°C. La réaction d'acétylation est ensuite arrêtée par ajout de 200 μL de Pristane/Xylène (2/1). Le mélange est vortexé 30 sec puis centrifugé 5 min à 15300 g. La phase solvant, contenant le chloramphénicol acétylé radiomarqué, est mélangée avec 3 ml de liquide scintillant (Emulsifier safe Perkin-Elmer) et mise à compter dans un compteur à scintillation. L'activité CAT est exprimée en cpm par minute et par mg de protéines totales.

3- Protocoles expérimentaux

Etude 1 : Caractérisation de l'expression d'UCP3 dans les muscles squelettiques

Des fragments de transgène de taille décroissante (Figure 19) ont été générés afin de caractériser la plus petite séquence intronique conférant la spécificité d'expression musculaire d'hUCP3 à travers le gène rapporteur CAT. Pour les fragments de transgène contenant les parties introniques A, A1 et A6, dans chaque cas deux lignées de souris présentant une expression musculaire de la CAT ont été établies. Les animaux transgéniques sont sacrifiés à l'âge adulte (6 à 10 semaines) et différents tissus sont prélevés: rate, cœur, tissu adipeux brun (TAB), diaphragme et quatre muscles squelettiques de la patte (*biceps femoris*, *rectus femoris*, *gastrocnemius* et *soleus*). Une mesure d'activité CAT (cf paragraphe 2.4.2) a été réalisé avec un animal représentatif de chacune de ces 6 lignées afin d'établir une comparaison des différents profils d'expression tissulaire.

A6 représente actuellement le plus petit fragment intronique qui assure la spécificité d'expression musculaire du gène rapporteur. Les régions génomiques comprenant le locus d'UCP3 ont été extraites de la banque de données UCSG Genome pour différentes espèces. Une analyse bioinformatique a été réalisée à l'aide de la suite de programmes JASPAR et Cis-eLement Over-representation (Clover) pour la recherche de sites putatifs de liaison de facteurs de transcription (125, 48). Un alignement de séquences nucléotidiques entre différentes espèces (homme, souris, rat, chimpanzé, macaque rhésus, chien et vache) a été réalisé avec le programme blastz/Threaded Blockset Aligner afin de rechercher des séquences conservées entre espèces.

Etude 2 : Manipulations nutritionnelles de jeûne chez l'adulte

Différentes lignées d'animaux transgéniques, avec le gène UCP3 entier (16 kb) ou avec les fragments A, A1 ou A6, comprenant des mâles et des femelles de souche B6D2 ont été utilisées (Figure 19). Les animaux, 2 ou 3 par cage, ont été mis à jeun pendant 48 heures tout en maintenant l'accès à l'eau afin d'éviter la déshydratation. Les animaux témoins ont continué d'être nourri avec le régime standard Harlan T2018. A l'issue de la période de 48 heures les animaux mis à jeun et les animaux contrôles sont sacrifiés et le sang est collecté sur 50 µl d'EDTA 2% pour récupérer le plasma (centrifugation à 1250 g pendant 15 min à 4°C). Lors de la dissection, les muscles de la patte (*biceps femoris*, *rectus femoris*, *gastrocnemius* et *soleus*), le diaphragme, le cœur, le TAB et un organe n'exprimant pas hUCP3 (foie, rein ou rate) sont prélevés et rapidement congelés dans l'azote liquide puis stockés à -20°C.

Etude 3 : Manipulations nutritionnelles de sevrage chez le souriceau et la femelle lactante

Différents groupes de femelles transgéniques pour le fragment A (intron 1) ont été constitués (Figure 19) :

- Groupe I : femelles vierges (n = 5)
- Groupe II : femelles gestantes sacrifiées le jour de la mise bas (J0) (n = 5)
- Groupe III : femelles lactantes avec souriceaux non sevrés (n = 6)
- Groupe IV : femelles lactantes avec souriceaux sevrés à J15 ou J20 (n = 5 ou 6)

Les femelles sont induites hormonalement (injection intrapéritonéale de PMSG à J-3 suivie d'une injection péritonéale d'HCG à J0) et mises à accoupler avec des mâles B6D2/F1. Après la mise bas (J0), la portée est criblée à J10 et seuls les souriceaux transgéniques sont conservés. A J15 ou J20, certains souriceaux (n = 6) sont séparés de leurs mères et alors soumis à un alimentation riche en glucides : c'est le sevrage, tandis que les autres (n = 6) continuent de têter. Dix-huit à 20 heures après cette transition nutritionnelle, les souriceaux (sevrés ou non sevrés) et les mères sont sacrifiés et le sang est collecté sur 50µl d'EDTA 2% pour récupérer le plasma (centrifugation à 1250 g pendant 15 min à 4°C). Lors de l'autopsie, les muscles de la patte (*biceps femoris*, *rectus femoris*, *gastrocnemius* et *soleus*), le diaphragme, le cœur, le TAB et un organe n'exprimant pas hUCP3 (foie, rein ou rate) sont prélevés et rapidement congelés dans l'azote liquide puis stockés à -20°C.

A

Fragment d'DN génomique d'intérêt	Effectifs		Age (semaines)
	Contrôle	A jeun	
Gène entier hUCP3 (16 kb)	6 (2M, 4F)	5 (2M, 3F)	20
A	6 (1M, 5F)	8 (2M, 6F)	19 à 29
A1	7 (3M, 4F)	6 (3M, 3F)	9
A6	6 (0M, 6F)	6 (0M, 6F)	12

48 heures

Sacrifice

- Plasma
 - Muscles (*Biceps femoris*, *rectus femoris*, *gastrocnemius*, *soleus*, diaphragme, cœur)
 - Tissu adipeux brun
 - Foie, rein, rate
- } Expression du transgène

BFemelles transgéniques pour le
fragment A (n=21)↓ Traitement hormonal (HCG,
PMSG)

Gestation

↓ Mise bas (J0)

Conservation des souriceaux
transgéniques

↓ Sevrage (J15 ou J20)

(ration riche en glucides)

↓ 18-20 heures

Sacrifice des souriceaux et des mères

- Plasma
 - Muscles (*Biceps femoris*, *rectus femoris*, *gastrocnemius*, *soleus*, diaphragme, cœur)
 - Tissu adipeux brun
 - Foie, rein, rate
- } Expression du transgène

Figure 19: Protocoles d'étude (A) de l'expression d'UCP3 lors d'une situation de jeûne chez l'adulte sur différentes lignées de souris transgéniques B6D2 (B) de l'expression d'UCP3 lors du sevrage chez les souriceaux et les mères transgéniques pour le fragment A

4- Autres dosages réalisés

4.1- Dosage de l'ARNm de mUCP3

Se reporter au paragraphe 2.4.1

4.2- Dosages biochimiques

Les acides gras libres sont dosés sur 5 µl de sérum par une méthode enzymatique colorimétrique à l'aide du kit NEFA-C (Wako Chemicals, USA), lecture au spectrophotomètre à 550 nm. Le glycérol est dosé sur 15 µl de sérum par la méthode du tampon hydrazine, lecture au spectrophotomètre à 340 nm. L'insuline est dosée sur 10 µl de sérum par méthode immunoenzymatique colorimétrique (kit Mercodia Ultra sensitive Mouse Insulin, Sweden). Le glucose et les triglycérides ont été dosés par la plate-forme de biochimie de l'IFR 31.

5- Analyses statistiques

Les comparaisons entre les différents groupes d'animaux sont établies par le test non paramétrique de Mann Whitney (Logiciel SPSS 12.0). Les valeurs présentées sur les graphiques et citées dans le texte correspondent à la moyenne plus ou moins l'erreur standard moyenne (ESM). * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

CHAPITRE 2 : INFLUENCE DE L'ALIMENTATION SUR L'EXPRESSION MUSCULAIRE DE UCP3

Peu d'études ont été menées sur la régulation de l'expression de hUCP3 *in vitro* et de surcroît *in vivo*. Les modèles cellulaires se sont révélés insuffisants : l'ARNm d'UCP3 est faiblement exprimé dans les cellules musculaires indifférenciées (myoblastes) et demeure éloigné des taux observés *in vivo*. Face à ces limites, Riquet et *al.* (116) ont entrepris en 2003 une étude *in vivo*, basée sur l'électroporation dans un muscle de souris de différentes constructions promoteur-gène rapporteur Luciférase. Mais ce modèle ne permet qu'une expression transitoire d'UCP3 humain (hUCP3) sans insertion dans un contexte chromatinien, ce qui laisse supposer des résultats différents de la situation physiologique. D'autre part, ce modèle ne permet pas l'étude de l'influence de nutriments ou de drogues sur l'expression de hUCP3. En réponse à ces différents problèmes, notre équipe a utilisé la **transgénèse additive** pour étudier *in vivo* les séquences régulatrices du gène humain UCP3. En effet, seule une analyse fonctionnelle chez l'animal permet de définir les séquences conférant la spécificité d'expression musculaire et celles responsables de la réponse aux hormones et nutriments.

Etude 1 : Caractérisation de l'expression d'UCP3 dans les muscles squelettiques

1- Résultats

1.1- Expression musculaire des différents fragments de transgénèse

Au cours de l'étude 1, différents fragments de transgénèse ont été microinjectés contenant tous 3,3 kb de promoteur et l'exon 1 en amont du gène rapporteur de la CAT et se différenciant par la nature de la séquence intronique ajoutée en aval du gène CAT. Ils caractérisent les différentes lignées de souris transgéniques obtenues. La microinjection des fragments A, A1 et A6 ont donné lieu à l'établissement de lignées de souris transgéniques dont certaines expriment le transgène au niveau musculaire. En revanche aucune lignée de souris transgéniques n'a présenté d'expression musculaire du gène rapporteur CAT avec les fragments A2 et A5. L'intégrité du transgène contenant le fragment intronique A5 a été vérifiée à partir d'ADN génomique de souris amplifié par PCR. La figure 20 compare la taille des différentes parties de la construction transgénique (promoteur de hUCP3, exon 1, gène rapporteur CAT et fragment intronique A5) pour des animaux représentatifs des trois lignées obtenues avec A5 avec celles d'un animal transgénique contrôle positif portant le fragment A1 (qui inclue donc le fragment A5) et un animal contrôle négatif transgénique, pour une tout autre construction (gène de la lipase hormono-sensible sous contrôle du promoteur ap2). Le promoteur, l'exon 1, la CAT et le fragment intronique en aval du gène rapporteur des animaux portant le fragment A5, mesurent respectivement 400 pb, 494 pb, 438 pb et 331 pb et correspondent bien aux tailles obtenues avec l'animal contrôle positif portant le fragment A1. Aucune trace n'est observée à ces mêmes tailles pour l'animal contrôle négatif.

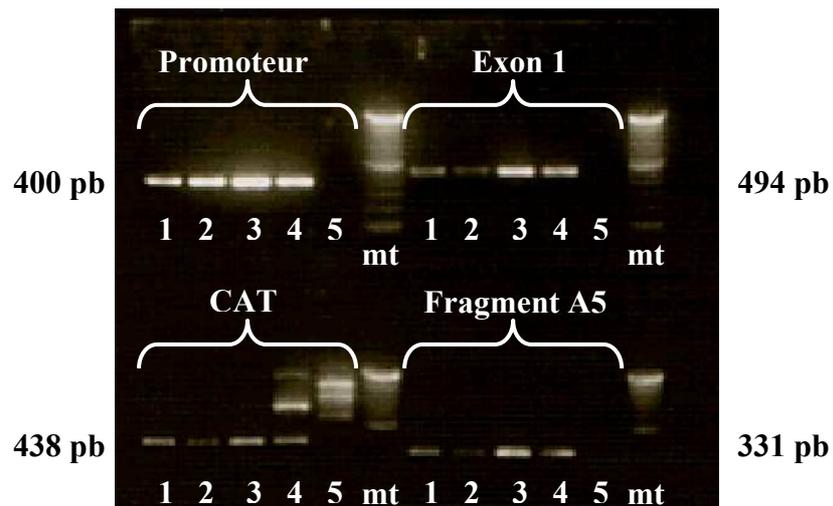


Figure 20: Vérification de l'intégrité du transgène contenant le fragment A5.

Amplification par PCR sur 2 μ l d'ADN génomique des différentes parties du transgène : promoteur, exon 1, gène CAT et fragment intronique A5. 1, 2 et 3 : animaux transgéniques pour le fragment A5 représentatifs de chacune des trois lignées établies. 4 : animal transgénique pour le fragment A1 (contenant A5), contrôle positif. 5 : animal transgénique portant une construction où le gène de la lipase hormono-sensible est sous contrôle du promoteur ap2, contrôle négatif. mt : marqueur de taille 100pb. En marge de la photo sont présentées les tailles attendues des différents amplicons.

Le tableau VI présente l'activité CAT dans les tissus d'un animal représentatif de chacune des lignées de souris transgéniques établies et exprimant le transgène au niveau musculaire. Premièrement, quelque soit le fragment intronique, l'expression dans le cœur et la rate est très faible et peut être considéré comme nulle ; dans le diaphragme, l'expression est faible. Aucune expression musculaire du transgène n'est observée chez les animaux portant respectivement le fragment A2 ou A5, par rapport à ceux portant le fragment A1 ou A6, permettant de conclure que les séquences responsables de l'expression musculaire d'UCP3 se situent dans la partie 5' de l'intron 1, et plus particulièrement dans une région « interne ». L'expression du transgène est maximale dans le *biceps femoris*, muscle à métabolisme glycolytique et contraction rapide, chez les animaux A 22.70, A 6.35, A1 4.1 et A1 9.1 (Figure 21). Cette expression est maximale dans le muscle mixte *gastrocnemius* chez l'animal A6 26.4, et dans le *soleus* (muscle à métabolisme oxydatif et contraction lente) chez l'animal A6 13.8. Enfin, une hétérogénéité de l'expression du transgène dans les muscles en fonction de la lignée obtenue pour un même transgène peut être relevée :

- L'activité CAT dans le *biceps femoris* et dans le *gastrocnemius* est plus faible chez l'animal A 6.35 représentant la lignée 6 que chez l'animal A 22.70, représentant la lignée 22 (respectivement 41340 vs 311660 cpm/min/mg et 18951 vs 296007 cpm/min/mg).
- L'activité CAT dans le *biceps femoris* est plus faible chez l'animal A1 4.1 représentant la lignée 4 que chez l'animal A1 9.1, représentant la lignée 9 (32410 vs 169285 cpm/min/mg).
- L'activité CAT dans le *biceps femoris*, le *rectus femoris*, le *gastrocnemius*, le *soleus* et le diaphragme est plus faible chez l'animal A6 26.4 représentant la lignée 26 que chez l'animal A6 13.8, représentant la lignée 13 (respectivement 7215 vs 91507 cpm/min/mg, 11201 vs 75007 cpm/min/mg, 15063 vs 240035 cpm/min/mg, 14201 vs 297326 cpm/min/mg et 4938 vs 104507 cpm/min/mg).

Le niveau d'expression du transgène est dépendant de son site d'insertion dans l'ADN (et très rarement du nombre de copies insérées). De ce fait, les observations citées ci-dessus ne sont que purement descriptives et n'ont pas de portée fonctionnelle.

Fragment	X / Y	Dénomination	Activité CAT (cpm/min/mg)							
			BF	RF	Gc	Sol	Dia	Co	TAB	Ra
A	2/8	22.70	311660	40938	296007	10410	20271	4076	4826	4104
		6.35	41340	26368	18951	2215	4979	2771	1868	2340
A1	2/3	4.1	32410	14049	12799	3215	2479	2299	2979	2438
		9.1	169285	23979	14660	13507	3632	2507	3549	3132
A2	0/3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A5	0/3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A6	2/3	13.8	91507	75007	240035	297326	104507	3188	14924	2285
		26.4	7215	11201	15063	14201	4938	3257	3854	243

Tableau VI : Activité CAT dans les tissus chez différentes lignées de souris transgéniques, portant un fragment intronique de taille variable.

X : nombre de lignées de souris transgéniques présentant une expression musculaire du transgène, Y : nombre de lignées de souris transgéniques établies. La dénomination des lignées de souris transgéniques exprimant le transgène au niveau musculaire comprend le numéro de la lignée suivi du numéro de l'animal. Chacune de ces lignées est représentée par un animal, sur lequel la mesure de l'activité CAT a été réalisée. BF: *biceps femoris*, RF: *rectus femoris*, Gc: *gastrocnemius*, Sol: *soleus*, Dia: diaphragme, TAB: tissu adipeux brun, Co: cœur, Ra: rate.

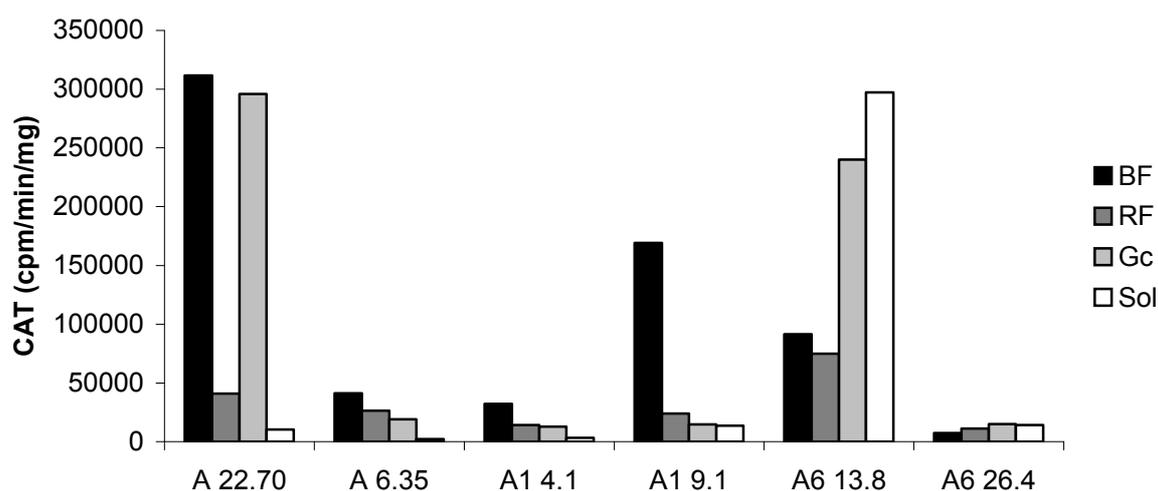


Figure 21: Profils d'expression musculaire d'hUCP3 chez les différentes lignées transgéniques.

1.2- Analyse informatique assistée du fragment A6

L'alignement des introns 1 d'UCP3 a été réalisé pour 7 espèces de mammifères (*bos taurus*, *canis familiaris*, *homo sapiens*, *mus musculus*, *pan troglodytes*, *rhesus macacus* et *rattus norvegicus*) et a révélé d'importants sites conservés localisés dans les parties A5, A6 et à l'extrémité 3' de l'intron (Figure 22). Les analyses assistées par ordinateur ont également révélé l'existence de plusieurs sites putatifs de liaison pour des facteurs de transcription au sein de ces séquences. Dans la partie A6, deux régions sont hautement conservées entre 5 espèces (*bos taurus*, *canis familiaris*, *homo sapiens*, *pan troglodytes* et *rhesus macacus* ; l'intron 1 des rongeurs étant plus court, les parties A5 et A6 n'ont pas de correspondance chez eux). La première (position 37-42) inclue un site potentiel de liaison pour un facteur de transcription à motif doigt de zinc de la famille DOF. Cependant, l'importance de ce facteur de transcription est moindre car ce type d'élément régulateur appartient au règne végétal. La deuxième région d'intérêt hautement conservée (position 24-32) présente des sites putatifs de liaison de facteurs de transcription de type Forkhead (FOX), SRY ou Broad-complex. D'autres régions nucléotidiques plus faiblement conservées ont également été mises en évidence, présentant des sites de liaison pour des facteurs à doigt de zinc (Klf4 et PBF) ainsi que pour le récepteur nucléaire RORa.

```

401
CCCACAATTCCTCCAGAGTATAAGGCCCTTTC--CCCAGGAGG----- bta
TCCAGAACCCCTCCAGAGCGTTAAGCCCTTTC--CCCATGAGGGTCTCTGG cfa
TCTGCGATTCTCCAGAGCATAAATCCCTCTCTTTCCATGAGGACCCCTGG hsa
mmu
TCTGCGATTCTCCATAGCATAAATCCCTCTCTTTCCATGAGGACCCCTGG ptr
TCTGCGATTCTCCAGAGCATAAAGTCCCTTTCTTTCCGTGAAGACCCCTGG rma
rno

451
---CCCCCTACTCAGGAGGG-----GGCACT----- bta
GGACCCCTTTTCTGGGTAGAGGTGGTACAGGCACTTCTGGCC----- cfa
GG--CCCTCTTCTGAGTAGGGATGACAGGGGCACCTTCTGACCTGAGGCGT hsa
mmu
GG--CCCTCTTCTGAGTAGGGATGACAGGGGCACCTTCTGACCTGAGGCGT ptr
GG--CCTCTTCTGAGTAGGGATGACAGGGGCACCTTCTGACCTGAGGC-T rma
rno

501
-----CCC-----CG--A bta
-----TTATATACAGGGAGGTTTGAGAGCCCCAAAACCTCTTT--A cfa
GGTCCAGGTCATTTGCTGGGAGCTTTACAGAGCCC--ATGGTCTCT--G hsa
mmu
GGTCCAGGTCATTTACTGGGAGCTTTCCAGAGCCC--ATGGTCTCTCCG rma
rno

551
CTCAGCA-----GGCATGCAGGAGAGACTTTGCCGGGAAGGT bta
CTCAGGCGGGTTCCTCCGCGGGGATGCTGTGGAGGCTTTGCCAGGAGGGT cfa
CCGAGACGGCTTCTTCAGT--GGGCTGCTGTGAAGGCTTTGCCGGGAGGGT hsa
mmu
CCCAGACGGCTTCTTCAGT--GGGCTGCTGTGAAGGCTTTGCCGGGAGGGT ptr
CCTAGATGGCTTCTTCAGT--GGGCTGCTGTGAAGGCTTTGCCGGGAGGGT rma
rno

Dof 3, PBF

601
GGG-----GTCG--AGGGCATCTCAGAACAG bta
GAG-----ACCAGGCGGGGCATCTCAGAAACGG cfa
GGGTGGAGTTGGGGAGGCAACTGGTGTGGGTAGGATGtctcaaatgg hsa
mmu
GGGTGGAGTTGGGGAGGCAACTGGTGTGGGTAGGATGTCTCAAAATGG ptr
GGGTGGAGTTGGGGAGGCAACTGGTATTTGGGTAGGATGTCTCAAAATGG rma
rno

651
GGACTCTGA-TCCCTGCTCCAGAGCCACCACGGAGAATTTGTTCTAATG bta
GGTCCCCTGACCCCTGCTTCCAGAGCTGCCATGGAGA-----A cfa
ggctcctctt-cccctgcttcagagctaccacagggagtt--ttcctaag hsa
mmu
GGTCCCTCTT-CCCCCGCTTCCAGAGCTACCACAGGGAGTT--TTCCTAATG ptr
GGTCCCCTT-CCCCCGCTTCCAGAGCTACCATGGGGAGTT--TTCCTAATG rma
rno

701
CAGATTCCTAGG-CCCCACCCAGACCTAAATCAGGATCTCTGGGGCTGA bta
CAGATACCCAG-CCCCAGCCTACACCTGAATCAGGATATCTGGCCTTGA cfa
cagattcctaggt-ccccacccagacctaataatcaggatctctggggctga hsa
mmu
CAGATTCCTAGG-CCCCACCCAGACCTAAATCAGGATCTCTGGGGCTGA ptr
CAGATTCCTAGG-CCCCACCCAGACCTAAATCAGGATCTCTGGGGCTGA rma
rno

751
GGG--CCAAGAATCCGCTCTGTAAACAAGTGGCTCCAGGTACCCCTGAGC bta
GGGCCTCTGAGAATCCACTCTGTAAACAAGCAGCTCCAGGGATCCTGAGC cfa
gag--ctgagaatctgctctgttaacaagcagctcaaggatccttggc hsa
mmu
GAG--CTGAGAATCTGCTCTGTAAACAAGCAGCTCAAGGGATCCTTGGC ptr
GGG--CTGAGAATCTACTCTGTAAACAAGCAGCTCAAGGGATCTTCGGC rma
rno

```

Foxq1, FoxD1, SRY, Broad complex 3

Figure 22 : Analyse bio informatique, alignement du fragment A6 pour différentes espèces et positionnement des éléments régulateurs potentiels.

Les séquences nucléotidiques ont été alignées entre 7 espèces de mammifères (bta: *bos taurus*, cfa: *canis lupus familiaris*, hsa: *homo sapiens*, mmu: *mus musculus*, ptr: *pan troglodytes*, rma: *rhesus macacus* et rno: *rattus norvegicus*). La séquence humaine apparaît en bleu. _ signifie qu'il n'existe pas de correspondance nucléotidique.

Les régions de forte homologie, conservées dans les 5 espèces de mammifères (bta, cfa, hsa, ptr et rma), ont été encadrées en rouge. Les facteurs de transcription potentiels sont présentés en rouge sous chaque cadre. Les régions de forte homologie obtenues par l'analyse de l'équipe de Villarroya apparaissent en gras.

Dof: DNA binding with one finger , PBF: papillomavirus binding factor, Fox: forkhead factor, SRY: sex-determining region Y.

2- Discussion

Au laboratoire, lors d'une première approche, l'utilisation d'un transgène comprenant 16 kb de hUCP3 a montré une expression marquée de l'ARNm d'hUCP3 dans les muscles squelettiques des souris transgéniques, comparable à celle observée dans les échantillons musculaires murins ou humains. D'autre part, l'expression de l'ARNm d'hUCP3 était plus forte dans les muscles de type glycolytique que dans ceux de type oxydatif comme cela avait été décrit par Hesselink et al. (61). De plus, ces animaux ont présenté une augmentation de l'expression de l'ARNm de hUCP3 après 48h de jeûne. Aussi, toutes les séquences régulatrices nécessaires à la spécificité musculaire, la distribution selon le type de fibre ainsi que celles importantes pour la régulation nutritionnelle semblaient présentes au sein du fragment de 16 kb.

Par la suite, l'étude du promoteur de hUCP3 montra clairement qu'il n'était pas suffisant pour l'expression d'UCP3. En effet, la microinjection de constructions constituées de délétions successives du promoteur de hUCP3 placées en amont du gène rapporteur LacZ ou de la chloramphenicol acetyl transferase (CAT) n'a pas permis d'obtenir de lignée de souris présentant l'expression musculaire du gène rapporteur utilisé.

Ces résultats ont donc mené l'équipe à supposer que les séquences responsables de la spécificité musculaire d'expression se localisaient non dans le promoteur mais dans les séquences introniques.

2.1- Expression musculaire spécifique des fragments A, A1 et A6

La construction et la micro-injection de nouvelles constructions portant différents fragments introniques a permis de préciser la position intronique des séquences conférant la spécificité d'expression musculaire d'hUCP3. En effet, une expression musculaire spécifique des transgènes contenant les fragments A, A1 et A6 a été observée chez les animaux transgéniques, ce qui n'a pas été le cas les animaux portant les fragments A2 ou A5, mettant en évidence l'importance des régions internes de la partie 5' de l'intron 1.

2.2- Absence d'expression tissulaire de A5

La régulation transcriptionnelle de gènes exprimés préférentiellement dans le muscle squelettique a été largement étudiée *in vitro* dans des modèles cellulaires. Dans le cas de hUCP3, les études sur cellules L6 (myotubes) ou sur cellules musculaires

humaines ont permis de mettre en évidence dans le promoteur proximal des séquences *cis* régulatrices nécessaires à la fixation *in vitro* du facteur de transcription musculaire MyoD. Le promoteur proximal présente également un élément de régulation multi-hormonal où PPAR α s'hétérodimérise avec RXR α et interagissant avec MyoD, activerait la transcription du gène UCP3 (143). Cependant les lignées ou les cultures primaires de muscle expriment des niveaux très faibles par rapport au muscle *in vivo*. *In vivo*, par transgénèse additive ce même promoteur demeure inactif (travaux non publiés du laboratoire) laissant supposer l'existence d'éléments régulateurs introniques additionnels nécessaires à l'expression musculaire de hUCP3. L'analyse de l'intron 1 par transgénèse additive semble montrer que ces séquences se localiseraient plus précisément dans les 966 premières paires de base de l'intron 1, c'est à dire dans le fragment A1. Une analyse bioinformatique comparative de l'intron 1 entre 7 espèces de mammifères a montré des modules conservés entre différentes espèces au sein du fragment A5 mais ne semblant pas être impliqués dans l'expression musculaire spécifique d'UCP3. Un défaut du transgène peut être écarté car les différentes parties de la construction ont été vérifiées par PCR. Cela laisse supposer que les séquences responsables de l'expression musculaire ne se situent pas dans ce fragment intronique ou bien que ce dernier ne suffit pas à lui seul pour l'expression.

2.3- Expression musculaire du transgène portant le fragment A6

Deux des trois lignées établies pour le fragment A6 ont présenté une expression musculaire du gène rapporteur.

L'expression de la CAT présente une hétérogénéité en fonction des lignées.

Le profil d'expression musculaire présenté par les animaux portant le fragment A6 diffère de ceux obtenus chez les lignées transgéniques pour les fragments A et A1. Dans ce dernier cas, l'expression d'UCP3 n'est pas majoritaire dans les muscles de type 2B (*biceps femoris*, *rectus femoris*). L'expression d'UCP3 dans le muscle de type 2A *soleus* est très importante. Cela signe peut être une perte de l'expression spécifique du type de fibre chez les animaux exprimant le transgène avec le fragment A6. Cette observation a été confirmée au niveau des ARNm et sur plusieurs animaux (données non présentées).

Une analyse bio-informatique a été réalisée sur l'intron 1 et plus particulièrement sur la région A6. Les séquences introniques de 7 espèces de mammifères (cf paragraphe 1.2) ont été alignées. La partie A6 des primates, du bœuf et du chien n'a pas de correspondance chez les rongeurs car l'intron 1 est plus petit. Au sein de ce

fragment nous avons donc accordé de l'importance aux séquences conservées entre toutes les espèces excepté les rongeurs. Deux zones hautement conservées ont été mises en évidence. Les matrices du programme informatique utilisé ont distingué au sein de la première région conservée un site de liaison pour un facteur de transcription de la famille DOF, n'ayant cependant pas d'activité dans les cellules animales. Dans la deuxième région conservée, de sites de liaison pour des facteurs de type Forkhead, SRY ou Broad complex ont été révélés. Nous avons alors entrepris une collaboration avec l'équipe espagnole du Professeur F. Villarroya avec pour objectif de tester *in vitro* la fonctionnalité des séquences d'intérêt dégagées par l'analyse *in silico*. L'analyse informatique menée indépendamment par cette équipe a abouti à des résultats similaires aux nôtres ; deux autres régions conservées ont été mises en évidence pouvant lier différents facteurs de transcription (ETS, NRF2...). Des tests de fonctionnalité ont été réalisés *in vitro*. Des systèmes promoteur-Luciférase plus ou moins additionnés de l'intron 1 ont été transfectés dans deux modèles de myotubes (C2C12 et L6) accompagnés de vecteurs d'expression pour différents facteurs de transcription (NRF2 α , NRF2 β , MyoD, FOXO1, FOXO3, FOXO2, Myf 5, ETS2, PPAR α ou combinés : MyoD+FOXO2, MyoD+FOXO3A, MyoD+ETS2, MyoD+NRF2, MyoD+PPAR α). La présence de l'intron n'a pas permis d'augmenter l'activité du gène rapporteur en présence des différents facteurs de transcription. Cependant, ce résultat ne signifie pas que ces sites ne sont pas impliqués dans la régulation *in vivo* de l'expression musculaire d'UCP3. En effet, d'autres protéines trans régulatrices dans un contexte *in vivo* pourraient jouer un rôle. Différents projets pourraient être envisageables à moyen terme afin de tester la pertinence des régions conservées au sein du fragment A6. Une approche par gel retard pourrait être menée pour caractériser les éléments qui lient spécifiquement des facteurs de transcription musculaires en comparant des extraits nucléaires de muscle squelettique qui expriment fortement UCP3 et de foie qui n'exprime pas cette protéine. En fonction des interactions établies dans ces zones, il est ensuite envisageable de réaliser de nouvelles constructions de transgénèse ciblées en utilisant la mutagenèse dirigée. Enfin, il serait intéressant de voir si la mutation d'éléments introniques d'intérêt affecte l'expression musculaire de hUCP3.

Etude 2 : Régulation de l'expression d'UCP3 (murin ou gène CAT en totalité, 16 kb, ou en partie, fragments A,A1 ou A6) après une période de jeûne de 48 heures chez les souris adultes.

1- Résultats

1.1- Expression de mUCP3 (UCP3 murin)

1.1.1- Chez les animaux contrôles négatifs (animaux nourris)

Distribution tissulaire de mUCP3 (ARNm)

L'expression de mUCP3 est observée dans les muscles striés squelettiques totalement (*biceps femoris* et *rectus femoris*) ou majoritairement (*gastrocnemius*) à métabolisme glycolytique et contraction rapide (type IIB) et dans le diaphragme à un niveau comparable quelque soit la lignée de souris transgéniques (Tableau VII). Dans le *soleus*, un muscle à métabolisme oxydatif et à contraction lente, l'expression de mUCP3 s'avère plus faible sauf chez les souris portant le transgène incluant les fragments A1 ou A6. Enfin, dans le TAB, l'expression d'UCP3 est comparable à celle observée dans les muscles de la patte, dans tous les cas.

Intensité de l'expression de mUCP3 (ARNm)

L'expression de mUCP3 est maximale chez les animaux portant le transgène de 16 kb et le fragment A6, intermédiaire pour les animaux transgéniques portant le fragment A et plus faible pour ceux portant le fragment A1.

1.1.2- Chez les animaux mis à jeun pendant 48 heures

Quelque soit le fragment de transgénèse, l'expression de l'ARNm de mUCP3 augmente

- dans les muscles striés squelettiques (facteur multiplicatif approximatif : 2 à 3) :
 - o *biceps femoris* ($p < 0,01$ pour 16 kb et A1 ; $p < 0,001$ pour A6)
 - o *rectus femoris* ($p < 0,01$ pour 16 kb, A1, et A6; $p < 0,05$ pour A)
 - o *gastrocnemius* ($p < 0,01$ pour 16 kb, A, A1 et A6)
 - o *soleus* ($p < 0,01$ pour A et A6; $p < 0,05$ pour 16 kb et A1)

- dans le diaphragme (facteur multiplicatif approximatif : 2) ($p < 0,05$ pour A et A1 et A6)
- dans le cœur (facteur multiplicatif approximatif : 2) ($p < 0,05$ pour 16 kb et A6 ; $p < 0,001$ pour A1)

En revanche, l'expression de l'ARNm de mUCP3 reste stable dans le TAB.

Fragment	Statut	ARNm de mUCP3 ($2^{\Delta Ct} \cdot 10^6$)						
		BF	RF	Gc	Sol	Dia	Cœur	TAB
16 kb	Nourris	6227 ± 1161 ^{aA}	6150 ± 932 ^{aA}	6843 ± 932 ^{aA}	1946 ± 262 ^{cA}	5911 ± 1718 ^{aA}	3526 ± 947 ^{bA}	4932 ± 784 ^{aA}
	Jeûne 48 h	16802 ± 914 ^{aA***}	17244 ± 1920 ^{aA**}	15677 ± 1551 ^{aA**}	3517 ± 481 ^{bA}	8956 ± 2428 ^{aA}	7690 ± 1478 ^{bA*}	4133 ± 571 ^b
A	Nourris	2613 ± 920 ^{aB}	2427 ± 785 ^{aB}	2102 ± 597 ^{aB}	702 ± 104 ^{bB}	1598 ± 522 ^{aB}	1744 ± 843 ^{aB}	2550 ± 654 ^{aB}
	Jeûne 48 h	7111 ± 2760 ^{aB}	9781 ± 3031 ^{aA*}	8633 ± 2304 ^{aB*}	3665 ± 1406 ^{bA}	7502 ± 2056 ^{aA*}	6364 ± 2110 ^{aA*}	3366 ± 672 ^{bA}
A1	Nourris	424 ± 35 ^{aC}	516 ± 82 ^{aC}	478 ± 67 ^{aC}	466 ± 88 ^{aB}	477 ± 59 ^{aC}	288 ± 46 ^{bC}	593 ± 207 ^{aC}
	Jeûne 48 h	1560 ± 238 ^{aC**}	2147 ± 476 ^{aB*}	1755 ± 329 ^{aC**}	1427 ± 322 ^{aB*}	1443 ± 172 ^{aB***}	703 ± 115 ^{bB***}	349 ± 131 ^{cB}
A6	Nourris	4265 ± 739 ^a	7910 ±1554 ^a	5336 ±916 ^a	6973 ± 1691 ^a	10135 ±2680 ^b	5085 ±1658 ^a	3832 ±1182 ^a
	Jeûne 48h	108307 ± 1988 ^{***}	35644 ± 7827 [*]	27376 ± 6151 ^{**}	18387 ± 1660 ^{**}	20447 ± 3173 [*]	11744 ± 2033 [*]	3010 ± 1182

Tableau VII : Expression tissulaire de l'ARNm de mUCP3 chez les souris portant le gène hUCP3 en entier (fragment de 16kb) ou en partie (fragment A, A1 ou A6) dans une construction promoteur-gène rapporteur et soumis ou non à un jeûne de 48 heures.

a, b, c...pour une même ligne, les différents superscripts indiquent une différence significative dans la distribution tissulaire de l'ARNm de mUCP3 (a, NS ; b, p < 0,05 ; c, p < 0,001)

A, B, C...pour une même colonne, les différents superscripts indiquent une différence significative dans la distribution tissulaire de l'ARNm de mUCP3 (A, NS ; B, p < 0,05 ; C, p < 0,001)

* p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p < 0,001 Comparaison entre les contrôles négatifs (animaux nourris) et les animaux mis à jeun pendant 48 heures portant le même fragment de transgénèse.

BF: *biceps femoris*, RF: *rectus femoris*, Gc: *gastrocnemius*, Sol: *soleus*, Dia: diaphragme, TAB: tissu adipeux brun.

1.2- Expression de l'ARNm de hUCP3 (UCP3 humain) (en totalité ou fragment de 16 kb) ou de la CAT (fragments A, A1 et A6)

Chez les animaux contrôles négatifs (animaux nourris)

En premier lieu, quelque soit le fragment de transgénèse, aucune expression n'est relevée dans le cœur et le TAB (Tableau 8).

D'autre part, l'expression de l'ARNm de hUCP3 ou de la CAT est supérieure dans les muscles squelettiques *biceps femoris*, *rectus femoris* et *gastrocnemius* à celle observée dans le diaphragme et dans le *soleus* pour les différents fragments de transgénèse sauf pour les animaux portant le fragment A6 où l'expression dans le diaphragme et le soléaire sont comparables à celle du *gastrocnemius*.

L'intensité de l'expression de l'ARNm de hUCP3 ou de CAT dans les muscles *biceps femoris* est maximale avec le fragment A, dans le *rectus femoris* avec le fragment A6, dans le *gastrocnemius*, *soleus* et diaphragme avec le fragment A6.

Chez les animaux mis à jeun pendant 48 heures

L'expression de l'ARNm de hUCP3 ou de CAT a tendance à augmenter chez les souris transgéniques portant le fragment de 16 kb et chez celles portant le fragment A dans les muscles *biceps femoris* et *rectus femoris*. L'augmentation est significative ($p < 0,01$ pour le fragment 16 kb, $p < 0,001$ pour le fragment A) dans le *gastrocnemius*, et dans le diaphragme ($p < 0,05$ pour le fragment A). Mais chez ces deux types de souris transgéniques, aucune variation de l'expression de hUCP3 ou de CAT n'est observée dans le muscle *soleus*. En revanche, l'expression de l'ARNm de CAT n'est pas modifiée par le jeûne de 48 heures chez les souris transgéniques portant le fragment A1 ou A6.

Fragment	Statut	ARNm de hUCP3 ou CAT ($2^{\Delta Ct} \cdot 10^{\Delta 6}$)						
		BF	RF	Gc	Sol	Dia	Cœur	TAB
16 kb	Nourris	12440 ± 3805 ^{aB}	10810 ± 3208 ^{aB}	8546 ± 1257 ^{aB}	1512 ± 532 ^{bB}	7320 ± 1787 ^{aA}	151 ± 121 ^{cA}	76 ± 33 ^{cB}
	Jeûne 48 h	17607 ± 2902 ^{aB}	17341 ± 4329 ^{aB}	15506 ± 2789 ^{aB**}	1958 ± 430 ^{bA}	11250 ± 4512 ^{aB}	136 ± 115 ^{cA}	369 ± 109 ^c
A	Nourris	40688 ± 8896 ^{aA}	34661 ± 10639 ^{aA}	36781 ± 6235 ^{aA}	2293 ± 664 ^{cA}	9641 ± 3088 ^{bA}	ND	430 ± 180 ^{dA}
	Jeûne 48 h	60046 ± 14585 ^{aA}	70230 ± 10800 ^{aA*}	84457 ± 7308 ^{aA***}	2991 ± 1031 ^{cA}	21715 ± 3248 ^{bA*}	ND	626 ± 292 ^d
A1	Nourris	8392 ± 1762 ^{aB}	7666 ± 1521 ^{aB}	12094 ± 2749 ^{aB}	3010 ± 929 ^{bA}	2184 ± 323 ^{bB}	17 ± 4 ^{cB}	18 ± 6 ^{cC}
	Jeûne 48 h	9533 ± 3336 ^{aC}	7306 ± 2779 ^{aC}	11203 ± 3620 ^{aB}	2531 ± 740 ^{bA}	2579 ± 876 ^{bC}	25 ± 13 ^{cB}	8 ± 2 ^c
A6	Nourris	31432 ± 13598	75148 ± 25398	103551 ± 22821	105210 ± 27977	103113 ± 33881	127 ± 105	409 ± 191
	Jeûne 48 h	21278 ± 9716	49475 ± 9512	63955 ± 15073	114499 ± 22397	105672 ± 26417	98 ± 31	458 ± 387

Tableau VIII : Expression tissulaire de l'ARNm de hUCP3 ou du gène rapporteur CAT chez les souris portant le gène hUCP3 en entier (fragment de 16kb) ou en partie (fragment A ou A1) dans une construction promoteur-gène rapporteur et soumis ou non à un jeûne de 48 heures.

a, b, c...pour une même ligne, les différents superscripts indiquent une différence significative dans la distribution tissulaire de l'ARNm de hUCP3 (a, NS ; b, p < 0,05 ; c, p < 0,001)

A, B, C...pour une même colonne, les différents superscripts indiquent une différence significative dans la distribution tissulaire de l'ARNm de hUCP3 (A, NS ; B, p < 0,05 ; C, p < 0,001)

* p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p < 0,001 Comparaison entre les contrôles négatifs (animaux nourris) et les animaux mis à jeun pendant 48 heures portant le même fragment de transgénèse.

BF: *biceps femoris*, RF: *rectus femoris*, Gc: *gastrocnemius*, Sol: *soleus*, Dia: diaphragme, TAB: tissu adipeux brun.

1.3- Variations des concentrations plasmatiques des acides gras

Chez les animaux contrôles négatifs (animaux nourris)

La concentration moyenne des acides gras chez toutes les souris, indépendamment du transgène, est de $0,541 \pm 0,042$ mmol/l, l'intervalle de confiance à 95% est : [0,4550 ; 0,6264] (Tableau IX).

Pour chaque type de souris transgéniques la concentration moyenne d'acides gras plasmatiques est de $0,538 \pm 0,046$ mmol/l pour le fragment de 16 kb, $0,699 \pm 0,180$ mmol/l pour le fragment A, $0,429 \pm 0,055$ mmol/l pour le fragment A1 et $0,542 \pm 0,053$ mmol/l pour le fragment A6. Il n'existe pas de différence significative entre ces quatre groupes.

Chez les animaux mis à jeun pendant 48 heures

La concentration moyenne des acides gras chez toutes les souris, indépendamment du transgène, est de $0,8764 \pm 0,0549$ mmol/l, l'intervalle de confiance à 95% est : [0,7662 ; 0,9866].

Pour chaque type de souris transgéniques la concentration moyenne d'acides gras plasmatiques est de $0,883 \pm 0,094$ mmol/l pour le fragment de 16 kb, $0,795 \pm 0,119$ mmol/l pour le fragment A, $0,781 \pm 0,137$ mmol/l pour le fragment A1 et $1,061 \pm 0,082$ mmol/l pour le fragment A6. Il n'existe pas de différence significative entre ces quatre groupes.

Acides gras plasmatiques (mmol/l)					
Statut	Transgène				Total
	16 kb	A	A1	A6	
Effectif	6	5	7	6	24
Nourris	0,538 ± 0,046 ^a	0,699 ± 0,180 ^a	0,429 ± 0,055 ^b	0,542 ± 0,053 ^a	0,541 ± 0,042
Effectif	5	7	6	6	24
Jeûne 48 h	0,883 ± 0,094 ^{aB}	0,795 ± 0,119 ^{aA}	0,781 ± 0,137 ^{aA}	1,061 ± 0,082 ^{aC}	0,876 ± 0,054 ^B

Tableau IX : Concentrations plasmatiques des acides gras chez les souris transgéniques pour les fragments hUCP3 de 16 kb, A, A1 et A6 après une période de jeûne de 48 heures ou nourries pendant cette période (contrôles négatifs).

a, b, c...pour une même ligne, les différents superscripts indiquent une différence significative entre les groupes de transgène pour les animaux contrôles négatifs (animaux nourris) et pour les animaux à jeun (a, NS ; b, p < 0,05)

A, B, C...pour une même colonne, les différents superscripts indiquent une différence significative entre les animaux contrôle négatifs (animaux nourris) et les animaux à jeun portant le même transgène (A, NS ; B, p < 0,05 ; C, p < 0,01)

1.4- Recherche de corrélations entre les concentrations plasmatiques d'acides gras et l'expression des ARNm d'UCP3

Chez l'ensemble des animaux

Chez les animaux portant le fragment de 16kb, les concentrations plasmatiques d'acides gras sont positivement corrélées à l'expression génique de mUCP3 dans le *biceps femoris* ($r = 0.707$, $p < 0.05$), le *rectus femoris* ($r = 0.716$, $p < 0.01$), le *gastrocnemius* ($r = 0.726$, $p < 0.05$) ; et à l'expression génique de hUCP3 seulement dans le *gastrocnemius* ($r = 0.726$, $p < 0.05$).

Chez les animaux portant le fragment A, les concentrations plasmatiques d'acides gras sont positivement corrélées à l'expression génique de mUCP3 dans le *biceps femoris* ($r = 0.613$, $p < 0.05$) et le *gastrocnemius* ($r = 0.564$, $p = 0.05$) ; et à l'expression génique de la CAT seulement dans le *rectus femoris* ($r = 0.705$, $p = 0.01$).

Chez les animaux portant le fragment A1, les concentrations plasmatiques d'acides gras sont positivement corrélées à l'expression génique de mUCP3 dans le *biceps femoris* ($r = 0.838$, $p < 0.001$), le *rectus femoris* ($r = 0.765$, $p < 0.01$), le *gastrocnemius* ($r = 0.616$, $p < 0.05$). Aucune corrélation ne peut être établie entre les concentrations plasmatiques d'acides gras et l'expression de la CAT dans les muscles squelettiques chez ces animaux.

Chez les animaux portant le fragment A6, les concentrations plasmatiques d'acides gras sont positivement corrélées à l'expression génique de mUCP3 dans le *biceps femoris* ($r = 0.691$, $p < 0.05$), le *rectus femoris* ($r = 0.580$, $p < 0.05$), le *gastrocnemius* ($r = 0.589$, $p < 0.05$) et le *soleus* ($r = 0.672$, $p < 0.05$). Aucune corrélation n'a pu être établie entre les concentrations plasmatiques d'acides gras et l'expression de la CAT dans les muscles squelettiques chez ces animaux.

Chez les animaux contrôle négatif (nourris)

Chez les animaux portant le fragment de 16kb, aucune corrélation n'a pu être établie entre les concentrations plasmatiques d'acides gras et l'expression musculaire de mUCP3 ou de hUCP3.

Chez les animaux portant le fragment A, les concentrations plasmatiques d'acides gras sont positivement corrélées à l'expression de mUCP3 dans le *biceps femoris* ($r = 0.950$, $p < 0.05$) et dans le *gastrocnemius* ($r = 0.878$, $p=0.050$) ; et à l'expression de la CAT seulement dans le *rectus femoris* ($r = 0.788$, $p < 0.05$).

Chez les animaux portant le fragment A1 ou le fragment A6, aucune corrélation n'a pu être établie entre les concentrations plasmatiques d'acides gras et l'expression musculaire de mUCP3 ou de la CAT.

Chez les animaux mis à jeun pendant 48h

Chez les animaux portant le fragment de 16kb, aucune corrélation n'a pu être établie entre les concentrations plasmatiques d'acides gras et l'expression musculaire de mUCP3 ou de hUCP3.

Chez les animaux portant le fragment A, les concentrations plasmatiques d'acides gras sont positivement corrélées à l'expression de la CAT dans le *rectus femoris* ($r = 0.788$, $p < 0.05$).

Chez les animaux portant le fragment A1, les concentrations plasmatiques d'acides gras sont positivement corrélées à l'expression de mUCP3 et hUCP3 dans le *biceps femoris* ($r = 0.837$, $p < 0.05$; $r = 0.889$, $p < 0.05$ respectivement).

Chez les animaux portant le fragment A6, aucune corrélation n'a pu être établie entre les concentrations plasmatiques d'acides gras et l'expression musculaire de la CAT.

2- Discussion

2.1- Cas de l'expression des ARNm de mUCP3

L'analyse de l'expression des ARNm de la forme endogène d'UCP3 a permis de vérifier les profils d'expression décrits dans la littérature, à savoir, une distribution préférentielle d'UCP3 dans les muscles squelettiques et dans le TAB, et plus faible dans le cœur. Ce profil a été observé chez les animaux nourris quelque soit le transgène hormis pour le transgène de 16 kb où l'expression des ARNm de mUCP3 est plus faible dans le TAB.

L'objectif du protocole 2 était de vérifier si le statut nutritionnel entraînait une régulation de l'expression d'UCP3 exogène et endogène en mesurant les ARNm de mUCP3 et, soit directement les ARNm de hUCP3 soit indirectement par les ARNm du gène rapporteur CAT chez les animaux mis à jeun pendant 48 heures. Initialement un jeûne de 24 heures avait été réalisé chez une lignée transgénique portant le transgène avec le fragment A (intron 1). Ce jeûne de 24 heures n'avait entraîné aucune modification de l'expression d'UCP3 tant sur le plan transcriptionnel que protéique. Il a donc été décidé d'allonger la période de jeûne à 48 heures. Le jeûne de 48 heures n'influence pas l'expression de l'ARNm de mUCP3 dans le TAB, ce qui va à l'encontre de données de la littérature (16, 55, 68, 110, 140). En

revanche, ce jeûne a une influence positive sur l'expression de l'ARNm de mUCP3 dans les muscles squelettiques striés et ceci quelque soit le transgène hormis dans le *soleus* avec le transgène de 16 kb. Ces données sont conformes avec celles de la littérature, décrivant une induction importante de l'expression du gène UCP3 à la suite d'un jeûne.

Les quantités d'ARNm de mUCP3, indépendamment du statut nutritionnel, sont positivement corrélées aux concentrations plasmatiques d'acides gras dans les muscles à métabolisme glycolytique.

2.2- Cas de l'ARNm de hUCP3 ou du gène rapporteur CAT

La distribution tissulaire des ARNm des transgènes incluant les fragments A, A1 et A6 ainsi que l'intensité de leur expression observées dans l'étude 2 (expression plus importante dans les muscles squelettiques à métabolisme glycolytique par rapport aux autres muscles et à l'ensemble des tissus) est cohérente avec le profil d'expression protéique obtenu dans l'étude 1 pour des lignées transgéniques identiques. Pour les animaux portant le fragment de 16 kb, le profil d'expression des ARNm de hUCP3 est comparable avec ceux des souris portant les transgènes incluant les fragments A ou A1. En revanche, le profil d'expression des ARNm de hUCP3 des animaux portant le fragment A6 est différent des trois premiers et conforte le profil protéique obtenu dans l'étude 1.

Le jeûne de 48 heures a entraîné une induction de l'expression de hUCP3 ou du gène rapporteur CAT dans les lignées transgéniques portant le fragment de 16kb ou le fragment A. Si ce jeûne entraîne une augmentation des ARNm de mUCP3 dans tous les muscles squelettiques analysés, il ne concerne jamais l'ensemble de ces muscles lorsqu'on regarde l'expression du transgène. Cette observation est sans doute due à la plus grande hétérogénéité des effets du jeûne sur l'expression du transgène par rapport au gène endogène. L'analyse du tableau VIII permet de conclure que le fragment A (intron 1), comporte tous les éléments régulateurs nécessaires à la réponse au jeûne. En revanche, les fragment A1 et A6 ne semblent pas suffisants pour assurer une réponse au jeûne. En effet, la majorité des animaux ne montrent pas de modification de l'expression du gène rapporteur. Le redécoupage de l'intron 1 a peut-être entraîné la perte d'un élément de réponse régulateur se situant dans la moitié 3' de l'intron 1. Cependant, l'analyse individuelle des animaux portant le fragment intronique A1 a permis de faire ressortir deux sous populations d'animaux parmi le groupe soumis au jeûne de 48 heures. Ainsi, trois animaux

présentent une augmentation de l'expression des ARNm de la CAT dans le *biceps femoris* tandis que les trois autres ne présentent pas de modification de l'expression du gène rapporteur dans ce muscle. Cette observation se vérifie également au niveau des variations des concentrations plasmatiques d'AG libres. Deux explications pourraient servir ces données. Tout d'abord, il n'est pas impossible que le mâle fondateur de cette lignée ait donné naissance à deux sous lignées ayant été mélangées. Chez cet animal, le transgène peut être inséré à deux endroits différents du génome. Lors de la gamétogenèse, deux types de gamètes avec des sites d'insertion différents ont été produits. Par la suite, deux sous lignées de souris ont été formées. L'une d'elles présente un transgène sensible au jeûne et l'autre non. Une deuxième explication réside dans le phénomène de variégation. L'expression d'une séquence codante d'ADN dépend de séquences *cis* régulatrices. Ces séquences dirigent quand et comment chaque gène s'exprime dans l'organisme. Un transgène intégré artificiellement dans un génome peut ainsi subir l'influence de séquences *cis* régulatrices endogènes en fonction de sa position dans le génome. On parle d'effet de position. Dans le cas présent, on peut imaginer que les animaux de cette lignée présentent tous le même site d'insertion du transgène mais que l'effet du contexte chromatinien sur le transgène s'exprime différemment chez les animaux. C'est ainsi que des analyses du promoteur de la prolactine du saumon par transgénèse additive d'une construction promoteur gène rapporteur LacZ chez le poisson ont montré de très grandes variations du niveau d'expression du gène LacZ entre les portées d'une même lignée transgénique (155). Afin de mieux caractériser la position intrachromatinienne du transgène, une analyse du tissu musculaire par Southern blot pourrait être envisagée au sein des deux sous populations d'animaux : l'émergence de deux profils différents d'ADN pourraient confirmer l'existence de deux sous lignées au sein de cette lignée. Cependant, l'hétérogénéité des résultats observés pour un transgène peut être liée aux variations des concentrations d'acides gras plasmatiques.

In vivo, autant chez l'Homme que les rongeurs, les AG régulent l'expression d'UCP3. Le jeûne est une des situations physiologiques augmentant les concentrations plasmatiques d'AG et induisant ainsi l'expression des ARNm d'UCP3 dans les muscles squelettiques.

L'expression du transgène pourrait être contrôlée par d'autres facteurs que les AG pendant le jeûne. Il serait intéressant de doser les autres paramètres biochimiques de l'homéostasie lipidique (triglycérides, glycérol, cholestérol...) ainsi que des paramètres tels que le glucose, l'insuline et les corps cétoniques. D'autre part, les

AG exerceraient un effet temporel sur l'expression du transgène. Au cours du jeûne, il y a peut être eu augmentation momentanée des concentrations plasmatiques d'AG libres nécessaires à l'induction de l'expression des ARNm du gène rapporteur avant de diminuer après une capture hépatique. L'établissement d'une cinétique des concentrations plasmatiques d'AG au cours du jeûne de 48 heures pourrait permettre de vérifier cette hypothèse mais ce dosage serait certainement limité par les quantités de sang prélevables de façon itérative chez la souris.

Etude 3 : Influence du sevrage sur l'expression de l'ARNm d'UCP3 chez les femelles lactantes et les souriceaux

3- Résultats

1.1- Cas des mères en lactation

1.1.1- Expression de l'ARNm de mUCP3

Le niveau d'expression de l'ARNm de mUCP3 est comparable dans les groupes I (femelles vierges), II (femelles gestantes) et III (femelles lactantes, petits non sevrés) comparativement au groupe IV (femelles aux petits sevrés) dans les muscles squelettiques *biceps femoris*, *rectus femoris* et *gastrocnemius*. Bien que non significativement différente, l'expression de l'ARNm de mUCP3 est toujours (quelque soit le tissu) plus faible chez les femelles du groupe III (pas de sevrage) par rapport aux autres groupes. L'expression de l'ARNm de mUCP3 n'est statistiquement ($p < 0,05$) augmentée que dans le TAB après le sevrage (groupe III vs. groupe IV).

1.1.2- Expression de l'ARNm de CAT

La comparaison des groupes I (femelles vierges) et II (femelles gestantes) fait apparaître une diminution de l'expression de l'ARNm de CAT dans le *biceps femoris*, *rectus femoris* et *gastrocnemius* dans le groupe II (Figure 23A). Quelque soit le tissu, l'expression de l'ARNm de CAT dans le groupe III (pas de sevrage) est comparable à celle du groupe II (femelles gestantes). La comparaison des groupes III (pas de sevrage) et IV (sevrage) met en évidence une augmentation de l'expression de l'ARNm de CAT dans le groupe IV dans le *biceps femoris* ($p < 0,05$), le *rectus femoris* ($p < 0,05$), le *gastrocnemius* et le diaphragme (non significatif).

1.1.3- Expression de la protéine CAT

L'activité de la protéine rapporteur CAT a été évaluée dans les quatre groupes de femelles transgéniques pour le fragment A (intron 1) sur 1 μg de protéines dans les muscles striés squelettiques (*biceps femoris*, *rectus femoris*, *gastrocnemius*, *soleus*, diaphragme), le cœur, le TAB et le foie (Figure 23B). Quelque soit le tissu considéré, aucune différence significative n'a pu être établie entre les différents groupes, ce qui

montre que le sevrage des souriceaux n'affecte pas le niveau d'activité CAT chez les femelles en lactation.

1.1.4- Concentrations plasmatiques d'acides gras

Les concentrations plasmatiques d'acides gras sont similaires dans les groupes I (femelles vierges), II (femelles gestantes) et III (femelles lactantes, petits non sevrés). Une augmentation significative de 44% ($p < 0,05$) de la concentration plasmatique d'acides gras est observée dans le groupe IV (sevrage) par rapport au groupe III (pas de sevrage) (Figure 23C).

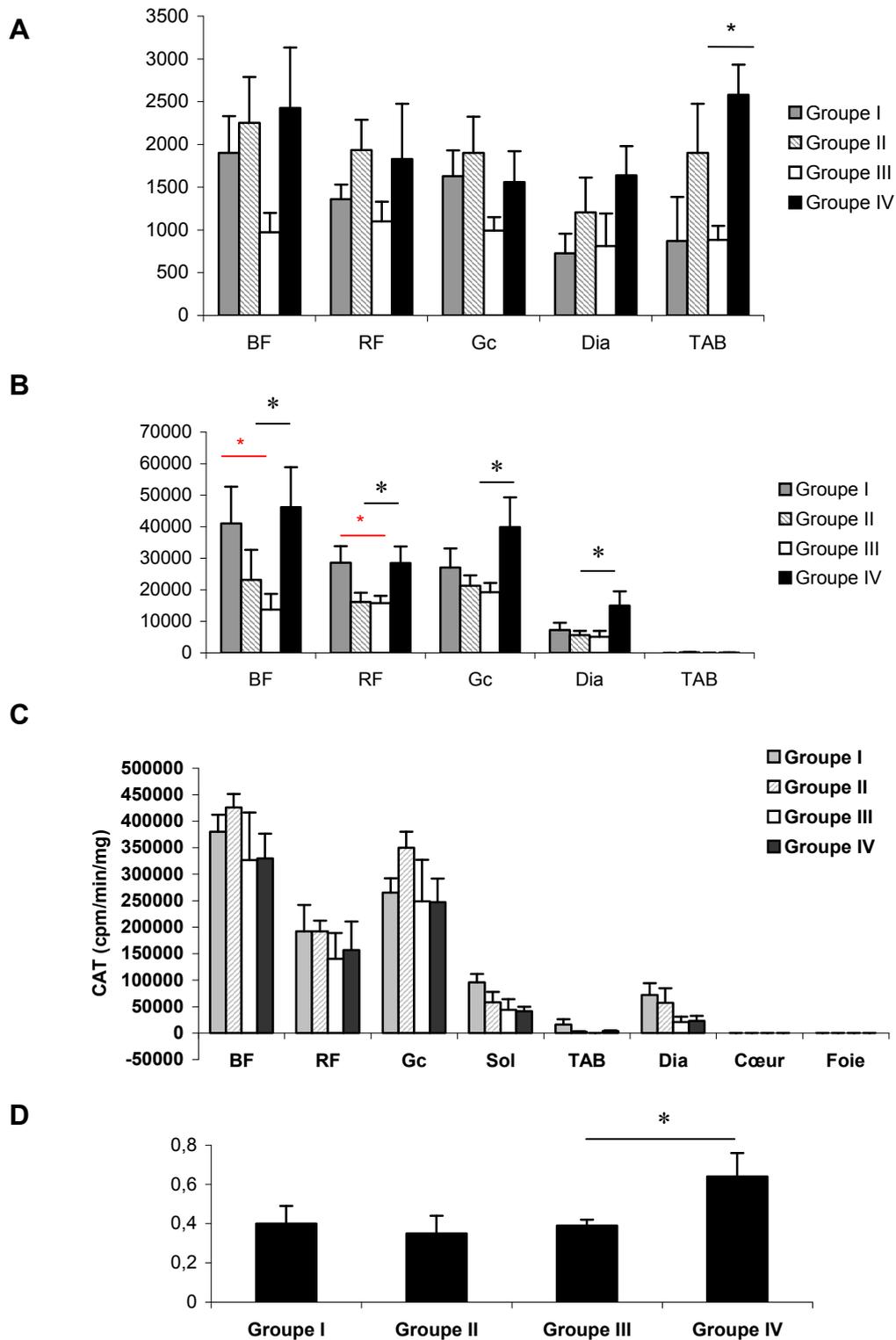


Figure 23 : Variations de l'expression de l'ARNm de mUCP3 (A), de l'ARNm du gène rapporteur CAT (B) de son activité (C) et des concentrations plasmatiques d'acides gras (D) chez les mères transgéniques pour le fragment A (intron 1 de hUCP3).

Groupe I : femelles vierges (n=5) ; Groupe II : femelles gestantes à J0 (date de la mise bas) (n=5) ; Groupe III : femelles lactantes dont les souriceaux ne sont pas sevrés ; Groupe IV : femelles lactantes dont les souriceaux ont été sevrés à J15. BF : biceps femoris, RF: rectus femoris, Gc :gastrocnemius, Dia : diaphragme, TAB : tissu adipeux brun.

1.2- Cas des souriceaux

1.2.1- Evolution pondérale et paramètres biochimiques plasmatiques

L'évolution pondérale ainsi que différents paramètres biochimiques plasmatiques (concentrations de triglycérides, acides gras libres, glycérol, glucose et insuline) ont été comparés entre les souriceaux non sevrés (issus des mères du groupe III) et les souriceaux sevrés (issus des mères du groupe IV) (Tableau 10). Avant le sevrage, à T0, le poids moyen des souriceaux des deux groupes était similaire mais après 18 heures de sevrage (T18) à l'âge de 15 jours, le poids moyen des souriceaux sevrés a diminué de façon significative ($p < 0,05$) par rapport à celui observé pour les souriceaux non séparés de leur mère. Le sevrage a donc entraîné une perte de poids de l'ordre de 8% chez les souriceaux tandis que les animaux non sevrés ont montré un gain de poids de l'ordre de 10% (poids moyen du groupe non sevré après 18h : $8,9 \pm 0,4$ g). Après sevrage les deux groupes de souriceaux présentent une différence de poids moyen de 18%. D'autre part, chez les souriceaux sevrés, la perte de poids est accompagnée d'une diminution de tous les paramètres plasmatiques nutritionnels par rapport aux animaux non sevrés (triglycérides : diminution de 80% ($p < 0,001$) ; acides gras libres : diminution de 40% ($p < 0,05$) ; glycérol et insuline : diminution de 70% ($p < 0,001$) ; glucose : diminution de 30% ($p < 0,05$)).

Paramètres		Souriceaux sevrés à J15	Souriceaux non sevrés	p
Poids vif (g)	T0	8,1 ± 0,3	8,5 ± 0,3	NS
	T18	7,8 ± 0,3	8,9 ± 0,4	p < 0,05
Triglycérides (mmol/l)	T18	0,41 ± 0,38	2,28 ± 0,05	p < 0,001
Acides gras libres (mmol/l)	T18	0,39 ± 0,08	0,65 ± 0,05	p < 0,05
Glycérol (mmol/l)	T18	0,35 ± 0,05	1,05 ± 0,18	p < 0,001
Glucose (mmol/l)	T18	4,98 ± 0,32	7,41 ± 0,39	p < 0,05
Insuline (mmol/l)	T18	0,61 ± 0,1	2,23 ± 0,61	p < 0,001

Tableau X : Evolution du poids vif et des paramètres biochimiques plasmatiques nutritionnels chez les souriceaux transgéniques pour le fragment A de hUCP3 (intron 1) sevrés à J15 ou non.

T0 marque le début du protocole, la séparation mère/souriceaux pour le groupe d'animaux sevrés. T18 marque la fin du protocole c'est à dire le sacrifice des animaux, 18 heures après la séparation des souriceaux de leur mères pour le groupe sevré. Les animaux contrôles (non sevrés) sont également sacrifiés à T18.

1.2.2- Expression d'UCP3 après un sevrage à 15 jours

Le sevrage entraîne une augmentation (induction d'un facteur 2) de l'expression de l'ARNm de mUCP3 chez les souriceaux par rapport aux animaux non séparés de leur mère, dans les muscles striés squelettiques, significative pour le *biceps femoris*, le *rectus femoris* ($p < 0,001$) et pour le *gastrocnemius* ($p < 0,001$) et dans le TAB (Figure 24A).

L'expression de l'ARNm de CAT est induite d'un facteur 8 à 18 dans les muscles striés squelettiques chez les animaux sevrés par rapport aux souriceaux non sevrés. Cette augmentation est significative pour le *biceps femoris*, le *rectus femoris*, le *gastrocnemius* ($p < 0,001$) ainsi que pour le diaphragme ($p < 0,01$), mais demeure non significative pour le TAB (Figure 24B). Cette induction de l'expression du gène CAT chez les souriceaux sevrés est confirmée au niveau protéique. L'activité CAT est augmentée d'un facteur 3 à 5 dans les muscles *biceps femoris*, *rectus femoris* et *gastrocnemius* ($p < 0,001$) (Figure 24C).

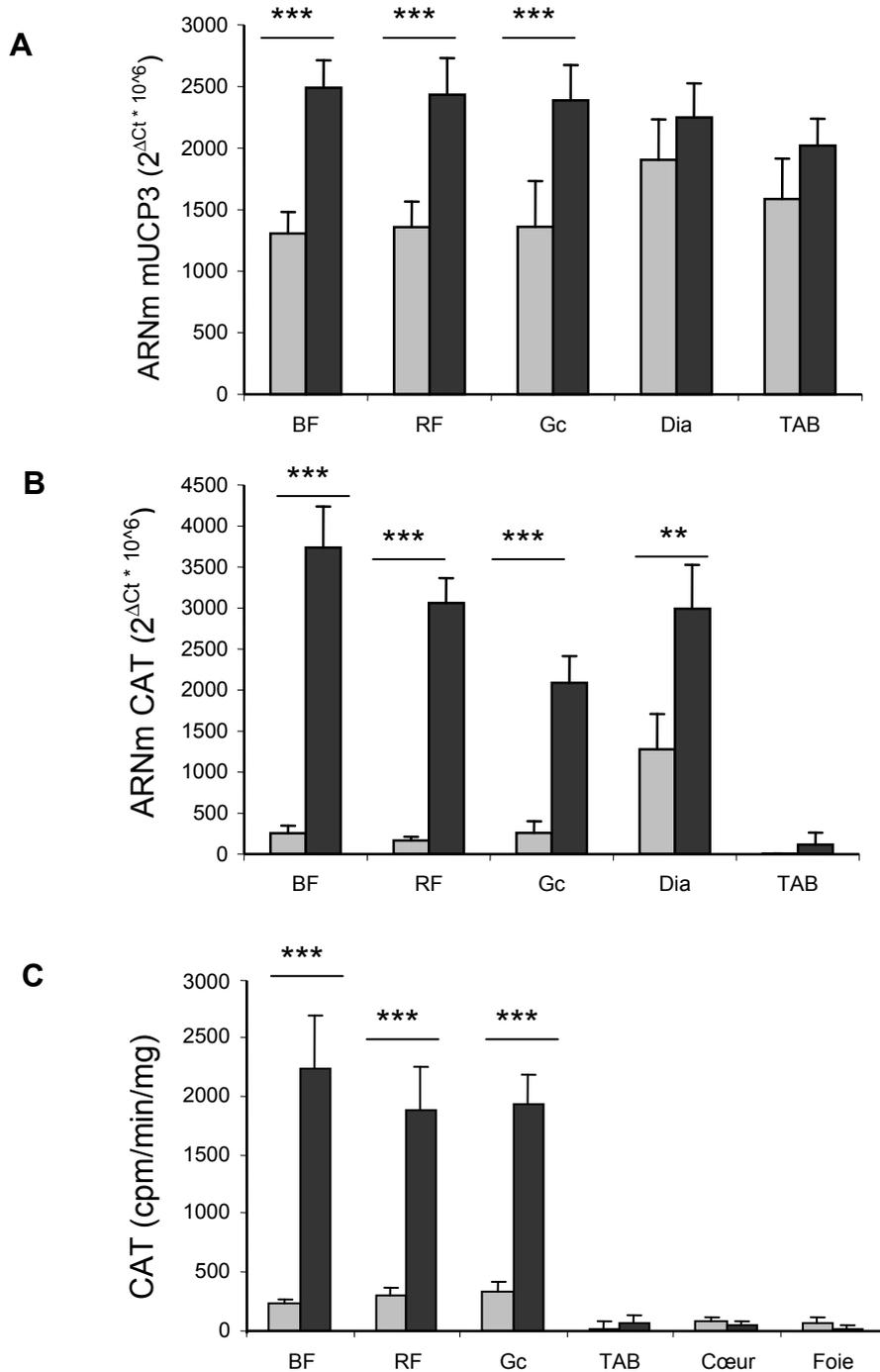


Figure 24: Expression tissulaire de UCP3 chez les souris transgéniques pour le fragment A (intron 1 de hUCP3) sevrés ou non à J15.

Expression des ARNm de mUCP3 (A) ou du gène rapporteur CAT (B). Expression de la protéine CAT (C). Les animaux non sevrés (n = 9) sont représentés en gris et les animaux sevrés (n = 9) en noir. BF: *biceps femoris*, RF: *rectus femoris*, Gc: *gastrocnemius*, Dia: diaphragme, TAB: tissu adipeux brun.

1.2.3- Cas d'un sevrage réalisé à 20 jours

Dans le cas d'un sevrage plus tardif réalisé à J20, les concentrations d'acides gras plasmatiques des souriceaux augmentent de façon significative ($p < 0,05$) par rapport aux animaux non sevrés (Figure 25A).

Parallèlement, l'expression tissulaire de la protéine CAT chez les souriceaux sevrés tardivement devient comparable à celle observée chez les souriceaux non séparés de leur mère à J15 (Figure 25B). Aucune différence significative de l'expression de cette protéine n'est observée entre ces deux groupes lors du sevrage tardif. Néanmoins, même si le niveau d'expression de cette protéine apparaît plus faible chez les souriceaux sevrés à J15, l'absence de différence significative entre les souriceaux sevrés ou non sevrés dans la quantité tissulaire de la protéine CAT pourrait être liée à une expression augmentée de cette protéine chez les souriceaux plus âgés. En effet l'expression de la CAT chez les souriceaux non sevrés à J20 est statistiquement plus élevée ($p < 0,01$) que chez les souriceaux non sevrés à J15, et ceci pour tous les tissus (hormis le foie).

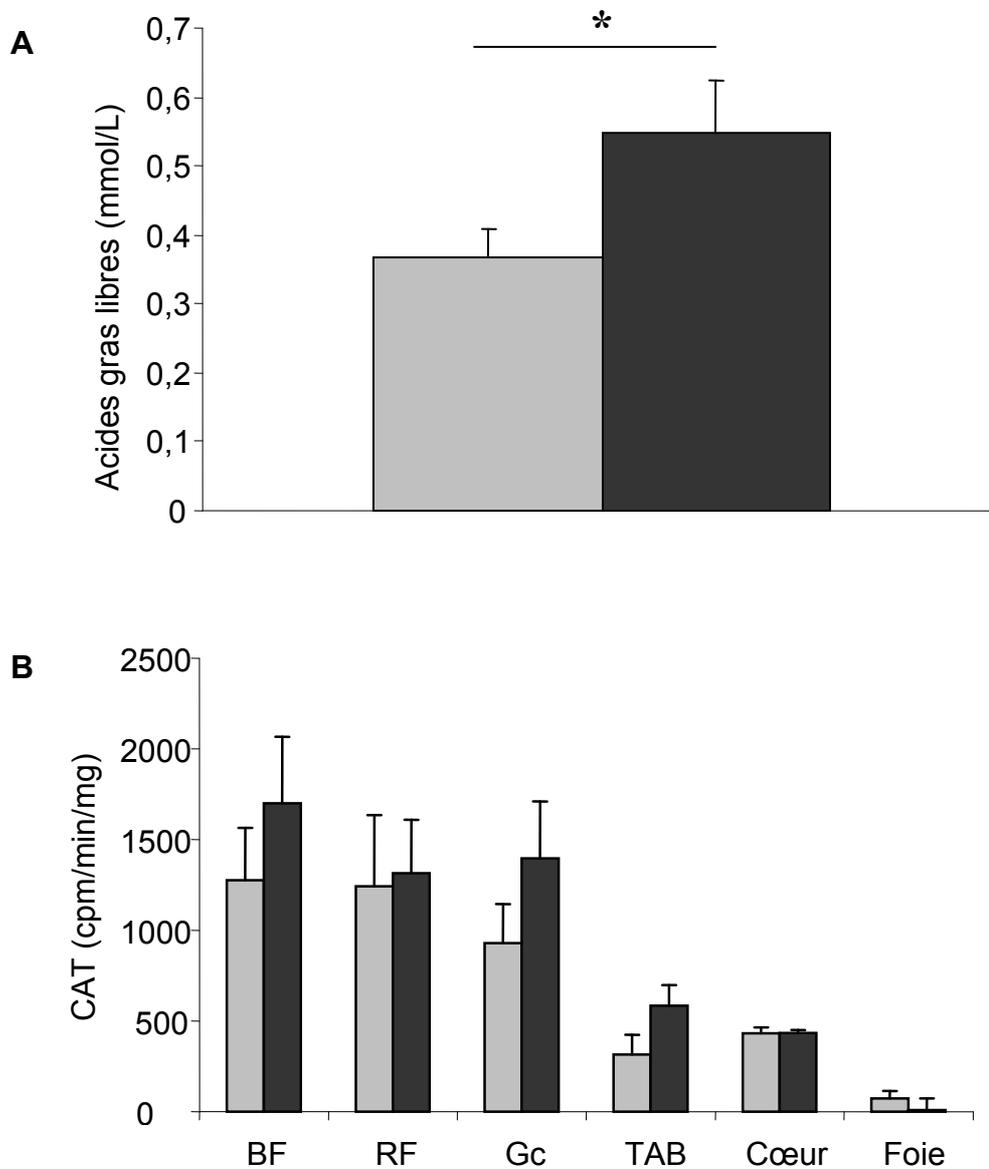


Figure 25: Concentrations plasmatiques des acides gras libres (A) puis expression tissulaire de la protéine CAT (protéine rapporteur sous l'influence du fragment A, intron 1 du gène hUCP3) (B) chez les souriceaux sevrés à J20 ou non.

Les animaux non sevrés (n = 6) sont représentés en gris et les animaux sevrés (n = 6) en noir. BF: *biceps femoris*, RF: *rectus femoris*, Gc: *gastrocnemius*, Dia: diaphragme, TAB: tissu adipeux brun.

4- Discussion

2.1- Effets métaboliques du sevrage chez les femelles allaitantes

Le sevrage correspond à une transition nutritionnelle, pendant laquelle les souriceaux passent d'une alimentation riche en graisse (lait) à une alimentation riche en glucides. Chez les femelles allaitantes, des adaptations métaboliques se mettent en place pour permettre l'utilisation des substrats énergétiques par la glande mammaire : le glucose et les AG sont orientés vers la mamelle en vue de la synthèse du lait, alors que les autres tissus, dont les muscles squelettiques, réduisent l'utilisation oxydative de ces substrats. En général, 15 jours après la naissance des souriceaux, les mères présentent un pic de lactation.

Lorsque le sevrage est pratiqué à J15, une augmentation significative des concentrations plasmatiques d'acides gras a été observée chez les femelles séparées de leur progéniture alors que les concentrations plasmatiques d'acides gras sont restées comparables chez les mères allaitantes à celles observées chez les femelles vierges ou en fin de gestation. Néanmoins, ces variations sont demeurées faibles chez les souris B6D2 par rapport à celles observées chez les femelles OF1 (107), ce qui suggère que, dans le cas présent, les mécanismes d'utilisation des substrats énergétiques (glucose, acides gras libres) par les tissus périphériques (dont les muscles) redeviennent très rapidement prépondérants lorsque la production lactée chute (cas du sevrage). En revanche, l'utilisation des acides gras libres par la mamelle demeure optimale chez les femelles toujours allaitantes (souriceaux non sevrés).

Parallèlement, bien que les différences ne soient pas statistiquement significatives, l'expression musculaire de l'ARNm de mUCP3 est apparue plus faible dans le groupe III (femelles toujours allaitantes) par rapport à celle observée dans les autres groupes (femelles sans souriceaux ou en tarissement). En outre, les souris du groupe III (femelles allaitantes) ont présenté une production plus faible de l'ARNm de la protéine rapporteur CAT dans les muscles striés squelettiques et dans le diaphragme par rapport aux groupes I (femelles vierges) et IV (femelles en tarissement). Chez les femelles allaitantes, il est donc probable que la quantité d'acides gras libres atteignant le tissu musculaire ne soit plus suffisante pour assurer une induction suffisante du gène murin UCP3 ou du transgène en raison d'une utilisation privilégiée de ces derniers par la mamelle en lactation.

En revanche, chez les femelles en tarissement (sevrage de la progéniture) l'expression des ARNm de mUCP3 et du gène rapporteur CAT est comparable à celle observée dans le groupe I (femelles vierges) dans les muscles striés squelettiques (*biceps femoris*, *rectus femoris* et *gastrocnemius*). De plus, alors qu'une augmentation significative de l'ARNm de mUCP3 a été mise en évidence dans le TAB chez les femelles du groupe IV, l'expression de l'ARNm du transgène s'est révélé significativement accrue dans les muscles *biceps femoris* et *rectus femoris* par rapport à la situation observée chez les femelles toujours allaitantes (groupe III). Ces résultats suggèrent qu'une brutale réorientation de l'utilisation métabolique des acides gras libres par les tissus autres que la mamelle (tissu adipeux, muscles) est favorable à une reprise de la synthèse d'UCP3 (au moins de la transcription du gène). Les variations des quantités musculaires d'acides gras libres seraient ainsi des facteurs importants dans le contrôle de l'expression d'UCP3 plutôt que les concentrations circulantes en acides gras *per se*.

Néanmoins, les activités enzymatiques de la protéine rapporteur CAT permettant la mise en évidence directe de la synthèse protéique, n'a pas varié de façon significative que ce soit dans le groupe III ou dans le groupe IV. D'une part, l'importante variabilité inter-individuelle observée chez les femelles allaitantes plus particulièrement et d'autre part la demi-vie longue de la protéine CAT (50 heures) peuvent expliquer ces résultats. La persistance de la CAT pourrait masquer l'induction entraînée par le sevrage si cette induction n'est pas assez prononcée. Ce problème a déjà été rencontré au laboratoire lors des manipulations de jeûne sur les adultes.

Enfin, la période de sevrage représente une situation physiologique complexe chez la mère au cours de laquelle d'autres facteurs de modulation de l'expression d'UCP3 interviennent probablement, tels que la prolactine (104) ou la leptine. En effet, Xiao et al. (166, 167) ont mis en évidence une diminution des concentrations plasmatiques de leptine chez la ratte en lactation. Ils suggèrent que la diminution de l'expression d'UCP3 dans les muscles squelettiques et le TAB serait reliée à la chute des concentrations plasmatiques de leptine durant la lactation.

2.2- Effets métaboliques du sevrage chez les souriceaux

Chez les souriceaux la période de sevrage correspond à un changement alimentaire, c'est à dire le passage d'un régime lacté, riche en lipides, à une alimentation riche en glucides. Au cours de cette étude, le premier essai de sevrage a été réalisé au 15^{ième}

jour, l'équipe de Villarroya ayant reporté un pic d'expression de mUCP3 à cette date (108). D'autre part, cette date coïncide avec une prise maximale de lait par les souriceaux (22).

L'analyse de l'évolution pondérale et du profil biochimique plasmatique révèle chez les souriceaux sevrés à J15 un état de subcarence nutritionnelle : perte de poids vif de 18% par rapport aux souriceaux non sevrés, couplée à une diminution significative de l'insulinémie, des marqueurs du métabolisme glucidique (glycémie) et lipidique (concentrations plasmatiques de triglycérides, glycérol et acides gras libres). Il est donc probable que dans l'essai de sevrage réalisé à 15 jours, les souriceaux ont seulement été privés de leur alimentation lactée et n'ont pas en fait changé de régime alimentaire : ils se trouvent donc dans une situation de jeûne, biochimiquement différente de celle de l'adulte en raison des réserves endogènes insuffisantes. Pendant l'allaitement, les acides gras du lait sont majoritairement utilisés comme substrats énergétiques par les tissus périphériques (muscles et foie essentiellement) alors que le glucose issu de la dégradation du lactose est consommé par des organes strictement dépendants tels que le cerveau. Lors du sevrage physiologique (vers 21 jours) l'alimentation devient plus riche en glucides et parallèlement l'homéostasie glucidique et l'insulinosensibilité se mettent en place (112) permettant non seulement une utilisation plus large par l'ensemble des tissus (cerveau, foie et muscles) du glucose comme substrat énergétique mais aussi le stockage des acides gras sous forme de triglycérides dans les adipocytes. Dans le cas d'un sevrage précoce, à J15, l'hypoglycémie observée résulte d'une diminution des apports exogènes (carence alimentaire) associée à une production endogène insuffisante (faible intensité de la glycogénolyse et de la néoglucogenèse due à des réserves réduites en glycogène et en protéines musculaires). En outre, comme l'insuline demeure encore inefficace, le glucose apporté par les granules ingérés en quantité insuffisante, reste utilisé préférentiellement par le cerveau. Cette consommation sélective de l'ose conduit à une exacerbation de la lipolyse et à une oxydation privilégiée des acides gras libérés par les muscles et le foie ce qui contribue à une diminution des concentrations plasmatiques d'acides gras.

Le sevrage réalisé à J15 a conduit à une induction significative de l'expression de mUCP3 (augmentation de la quantité d'ARNm correspondant) dans les muscles striés squelettiques (*biceps femoris*, *rectus femoris*, *gastrocnemius*) ainsi que du transgène (augmentation de la quantité d'ARNm et de la protéine rapporteur CAT) dans les muscles *biceps femoris*, *rectus femoris*, *gastrocnemius* et le diaphragme. Au cours de cet essai, l'induction d'UCP3 (endogène et de la protéine du transgène) est

corrélée avec l'état global de carence alimentaire précédemment décrit et n'est pas associée ici à une augmentation des concentrations plasmatiques d'acides gras contrairement aux travaux de Villarroya (22). Cette équipe, en étudiant l'évolution de l'expression d'UCP3 murin en fonction de l'âge de souriceaux OF1, avait démontré que la synthèse d'UCP3 débutait après la naissance, culminait à 15 jours avant de décroître après le sevrage, et qu'elle était positivement corrélée avec les variations des concentrations plasmatiques d'acides gras libres. Les divergences observées entre ces deux études pourraient être liées à la nature du fond génétique des souris utilisées, la souche OF1 étant connue pour une croissance rapide.

En effet, on observe une augmentation marquée de l'expression du transgène (protéine rapporteur CAT) chez les souriceaux B6D2 non sevrés à 20 jours par rapport aux souriceaux à J15. L'expression du transgène varie donc en fonction de l'âge des souriceaux B6D2. De même, la diminution de la concentration circulante des acides gras libres chez les souriceaux non sevrés de 20 jours par rapport à ceux de J15 suggère l'existence d'une lipogenèse (mise en réserve des acides gras).

Au vu de l'ensemble de ces résultats, il semble donc que, comparé à la souche OF1, un sevrage à J15 s'avère trop précoce pour les souris de souche B6D2 et conduit à l'installation d'une carence alimentaire et énergétique d'autant plus rapidement que les réserves endogènes en lipides, glucides et protéines ne sont pas encore suffisamment constituées.

En revanche, lors d'un sevrage plus tardif (à J20), les concentrations plasmatiques d'acides gras augmentent de façon significative chez les jeunes sevrés par rapport aux souriceaux non sevrés. Cependant, cette transition nutritionnelle n'a pas été associée à l'accroissement de la synthèse du transgène (pas de variation significative de la production de la protéine rapporteur CAT). Néanmoins, comme dans cet essai, la production des ARNm de mUCP3 ou de CAT n'a pas été évaluée en parallèle, il est possible que la synthèse des protéines correspondantes soit décalée de quelques heures et n'a pas été encore décelée. Contrairement à un sevrage tardif (J20) qui ne semble pas modifier l'expression d'UCP3, une situation de carence nutritionnelle chez les jeunes, caractérisée par une diminution des concentrations plasmatiques d'acides gras, liée à un sevrage précoce (J15) conduit à une induction marquée d'UCP3 dans les tissus musculaires. Ainsi, il existe d'autres facteurs endogènes de contrôle de l'expression d'UCP3 que les acides gras.

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

Dans ce travail d'étude de la régulation de l'expression de hUCP3, nous avons tenté de caractériser plus précisément, par une méthode de transgénèse additive, les séquences introniques qui confèrent à UCP3 une expression spécifique dans les muscles squelettiques. Nous avons en parallèle étudié l'implication du promoteur et de l'intron 1 du gène hUCP3 dans deux situations physiologiques connues pour moduler fortement les concentrations plasmatiques d'AG : le jeûne et le sevrage.

Au sein du premier intron, une séquence d'environ 600 pb (fragment A6) a été caractérisée, qui présente un motif nucléotidique hautement conservé entre espèces, conférant une expression spécifiquement musculaire *in vivo*, chez la souris. L'expression d'hUCP3 dans les muscles squelettiques n'est pas seulement conférée par le promoteur mais dépend également de séquences *cis* régulatrices de l'intron 1. Ce type de régulation original est également observé dans d'autres gènes musculaires comme la dystrophine (89) ou le gène de l'acétylcholinestérase (29)... Les études sur modèles cellulaires ont révélé des éléments régulateurs importants dans le promoteur d'hUCP3, cependant nos travaux de transgénèse démontrent la nécessité de l'intron 1 *in vivo* tant pour les études de caractérisation de l'expression musculaire que pour l'étude des effets des nutriments et hormones.

Chez l'Homme et les rongeurs, UCP3 est exprimé plus fortement dans les muscles à métabolisme glycolytique que dans ceux à métabolisme oxydatif. Ce profil d'expression musculaire, observé chez animaux issus des manipulations antérieures, n'a pas été retrouvé chez les derniers animaux transgéniques obtenus portant le fragment A6. Cela laisse penser que des éléments régulateurs permettant l'expression relative selon le type de fibre ont été perdus.

Des animaux adultes exprimant différentes constructions transgéniques ont été soumis à un jeûne de 48 heures. Cette étude a permis de mettre en évidence une induction de l'expression des ARNm d'UCP3 exogène dans au moins un muscle squelettique de type 2B. Le jeûne a constitué une situation de régulation de l'expression de certains transgènes et de la forme endogène, mUCP3. A travers la mesure des concentrations plasmatiques d'AG, nous attendons voir des variations chez les animaux soumis au jeûne et pouvant expliquer les inductions d'expression des ARNm observées. Cela s'est vérifié pour certains transgènes dans le muscle *rectus femoris*. Ces données contrastent avec celles de la littérature. La mesure des concentrations d'AG n'est peut-être pas le seul paramètre à prendre en considération dans la mécanistique de la régulation de l'expression d'UCP3 pendant le jeûne. La

durée de ce jeûne n'est peut-être pas idéale pour observer les meilleures variations des concentrations plasmatiques d'AG. D'autre part, il est important de noter que la mesure de tels paramètres biochimiques est variable selon le fond génétique des animaux utilisé. Si les animaux de souche OF1 semblent montrer des variations importantes d'AG suite à un jeûne, les souris de souche B6D2 sont peut être moins sensibles à cette régulation physiologique.

Nous avons étudié l'expression d'UCP3 dans une seconde situation physiologique : le sevrage. Les animaux sevrés à quinze jours d'âge ont présenté une remarquable induction de l'expression d'UCP3 tant sur le plan transcriptionnel que protéique. Cependant, contrairement aux souris OF1, l'analyse des paramètres biochimiques et du poids des animaux a révélé un état de carence alimentaire chez les jeunes B6D2 caractérisé par une diminution des concentrations plasmatiques des substrats énergétiques (glucose, triglycérides, glycérol, acides gras libres) et une insulinopénie. En revanche, la réalisation d'un sevrage tardif (à J20) bien qu'induisant une augmentation des concentrations plasmatiques d'acides gras n'a pas engendré de modification significative de l'expression du transgène. La période optimale de sevrage peut varier d'une souche génétique à l'autre tant le patrimoine génétique module les vitesses de croissance et les capacités d'adaptation métabolique à un changement de régime alimentaire. Cependant, dans cette deuxième situation physiologique, il apparaît que les augmentations des concentrations plasmatiques d'acides gras ne soient pas non plus déterminantes dans la régulation de l'expression d'UCP3.

Cette discussion amène la question intéressante de l'implication d'autres acteurs biochimiques dans la régulation de l'expression d'UCP3 pendant le jeûne chez les adultes et les souriceaux. Cependant, si l'action des AG est caractérisée et s'effectue par les PPAR, les mécanismes moléculaires relevant d'autres acteurs biochimiques ne sont pas connus à ce jour.

En situation physiologique, UCP3 est exprimée préférentiellement dans les muscles à métabolisme glycolytique (type 2B), dont on sait qu'ils présentent moins de mitochondries et une capacité oxydative moindre par rapport aux muscles de type 1. On pourrait imaginer qu'un muscle de type 2B soit moins apte à faire face à des situations nécessitant de grandes capacités oxydatives. En période de jeûne par

exemple, l'augmentation plasmatique des AG représente une situation de risque d'accumulation d'AG dans la cellule musculaire et dans les mitochondries des muscles de types 2B. La protéine UCP3 serait donc plus exprimée au sein des mitochondries de ce type de muscle afin de prévenir l'accumulation délétère d'AG. Les muscles de type 1 ont des capacités oxydatives suffisantes pour éviter l'accumulation d'AG dans les mitochondries et ont donc, en ce sens, moins besoin d'UCP3. Ainsi, UCP3 pourrait être perçue comme une protéine protectrice de la mitochondrie. Cette hypothèse est soutenue par le groupe de Schrauwen (129). Outre les effets protecteurs d'UCP3 contre les mécanismes de lipotoxicité, Himms-Hagen et Harper impliquent cette protéine au sein même du métabolisme des AG et la considèrent comme un acteur régulateur de ce métabolisme. Cette hypothèse, dans laquelle UCP3 améliorerait les capacités oxydatives, semble en accord avec les profils d'expression musculaires connus chez l'Homme. Ces deux hypothèses reposent sur les capacités présumées de transport des AG par UCP3. Or, à ce jour, aucune expérience ne montre de manière directe ce rôle de transporteur sur le plan moléculaire. D'autre part, si la surexpression d'UCP3 chez des souris semble augmenter les capacités d'oxydation des acides gras, les souris KO UCP3 ne semblent pas présenter de grandes modifications du métabolisme des AG dans les muscles isolés. Seule une légère diminution de la β -oxydation peut être observée chez ces animaux. D'autres analyses sont nécessaires pour clarifier le mode de régulation du métabolisme des AG par UCP3.

En situation pathologique, au cours du diabète de type 2, la caractérisation de l'expression d'UCP3 est controversée. Certains groupes ont constaté une diminution de l'expression d'UCP3 chez les sujets diabétiques. D'un point de vue fonctionnel, cette diminution s'accorde avec la diminution des capacités oxydatives des AG dans les muscles des sujets diabétiques. La diminution de l'expression d'UCP3 parmi celle d'autres protéines, pourrait contribuer à la physiopathologie de cette maladie. Mais on pourrait également envisager que ce soit l'état pathologique lui-même qui entraîne une diminution de l'expression d'UCP3 dans le muscle. D'autres laboratoires ont mis en évidence une augmentation de l'expression d'UCP3 dans le muscle de sujets diabétiques. Cette augmentation d'expression peut alors être considérée comme un mécanisme adaptatif des muscles insulino-résistants dont les capacités d'oxydation des AG sont fortement diminuées. Cette idée d'adaptation introduit la notion de « flexibilité métabolique ». La flexibilité métabolique représente la capacité du muscle à changer de substrat en fonction de sa disponibilité pour générer de l'énergie, de passer des glucides aux lipides en situation d'augmentation

des concentrations plasmatiques d'AG (période de jeûne). Elle est liée à l'insulinosensibilité, le pourcentage de masse grasse et à la condition physique (49). Au cours de l'obésité et du diabète de type 2, l'augmentation des concentrations plasmatiques d'AG concourt à l'établissement d'une insulino-résistance dans le muscle. Ce dernier n'est alors plus capable d'utiliser les lipides comme substrat énergétique et ceux-ci peuvent s'accumuler dans la cellule et la mitochondrie d'autant plus que les capacités d'oxydation des AG sont diminuées. Dans ce schéma pathologique, l'augmentation de l'expression d'UCP3 pourrait contribuer à l'amélioration de cette « inflexibilité métabolique ».

L'étude *in vivo* d'UCP3 participe à la compréhension du fonctionnement métabolique mitochondrial et à plus grande échelle à la compréhension des adaptations métaboliques du muscle. Le muscle est un organe essentiel de la dépense énergétique et tient une place majeure dans la physiopathologie de maladies métaboliques telles que l'obésité et le diabète de type 2.

Dans une vision thérapeutique, qu'elle peut être alors la place d'UCP3? L'ère de la thérapie génique pourrait elle concerner UCP3? Concernant les maladies métaboliques telles que l'obésité ou le diabète de type 2, il est illusoire d'envisager un traitement par protéine recombinante tant le schéma physiopathologique de ces maladies est multifactoriel et complexe. En revanche, le promoteur et l'intron 1 du gène hUCP3 pourraient constituer un outil intéressant afin de faire exprimer un gène d'intérêt de manière muscle et/ou type de fibre spécifique. Cet outil pourrait être utilisé dans des maladies ciblées, telles les dystrophies musculaires.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 ACIN A., RODRIGUEZ M., RIQUE H., et al.**
Cloning and characterization of the 5' flanking region of the human uncoupling protein 3 (UCP3) gene.
Biochem Biophys Res Commun., 1999, **258**:278-283.
- 2 ADAMS A.E., CARROLI A.M., FALLON P.G., et al.**
Mitochondrial uncoupling protein-1 expression in thymocytes.
Biochim Biophys Acta, 2008, **1777**:772-776
- 3 ADAMS A.E., HANRAHAN O., NOLAN D.N., et al.**
Images of mitochondrial UCP1 in mouse thymocytes using confocal microscopy.
Biochim Biophys Acta, 2008, **1777**:115-117
- 4 ALONSO A., MARTI A., CORBALAN M.S., et al.**
Association of UCP3 gene -55C>T polymorphism and obesity in a Spanish population.
Ann Nutr Metab., **49**:183-188.
- 5 ANDREWS Z.B., HORVATH B., BARNSTABLE C.J., et al.**
Uncoupling protein-2 is critical for nigral dopamine cell survival in a mouse model of Parkinson's disease.
J Neurosci., 2005, **25**:184-191.
- 6 ARSENIJEVIC D., ONUMA H., PECQUEUR C. et al.**
Disruption of uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production.
Nat. Genet. , 2000, **26**:435-439.
- *****
- 7 BAO S., KENNEDY A., WOJCIECHOWSKI B., et al.**
Expression of mRNAs encoding uncoupling proteins in human skeletal muscle: effects of obesity and diabetes.
Diabetes, 1998, **47**:1935-1940.
- 8 BARBE P., LARROUY D., BOULANGER C., et al.**
Triiodothyronine-mediated up-regulation of UCP2 and UCP3 mRNA expression in human skeletal muscle without coordinated induction of mitochondrial respiratory chain genes.
FASEB J., 2001, **15**:13-15.
- 9 BARBER M.C., CLEGG R.A., TRAVERS M.T., et al.**
Lipid metabolism in the lactating mammary gland.
Biochim Biophys Acta., 1997, **1347**:101-126.
- 10 BEZAIRE V., HOFMANN W., KRAMER J., et al.**
Effects of fasting on muscle mitochondrial energetics and fatty acid metabolism in UCP3 (-/-) and wild-type mice.
Am J Physiol Endocrinol Metab, 2001, **281**:975-982
- 11 BEZAIRE V., SPRIET L.L., CAMPBELL S., et al.**

Constitutive UCP3 overexpression at physiological levels increases mouse skeletal muscle capacity for fatty acid transport and oxidation.
FASEB J., 2005, **19**:977-979.

12 BEZAIRE V., BRUCE C.R., HEIGENHAUSER G.J., et al.

Identification of fatty acid translocase on human skeletal muscle mitochondrial membranes: essential role in fatty acid oxidation.
Am J Physiol Endocrinol Metab., 2006, **290**:509-515.

13 BEZAIRE V., SEIFERT E.L. and HARPER M.E.

Uncoupling protein-3: clues in an ongoing mitochondrial mystery
FASEB J., 2007, **21**:312-324

14 BIOCARTA. CHARTING PATHWAYS OF LIFE.

BioCarta LLC. Site consulté le 10 Octobre 2006. Adresse URL:
<http://www.Biocarta.com>

15 BOSS O., SAMEC S., DESPLANCHES D., et al.

Effect of endurance training on mRNA expression of uncoupling proteins 1, 2 and 3 in the rat.
FASEB J., 1998, **12**:335-339.

16 BOSS O., SAMEC S., KUHNE F., et al.

Uncoupling protein-3 expression in rodent skeletal muscle is modulated by food intake but not by changes in environmental temperature.
J Biol Chem., 1998, **273**:5-8.

17 BOSS O., SAMEC S., PAOLONI-GIACOBINO A., et al.

Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression.
FEBS Lett., 1997, **408**:39-42.

18 BOUILLAUD F., RICQUIER D., THIBAUT J., et al.

Molecular approach to thermogenesis in brown adipose tissue: cDNA cloning of the mitochondrial uncoupling protein
Proc Natl Acad Sci U S A., 1985, **82**:445-448.

19 BRAND M.D., BRINDLE K.M., BUCKINGHAM J.A., et al.

The significance and mechanism of mitochondrial proton conductance.
Int J Obes Relat Metab Disord., 1999, **23** Suppl 6:4-11.

20 BRAND M.D., CHIEN L.F., AINSCOW E.K. et al.

The causes and functions of mitochondrial proton leak.
Biochim. Biophys. Acta., 1994, **1187**:132-139.

21 BRAND M.D., PAMPLONA R., PORTERO-OTIN M., et al.

Oxidative damage and phospholipid fatty acyl composition in skeletal muscle mitochondria from mice underexpressing or overexpressing uncoupling protein 3.
Biochem J., 2002, **368**:597-603.

22 BRUN S., CARMONA M.C., MAMPEL T., et al.

Uncoupling protein-3 gene expression in skeletal muscle during development is regulated by nutritional factors that alter circulating non-esterified fatty acids.
FEBS Lett., 1999, **453**:205-209.

23 BRUN S., CARMONA M.C., MAMPEL T., et al.

Activators of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha induce the expression of the uncoupling protein-3 gene in skeletal muscle: a potential mechanism for the lipid intake-dependent activation of uncoupling protein-3 gene expression at birth.
Diabetes., 1999, **48**:1217-1222.

24 CABRERO A., ALEGRET M., SANCHEZ R., et al.

Uncoupling protein-3 mRNA up-regulation in C2C12 myotubes after etomoxir treatment.
Biochim Biophys Acta., 2001, **1532**:195-202.

25 CADENAS S., BUCKINGHAM J.A., SAMEC S., et al.

UCP2 and UCP3 rise in starved rat skeletal muscle but mitochondrial proton conductance is unchanged
FEBS Lett., 1999, **462**:257-260

26 CADRIN M., TOLSZCZUK M., GUY J et al.

Immunohistochemical identification of the uncoupling protein in rat brown adipose tissue.
J. Histochem. Cytochem., 1985, **33**:150-154.

27 CARROLL A.M., HAINES L.R., PEARSON T.W., et al.

Identification of a functioning mitochondrial uncoupling protein 1 in thymus.
J Biol Chem, 2005, **280**:15534-15543

28 CHAN C.B., DE LEO D., JOSEPH J.W., et al.

Increased uncoupling protein-2 levels in beta-cells are associated with impaired glucose-stimulated insulin secretion: mechanism of action.
Diabetes, 2001, **50**:1302-1310.

29 CHAN R., BOURDREAU-LARIVIERE C., ANGUS L., et al.

An intronic enhancer containing an N-box motif is required for synapse- and tissue-specific expression of the acetylcholinesterase gene in skeletal muscle fibers.
Proc Natl Acad sci. USA, 1999, **96**:4627-4632.

30 CHEVILLOTTE E., RIEUSSET J., ROQUES M. et al.

The regulation of uncoupling protein-2 gene expression by omega-6 polyunsaturated fatty acids in human skeletal muscle cells involves multiple pathways including the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor beta.
J. Biol. Chem., 2001, **276**:10853-10860.

31 CLEMENT K., VIGUERIE N., DIEHN M., et al.

In vivo regulation of human skeletal muscle gene expression by thyroid hormone.
Genome Res., 2002, **12**:281-291.

32 COMUZZIE A.G., ALMASY L., COLE S.A., et al.

Linkage exclusion analysis of the chromosome 11 region containing UCP2 and UCP3 with obesity-related phenotypes in Mexican Americans.
Int J Obes Relat Metab Disord., 2000, **24**:1065-1068.

33 COSTFORD S.R., CHAUDHRY S.N., CRAWFORD S.A., et al.
Long-term high-fat feeding induces greater fat storage in mice lacking UCP3.
Am J Physiol Endocrinol Metab. 2008, **295**:1018-1024.

34 CORTRIGHT R.N., ZHENG D., JONES J.P., et al.
Regulation of skeletal muscle UCP-2 and UCP-3 gene expression by exercise and denervation
Am J Physiol., 1999, **276**: 217-221.

35 CUSIN I., ZAKRZEWSKA K.E., BOSS O., et al.
Chronic central leptin infusion enhances insulin-stimulated glucose metabolism and favors the expression of uncoupling proteins.
Diabetes., 1998, **47**:1014-1019.

36 CYBERLIPID CENTER-RESOURCE SITE FOR LIPID STUDIES.
Dernière mise à jour par le Dr C. Leray le 29/04/09. Site consulté le 15 Septembre 2006. Adresse URL : <http://www.cyberlipid.org>

37 CYPESS A.M., LEHMAN S., WILLIAMS G., et al.
Identification and importance of brown adipose tissue in adults humans
N Engl J Med, 2009, **360**:1509-1517.

38 DEANJAN F., DESPLANCHES D., LACHUER J et al.
Muscle-specific up-regulation of rat UCP3 mRNA expression by long-term hindlimb unloading.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1999, **266**:518-522.

39 ECHTAY K.S., ESTEVES T.C., PAKAY J.L., et al.
A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling.
EMBO J., 2003, **22**:4103-4110.

40 ECHTAY K.S., ROUSSEL D., ST-PIERRE J., et al.
Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins.
Nature, 2002, **415**:96-99.

41 ECKEL R.H.
Obesity and heart disease: a statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee, American Heart Association.
Circulation, 1997, **96**:3248-3250.

42 EHEHALT R., FULLEKRUG J., POHL J., et al.
Translocation of long chain fatty acids across the plasma membrane--lipid rafts and fatty acid transport proteins.

Mol Cell Biochem., 2006, **284**:135-140.

43 ENERBACK S., JACOBSSON A., SIMPSON E.M., et al.

Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese.
Nature, 1997, **387**:90-94.

44 ESTERBAUER H., OBERKOFER H., KREMLER F., et al.

The uncoupling protein-3 gene is transcribed from tissue-specific promoters in humans but not in rodents.
J Biol Chem., 2000, **275**:36394-36399.

45 ESTERBAUER H., OBERKOFER H., DALLINGER G., et al.

Uncoupling protein-3 gene expression: reduced skeletal muscle mRNA in obese humans during pronounced weight loss.
Diabetologia., 1999, **42**:302-309.

46 EVOCK-CLOVER C.M., POCH S.M., RICHARDS M.P., et al.

Expression of an uncoupling protein gene homolog in chickens.
Comp Biochem Physiol, 2002, **133**:345-358

47 FLEURY C., NEVEROVA M., COLLINS S., et al.

Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia.
Nat Genet., 1997, **15**:269-272.

48 FRITH M.C., FU Y., Yu L., et al.

Cis e-Lement OVER representation (CLOVER), 2004. Programme utilisé le 09 octobre 2007. Available from World Wild Web :< <http://zlab.bu.edu/clover>>.

49 GALGANI J.E., MORO C., and RAVUSSIN E.

Metabolic flexibility and insulin resistance.
Am J Physiol Endocrinol Metab., 2008, **295**:1009-1017.

50 GERMAN A.J.

The growing problem of obesity in dogs and cats.
J Nutr., 2006, **136**:1940-1946.

51 GIACOBINO J.P.

Effects of dietary deprivation, obesity and exercise on UCP3 mRNA levels.
Int J Obes Relat Metab Disord., 1999, **23** :60-63.

52 GIMENO R.E., DEMBSKI M., WENG X., et al.

Cloning and characterization of an uncoupling protein homolog: a potential molecular mediator of human thermogenesis.
Diabetes, 1997, **46**:900-906.

53 GOGLIA F., SKULACHEV V.P.

A function for novel uncoupling proteins: antioxidant defense of mitochondrial matrix by translocating fatty acid peroxides from the inner to the outer membrane leaflet. *FASEB J.*, 2003, **17**:1585-1591

54 GOMEZ-AMBROSI J., FRUHBECK G., MARTINEZ J.A.

Leptin, but not a beta 3-adrenergic agonist, upregulates muscle uncoupling protein-3 messenger RNA expression: short-term thermogenic interactions. *Cell Mol Life Sci.*, 1999, **55**:992-997.

55 GONG D.W., HE Y., KARAS M., et al.

Uncoupling protein-3 is a mediator of thermogenesis regulated by thyroid hormone, beta3-adrenergic agonists, and leptin. *J Biol Chem.*, 1997, **272**:24129-24132.

56 GONG D.W., HE Y. and REITMAN M.L.

Genomic organization and regulation by dietary fat of the uncoupling protein 3 and 2 genes. *Biochem Biophys Res Commun.*, 1999, **256**:27-32.

57 GONG D.W., MONEMDJOU S., GAVRILOVA O., et al.

Lack of obesity and normal response to fasting and thyroid hormone in mice lacking uncoupling protein-3. *J Biol Chem.*, 2000, **275**:16251-16257.

58 HANAK P., JEZEK P.

Mitochondrial uncoupling proteins and phylogenesis--UCP4 as the ancestral uncoupling protein. *FEBS Lett.*, 2001, **495**:137-141.

59 HEATON G.M., WAGENVOORD R.J., KEMP A. Jr, et al.

Brown-adipose-tissue mitochondria: photoaffinity labelling of the regulatory site of energy dissipation. *Eur J Biochem.*, 1978, **82**:515-521.

60 HECKETSWEILER B. et HECKETSWEILER H.

Voyage en biochimie. Circuits en biochimie humaine, nutritionnelle et métabolique.
3^{ième} Edition
Paris : Elsevier, 2004, 72 p.

61 HESSELINK M.K., KEIZER H.A., BORGHOUTS L.B., et al.

Protein expression of UCP3 differs between human type 1, type 2a, and type 2b fibers. *FASEB J.*, 2001, **15**:1071-1073.

62 HIMMS-HAGEN J.

Brown adipose tissue thermogenesis: interdisciplinary studies. *FASEB Journal*, 1990, **4**:2890-2898.

63 HIMMS-HAGEN J., HARPER M.E.

Physiological role of UCP3 may be export of fatty acids from mitochondria when fatty acid oxidation predominates: an hypothesis.
Exp Biol Med, 2001, **226**:78-84.

64 HO P.W., CHAN D.Y., KWOK K.H., et al.

Methyl-4-phenylpyridinium ion modulates expression of mitochondrial uncoupling proteins 2, and 5 in catecholaminergic (SK-N-SH) cells.
J Neurosci Res, 2005, **81**:261-268

65 HO P.W., CHU A.C., KWOK K.H., et al.

Knockdown of uncoupling protein-5 in SH-SY5Y cell: effects on MPP⁺- induced mitochondrial membrane depolarization, ATP deficiency and oxidative cytotoxicity.
J Neurosci Res, 2006, **84**:1358-1366

66 HOEKS J., HESSELINK M.K., VAN BILSEN M., et al.

Differential response of UCP3 to medium versus long chain triacylglycerols; manifestation of a functional adaptation.
FEBS Lett., 2003, **555**:631-637.

67 HWANG C.S., LANE M.D.

Up-regulation of uncoupling protein-3 by fatty acid in C2C12 myotubes.
Biochem Biophys Res Commun., 1999, **258**:464-469.

68 IOSSA S., LEONETTI L., MOLLICA M.P. et al.

Differences in proton leak kinetics, but not in UCP3 protein content in subsarcolemmal and intermyofibrillar skeletal muscle mitochondria from fed and fasted rats.
FEBS Lett., 2001, **505**:53-56.

69 JACOBSSON A., STADLER V., GLOTZER M.A. et al.

Mitochondrial uncoupling from mouse brown fat. Molecular cloning, genetic mapping and mRNA expression.
J. Biol. Chem., 1985, **260**:16250-16254.

70 JAKUS P.B., SIPOS K., KISPAL G., et al.

Opposite regulation of uncoupling protein 1 and uncoupling protein 3 in vivo in brown adipose tissue of cold-exposed rats.
FEBS Lett., 2002, **519**:210-214.

71 JARMUSZKIEWICZ W., MILANI G., FORTES F., et al.

First evidence and characterization of an uncoupling protein in fungi kingdom: CpUCP of *Candida parapsilosis*.
FEBS Lett., 2000, **467**:145-149.

72 JARMUSZKIEWICZ W., SLUSE-GOFFART C.M., HRYNIEWIECKA L., et al.

Identification and characterization of a protozoan uncoupling protein in *Acanthamoeba castellanii*.
J Biol Chem., 1999, **274**:23198-23202.

73 JIMENEZ M., YVON C., LEHR L., et al.

Expression of uncoupling protein-3 in subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria of various mouse muscle types and its modulation by fasting.
Eur J Biochem., 2002, **269**:2878-2884.

74 JUCKER B.M., DUFOUR S., REN J., et al.

Assessment of mitochondrial energy coupling in vivo by ¹³C/³¹P NMR.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, **97**:6880-6884.

75 KERSTEN S., SEYDOUX J., PETERS J.M., et al.

Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting.
J Clin Invest., 1999, **103**:1489-1498.

76 KHALFALLAH Y., FAGES S., LAVILLE M., et al.

Regulation of uncoupling protein-2 and uncoupling protein-3 mRNA expression during lipid infusion in human skeletal muscle and subcutaneous adipose tissue.
Diabetes., 2000, **49**:25-31.

77 KIENS B.

Skeletal muscle lipid metabolism in exercise and insulin resistance.
Physiol. Rev., 2006, **86**:205-243.

78 KIM-HAN J.S., REICHERT S.A., QUICK K.L., et al.

BMCP1: a mitochondrial uncoupling protein in neurons which regulates mitochondrial function and oxidant production.
J Neurochem, 2001, **79**:658-668

79 KLAUS S., MUNZBERG H., TRULOFF C., et al.

Physiology of transgenic mice with brown fat ablation: obesity is due to lowered body temperature.
Am. J. Physiol., 1998, **274**:287-293.

80 KRAUSS S., ZHANG C.Y., SCORRANO L., et al.

Superoxide-mediated activation of uncoupling protein 2 causes pancreatic beta cell dysfunction.
J Clin Invest., 2003, **112**:1831-1842.

81 KROOK A., DIGBY J., O'RAHILLY S., et al.

Uncoupling protein 3 is reduced in skeletal muscle of NIDDM patients.
Diabetes, 1998, **47**:1528-1531.

82 LANGIN D., LARROUY D., BARBE P., et al.

Uncoupling protein-2 (UCP2) and uncoupling protein-3 (UCP3) expression in adipose tissue and skeletal muscle in humans.

Int J Obes Relat Metab Disord., 1999, **23** :64-67.

83 LANOUILLE C.M., GIACOBINO J.P., PERUSSE L., et al.

Association between uncoupling protein 3 gene and obesity-related phenotypes in the Quebec Family Study.

Mol Med., 2001, **7**:433-41.

84 LARKIN S., MULL E., MIAO W., et al.

Regulation of the third member of the uncoupling protein family, UCP3, by cold and thyroid hormone.

Biochem Biophys Res Commun., 1997, **240**:222-227.

85 LENGACHER S., MAGISTRETTI P.J. and PELLERIN L.J.

Quantitative rt-PCR analysis of uncoupling protein isoform in mouse brain cortex: methodological optimization and comparison of expression with brown adipose tissue and skeletal muscles.

J Cereb Blood Flow Metab, 2004, **24**:780-788

86 LIN B., COUGHLIN S., PILCH P.F.

Bidirectional regulation of uncoupling protein-3 and GLUT-4 mRNA in skeletal muscle by cold.

Am J Physiol., 1998, **275**:386-391.

87 LIU Y.J., LIU P.Y., LONG J., et al.

Linkage and association analyses of the UCP3 gene with obesity phenotypes in Caucasian families.

Physiol Genomics., 2005, **22**:197-203.

88 MAO W., YU X.X., ZHONG A., et al.

UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells.

FEBS Lett., 1999, **449**:293.

89 MARSHALL P., CHARTRAND N., de REPENTIGNY Y et al.

Mouse dystrophin enhancer preferentially target lacZ expression in skeletal and cardiac muscle.

Dev Dyn., 2002, **224**:30-38.

90 MASAKI T., YOSHIMATSU H., CHIBA S., et al.

Impaired response of UCP family to cold exposure in diabetic (db/db) mice.

Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., 2000, **279**:1305-1309.

91 MASAKI T., YOSHIMATSU H. and SAKATA T.

Expression of rat uncoupling protein family mRNA levels by chronic treatment with thyroid hormone.

Int J Obes Relat Metab Disord., 2000, **24**:162-164.

92 MATHER IH and JACK LJ

A review of the molecular and cellular biology of butyrophilin, the major protein of bovine milk fat globule membrane.

J Dairy Sci., 1993, **76**:3832-3850.

93 MATTHIAS A., JACOBSSON A., CANNON B., et al.

The bioenergetics of brown fat mitochondria from UCP1-ablated mice. Ucp1 is not involved in fatty acid-induced de-energization ("uncoupling").

J Biol Chem., 1999, **274**:28150-28160.

94 MILLET L., VIDAL H., ANDREELLI F., et al.

Increased uncoupling protein-2 and -3 mRNA expression during fasting in obese and lean humans.

J Clin Invest., 1997, **100**:2665-2670.

95 MILLET L., VIDAL H., LARROUY D., et al.

mRNA expression of the long and short forms of uncoupling protein-3 in obese and lean humans.

Diabetologia, 1998, **41**:829-832.

96 MILLS E.M., BANKS M.L., SPRAGUE J.E., et al.

Pharmacology: uncoupling the agony from ecstasy

Nature, 2003, **426**:403-404

97 MOORE G.B., HIMMS-HAGEN J., HARPER M.E., et al.

Overexpression of UCP-3 in skeletal muscle of mice results in increased expression of mitochondrial thioesterase mRNA.

Biochem Biophys Res Commun., 2001, **283**:785-790.

98 MORENO M., LOMBARDI A., DE LANGE P., et al.

Fasting, lipid metabolism, and triiodothyronine in rat gastrocnemius muscle: interrelated roles of uncoupling protein 3, mitochondrial thioesterase, and coenzyme Q.

FASEB J., 2003, **17**:1112-1114.

99 MUOIO D.M., MAC LEAN P.S., LANG D.B., et al.

Fatty acid homeostasis and induction of lipid regulatory genes in skeletal muscles of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha knock-out mice. Evidence for compensatory regulation by PPAR delta.

J Biol Chem., 2002, **277**:26089-26097.

100 NAGASE I., YOSHIDA S., CANAS X., et al.

Up-regulation of uncoupling protein 3 by thyroid hormone, peroxisome proliferator-activated receptor ligands and 9-cis retinoic acid in L6 myotubes.

FEBS Lett., 1999, **461**:319-322.

101 NEDERGAARD J., BENGTSONN T., CANNON B.

Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans.
Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007, **293**:444-452

102 NICHOLLS D.G., SNELLING R., RIAL E.

Proton and calcium circuits across the mitochondrial inner membrane.
Biochem Soc Trans., 1984, **12**:388-390.

103 NORDFORS L., HOFFSTEDT J., NYBERG B., et al.

Reduced gene expression of UCP2 but not UCP3 in skeletal muscle of human obese subjects.
Diabetologia, 1998, **41**:935-939.

104 PEARCE S., MOSTYN A., ALVES-GUERRA M.C., et al.

Prolactin, prolactin receptor and uncoupling protein during fetal and neonatal development.
Proc. Nutr. Soc., 2003, **62**:421-427.

105 PECQUEUR C., ALVES-GUERRA MC, GELLY C, et al.

Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation.
J Biol Chem., 2001, **276**:8705-8712.

106 PECQUEUR C., CASSARD-DOULCIER A.M., RAIMBAULT S., et al.

Functional organization of the human uncoupling protein-2 gene, and juxtaposition to the uncoupling protein-3 gene.
Biochem Biophys Res Commun., 1999, **255**:40-46.

107 PEDRAZA N., SOLANES G., CARMONA M.C., et al.

Impaired expression of the uncoupling protein-3 gene in skeletal muscle during lactation: fibrates and troglitazone reverse lactation-induced downregulation of the uncoupling protein-3 gene.
Diabetes., 2000, **49**:1224-1230.

108 PEDRAZA N., SOLANES G., IGLESIAS R., et al.

Differential regulation of expression of genes encoding uncoupling proteins 2 and 3 in brown adipose tissue during lactation in mice.
Biochem J., 2001, **355**:105-111.

109 PEDRAZA N., ROSELL M., VILLARROYA J., et al.

Developmental and tissue-specific involvement of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in the control of mouse uncoupling protein-3 gene expression.
Endocrinology, 2006, **147**:4695-4704.

110 PILEGAARD H., ORDWAY G.A., SALTIN B., et al.

Transcriptional regulation of gene expression in human skeletal muscle during recovery from exercise.
Am J Physiol Endocrinol Metab., 2000, **279**:806-814.

111 PILEGAARD H., SALTIN B. and NEUFER P.D.

Effect of short-term fasting and refeeding on transcriptional regulation of metabolic genes in human skeletal muscle.
Diabetes, 2003, **52**:657-662.

112 POSTIC C., LETURQUE A., PRINTZ R.L., et al.

Development and regulation of glucose transporter and hexokinase expression in rat.
Am J Physiol., 1994, **266**:548-559.

113 RAIMBAULT S., DRIDI S., DENJEAN F., et al.

An uncoupling protein homologue putatively involved in facultative muscle thermogenesis in birds.
Biochem J., 2001, **353**:441-444.

114 RICQUIER D., BOUILLAUD F.

The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP.
Biochem J., 2000, **345** :161-179.

115 RICQUIER D. and KADER J.C.

Mitochondrial protein alteration in active brown fat: a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study.
Biochem Biophys Res Commun., 1976, **73**:577-583.

116 RIQUET F.B., RODRIGUEZ M., GUIGAL N., et al.

In vivo characterisation of the human UCP3 gene minimal promoter in mice tibialis anterior muscles.
Biochem Biophys Res Commun., 2003, **311**:583-591.

117 ROLFE D.F. and BRAND M.D.

Contribution of mitochondrial proton leak to skeletal muscle respiration and to standard metabolic rate.
Am J Physiol., 1996, **271**:1380-1389.

118 ROTHWELL N.J., STOCK M.J.

A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis.
Nature, 1979, **281**:31-35.

119 RUSSEL A.P., WADLEY G., HESSELINK M.K., et al.

UCP3 protein expression is lower in type I, IIA and IIX muscle fiber types of endurance-trained compared to untrained subjects.
Pflugers Arch., 2003, **445**:563-569.

120 SALE M.M., HSU F.C., PALMER N.D., et al.

The uncoupling protein 1 gene, UCP1, is expressed in mammalian islet cells and associated with acute insulin response to glucose in African American families from the IRAS family study.

BMC Endocrinol Disord, 2007, **30**:7-11

121 SAMEC S., SEYDOUX J., DULLOO A.G.

Interorgan signaling between adipose tissue metabolism and skeletal muscle uncoupling protein homologs: is there a role for circulating free fatty acids?

Diabetes, 1998, **47**:1693-1698.

122 SAMEC S., SEYDOUX J., DULLOO A.G.

Post-starvation gene expression of skeletal muscle uncoupling protein 2 and uncoupling protein 3 in response to dietary fat levels and fatty acid composition: a link with insulin resistance.

Diabetes, 1999, **48**:436-441.

123 SANCHIS D., FLEURY C., CHOMIKI N., et al.

BMCP1, a novel mitochondrial carrier with high expression in the central nervous system of humans and rodents, and respiration uncoupling activity in recombinant yeast.

J Biol Chem., 1998, **273**:34611-34615.

124 SANCHIS D., BUSQUETS S., ALVAREZ B., et al.

Skeletal muscle UCP2 and UCP3 gene expression in a rat cancer cachexia model.

FEBS Lett., 1998, **436**:415-418.

125 SANDELIN A., ALKEMA W., ENGSTROM P, et al.

Jaspar Database Version 3.0 STABLE. Copenhagen, 2004. Programme utilisé le 09 octobre 2007. Available from World Wide Web: <<http://www.jaspar.cgb.ki.se>>.

126 SBRACCIA P., D'ADAMO M., LEONETTI F., et al.

Relationship between plasma free fatty acids and uncoupling protein-3 gene expression in skeletal muscle of obese subjects: in vitro evidence of a causal link.

Clin Endocrinol (Oxf), 2002, **57**:199-207.

127 SCHRAUWEN P., HESSELINK M.K.

The role of uncoupling protein 3 in fatty acid metabolism: protection against lipotoxicity?

Proc Nutr Soc., 2004, **63**:287-292.

128 SCHRAUWEN P., HESSELINK M.K., BLAAK E.E., et al.

Uncoupling protein 3 content is decreased in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes.

Diabetes, 2001, **50**:2870-2873.

129 SCHRAUWEN P., HOEKS J., HESSELINK M.K., et al.

Putative function and physiological relevance of the mitochondrial uncoupling protein-3: involvement in fatty acid metabolism?

Prog Lipid Res., 2006, **45**:17-41.

130 SCHRAUWEN P., HOEKS J., SCHAART G., et al.

Uncoupling protein 3 as a mitochondrial fatty acid anion exporter.

FASEB J., 2003, **17**:2272-2274.

- 131 SCHRAUWEN P., HOPPELER H., BILLETER R., et al.**
Fiber type dependent upregulation of human skeletal muscle UCP2 and UCP3 mRNA expression by high-fat diet.
Int J Obes Relat Metab Disord., 2001, **25**:449-456.
- 132 SCHRAUWEN P., MENSINK M., SCHAART G., et al.**
Reduced skeletal muscle uncoupling protein-3 content in prediabetic subjects and type 2 diabetic patients: restoration by rosiglitazone treatment.
J Clin Endocrinol Metab., 2006, **91**:1520-1525.
- 133 SCHRAUWEN P., RUSSELL A.P., MOONEN-KORNIPS E., et al.**
Effect of 2 weeks endurance training on uncoupling protein 3 content in untrained human subjects.
Acta Physiol Scand., 2005, **183**:273-280.
- 134 SCHRAUWEN P., TROOST F.J., RAVUSSIN E., et al.**
Skeletal muscle UCP2 and UCP3 expression in trained and untrained male subjects.
Int Obes Relat Metab Disord., 1999, **23**:966-972.
- 135 SCHRAUWEN P., WESTERTERP-PLANTENGA M.S., KORNIPS E., et al.**
The effect of mild cold exposure on UCP3 mRNA expression and UCP3 protein content in humans.
Int J Obes Relat Metab Disord., 2002, **26**:450-457.
- 136 SCHRAUWEN P., XIA J., WALDER K., et al.**
A novel polymorphism in the proximal UCP3 promoter region: effect on skeletal muscle UCP3 mRNA expression and obesity in male non-diabetic Pima Indians.
Int J Obes Relat Metab Disord., 1999, **23**:1242-1245.
- 137 SHENNAN D.B., PEAKER M.**
Transport of milk constituents by the mammary gland.
Physiol Rev., 2000, **80**:925-951.
- 138 SKULACHEV V.P.**
Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants.
Rev Biophys., 1996, **29**:169-202.
- 139 SKULACHEV V.P.**
Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics.
Biochim Biophys Acta., 1998, **1363**:100-124.
- 140 SIVITZ W.I., FUIK B.D. and DONOHOUE P.A.**
Fasting and leptin modulate adipose and muscle uncoupling protein: divergent effects between messenger ribonucleic acid and protein expression.
Endocrinology, 1999, **140**:1511-1519
- 141 SOKOLOVA I.M., SOKOLOV E.P.**
Evolution of mitochondrial uncoupling proteins: novel invertebrate UCP homologues suggest early evolutionary divergence of the UCP family.
FEBS Lett., 2005, **579**:313-317.
- 142 SOLANES G., PEDRAZA N., CALVO V., et al.**

Thyroid hormones directly activate the expression of the human and mouse uncoupling protein-3 genes through a thyroid response element in the proximal promoter region.

Biochem J., 2005, **386**:505-513.

143 SOLANES G., PEDRAZA N., IGLESIAS R., et al.

Functional relationship between MyoD and peroxisome proliferator-activated receptor-dependent regulatory pathways in the control of the human uncoupling protein-3 gene transcription.

Mol Endocrinol., 2003, **17**:1944-1958.

144 SOLANES G, VIDAL-PUIG A, GRUJIC D, et al.

The human uncoupling protein-3 gene. Genomic structure, chromosomal localization, and genetic basis for short and long form transcripts.

J Biol Chem., 1997, **272**:25433-25436.

145 SON C., HOSODA K., MATSUDA J., et al.

Up-regulation of uncoupling protein 3 gene expression by fatty acids and agonists for PPARs in L6 myotubes.

Endocrinology, 2001, **142**:4189-4194.

146 STAHL A.

A current review of fatty acid transport proteins (SLC27).

Pflugers Arch. 2004, **447**:722-727.

147 STRYER L.

La biochimie de Lubert Stryer.

Paris, Médecine-Sciences. Flammarion, 3ième edition, 1992, x p.

148 STUART J.A., HARPER J.A., BRINDLE K.M., et al.

Uncoupling protein 2 from carp and zebrafish, ectothermic vertebrates.

Biochim Biophys Acta., 1999, **1413**:50-54.

149 TIRABY C., TAVERNIER G., CAPEL F. et al.

Resistance to high-fat-diet-induced obesity and sexual dimorphism in the metabolic responses of transgenic mice with moderate uncoupling protein 3 overexpression in glycolytic skeletal muscles.

Diabetologia, 2007, **50**:2190-2199.

150 TOYOMIZU M., UEDA M., SATO S., et al.

Cold-induced mitochondrial uncoupling and expression of chicken UCP and ANT mRNA in chicken skeletal muscle.

FEBS Lett., 2002, **529**:313-318.

151 TU M., CHEN H., WINNIKES U, et al.

Structural organization and mutational analysis of the human uncoupling protein-2 gene.

Life Sci., 1999, **64**:41-50.

152 TU N., CHEN H., WINNIKES U., et al.

Functional characterization of the 5'-flanking and the promoter region of the human UCP3 (hUCP3) gene.

Life Sci., 2000, **67**:2267-2279.

153 TUNSTALL R.J., MEHAN K.A., HARGREAVES M., et al.

Fasting activates the gene expression of UCP3 independent of genes necessary for lipid transport and oxidation in skeletal muscle.

Biochem Biophys Res Commun., 2002, **294**:301-308.

154 UYEMURA S.A., LUO S., MORENO S.N., et al.

Oxidative phosphorylation, Ca²⁺ transport, and fatty acid-induced uncoupling in malaria parasites mitochondria.

J Biol Chem., 2000, **275**:9709-9715.

155 UZBEKOVA S., AMOROS C., CAUTY C., et al.

Analysis of cell-specificity and variegation of transgene expression driven by salmon prolactin promoter in stable lines of transgenic rainbow trout.

Transgenic Res., 2003, **12**:213-227.

156 VAN MARKEN LICHTENBELT W.D., VANHOMMERIG J.W., SMULDERS N.M., et al.

Cold-activated brown adipose tissue in healthy men.

N Engl J Med, 2009, **360**:1500-1508

157 VERNON R.G.

Comparative aspects of lipid metabolism in monogastric, pre-ruminant and ruminating animals.

Biochem Soc Trans., 1980, **8**:291-292.

158 VIANNA C.R., HAGEN T., ZHANG C.Y., et al.

Cloning and functional characterization of an uncoupling protein homolog in hummingbirds.

Physiol Genomics., 2001, **5**:137-145.

159 VIDAL H., LANGIN D., ANDREELLI F., et al.

Lack of skeletal muscle uncoupling protein 2 and 3 mRNA induction during fasting in type-2 diabetic subjects.

Am J Physiol., 1999, **277**:830-837.

160 VIDAL-PUIG A.J., GRUJIC D., ZHANG C.Y., et al.

Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice.

J Biol Chem., 2000, **275**:16258-16266

161 VIDAL-PUIG A., SOLANES G., GRUJIC D., et al.

UCP3: an uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue.

Biochem Biophys Res Commun., 1997, **235**:79-82.

162 VIRTANEN K.A., LIDELL M.E., ORAVA J., et al.

Functional Brown adipose tissue in healthy adults.

N Engl J Med, 2009, **360**:1518-1525

163 WALDER K., NORMAN R.A., HANSON R.L., et al.

Association between uncoupling protein polymorphisms (UCP2-UCP3) and energy metabolism/obesity in Pima indians.

Hum Mol Genet., 1998, **7**:1431-1435.

164 WANG Z., KONTANI Y. SATO Y., et al.

Muscle type difference in the regulation of UCP3 under cold conditions.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 2003, **305**:244-249.

165 WEIGLE D.S., SELFRIDGE L.E., SCHWARTZ M.W., et al.

Elevated free fatty acids induce uncoupling protein 3 expression in muscle: a potential explanation for the effect of fasting.

Diabetes, 1998, **47**:298-302.

166 XIAO X.Q., GROVE K.L., GRAYSON B.E., et al.

Inhibition of uncoupling protein expression during lactation: role of leptin.

Endocrinology, 2004, **145**:830-838.

167 XIAO X.Q., GROVE K.L., SMITH M.S.

Metabolic adaptations in skeletal muscle during lactation: complementary deoxyribonucleic acid microarray and real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression.

Endocrinology, 2004, **145**:5344-5354.

168 YAMASHITA H., SATO Y. and MORI N.

Differences in induction of uncoupling protein genes in adipose tissues between young and old rats during cold exposure.

FEBS Lett., 1999, **458**:157-161.

169 YOSHITOMI H., YAMAZAKI K., TANAKA I.

Cloning of mouse uncoupling protein 3 cDNA and 5'-flanking region, and its genetic map.

Gene, 1998, **215**:77-84.

170 YU X.X., MAO W., ZHONG A., et al.

Characterization of novel UCP5/BMCP1 isoforms and differential regulation of UCP4 and UCP5 expression through dietary or temperature manipulation.

FASEB J, 2000, **14**:1611-1618

171 ZHANG C.Y., BAFFY G., PERRET P., et al.

Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes.

Cell, 2001, **105**:745-755.

172 ZHANG M., WANG B., NI Y.H., et al.

Overexpression of uncoupling protein 4 promotes proliferation and inhibits apoptosis and differentiation of preadipocytes.

Life Sci, 2006, **79**:1428-1435

173 ZHOU M., LIN B.Z., COUGHLIN S., et al.

UCP-3 expression in skeletal muscle: effects of exercise, hypoxia and AMP-activated protein kinase.

Am J Physiol Endocrinol Metab., 2000, **279**:622-629.

ANNEXE

Transcription of the human uncoupling protein 3 gene is governed by a complex interplay between the promoter and intronic sequences

A. Girisouss · G. Tavernier · C. Tiraby ·
L. Lichtenstein · J. S. Iacovoni · A. Mairal ·
F. Villarroya · D. Langin

Received: 23 February 2009 / Accepted: 17 April 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract

Aims/hypothesis Uncoupling protein (UCP) 3 is an inner mitochondrial membrane transporter mainly produced in skeletal muscle in humans. UCP3 plays a role in fatty acid metabolism and energy homeostasis and modulates insulin sensitivity. In humans, UCP3 content is higher in fast-twitch glycolytic muscle than in slow-twitch oxidative muscle and is dysregulated in type 2 diabetes. Here, we

studied the molecular mechanisms determining human UCP3 levels in skeletal muscle and their regulation by fasting in transgenic mice.

Methods We produced a series of transgenic lines with constructs bearing different putative regulatory regions of the human *UCP3* gene, including promoter and intron sequences. *UCP3* mRNA and reporter gene expression and activity were measured in different skeletal muscles and tissues.

Results The profile of expression and the response to fasting and thyroid hormone of human *UCP3* mRNA in transgenic mice with 16 kb of the human *UCP3* gene were similar to that of the endogenous human gene. Various parts of the *UCP3* promoter did not confer expression in transgenic lines. Inclusion of intron 1 resulted in an expression profile in skeletal muscle that was identical to that of human *UCP3* mRNA. Further dissection of intron 1 revealed that distinct regions were involved in skeletal muscle expression, distribution among fibre types and response to fasting.

Conclusions/interpretation The control of human *UCP3* transcription in skeletal muscle is not solely conferred by the promoter, but depends on several *cis*-acting elements in intron 1, suggesting a complex interplay between the promoter and intronic sequences.

Keywords Diabetes · Fasting · Regulatory sequences · Transgenic · UCP3 · Uncoupling protein

A. Girisouss · G. Tavernier (✉) · C. Tiraby · L. Lichtenstein ·
J. S. Iacovoni · A. Mairal · D. Langin (✉)
Inserm U858, Institut de Médecine Moléculaire de Rangueil,
Laboratoire de recherches sur les obésités,
Equipe 4, 1 avenue Jean Poulhès, Box 84225,
31432 Toulouse Cedex 4, France
e-mail: genevieve.tavernier@inserm.fr
e-mail: dominique.langin@inserm.fr

A. Girisouss · G. Tavernier · C. Tiraby · L. Lichtenstein ·
J. S. Iacovoni · A. Mairal · D. Langin
Université Paul Sabatier, Institut Louis Bugnard, IFR150,
Toulouse, France

F. Villarroya
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular and Institut de
Biomedicina, Universitat de Barcelona (IBUB),
Barcelona, Spain

F. Villarroya
CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición,
Instituto de Salud Carlos III,
Barcelona, Spain

D. Langin
CHU de Toulouse, Laboratoire de biochimie,
Institut Fédératif de Biologie de Purpan,
Toulouse, France

Introduction

Uncoupling protein (UCP) 3 is a member of the mitochondrial carrier superfamily with high sequence identity to UCP1 and UCP2 [1–3]. UCP3 is the only member of the family with a tissue distribution preferentially to skeletal muscle in adult humans. Among skeletal muscles, levels of UCP3 vary according to the type of fibres. Higher levels are found in type II fast-twitch glycolytic and glycolytic-oxidative fibres than in type I slow-twitch oxidative fibres [4]. The higher levels in type II than in type I fibres may be related to the respective content in mitochondria and associated functions. Glycolytic fibres show limited numbers of mitochondria and therefore limited capacity to oxidise lipid and to fight reactive oxygen species production. UCP3 may thereby contribute to the protection of glycolytic fibres. Accordingly, mice that lack UCP3 show evidence of increased reactive oxygen species production and oxidative damage in skeletal muscle mitochondria [5]. UCP3 may also play a role in the transport of fatty acid anions. In one model, UCP3 would prevent accumulation of non-esterified fatty acids within the mitochondria preventing mitochondrial damage [6]. In a second model, the export of fatty acyl anions would allow fatty acid reactivation by acyl-CoA synthetases to support fatty acid oxidation [7]. A role in the crosstalk between glucose and fatty acid metabolism is suggested by the effect of UCP3 overproduction in human muscle cells. It results in an increase of fatty acid and glucose oxidation, and also in an enhancement of fatty acid-mediated inhibition of glucose oxidation [8]. These data suggest a role for UCP3 in nutrient partitioning. The importance of UCP3 in whole-body metabolism is further suggested by the fact that high overproduction in skeletal muscle protects against fat-induced insulin resistance [9]. Moreover, physiological overproduction of UCP3 in glycolytic muscles of transgenic mice results in mitochondrial uncoupling, resistance to high fat diet-induced obesity and sex specificity regarding insulin sensitivity and whole-body substrate utilisation [10]. In another transgenic model, physiological overexpression of UCP3 conferred protection from fat gain induced by long-term high-fat feeding [11].

UCP3 gene transcription in skeletal muscle is highly regulated. The production of UCP3 is dependent on the level of cellular differentiation. Muscle cells differentiated *in vitro* produce little if any UCP3. Myoblast transplantation in immunodeficient mice revealed that fully differentiated skeletal muscle cells are required to reach *in vivo* levels of human UCP3 mRNA expression [12]. Hormonal and metabolic signals modulate UCP3 levels *in vivo*. Fasting has been shown to induce UCP3 mRNA expression in rodents and humans [13, 14]. Fatty acids are potential mediators of this effect, which may at least in part depend

on the activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α in skeletal muscle [15]. Thyroid hormones are also strong inducers of UCP3 expression in humans and in mice [14, 16, 17].

The promoter of the human UCP3 gene has been mapped and partly characterised [18, 19]. In muscle cells, the myogenic differentiation 1 factor (MyoD) is required for substantial promoter activity [20]. Upstream of non-canonical elements binding MyoD is located a functional PPAR and retinoic acid-responsive element. This site also mediates the thyroid hormone effect, indicating that it behaves as a multihormonal responsive element [21, 22]. However, molecular studies on the regulatory elements governing UCP3 production in skeletal muscle and its regulation by hormones and metabolites have so far relied on cells *in culture*, which produced very low levels of UCP3 and consequently do not constitute optimal models. Investigation of the transcriptional regulation of UCP3 may be relevant to human metabolism, as several reports have highlighted the association between a polymorphism in the UCP3 promoter and both adiposity and type 2 diabetes in human populations [23–25]. To date, no investigation has been carried out to identify the molecular mechanisms responsible *in vivo* for muscle production of human or murine UCP3. Here, we studied the importance of regulatory sequences in the human UCP3 gene *in vivo* in transgenic mice.

Methods

Generation and analysis of transgenic mouse lines Animal protocols were performed in accordance with the INSERM and the Louis Bugnard Institute Animal Care Facility guidelines. DNA from a bacterial artificial chromosome clone (Genbank accession number AF050113) containing the human UCP3 gene (provided by the Institut de Recherches Servier) was amplified by PCR (Expand Long Template PCR System; Roche Diagnostics, Meylan, France) and the following primers: forward 5' GGCCTCCC AAAGTGCTGGGGTTACAGA 3'; reverse 5' TGACAC CACATGTCTGCTTTCCAAGG 3'. The 16,023 bp (16 kb) fragment was subcloned into the pGEMT easy cloning vector (Promega, Charbonnières, France). A series of human UCP3 promoter and intronic fragments were amplified by PCR. The PCR products were cloned into the promoterless pCAT3 basic (Promega) and the pSKT-NLS LacZ (Stratagene, Amsterdam, the Netherlands) plasmids. Transgenesis was performed as previously described in B6D2/F1 mice [26]. Mice were housed three per cage at 20°C with a 12 h light–dark cycle. For fasting challenges, mice were deprived of food for 48 h with free access to water. For triiodothyronine treatments, animals of the line expressing the 16 kb human UCP3 transgene were

acutely treated with triiodothyronine (50 µg/100 g) or vehicle and killed 15 h later. Tissues were dissected out, rapidly frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

Cell culture and transient transfection assays Myoblastic L6 cells were obtained from American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA); brown adipocyte-derived cells HIB-1B were a kind gift of B. Spiegelman (Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA, USA). Both types of cells were grown in DMEM containing 10% (vol./vol.) fetal bovine serum and transfection experiments were carried out in cells at 50% confluence using FuGene6 Transfection Reagent (Roche). Each transfection point was assayed in triplicate and contained 1.5 µg of the plasmids -3.2 kb/hUCP3promLuc or the -3.2 kb/hUCP3promLuc/intron1 (where 'h' stands for 'human' and 'Luc' for 'luciferase') and, when required, 0.3 µg of the plasmid mammalian expression vectors for various transcription factors and 3 ng of pRL-CMV (Promega), an expression vector for the sea pansy (*Renilla reniformis*) luciferase used as an internal transfection control. Cells were incubated for 48 h after transfection. Luciferase activity elicited by UCP3 promoter constructs was normalised for variation in transfection efficiency using *Renilla* luciferase as an internal standard.

Quantification of mRNA Mouse tissues were homogenised in RLT buffer (RNA fibrous tissue kit; Qiagen, Courtaboeuf, France) using a rotor-stator. Total RNA from skeletal muscle was extracted using RNeasy kit (Qiagen). Quantitation of mRNA levels was performed by reverse transcription quantitative PCR [27].

Reporter gene assay Choramphenicol acetyl transferase (CAT) and β-galactosidase activities were determined on tissue homogenates using standard procedures [28]. In cell transfection experiments, firefly luciferase and *Renilla* luciferase activities were measured in a luminometer

(TD20/20; Turner Designs, Sunnyvale, CA, USA) using a kit (Dual Luciferase Reporter assay system; Promega).

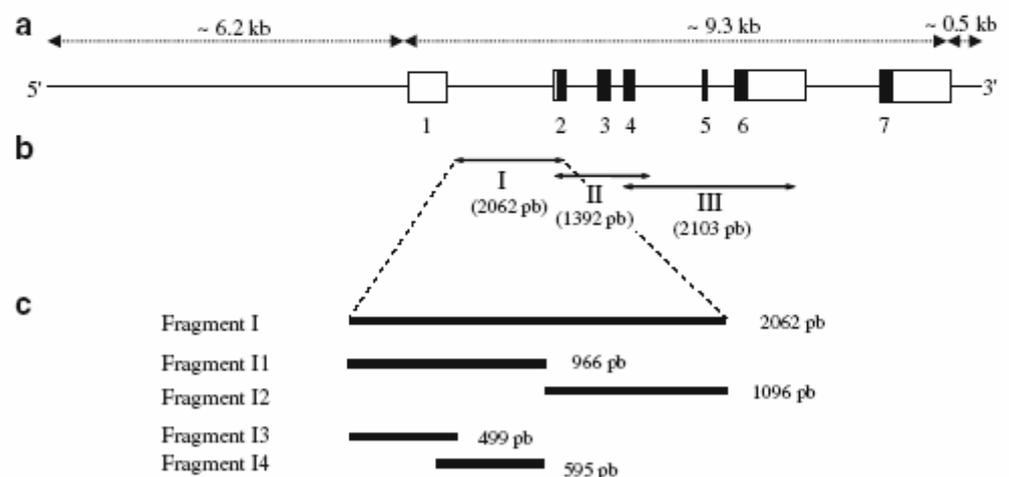
Computer-assisted analysis Genomic regions encompassing the UCP3 loci were extracted from the UCSC Genome database (available at <http://genome.ucsc.edu>, accessed 9 October 2007) for human, mouse, rat, chimpanzee, rhesus, dog and cow. Human intron 1 and various subsequence fragments were fed in the blastz/Threaded Blockset Aligner pipeline in order to generate alignments to use as a conservation filter in subsequent transcription factor binding site analyses. Jaspar matrices were used in conjunction with the Cis-element Over-representation (Clover) search program to look for putative binding sites in the human sequence (<http://jaspar.cgb.ki.se>, accessed 9 October 2007; the Clover program is available for downloading at <http://zlab.bu.edu/clover>). The multi-species alignment was then used to assess the degree of conservation of putative sites (Jaspar PMID: 14681366, Clover PMID: 14988425, TBA PMID: 15060014, UCSC PMID: 18086701). A threshold of 0.95 was set for matrix similarity score to ensure good sensitivity and specificity. Thus, only predicted binding sites with a score over the above threshold were taken into account.

Statistics Values are means±SEM. Statistical significance was determined using the non-parametric Mann-Whitney test and the SPSS package, version 11.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA).

Results

The human UCP3 gene is expressed in skeletal muscle of transgenic mice To gain insights into the sequences controlling expression of the human UCP3 gene in vivo, different transgenic mouse lines were created (Fig. 1). Two lines of

Fig. 1 Genomic organisation of human UCP3 and of intronic fragments used in transgenesis. **a** A 16 kb region including the promoter region, exons, introns and a short 3' flanking region. White boxes, non-coding sequences in exons; black boxes, coding regions. **b** Fragments from intronic and exonic sequences used in transgenic constructs. **c** Subdivision of the first intron in fragments named I1 to I4 used in transgenic constructs



mice were produced with a 16 kb human *UCP3* transgene containing 6.2 kb of the promoter and the entire exon–intron sequences. Human and murine *UCP3* mRNA amounts were quantified in various tissues (Fig. 2a–c). In the two transgenic lines, human *UCP3* was expressed at higher levels in glycolytic (biceps femoris and gastrocnemius) than in mixed (diaphragm) and oxidative (soleus) muscle. In heart and brown adipose tissue, the level of human *UCP3* mRNA was very low. As expected, no human *UCP3* mRNA expression was detected in the kidney. Murine *Ucp3* mRNA expression was also higher in the gastrocnemius and biceps femoris glycolytic muscle than in the oxidative soleus muscle. A noticeable difference from human *UCP3* was the substantial expression of mouse *Ucp3* mRNA in heart and brown adipose tissue.

To determine whether the 16 kb fragment contained the sequences responsible for human *UCP3* gene regulation in vivo, transgenic mice were submitted to fasting and treated with thyroid hormone. A twofold induction of human and mouse *Ucp3* mRNA expression was observed during fasting in gastrocnemius muscle (Fig. 3a, c). Acute thyroid hormone treatment also promoted induction of human and mouse *Ucp3* mRNA (Fig. 3b, d). These results demonstrate that the 16 kb human *UCP3* transgene contain the *cis*-acting sequences that mediate the effect of fasting and thyroid hormone.

The promoter region is not sufficient to confer skeletal muscle expression of the human UCP3 gene Next, we determined whether the sequences responsible for skeletal muscle expression of human *UCP3* were located in the promoter region. Four promoter–CAT gene constructs were microinjected into mouse oocytes (Table 1). Two to five lines were established for each construct with various portions of the human *UCP3* promoter. None of the constructs led to expression of *CAT* determined both by enzymatic activity and mRNA levels in the hindlimb skeletal muscles as well as in kidney, spleen, white and brown adipose tissues, lung, heart and diaphragm (data not shown). No production of *CAT* was detected in skeletal

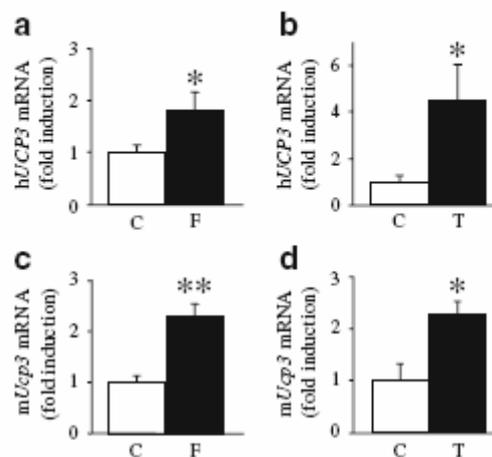


Fig. 3 Effect of 48 h fasting and acute treatment with thyroid hormone on human and murine *UCP3* mRNA in mice expressing the human *UCP3* 16 kb transgene. **a**, **c** Effect of fasting (F). **b**, **d** Effect of thyroid hormone (T). Human *UCP3* (h*UCP3*) and murine *Ucp3* (m*Ucp3*) mRNA levels were determined before (C) and after the treatments in gastrocnemius muscle. Results are expressed as fold induction of the mRNA levels quantified in control animals. Data are the means \pm SE ($n=5-9$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$

muscle when the -2.4 kb/h*UCP3* promCAT mice were studied in conditions of enhanced induction of endogenous *UCP3*, such as the postnatal period or fasting (data not shown). To determine whether these constructs were functional, transient cotransfection of the -5.5 kb/h*UCP3*-promCAT with MyoD and retinoic acid receptor expression vectors was performed into muscular L6 cells [20]. A clear induction was observed when MyoD was expressed (6.5 ± 0.5 , $p<0.05$, $n=4$). Further induction was observed with retinoic acid receptor in the presence of retinoic acid (9.2 ± 1.1 , $p<0.05$, $n=4$). To exclude an in vivo silencing in the expression of the *CAT* gene, the *LacZ* reporter system was used. Transgenic lines were produced with two promoter–*LacZ* gene constructs. None of them showed β -galactosidase activity in skeletal muscles. Consequently, promoter sequences are not sufficient to drive skeletal muscle expression of human *UCP3* in vivo.

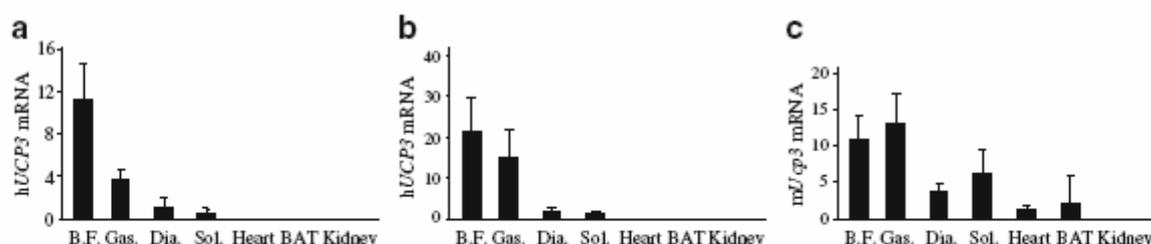


Fig. 2 Expression profile of human and mouse *UCP3* mRNA in lines expressing the human *UCP3* 16 kb transgene. **a** Human *UCP3* (h*UCP3*) mRNA level in transgenic line A. **b** Human *UCP3* mRNA level in transgenic line B. **c** Mouse *Ucp3* (m*Ucp3*) mRNA level in the

two transgenic lines. Results are expressed as $2^{-\Delta C_t} \times 10^9$. Data are the means \pm SE ($n=5-7$). BAT, brown adipose tissue; B.F., biceps femoris; Dia., diaphragm; Gas., gastrocnemius; Sol., soleus

Table 1 Study of the human *UCP3* gene promoter in transgenic mice

Construct	Founders (n)	Total transgenic lines (n)	Expressing lines (n)	Transgene copy number
-5.5 kb/h <i>UCP3</i> promCAT	6	4	0	20–50
-3.2 kb/h <i>UCP3</i> promCAT	6	5	0	10–50
-2.4 kb/h <i>UCP3</i> promCAT	3	2	0	20–50
-0.4 kb/h <i>UCP3</i> promCAT	3	2	0	10–50
-2.4 kb/h <i>UCP3</i> promLacZ	3	3	0	20–50
-0.7 kb/h <i>UCP3</i> promLacZ	10	10	0	20–50

CAT or LacZ activities were determined on hindlimb muscles from three to six mice per transgenic line

The sizes of the promoter region are shown according to the transcriptional start site determined by Acin et al. [19]

Each construct contained 657 bp of exon 1 because several transcriptional start sites have been reported [18, 19, 33]

Intron 1 is essential for UCP3 expression in skeletal muscle As the 16 kb fragment but not the promoter region confers expression of the transgene, DNA elements downstream of the transcriptional start site are likely to be crucial for human *UCP3* expression in skeletal muscle. A new series of CAT constructs was produced containing 3.2 kb of the promoter and, downstream of the *CAT* gene, different sequences encompassing the first five introns (Fig. 1b). The transgenic mice were screened for CAT activity in hindlimb muscle (Table 2). The six transgenic lines containing fragments II and III that overlap introns 2 to 5 were negative for *CAT* expression. However, CAT activity was detected in hindlimb skeletal muscle of two mouse lines bearing the first intron (Fig. 1b). Furthermore, the profile of *CAT* mRNA expression was determined in the distinct organs (Fig. 4a). *CAT* mRNA expression was greater in biceps femoris, rectus femoris (another fast-twitch muscle) and gastrocnemius than in diaphragm and soleus muscle. No *CAT* mRNA expression was detected in heart, brown adipose tissue and kidney. Therefore, the expression of human *UCP3* in skeletal muscles is driven by

Table 2 Study of intronic regions of the human *UCP3* gene in transgenic mice

Name of intronic fragments	Total transgenic lines (n)	Expressing lines (n)
I	8	2
II	3	0
III	3	0
II	3	2
I2	3	0
I3	3	0
I4	3	2

The constructs contain 3.2 kb of the promoter region, 657 bp of exon 1, the *CAT* gene and various intronic regions

The location and size of intronic fragments are shown on Fig. 1

CAT activity was determined on hindlimb muscles from three to six mice per transgenic line

regulatory elements within the first intron. To see whether the presence of intron 1 conferred higher expression in muscle cells *in vitro*, transient transfection experiments were performed in L6 myotubes. Luciferase activity was higher with the construct containing intron 1 than with the construct containing the promoter alone (Fig. 5a). However, the magnitude of increase was much lower than in the *in vivo* context. No expression was conferred by intron 1 in HIB-B1 cells derived from brown adipose tissue (Fig. 5b). The data show that intron 1 is required for human *UCP3* expression in skeletal muscle *in vivo*.

The first intron was divided into several regions in order to determine more precisely the intronic location of the regulatory elements (Fig. 1c, Table 2). Two transgenic lines containing the 5' moiety of intron 1 (fragment II) expressed the transgene in skeletal muscle (Table 2). None of the three lines with the 3' moiety of the first intron (fragment I2) presented skeletal muscle expression of the reporter gene. The 5' part of intron 1 was cut into two fragments, named I3 and I4, which overlap on about 100 nucleotides (Fig. 1c). While transgenic animals bearing the most 5' part of intron 1 (499 bp) were negative (fragment I3), two of the three transgenic lines with an internal 595 bp region (fragment I4) showed CAT activity in hindlimb muscle without ectopic expression in liver or spleen (data not shown). This small region of intron 1 contains elements necessary for skeletal muscle expression of human *UCP3* *in vivo*.

The expression pattern among different type of skeletal muscle was determined by measuring *CAT* mRNA levels in the different positive transgenic lines (Fig. 4b). Intron 1 (fragment I) and its 5' moiety (fragment II) conferred a profile similar to the human *UCP3* gene. However, the transgenic mice with the 595 bp internal region of intron 1 (fragment I4) had a profoundly altered pattern with strong expression of *CAT* mRNA in the diaphragm and soleus. A similar profile was observed at the protein level with *CAT* enzymatic assay (data not shown). Altogether, the data reveal that skeletal muscle expression of human *UCP3* depends on an internal region of intron 1 (fragment I4) but

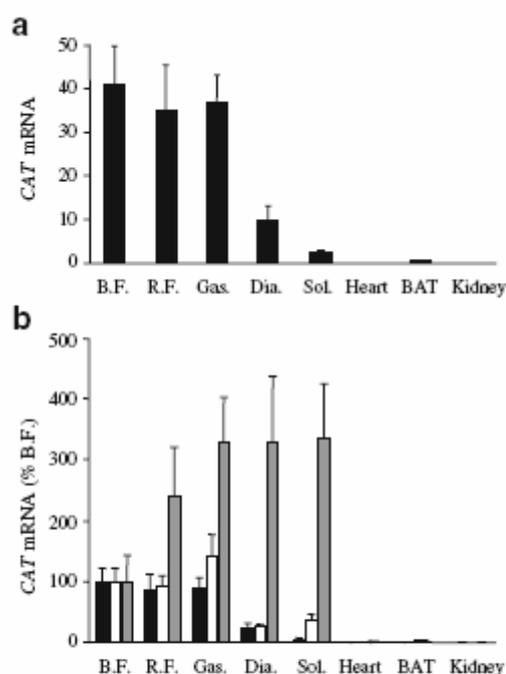


Fig. 4 *CAT* mRNA expression in tissue from transgenic lines with various fragments of intron 1. **a** Transgenic mice with the entire intron 1 (fragment I). Results are expressed as $2^{-\Delta C_t} \times 10^9$. **b** Comparison of *CAT* mRNA expression between transgenic lines bearing various portions of intron 1 (location and size of intronic fragments, see Fig. 1). Black bars, animal expressing fragment I of intron; white bars, animal expressing fragment II of intron; grey bars, animal expressing fragment I4 of intron. Results are expressed as % of biceps femoris (B. F.) values. Data are the means \pm SE ($n=5-7$). BAT, brown adipose tissue; Dia., diaphragm; Gas., gastrocnemius; R.F., rectus femoris; Sol., soleus

that a larger 5' region (fragment II) is necessary for proper distribution according to fibre types.

An *in silico* analysis was next carried out on the entire intron 1 of the human *UCP3* gene. Sequence alignments between different species (*Homo sapiens*, *Pan troglodytes*, *Rhesus macacus*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Bos taurus* and *Canis lupus familiaris*) revealed important conserved sites located in I3 part, I4 part and at the 3' end of the intron. Computer-assisted analyses also revealed the existence of several potential sites for transcription response elements. We therefore tested, in L6 cells, the effect of several transcriptional regulators that potentially bind conserved elements, either alone (MyoD, forkhead box [FOX] O1A, FOXO3A, FOXC2, myogenic factor 5 [Myf 5], nuclear respiratory factor [NRF]2 α , NRF2 β , v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homologue 2 [ETS]2, PPAR α), or in combination (MyoD and FOXO3A, FOXC2, NRF2 α , NRF2 β , ETS2 or PPAR α), on the -3.2 kb/hUCP3prom-Luciferase constructs in the absence and the presence of intron 1. None of these factors led to an increase in luciferase activity associated with the presence of the first intron (data not shown).

Intron 1 is essential for the response to fasting The transgenic mouse lines with expression of the *CAT* gene in skeletal muscle were submitted to 48 h fasting to identify the region of intron 1 involved in the response to fasting (Fig. 6). In transgenic mice bearing the entire intron 1 (fragment I), induction of *CAT* mRNA expression was observed in rectus femoris, gastrocnemius and diaphragm (Fig. 6a). In mice expressing the 5' moiety of intron 1 (fragment II) or the internal 595 bp of the first intron (fragment I4), fasting did not induce expression of *CAT* mRNA in skeletal muscles (Fig. 6b, c). As a control of the effectiveness of fasting, we measured mouse *Ucp3* mRNA levels in the skeletal muscles of mice derived from the different transgenic lines tested. As in wild-type animals, there was an upregulation of murine *Ucp3* (data not shown). Therefore, the 3' part of intron 1 (fragment I2), albeit not necessary for expression in skeletal muscle, is important for the response to fasting.

Discussion

So far, studies on the molecular mechanisms governing *UCP3* regulation have relied on cellular models and *in vitro* approaches. However, *UCP3* expression levels in cultures of skeletal muscle cells are very low compared with *in vivo* skeletal muscle. This is valid not only for mouse cell lines but also for primary cultures of human skeletal muscle cells [29–31]. Therefore, identification of the regulatory elements critical for total expression of *UCP3* at physiological levels is likely to be impossible when relying on transient transfection of promoter-reporter gene constructs in cultured cells. Using a transgenesis approach, our study revealed that the first intron of the human *UCP3* gene is essential for proper tissue distribution and that distinct regions are involved in skeletal muscle expression, fibre type specificity and response to fasting (Fig. 7).

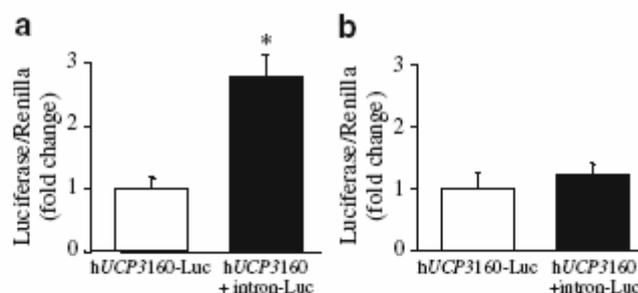


Fig. 5 Luciferase activity of -3.2 kb human *UCP3* promoter-reporter gene constructs in the presence and absence of intron 1. **a** Promoter activity in L6 myotubes. **b** Promoter activity in HIB-IB brown adipocytes. Data are expressed as fold-change relative to hUCP3160-Luc activity and are given as means \pm SE ($n=4-6$). * $p < 0.05$

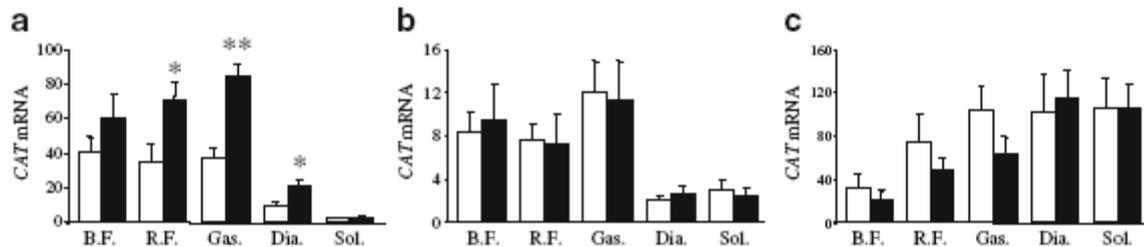


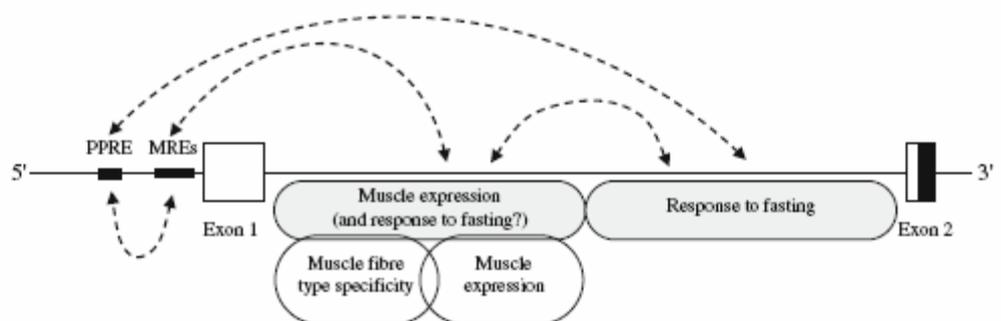
Fig. 6 Effect of 48 h fasting on *CAT* mRNA expression in transgenic lines with various fragments of intron 1. a Transgenic mice with fragment I. b Transgenic mice with fragment II. c Transgenic mice with fragment I4. Black bars, fasted animal; white bars, control fed animal. The location and size of intronic fragments are shown on

Fig. 1. *CAT* mRNA levels were determined in fed and fasted (48 h) animals. Results are expressed as $2^{-\Delta\Delta C_t}$ values. Data are the means \pm SE ($n=5-7$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$. B.F., biceps femoris; Dia., diaphragm; Gas., gastrocnemius; R.F., rectus femoris; Sol., soleus

A region encompassing 16 kb of the human *UCP3* gene sequence was sufficient to support skeletal muscle expression and regulation in transgenic mice. Higher levels of mouse than human *UCP3* transcripts were observed in heart and brown adipose tissue. These data are in accordance with earlier findings suggesting different control of *UCP3* expression between rodents and humans. Thus expression of *UCP3* mRNA was higher in human than in rat heart [16, 32]. In contrast to rodent brown adipose tissue, where high levels have been reported, little or no expression of *UCP3* was detected in human brown adipose tissue [32, 33]. Moreover, our data with the 16 kb construct are in agreement with the in vivo distribution of human *UCP3* in mice with an 80 kb transgene encompassing 50 kb of 5' flanking region and containing all the intronic regions [22]. Our data on cell lines confirm the specificity of expression of *UCP3* in skeletal muscle cells vs brown adipocytes. Altogether the currently available information suggests that *UCP3* shows higher specificity for skeletal muscle expression in humans than in rodents. Considering the profile of expression in the different muscles investigated, the rank order of expression among fibre types, i.e. type IIB \geq type IIA/IX > type I, in transgenic mice was similar to the endogenous profile described in human skeletal muscle [4]. Moreover, regulation by thyroid hormone and fasting was observed as shown earlier in humans [13, 17]. Therefore, all regulatory sequences crucial for tissue and fibre type distribution, as well as for hormonal and nutritional regulation were present in the 16 kb transgene. Generation

of numerous transgenic mouse lines revealed that the promoter region is not sufficient for expression of human *UCP3* and that intron 1 was indispensable for expression in skeletal muscle and fibre type specificity. The involvement of introns in skeletal muscle gene expression has been shown in vivo in few instances, e.g. for the acetylcholinesterase and dystrophin genes [34, 35]. In both, the enhancer is located in intron 1. Truncation of intron 1 of the human *UCP3* gene showed that the 5' part was necessary for a proper expression profile in the different skeletal muscles. Strikingly, further deletion pointed to an internal part that conferred expression in skeletal muscle, but totally abolished the differences between fibre types. Such a dichotomy makes the human *UCP3* gene a unique model to delineate elements critical for skeletal muscle expression from sequences conferring fibre type specificity. The bio-informatic analyses driven on the entire human *UCP3* intron 1 revealed that several sequences were conserved among species that could be implicated in transcription factor binding. Conceivably, these transcriptional regulators participate in muscle expression of human *UCP3*. However, none of the factors expressed transiently in the presence of intron 1 increased expression of the reporter system in L6 myotubes; this could either suggest that the factors and cognate *cis*-acting motifs tested are not involved in muscle specificity or that in vitro cellular transactivation systems do not support regulatory events occurring in vivo. The data raise the possibility that intron 1 of the human *UCP3* gene could reveal new combinations of

Fig. 7 Potential interactions between regions in intron 1 and *cis*-acting elements in the promoter region of the human *UCP3* gene. MREs, uncanonical MyoD responsive elements; PPRE, PPAR responsive element



regulatory sequences and transcription factors involved in skeletal muscle expression and fibre type specificity.

Study of the molecular mechanisms controlling gene expression by fasting has received much less attention in skeletal muscle than in liver. The human *UCP3* gene is strongly regulated by fasting both in rodents and in humans, an effect potentially mediated by fatty acids [13, 36–38]. Interestingly, we observed that the 3' part of intron 1, albeit dispensable for muscle expression, was important for the response to fasting. Altogether, the data indicate that different regions of intron 1 are involved in skeletal muscle expression, preferential expression in glycolytic muscles or response to fasting.

Our data shed new light on the control of human *UCP3* gene transcription and suggest interactions between *cis*-acting elements in the promoter and different regions of intron 1 (Fig. 7). In vitro studies focusing on the proximal promoter have shown that its activity was dependent on MyoD binding uncanonical elements close to the transcriptional start site [20, 21]. However, the present data clearly show that the 5' region of intron 1 is needed for skeletal muscle expression in vivo. Therefore, a functional interaction between that region and the proximal promoter could be expected. Furthermore, cooperativity between several elements within that region acts to obtain specific expression in skeletal muscle and proper distribution among muscles with different metabolism. A direct repeat-1 element upstream of the MyoD binding sites mediates activation by PPAR α and β . Crosstalk between the regulatory elements is suggested by the finding that MyoD is required for activation by a PPAR ligand. Accumulating evidence suggests that fatty acids induce *UCP3* gene expression through PPARs [39]. The in vivo analyses described here demonstrate that a critical element in the 3' part of intron 1 is likely to interact with the PPAR responsive element in the proximal promoter to obtain a full response to fasting. Nevertheless, we cannot exclude the possibility that elements for the response to fasting lie in the 5' part of the first intron and act in synergy with sequences present in the distal part.

The molecular basis of the preferential expression of human *UCP3* in skeletal muscles and its regulation by hormones and nutrients is of interest because skeletal muscles are important in energy homeostasis and because increasing evidence suggests that *UCP3* plays a role in this process. Furthermore, *UCP3* expression is decreased in type 2 diabetes [40]. This reduction has been shown in prediabetic and diabetic patients [41, 42]. The decrease of *UCP3* expression is not attributable to fibre type diminution, since fast-twitch glycolytic fibres, in which *UCP3* is preferentially expressed, are increased in muscles of diabetic patients. The relevance of studying regulatory sequences of the human *UCP3* gene is furthermore

supported by the association between a promoter polymorphism and risk of type 2 diabetes [24]. This study paves the way for future work aimed at dissecting the complex network of interactions between promoter and intronic *cis*-acting elements and at deciphering the mechanisms underlying dysregulation of *UCP3* in pathological conditions such as type 2 diabetes.

Acknowledgements This work was supported in part by grants from Inserm (Progres 4P007E), Institut de Recherches Servier and Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2008-01896), Spain. We are very grateful to C. Pujol (Obesity Research Laboratory Inserm U858) and J.-J. Maoret (Molecular Biology Facility of the Louis Bugnard Institute) for expert technical assistance. We also thank Y. Barreira and her team from the Animal Care Facility of the Louis Bugnard Institute.

Duality of interest The authors declare that there no duality of interest associated with this manuscript.

References

- Ricquier D, Bouillaud F (2000) The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem J* 345:161–179
- Krauss S, Zhang CY, Lowell BB (2005) The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:248–261
- Brand MD, Esteves TC (2005) Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metab* 2:85–93
- Hesselink MKC, Keizer HA, Borghouts LB et al (2001) Protein expression of *UCP3* differs between human type 1, type 2a, and type 2b fibers. *FASEB J* 15:1071–1073
- Vidal-Puig AJ, Grujic D, Zhang C-Y et al (2000) Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. *J Biol Chem* 275:16258–16266
- Schrauwen P, Hoeks J, Hesselink MK (2006) Putative function and physiological relevance of the mitochondrial uncoupling protein-3: involvement in fatty acid metabolism? *Prog Lipid Res* 45:17–41
- Bezaire V, Seifert EL, Harper ME (2007) Uncoupling protein-3: clues in an ongoing mitochondrial mystery. *FASEB J* 21:312–324
- Garcia-Martinez C, Sibille B, Solanes G et al (2001) Overexpression of *UCP3* in cultured human muscle lowers mitochondrial membrane potential, raises ATP/ADP ratio, and favors fatty acid vs glucose oxidation. *FASEB J* 15:2003–2035
- Choi CS, Fillmore JJ, Kim JK et al (2007) Overexpression of uncoupling protein 3 in skeletal muscle protects against fat-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 117:1995–2003
- Tiraby C, Tavemier G, Capel F et al (2007) Resistance to high-fat-diet-induced obesity and sexual dimorphism in the metabolic responses of transgenic mice with moderate uncoupling protein 3 overexpression in glycolytic skeletal muscles. *Diabetologia* 50:2190–2199
- Costford SR, Chaudhry SN, Crawford SA, Salkhordeh M, Harper ME (2008) Long-term high-fat feeding induces greater fat storage in mice lacking UCP3. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295: E1018–E1024
- Guigal N, Rodriguez M, Cooper RN et al (2002) Uncoupling protein-3 (*UCP3*) mRNA expression in reconstituted human muscle after myoblast transplantation in RAG2 $^{-/-}$ /gamma c/C5-immunodeficient mice. *J Biol Chem* 277:47407–47411

13. Millet L, Vidal H, Andreelli F et al (1997) Increased uncoupling protein-2 and -3 mRNA expression during fasting in obese and lean humans. *J Clin Invest* 100:2665–2670
14. Gong DW, He Y, Karas M, Reitman M (1997) Uncoupling protein-3 is a mediator of thermogenesis regulated by thyroid hormone, beta3-adrenergic agonists, and leptin. *J Biol Chem* 272:24129–24132
15. Pedraza N, Rosell M, Villarroya J et al (2006) Developmental and tissue-specific involvement of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in the control of mouse uncoupling protein-3 gene expression. *Endocrinology* 147:4695–4704
16. Larkin S, Mull E, Miao W et al (1997) Regulation of the third member of the uncoupling protein family UCP3 by cold and thyroid hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 240:222–227
17. Barbe P, Larrouy D, Boulanger C et al (2001) Triiodothyronine-mediated upregulation of *UCP2* and *UCP3* gene expression in human skeletal muscle without coordinated induction of mitochondrial respiratory chain genes. *FASEB J* 15:13–15
18. Solanes G, Vidal-Puig A, Grujic D, Flier JS, Lowell BB (1997) The human uncoupling protein-3 gene. Genomic structure, chromosomal localization, and genetic basis for short and long form transcripts. *J Biol Chem* 272:25433–25436
19. Acin A, Rodriguez M, Rique H, Canet E, Boutin JA, Galizzi J-P (1999) Cloning and characterization of the 5' flanking region of the human uncoupling protein 3 (*UCP3*) gene. *Biochem Biophys Res Commun* 258:278–283
20. Solanes G, Pedraza N, Iglesias R, Giral M, Villarroya F (2000) The human uncoupling protein-3 gene promoter requires MyoD and is induced by retinoic acid in muscle cells. *FASEB J* 14:2141–2143
21. Solanes G, Pedraza N, Iglesias R, Giral M, Villarroya F (2003) Functional relationship between MyoD and peroxisome proliferator-activated receptor-dependent regulatory pathways in the control of the human uncoupling protein-3 gene transcription. *Mol Endocrinol* 17:1944–1958
22. Solanes G, Pedraza N, Calvo V, Vidal-Puig A, Lowell BB, Villarroya F (2005) Thyroid hormones directly activate the expression of the human and mouse uncoupling protein-3 genes through a thyroid response element in the proximal promoter region. *Biochem J* 386:505–513
23. Cassell PG, Saker PJ, Huxtable SJ et al (2000) Evidence that single nucleotide polymorphism in the uncoupling protein 3 (*UCP3*) gene influences fat distribution in women of European and Asian origin. *Diabetologia* 43:1558–1564
24. Gable DR, Stephens JW, Cooper JA, Miller GJ, Humphries SE (2006) Variation in the *UCP2-UCP3* gene cluster predicts the development of type 2 diabetes in healthy middle-aged men. *Diabetes* 55:1504–1511
25. Otabe S, Clement K, Dina C et al (2000) A genetic variation in the 5' flanking region of the *UCP3* gene is associated with body mass index in humans in interaction with physical activity. *Diabetologia* 43:245–249
26. Blaise R, Grober J, Rouet P, Tavemier G, Daegelen D, Langin D (1999) Testis expression of hormone-sensitive lipase is conferred by a specific promoter that contains four regions binding testicular nuclear proteins. *J Biol Chem* 274:9327–9334
27. Mazzucotelli A, Viguerie N, Tiraby C et al (2007) The transcriptional coactivator PGC-1alpha and the nuclear receptor PPARalpha control the expression of glycerol kinase and metabolism genes independently of PPARgamma activation in human white adipocytes. *Diabetes* 56:2467–2475
28. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE et al (1996) *Current protocols in molecular biology*. Wiley, New York
29. Hwang CS, Lane MD (1999) Up-regulation of uncoupling protein-3 by fatty acid in C2C12 myotubes. *Biochem Biophys Res Commun* 258:464–469
30. Nagase I, Yoshida S, Canas X et al (1999) Up-regulation of uncoupling protein 3 by thyroid hormone, peroxisome proliferator-activated receptor ligands and 9-cis retinoic acid in L6 myotubes. *FEBS Lett* 461:319–322
31. Chevillotte E, Rieusset J, Roques M, Desage M, Vidal H (2001) The regulation of uncoupling protein-2 gene expression by omega-6 polyunsaturated fatty acids in human skeletal muscle cells involves multiple pathways, including the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor beta. *J Biol Chem* 276:10853–10860
32. Boss O, Samec S, Paoloni-Giacobino A et al (1997) Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett* 408:39–42
33. Esterbauer H, Oberkofler H, Krempler F, Strosberg AD, Patsch W (2000) The uncoupling protein-3 gene is transcribed from tissue-specific promoters in humans but not in rodents. *J Biol Chem* 275:36394–36399
34. Chan R, Boudreau-Larivière C, Angus L, Mankal F, Jasmin B (1999) An intronic enhancer containing an N-box motif is required for synapse- and tissue-specific expression of the acetylcholinesterase gene in skeletal muscle fibers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:4627–4632
35. Marshall P, Chartrand N, de Repentigny Y et al (2002) Mouse dystrophin enhancer preferentially targets lacZ expression in skeletal and cardiac muscle. *Dev Dyn* 224:30–38
36. Weigle DS, Selfridge LE, Schwartz MW et al (1998) Elevated free fatty acids induce uncoupling protein 3 expression in muscle. A potential explanation for the effect of fasting. *Diabetes* 47:298–302
37. Vidal H, Langin D, Andreelli F, Millet L, Larrouy D, Laville M (1999) Lack of skeletal muscle uncoupling protein 2 and 3 mRNA induction during fasting in type-2 diabetic subjects. *Am J Physiol* 277:E830–E837
38. Khalifallah Y, Fages S, Laville M, Langin D, Vidal H (2000) Regulation of uncoupling protein-2 and uncoupling protein-3 mRNA expression during lipid infusion in human skeletal muscle and subcutaneous adipose tissue. *Diabetes* 49:25–31
39. Brun S, Camona MC, Mampel T et al (1999) Activators of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha induce the expression of the uncoupling protein-3 gene in skeletal muscle: a potential mechanism for the lipid intake-dependent activation of uncoupling protein-3 gene expression at birth. *Diabetes* 48:1217–1222
40. Krook A, Digby J, O'Rahilly S, Zierath J, Wallberg-Henriksson H (1998) Uncoupling protein 3 is reduced in skeletal muscle of NIDDM patients. *Diabetes* 47:1528–1531
41. Schrauwen P, Hesselink MKC, Blaak EE et al (2001) Uncoupling protein 3 content is decreased in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 50:2870–2873
42. Schrauwen P, Mensink M, Schaart G et al (2006) Reduced skeletal muscle uncoupling protein-3 content in prediabetic subjects and type 2 diabetic patients: restoration by rosiglitazone treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 91:1520–1525

NOM : GIROUSSE

Prénom :

Amandine

TITRE : CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA REGULATION DE L'EXPRESSION DU GENE HUMAIN UCP3 DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE DE SOURIS : ETUDE EXPERIMENTALE.

RESUME : UCP3 est une protéine découplante de la membrane interne mitochondriale exclusivement exprimée ou presque dans les muscles squelettiques chez l'Homme et potentiellement impliquée dans le métabolisme des acides gras. Ce travail concerne la régulation de l'expression du gène humain UCP3 chez la souris. Des animaux portant le gène UCP3 en entier ou en partie ont été créés par transgénèse additive dans le but de délimiter les séquences responsables de la spécificité musculaire d'expression et celles responsables de la réponse aux nutriments. Une séquence intronique de 600 pb confère l'expression musculaire *in vivo*. Le jeûne et le sevrage sont deux situations entraînant une induction de l'expression du transgène et de la forme murine d'UCP3. Ces manipulations nutritionnelles font intervenir les acides gras, modulateurs connus de l'expression d'UCP3. Cependant, d'autres facteurs de régulation pourraient être impliqués dans la régulation de l'expression du gène UCP3.

MOTS-CLES : Protéine découplante, obésité, modèle animal, transgénèse, acides gras

ENGLISH TITLE: STUDY OF HUMAN UCP3 GENE REGULATION IN SKELETAL MUSCLE OF MOUSE: EXPERIMENTAL STUDY

ABSTRACT: Uncoupling protein UCP3 is an inner mitochondrial protein almost exclusively expressed in skeletal muscle in human which could be implicated in fatty acid metabolism. This work focuses on the regulation of the human UCP3 gene expression in mouse. A transgenesis approach has been used to create animals bearing all or part of the UCP3 gene in order to delineate the sequences responsible for the muscle specific expression and those responsible for its response to nutrients. A 600 bp sequence of the human UCP3 intron1 gene has been identified which confers the muscular expression *in vivo*. Fasting and weaning can induce expression of the transgene and the murine form of UCP3. These nutritional challenges implicate fatty acids known as modulator of UCP3 expression. Nevertheless other regulatory factors could be involved in the regulation of UCP3 gene.

KEYWORDS : Uncoupling protein, obesity, animal model, transgenesis, fatty acids