



# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*  
Discipline ou spécialité : *Physiopathologie*

---

Présentée et soutenue par *Amandine GIROUSSE*  
Le 5 Novembre 2010

**Titre :** *Régulation de la protéine découplante UCP3 et inhibition génique ou pharmacologique de la lipase hormono-sensible*

---

### JURY

*Dr Yannick LE MARCHAND-BRUSTEL*  
*Dr Daniel METZGER*  
*Pr Daniel RICQUIER*  
*Pr Pierre GOURDY*  
*Pr Dominique LANGIN*

---

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

**Unité de recherche :** *INSERM U858*

**Directeur(s) de Thèse :** *Pr Dominique Langin*

*Dr Geneviève TAVERNIER*

**Rapporteurs :** *Dr Yannick LE MARCHAND-BRUSTEL*

*Dr Daniel METZGER*

Merci...

Ces premières lignes sont en général celles écrites en dernier, j'ai pris (enfin ?) quelques minutes, je me suis retournée et j'ai regardé derrière moi...

Elles témoignent de ma gratitude envers toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail.

En premier lieu, je souhaiterais remercier Madame Yannick Le Marchand-Brustel, Monsieur Daniel Metzger et Monsieur Daniel Ricquier d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Vos carrières scientifiques sont à mes yeux impressionnantes et je suis véritablement honorée par votre investissement.

Un grand merci également à Monsieur Pierre Gourdy qui a accepté spontanément la présidence de ce jury thèse.

Je souhaiterais ensuite remercier mon Directeur de Thèse, le Professeur Dominique Langin. En fait juste avant, je devrais remercier Philippe Valet, qui, lorsque je cherchais à reprendre un cursus universitaire en M1, m'a dit «tu devrais aller voir Dominique, il est véto comme toi !»...c'est comme ça que tout a commencé. Je me suis retrouvée dans ton bureau, Dominique, puis dans ton équipe pour un stage de M1, puis pour un M2R et puis pour ma thèse ! 5 ans déjà ! Merci donc de m'avoir accueillie, stimulée, soutenue, ou reconfortée. J'ai tellement appris durant ces années au sein de ton laboratoire! Je garderai également de très bons souvenirs de nos discussions sur l'art, les voyages et la vie... Je te souhaite de toujours « avoir l'envie », c'est le plus important ! J'espère aussi que tu réaliseras tes rêves d'Afrique...

Je souhaiterais également remercier le Docteur Geneviève Tavernier. Comment trouver les mots justes pour te transmettre ce merci si spécial ? Quel plaisir d'avoir appris et travaillé à tes côtés ! Ton dynamisme, ton dévouement, ton implication de tous les jours a été tellement importante pour moi. Nous étions les madames « modèles animaux » de l'équipe, quelle aventure ! Et puis au-delà du travail, je souhaite te remercier pour tous les moments de vie partagés. Ces quelques années n'ont pas toujours été simples pour toi comme pour moi. Dans mon lit face à la Garonne pendant mon M2R, au fond d'un autre lit à Budapest avec un petit caillou dans le rein, ou bien pendant l'été 2008 si déchirant, tu m'as toujours témoigné cette gentillesse qui te caractérise si bien. Merci du fond du cœur !

Un énorme merci au Docteur Véronic Bézaire, un modèle pour moi ! Véro toi aussi tu m'as appris tant de choses et soutenue tant de fois, nos discussions scientifiques étaient toujours enrichissantes (qu'est ce qu'on a pu cogiter sur les « dilutions isotopiques » !). Merci aussi à toi et Stephen pour nous avoir fait partager votre culture Canado-caribouienne, des citrouilles d'Halloween aux biscuits décorés de Noël ! Les moments passés ensemble, c'était VRAIMENT L'FUN !!!

J'aimerais ensuite remercier tous les membres de l'équipe pour l'agréable ambiance qu'ils créent au quotidien.

Merci Corinne pour ton amitié, ton dynamisme (et tes galettes bretonnes, deux fois par an).  
Merci Cédric pour ton aide, ta bonne humeur, tes conseils ; j'ai énormément apprécié travailler à tes côtés et avoir été ta colocataire comme dit Gene. Toi aussi tu es un véritable modèle pour moi !

Merci François, ou devrais-je dire « Super François la basket bleue », je t'adore !

Merci Nath pour nos échanges, nos discussions dans les moments durs.

Merci Sylvie pour ton aide, en lipidomique et à la correction d'une partie de ce manuscrit.

Merci Laurent pour ton aide technique.

Merci Carine pour ta disponibilité.

Merci Aline pour ton aide, tes « bonjours! », nos discussions scientifiques.

Merci Dominique L. pour les discussions toujours passionnantes sur la biologie, le système éducatif, ou la séquestration de chevreuil dans les jardins de Ramonville.

Merci Marie-Adeline pour ton aide et ton expertise dans la lipolyse et surtout ce dynamisme et cette bonne humeur.

Merci Isabelle H. pour m'avoir donné l'opportunité d'enseigner en STAPS, ce fut une très bonne expérience.

Merci Balbine pour ton expertise en bio-info, ça m'impressionne toujours !

Merci Marion pour ton soutien, ta bonne humeur et ton humour.

Merci à Pascale et Lydia pour votre disponibilité.

Et puis aussi merci aux derniers arrivants : Pierre-Marie, Isa (power TLR4 !), Cathy, Emilie, Katie (pour ton aide, ce peps, ce joli rire et les goutaillons !) et Anne-Laure (mon mentor Endnote, copine de piscine, d'apéro sans alcool et de boules à facettes).

Je souhaiterais remercier les étudiants avec qui j'ai travaillé et que j'ai encadrés, la brillante Sarah qui continue sa route en Médecine et le super Aurélien. Merci Auré pour ton investissement, tes remarques pertinentes, ton dynamisme et ton éternelle bonne humeur même à la 4<sup>ième</sup> extraction de lipides à Purpan. Je te souhaite une longue et belle route !

Merci à mes compagnons de cantine, Sandra, Didi, Christian, pour nos agréables discussions autour d'une ratatouille acide, un poisson trop cuit ou une crème dessert expérimentale !

Merci à mes compagnons de galère, les thésards ! Camille A, ces yeux bleus pétillants, cette détermination dans le travail et ce bon caractère, ça t'assure que du bon pour la suite ! Notre séjour à Amsterdam et nos discussions au labo resteront d'excellents souvenirs, du coup ;-). Camille F, merci pour ta gentillesse et ton soutien au quotidien, ton incroyable efficacité pour l'impression de mes thèses, toutouyoutou ou piscine ? J'espère que tes projets se concrétiseront ! Rodolphe, merci pour ton humour décalé que j'apprécie beaucoup, ton soutien, les trajets en décapotable jusqu'à Purpan (j'adore !).

Merci aux « filles du 1<sup>er</sup> ». Coralie, tu es également un modèle pour moi. Un esprit tellement réactif et savant, un caractère tellement humble, une personne tellement accessible ! Virginie je voulais te remercier pour ton aide, ton soutien, ta bienveillance et ta gentillesse. Marie, on s'est connu tard mais finalement, c'est une très chouette rencontre et j'en garde plein de bons souvenirs (à Toulouse comme à Amsterdam). Et puis je vous remercie surtout les filles pour votre grain de folie collectif, c'est tellement bon ! c'est Giroussi qui vous le dit ! Sans transition je voudrais également remercier Lustucru d'avoir inventé les « Gnocchis à poêler ». Sans eux j'aurais connu la déprime de nombreuses soirées !

Je souhaiterais aussi remercier tout plein d'autres personnes de l'I2MR : Aurélie W (pour ton aide en clamp et ta bonne humeur), Jason (pour m'avoir appris comment insulter en anglais son ordinateur, non je plaisante, pour tout ton travail en bio-info sur UCP3), Claude K (pour le CNAM), Miss P, Dédé, Estelle, Danièle, Jean José...

Merci aussi au Professeur Max Lafontan pour toutes ces discussions passionnantes ! Comment ne pas s'enrichir à vos côtés ?!

Un grand merci également aux plate-formes techniques. Tout d'abord je souhaiterais saluer tout le personnel du service de zootechnie dirigé par Yara Barreira ; Hubert, Caro, Magali, Christine, Myriam, Corinne, Xavier... Leur disponibilité malgré la charge de travail importante, leur soutien et leur bonne humeur m'ont beaucoup apporté. Merci aussi à Sophie, Aurore, Laurent et Arielle d'Anexplo.

Je voudrais à présent remercier mes amis, qui ont participé à ce que je suis, qui m'ont soutenue à travers les années et qui croient en moi. Merci à ma « vieille bande », Joël, Jonath, Carl, Damien, Juju, Benja, vous êtes tellement importants pour moi même si les kilomètres et nos vies trépidantes nous séparent ! Merci à Audrey, macumba helvète, pour ton soutien sans faille ! J'apprécie tellement te revoir à chacun de tes passages sur Toulouse. Fonce, je sais que tu vas nous épater ! Merci à Pauline et Aumérine, mes vétos préférées !

Et pour finir je souhaiterais remercier ma famille qui m'a toujours soutenue dans mes projets et encouragée de son amour. Merci à toi mamie Mireille ! Merci à toi Maman, de me permettre de voir la fierté dans tes yeux, merci de ton amour inconditionnel ! Merci Yannou d'être là, de me soutenir. Merci aussi à la famille de Seb qui ne cesse de m'encourager. J'ai une pensée toute particulière pour mes deux grand-pères, Claude et André qui ont rejoint d'autres cieux pendant que j'effectuais cette thèse. Enfin, mon plus grand regret est que tu ne sois plus là Papa pour lire ces lignes et pour que je puisse te remercier de ton amour et de ton soutien. J'espère que tu aurais été fier de moi. Je te dédie ce travail.

Ma famille, c'est aussi Seb. Je souhaiterais te remercier de tout mon cœur pour ce que tu es et ce que nous devenons. Ma force je la trouve aussi en toi. Tu m'as encouragée dès les premiers jours de cette thèse, m'a emmené la nuit mettre mes souris à jeun, respecté mon rythme de travail, aidé à décompresser quand il le fallait...UCP3 et la LHS n'ont plus de secret pour toi ?! Je te dédie tout mon amour, et il est grand comme... le nombre d'adipocytes de tous les terriens (je crois que ça va aller en augmentant si l'on en croit l'épidémio...) !!!

# Sommaire

<b>Préambule : Métabolisme des acides gras.....</b>	<b>9</b>
<b>I- Présentation des acides gras et leurs différentes formes.....</b>	<b>9</b>
<b>II- Synthèse des acides gras.....</b>	<b>11</b>
<b>III- Devenir des acides gras.....</b>	<b>16</b>
1- Transport des acides gras .....	16
2- Stockage adipocytaire des acides gras .....	22
3- Lipolyse adipocytaire.....	28
4- Catabolisme des acides gras.....	34
5- Lipotoxicité ou la menace des acides gras .....	38
5.1- L'hypothèse initiale de Randle .....	40
5.2- Quelles sont les espèces moléculaires à l'origine de la lipotoxicité ? .....	41
 <b>PARTIE 1 : REGULATION DE L'EXPRESSION DE LA PROTEINE DECOUPLANTE UCP3</b>	
<b>.....</b>	<b>47</b>
<b>I Introduction : Les protéines découplantes.....</b>	<b>47</b>
1- Historique et phylogénie .....	47
2- Etude générale des protéines découplantes .....	52
2.1- Organisation génomique .....	52
2.2- UCP1 et UCP2 : données structurales .....	54
3- Cas particulier d'UCP3 .....	55
3.1- Données structurales .....	55
3.2- Régulation de l'expression d'UCP3.....	55
3.2.1- Arguments expérimentaux .....	56
3.2.2- Etude du promoteur humain d'UCP3 .....	65
3.3- Fonctions d'UCP3.....	68
3.3.1- Expression tissulaire .....	68
3.3.2-UCP3 et activité thermogénique .....	70
3.3.3- UCP3 et le transport de calcium .....	71
3.3.4- UCP3 et la production d'ERO .....	71
3.3.5- UCP3 et le métabolisme des acides gras.....	73
3.3.6- UCP3, obésité et diabète de type 2 .....	76
<b>II Objectifs.....</b>	<b>78</b>
<b>III Résultats expérimentaux.....</b>	<b>78</b>
ARTICLE I : La régulation de l'expression de la protéine découplante-3 (UCP3) humaine est gouvernée par une interaction complexe entre le promoteur et les séquences introniques .....	78
Introduction .....	78
Article.....	83
Discussion .....	85

<b>PARTIE II : CONSEQUENCES D'UNE DIMINUTION GENIQUE OU PHARMACOLOGIQUE de LA LIPASE HORMONO-SENSIBLE SUR L'INSULINO-SENSIBILITE ET L'INFLAMMATION DU TISSU ADIPEUX.....</b>	<b>89</b>
<b>I Introduction .....</b>	<b>89</b>
1- Lipolyse adipocytaire et modèles animaux .....	89
ARTICLE II : Les modèles animaux au service de l'étude de la lipolyse adipocytaire ..	89
Introduction .....	89
Article.....	91
2- Inflammation du tissu adipeux associée à l'obésité .....	93
2.1- Les observations associant obésité/insulino-résistance et inflammation. ....	93
2.2- Les acteurs cellulaires de l'inflammation du TA. ....	94
2.3- Communications intercellulaires .....	99
2.4- Mécanismes moléculaires .....	101
<b>II Objectifs.....</b>	<b>103</b>
<b>III Résultats expérimentaux.....</b>	<b>105</b>
ARTICLE III : Les souris hétérozygotes pour le gène de la lipase hormono-sensible (LHS <sup>+/-</sup> ) présentent une diminution des flux d'acides gras et une amélioration de la sensibilité à l'insuline.....	105
Introduction .....	105
Article.....	107
Résultats non publiés.....	109
Discussion .....	123
ARTICLE IV : L'inhibition chronique de la lipase hormono-sensible : un modèle d'amélioration de l'insulino-sensibilité et de remodelage du tissu adipeux. ....	133
Introduction .....	133
Article.....	137
Discussion .....	139
<b>Conclusion et perspectives générales .....</b>	<b>147</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>153</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>179</b>

# Liste des illustrations

## Figures

Figure 1 : Les différentes formes des acides gras. ....	11
Figure 2 : Système citrate de transport du groupement acétyle vers le cytosol pour la synthèse des acides gras. ....	13
Figure 3 : Synthèse des acides gras. ....	15
Figure 4 : Transport des acides gras et du cholestérol dans l'organisme. ....	17
Figure 5 : Protéines impliquées dans le transport membranaire des acides gras à longue chaîne. ....	19
Figure 6 : Transport cellulaire des acides gras. ....	22
Figure 7 : Synthèse des triglycérides, stockage adipocytaire des acides gras. ....	24
Figure 8 : Comparaison structurale d'une lipoprotéine et d'une gouttelette lipidique. ....	26
Figure 9 : Hypothèse de formation des gouttelettes lipidiques. ....	27
Figure 10 : Modèle de la lipolyse adipocytaire chez l'Homme. ....	29
Figure 11 : Voies antilipolytiques. ....	32
Figure 12 : Lipolyses basale et stimulée. ....	33
Figure 13 : Activation des acides gras et transport du groupement acyle dans la matrice mitochondriale par la carnitine. ....	35
Figure 14 : Séquence de réactions de la $\beta$ -oxydation des acides gras. ....	37
Figure 15 : Les étapes de l' $\omega$ oxydation. ....	38
Figure 16 : Vue générale du métabolisme des acides gras. ....	39
Figure 17 : Lipotoxicité : facteurs et mécanismes moléculaires. ....	45
Figure 18 : Chaîne respiratoire mitochondriale ....	48
Figure 19 : Représentation schématique des gènes d'UCP1, UCP2 et UCP3. ....	53
Figure 20 : Séquence de la région 5' du gène humain Ucp3. ....	67
Figure 21 : Implication d'UCP3 dans les mécanismes de translocation des acides gras (à gauche) et de leurs peroxydes (à droite). ....	72
Figure 22 : Rôles d'UCP3 dans le métabolisme mitochondrial des acides gras. ....	75
Figure 23 : Constructions de transgénèse. ....	80
Figure 24 : Le dialogue entre les adipocytes et les macrophages pendant l'obésité et l'insulino-résistance. ....	100

Figure 25 : Rationnel de l'étude et stratégie expérimentale.....	104
Figure 26 : Evaluation de l'insulino-sensibilité des souris haplodéficientes pour la lipase hormono-sensible.....	109
Figure 27 : Challenge nutritionnel : mise à jeun – réalimentation.....	112
Figure 28 : Protocole expérimental de l'étude de l'inflammation du tissu adipeux dans le modèle d'haplodéficienc e pour le gène de la lipase hormono-sensible. ...	113
Figure 29 : Les populations cellulaires de la fraction non adipocytaire (fraction stroma-vasculaire) du tissu adipeux.....	115
Figure 30 : Caractéristiques pondérales des animaux et quantification de la fraction stroma vasculaire de leur tissu adipeux.....	116
Figure 31 : Cellules leucocytaires.....	117
Figure 32 : Cellules non immunitaires de la fraction stroma vasculaire. ....	118
Figure 33 : Challenge adipogénique <i>in vitro</i> . ....	120
Figure 34 : Coupe histologique de tissu adipeux. ....	120
Figure 35 : Exemple de membrane à cytokine « cytokine array ».....	121
Figure 36 : Dosages d'adipokines dans les milieux d'explants et dans les plasmas. .	123
Figure 37 : Mode d'action du BAY, inhibiteur de la lipase hormono-sensible .....	134

## Tableaux

Tableau 1 : Expression tissulaire des différentes protéines découplantes. ....	51
Tableau 2 : Localisation chromosomique des gènes codant pour les principales protéines découplantes chez la Souris, le Rat et l'Homme .....	53
Tableau 3 : Régulation par le froid d'UCP3 (arguments expérimentaux). ....	57
Tableau 4 : Régulation par le jeûne d'UCP3 (arguments expérimentaux). ....	60
Tableau 5 : Caractéristiques biochimiques des fibres musculaires.....	69
Tableau 6 : Membrane à cytokine.....	121



## Liste des abréviations

### -A-

AG	Acide gras
ACBP	Acyl-CoA-binding protein
ACP	Acyl carrier protein
ACSL1	Long chain AcylCoA synthetase
AdPLA	Adipocyte phospholipase A2
ADRP	Adipose differentiation-related protein
AGLC	Acide gras à longue chaîne
AGPAT	Acylglycerol-3-phosphate acyltransferase
AIM	Apoptosis inhibitor of macrophage
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ANP	Atrial natriuretic peptide
ANT	Adenosine nucleotide translocase
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATGL	Adipose triglyceride lipase
ATP	Adénosine triphosphate

### -B-

BMCP1	Brain mitochondrial carrier protein-1
-------	---------------------------------------

### -C-

CAT	Chloramphenicol acetyl transferase
CCL	(C-C) motif ligand
CGI-58	Comparative gene identification 58
CIDE	Cell death-inducing fragmentation factor-alpha-like effector
CMC	Carboxyméthyl cellulose
CoA	Coenzyme A
COPI	Coat protein complex I
CPT	Carnitine palmitoyl transférase
CTACK	Cutaneous T-Cell attracting chemokine

### -D-

DG	Diglycéride, diacylglycérol
DGAT	Diglyceride acetyl transferase
DMSO	Diméthylsulfoxyde

### -E-

ECBM	Endothelial cell basal medium
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay

EP3 Prostaglandin receptor 3  
 ERO Espèces réactives de l'oxygène

**-F-**

FABP Fatty acid binding protein  
 FACS Flux analysis cell sorting  
 FADH2 Flavine adénine dinucléotide, forme réduite  
 FAS Fatty acid synthase  
 FAT/CD36 Fatty acid transporter  
 fsp27 Fat-specific 27

**-G-**

G0S2 G0/G1 switch gene 2  
 G-6-P Glucose-6-phosphate  
 Gi Protéine G inhibitrice  
 GC Guanosyl cyclase  
 GIR Glucose infusion rate  
 GL Gouttelette lipidique  
 GMPc Guanosyl monophosphate cyclique  
 GPAT Glycerol-3-phosphate acyltransferase  
 Gs Protéine G stimulatrice  
 GSK Glaxo Smith Kline  
 GTT Glucose tolerance test

**-H-**

HDL High density lipoprotein  
 HNE hydroxynonéal  
 HPG Hepatic glucose production  
 hUCP3 UCP3 humain

**-I-**

IDL Intermediary density lipoprotein  
 IFN Interferon gamma  
 IGF Insulin growth factor  
 IKK $\beta$  Ikappa B kinase  
 IL Interleukine  
 IRS Insulin receptor substrate  
 ITT Insulin tolerance test

**-J-**

JNK Jun N-terminal kinase

**-K-**

kDa	Kilo dalton
KO	Knock out
KRBHA	Krebs Ringer BSA HEPES Albumine

**-L-**

LBP	Lipid binding protein
LDL	Low density lipoprotein
LHS	Lipase hormono-sensible
LPA	Lysophosphatidic acid
LPS	Lipopolysaccharide

**-M-**

MAC	Macrophage 1 antigen
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1
MGAT	Monglycerol acyltransferase
MGL1	Macrophage galactose-type C-type lectin 1
MIP	Macrophage inflammatory protein
MR	Mannose receptor
mUCP3	UCP3 murin
MyoD	Myogenic determination factor

**-N-**

NAD <sup>+</sup>	Nicotinamide adénine dinucléotide, forme oxydée
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide, forme réduite
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme oxydée
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme réduite
NFκB	Nuclear factor-kappa B
NPY	Neuropeptide Y

**-O-**

OXPAT	Oxidative tissue-enriched PAT protein
-------	---------------------------------------

**-P-**

P	Phosphate
PAP	Phosphatidate phopho hydrolase
PAT	Perilipin, ADRP, TIP47
PEPCK	Phosphoenol pyruvate carboxykinase
PGC1	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator
PI3K	Phosphoinositide-3-kinase
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C

PKG Protéine kinase G  
 PPAR Peroxisome proliferator-activated receptor  
 PPRE Peroxisome proliferator-activated receptor responsive element

**-R-**

RCPG Récepteur couplé aux protéines G  
 RT PCR Reverse transcription polymerase chain reaction  
 RXR Retinoid X receptor

**-S-**

SC Sous-cutané  
 SNARE Soluble NSF Attachment Protein Receptors  
 SNC Système nerveux central  
 SREBP Sterol regulatory element binding protein  
 SVF Stroma vascular fraction

**-T-**

T3 Hormone thyroïdienne  
 TA Tissu adipeux  
 TAB Tissu adipeux brun  
 TG Triglycérides, triacylglycérol  
 TIMP Tissue inhibitor metalloproteinase  
 TIP47 Tail-interacting protein of 47 kDa  
 TNF Tumor necrosis factor  
 TRE Thyroid hormon responsive element

**-U-**

UCP Uncoupling protein

**-V-**

VLDL Very low density lipoprotein

**-W-**

WT Wild type

## PREAMBULE : METABOLISME DES ACIDES GRAS

Ce travail de thèse regroupe deux projets indépendants. Le premier axe de ce manuscrit est consacré à l'étude de la régulation de l'expression de la protéine découplante UCP3. Les protéines découplantes (UCP, pour *uncoupling protein*) sont des protéines mitochondriales impliquées dans la thermogénèse adaptative, la gestion de la lipotoxicité cellulaire, la limitation de production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou même l'immunité. En particulier, UCP3, exprimée majoritairement dans les muscles squelettiques pourrait être impliquée dans la prise en charge des acides gras (AG) intracellulaires. Ces derniers régulent en outre son expression. Le deuxième axe de ce travail s'oriente sur l'étude des conséquences d'une inhibition *in vivo* de la lipase hormono-sensible (LHS) sur la réponse périphérique à l'insuline et sur l'inflammation du tissu adipeux (TA). Une inhibition prolongée de la lipolyse affecte entre autre les concentrations ou les flux d'AG.

Ces deux axes de recherche s'articulent donc autour d'un point commun : le métabolisme des AG. Il me semblait de ce fait intéressant d'en rappeler les principales composantes. *Les données de ce préambule sont en partie extraites de l'ouvrage « La Biochimie de Lubert Stryer » (Stryer, 1992).*

### I- Présentation des acides gras et leurs différentes formes

Les AG appartiennent à la famille des lipides, molécules organiques insolubles dans l'eau, qui représentent des constituants essentiels de l'organisme. Les AG ont trois rôles physiologiques principaux. Ils présentent tout d'abord un **rôle structural**. Ils entrent dans la composition des membranes cellulaires. Deuxièmement, les dérivés d'AG sont les précurseurs d'hormones intervenant dans la **communication inter et intra cellulaire**. Enfin, les AG jouent le rôle de molécules de **stockage d'énergie** sous forme de triacylglycérol (TG).

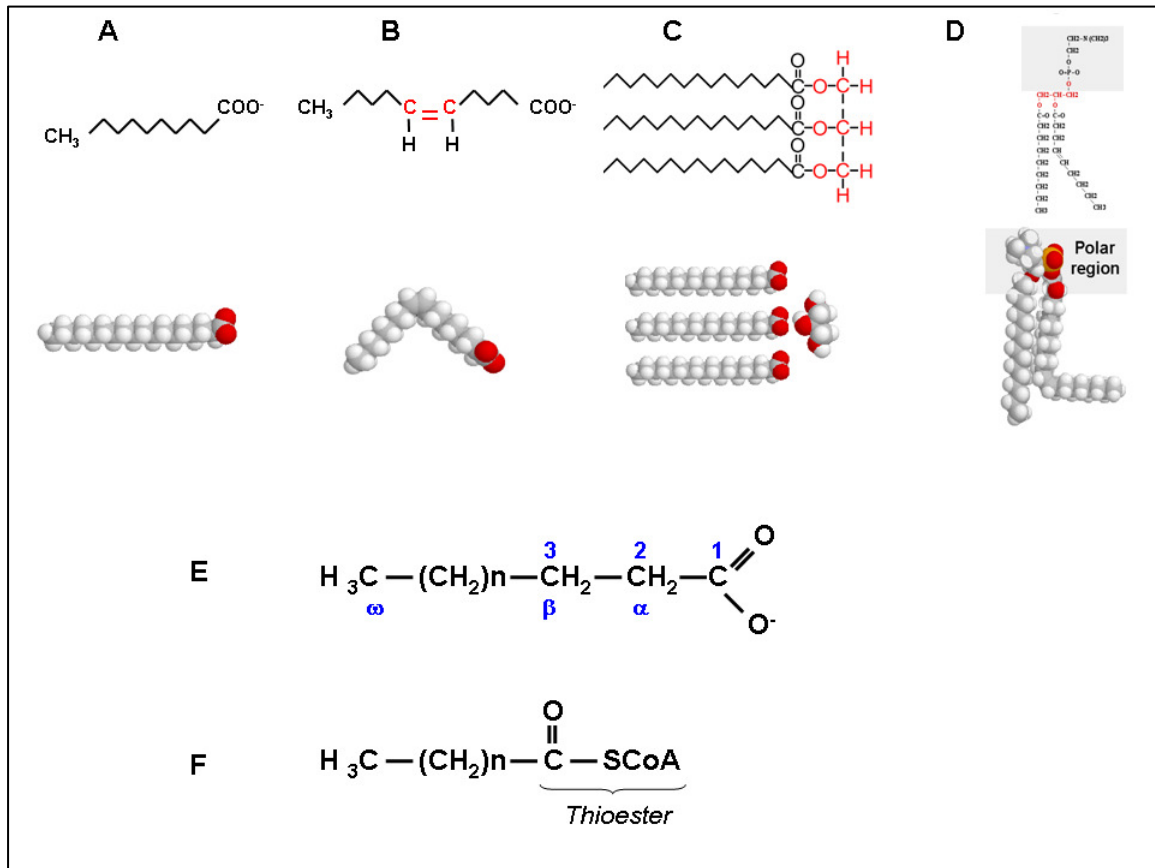
Les AG se présentent sous plusieurs formes. La forme la plus simple est dite **non estérifiée** ou **forme libre**. L'AG est composé d'un groupement terminal acide carboxylique (-COOH) et d'une chaîne aliphatique hydrophobe ionisée au pH physiologique (-COO<sup>-</sup>), dont la longueur varie de 4 à 30 atomes de carbone (Figure 1A). La chaîne carbonée, principalement à nombre pair de carbones, est rarement ramifiée, elle peut être saturée ou présenter une ou plusieurs doubles liaisons (Figure 1B). Les doubles liaisons sont principalement en configuration *cis*,

mais elles peuvent exister sous forme *trans*. Dans les AG polyinsaturés, les doubles liaisons sont en position malonique les unes par rapport aux autres. La longueur et le degré d'insaturation de la chaîne carbonée déterminent les propriétés physiques des AG et des lipides qui en dérivent. Les AG portent un nom usuel et un nom en rapport à leur structure (nombre de carbones, nombre de doubles liaisons). La Figure 1E présente la numérotation des atomes de carbone. Les atomes de carbone 2 et 3 sont souvent appelés respectivement  $\alpha$  et  $\beta$ . Le carbone du méthyle situé à l'extrémité distale de la chaîne est appelé carbone  $\omega$ . La nomenclature des AG insaturés se base sur la numérotation de la double liaison à partir du carbone  $\omega$ .

Les AG peuvent également se présenter sous forme **estérifiée**. Les TG sont des triples esters d'AG 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 TG est la gouttelette lipidique (GL), localisée principalement dans le cytoplasme des adipocytes. Les AG se présentent également sous forme estérifiée dans les hétérolipides de type glycérophospholipides ou sphingolipides (Figure 1D).

Les AG 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 mitochondriale située dans la membrane externe. Cette forme est absolument indispensable à l'utilisation métabolique des AG ( $\beta$ -oxydation mitochondriale, réactions d'estérification...).

Enfin, les AG peuvent être **peroxydés**. Les lipides des organismes vivants sont particulièrement sensibles à l'oxydation, principalement les AG polyinsaturés dans les membranes cellulaires et les LDL circulants. Les ERO (dont le radical  $\text{OH}^\bullet$  est le plus réactif) peuvent directement initier la peroxydation lipidique. De nombreux produits sont alors générés: diènes conjugués, peroxydes, aldéhydes, alcanes, dont la plupart sont cytotoxiques, athérogènes et mutagènes, comme par exemple le 4-hydroxy-2,3-trans-nonéanal (4HNE) impliqué dans l'activation des protéines découplantes (cf. infra).



**Figure 1 : Les différentes formes des acides gras.**

A, Acide gras saturé. B, Acide gras insaturé. C, Triacylglycérol. D, Phospholipide. (Au dessus, structures chimiques ; au dessous, représentation en trois dimensions. Les atomes d'oxygène, d'hydrogène et de carbone sont respectivement en rouge, blanc et gris.) E, structure et nomenclature d'un acide gras saturé. F, Formation d'un thioester de Coenzyme A. *D'après [www.cyberlipid.org](http://www.cyberlipid.org)*

## II- Synthèse des acides gras

Les sites majeurs de la lipogenèse sont le foie, les TAs, l'intestin, et chez les mammifères allaitants, la glande mammaire. La synthèse des AG est entièrement cytosolique alors que leur dégradation est majoritairement intra-mitochondriale.

La biosynthèse des AG répond à deux impératifs au niveau cellulaire : (i) la fourniture des AG nécessaires à la synthèse des lipides de structure et (ii) la mise en réserve de l'énergie.

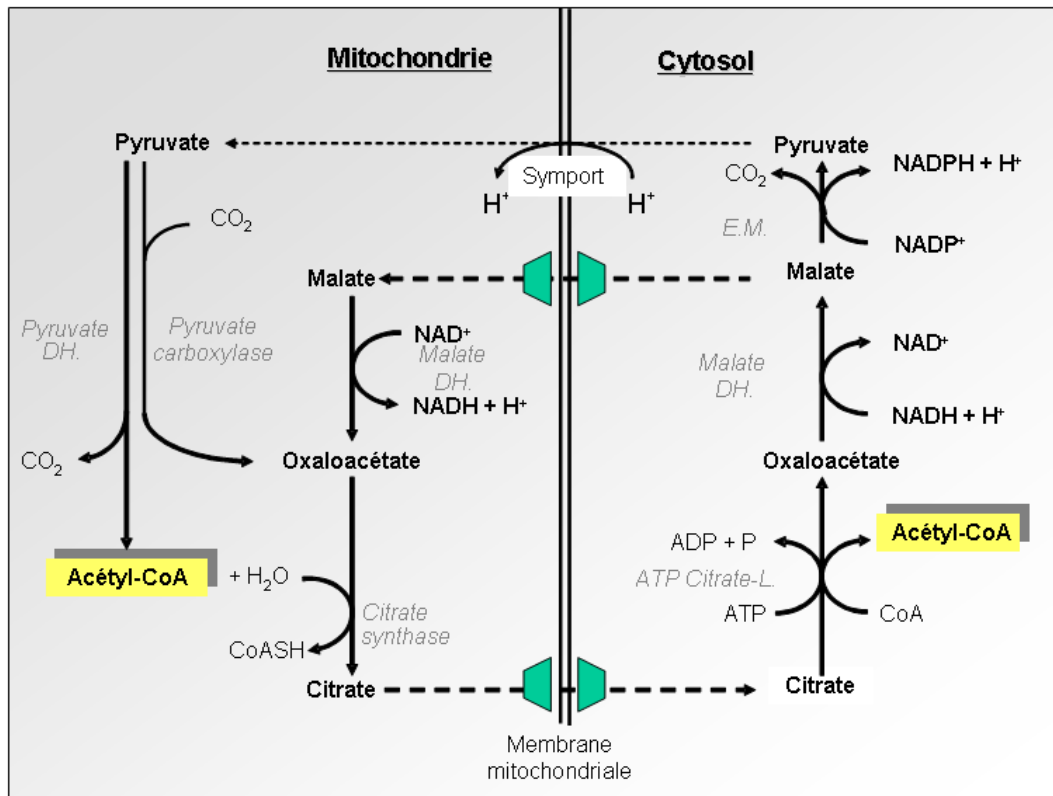
Toute biosynthèse nécessite :

- de l'**énergie** apportée par l'ATP,

- du **pouvoir réducteur**, fourni sous forme de NADPH, H<sup>+</sup>, provenant essentiellement du fonctionnement de la voie des pentoses phosphates,
- un **précurseur**, l'acétylCoA provenant de la dégradation oxydative d'AG, du pyruvate ou d'acides aminés cétoènes.

L'acétylCoA, quelle que soit son origine est formé dans la mitochondrie. Pour servir de précurseur dans le cytosol à la synthèse des AG, il doit être transporté (par l'intermédiaire du citrate) de la matrice mitochondriale vers le cytosol par une **navette citrate / L-malate** (Figure 2). Dans un premier temps, l'acétylCoA est condensé sur l'oxaloacétate par la citrate synthase dans la mitochondrie (première étape du cycle de Krebs). Puis, le citrate 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<sup>+</sup>.





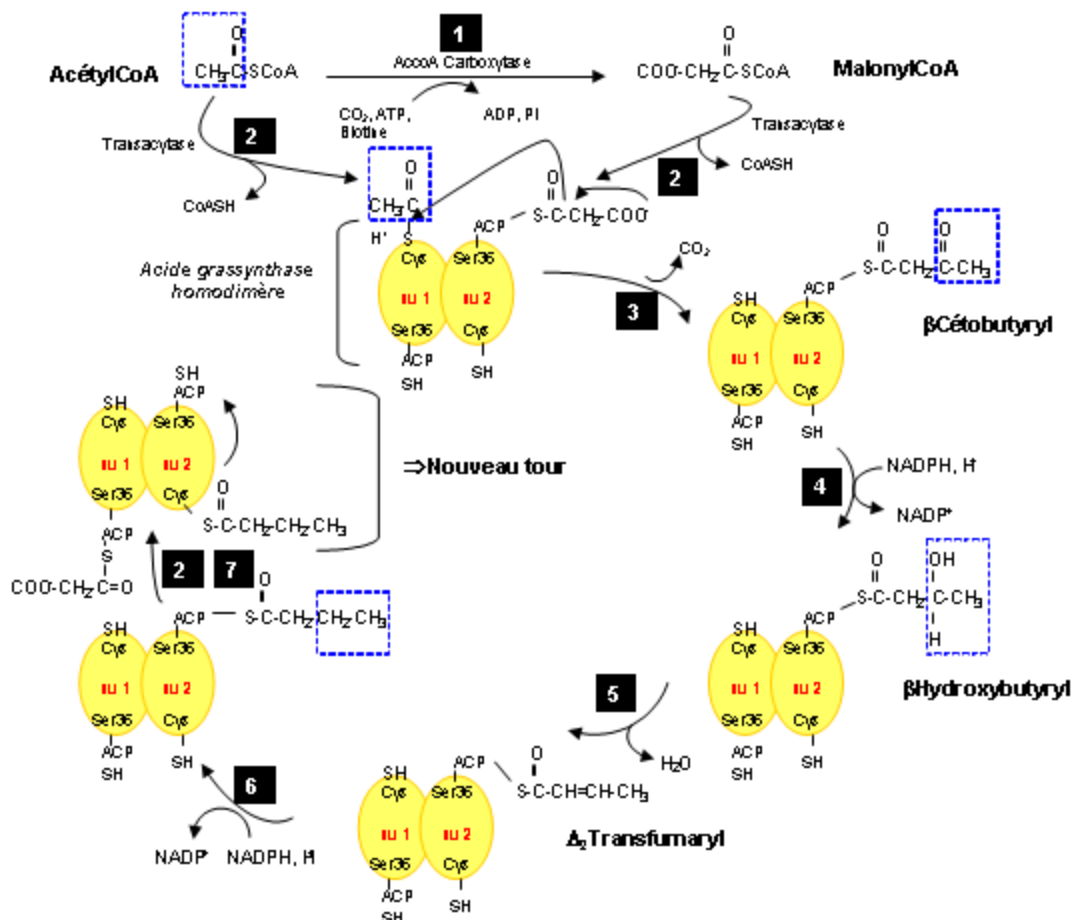
**Figure 2 : Système citrate de transport du groupement acétyl vers le cytosol pour la synthèse des acides gras.**

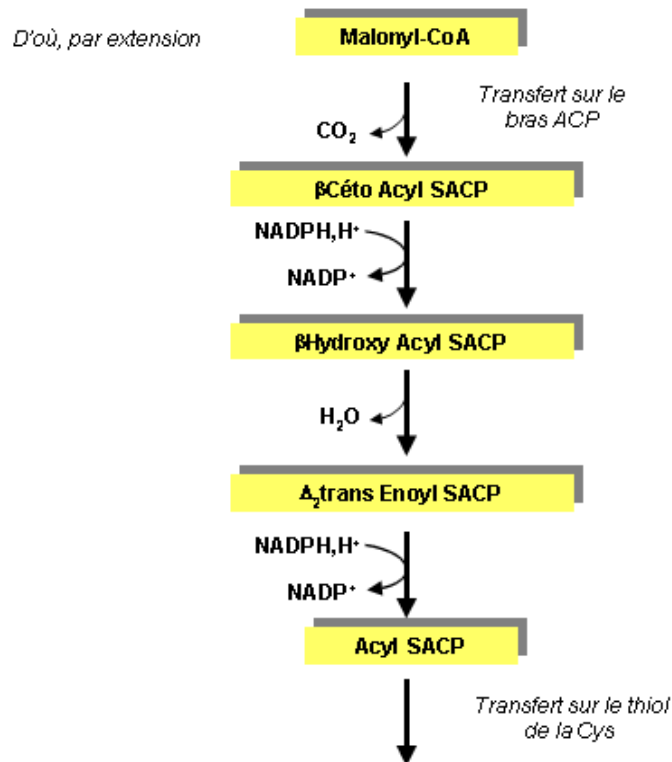
NADH : nicotinamide-adénine-dinucléotide (réduit), NADPH : nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate (réduit), NAD<sup>+</sup> : nicotinamide-adénine-dinucléotide (oxydé), NADP<sup>+</sup> : nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate (oxydé), CoA : coenzyme A, CO<sub>2</sub> : dioxyde de carbone, EM : enzyme malique, H<sub>2</sub>O : eau, H<sup>+</sup> : proton

La synthèse des AG commence par la carboxylation de l'acétylCoA en malonylCoA, catalysée par l'acétylCoA carboxylase, une enzyme à biotine ATP dépendante (Figure 3, haut). Le citrate stimule de manière allostérique cette étape clé de la synthèse des AG. 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. 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 AG 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 de l'autre sous-unité constituée par la phosphopantéthéine reliée à la sérine 36 de la sous unité par une liaison phospho-ester.

La décarboxylation spontanée du malonyl permet sa condensation sur le résidu acétyl et la libération de la cystéine alors que le  $\beta$  cétobutyryl obtenu subit des réductions en  $\beta$  sur le bras ACP qui pivote progressivement autour de la sous-unité. Les intermédiaires successivement obtenus sont le  $\beta$  hydroxybutyrate (réduction de la cétone) puis le fumaryl (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  $\beta$  cétoacyl à six 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  $\beta$  réductions se poursuivent jusqu'à l'obtention du palmityl (C16). La thioestérase 1 sépare l'acide palmitique néoformé du complexe enzymatique de l'acide gras synthétase. Au total, la formation du palmitate a nécessité 7 tours de  $\beta$  réduction sur l'AG synthase donc 7 malonyls (soit 7 ATP) et 14 NADPH. Ces principales étapes sont résumées dans la Figure 3, en bas.





### **Figure 3 : Synthèse des acides gras.**

ACP, *acyl carrier protein*, NADPH,  $\text{H}^+$  : nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate (réduit),  $\text{NADP}^+$  : nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate (oxydé), CoA : coenzyme A.

Les phases d'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. Des systèmes enzymatiques localisés dans les peroxysomes et les mitochondries assurent la formation de doubles liaisons dans les acyl-CoA à longue chaîne. Les mammifères ont perdu les enzymes permettant d'introduire des doubles liaisons aux atomes de carbone au delà de C9 (en partant du  $\text{COOH}$ ) dans une chaîne d'AG. Les AG qu'ils ne sont donc pas capables de synthétiser par voie endogène sont dits essentiels et doivent être apportés par l'alimentation. Ils représentent également des précurseurs des familles d'AG polyinsaturés  $\omega 3$  et  $\omega 6$ .

### III- Devenir des acides gras

#### 1- Transport des acides gras

##### *Transport des acides gras dans l'organisme*

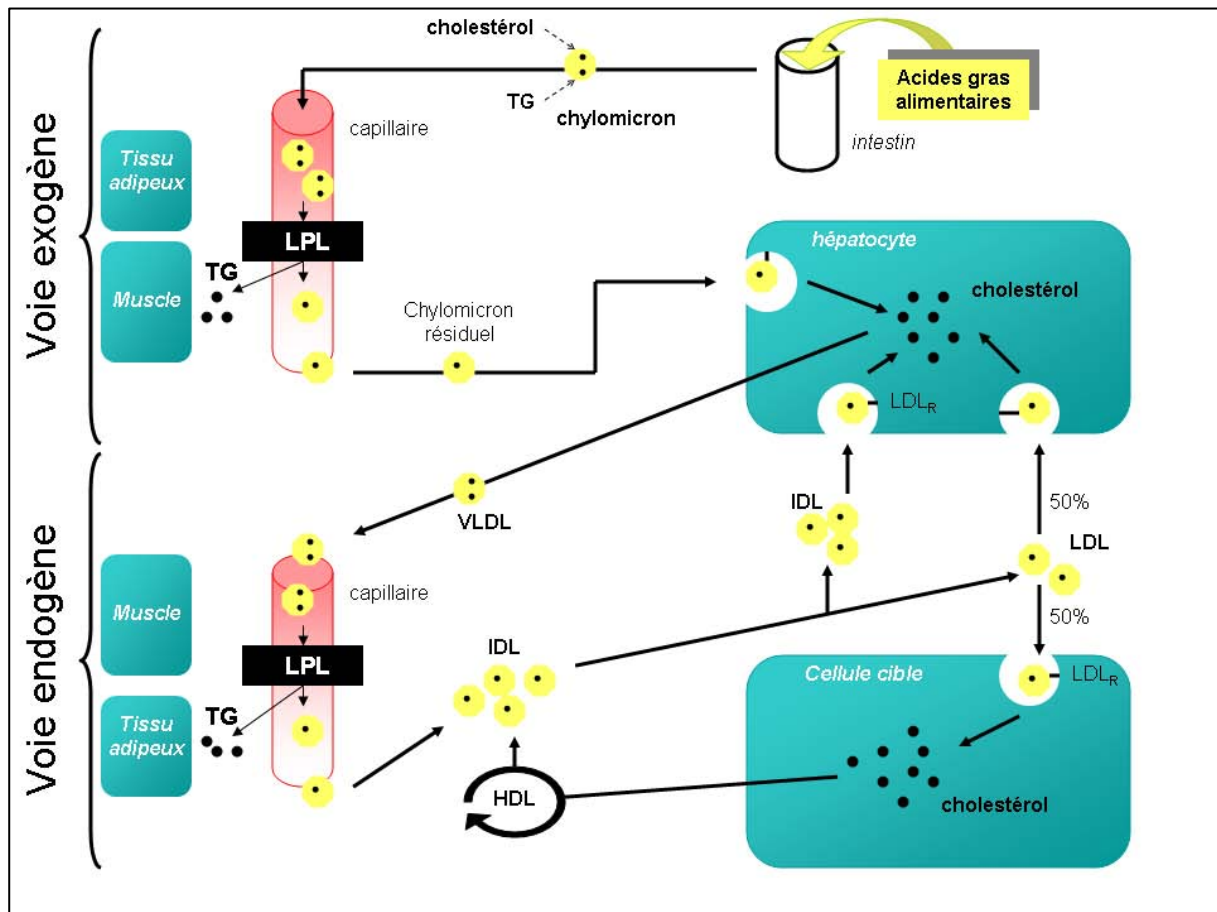
Qu'ils soient néoformés ou d'origine digestive, les AG sous leurs différentes formes sont principalement transportés par les **lipoprotéines** dans le plasma sanguin et la lymphe. De structure globulaire, les lipoprotéines sont constituées d'un cœur hydrophobe contenant essentiellement des TG et des esters de cholestérol, entouré d'une monocouche de lipides plus polaires constituée principalement de phospholipides et de cholestérol libre. Des protéines spécifiques, nommées apoprotéines, à leur surface, assurent la stabilité de la macromolécule et en contrôlent leur 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. Les lipoprotéines majeures sont :

- les **chylomicrons** synthétisés par les entérocytes, riches en lipides (TG) d'origine exogène,
- les **VLDL** (*very low density lipoproteins*) synthétisées dans le foie, riches en lipides (principalement TG) d'origine endogène,
- les **LDL** (*low density lipoproteins*) obtenues dans le sang à partir des VLDL (après passage par le stade intermédiaire d'IDL (*intermediate density lipoprotein*)) ; les LDL transportent le cholestérol vers les tissus périphériques,
- les **HDL** (*high density lipoproteins*) ramenant le cholestérol vers le foie.

Les TG sont donc transportés principalement par les chylomicrons et les VLDL tandis que le cholestérol et les phospholipides sont prépondérants dans les LDL et les HDL.

On appelle **voie exogène**, la voie de transport des AG provenant de l'alimentation et absorbés dans l'intestin, vers le foie. 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 AG et des 2-mono-acylglycérols (Figure 4). Ces micelles sont absorbées par les entérocytes. Dans ces cellules, les AG sont pris en charge par un transporteur spécifique qui les achemine dans le réticulum endoplasmique lisse. Les 2-mono-acylglycérols entrent dans le réticulum endoplasmique par diffusion passive. Les AG sont reestérifiés en TG par les enzymes du réticulum endoplasmique et associés à des apolipoprotéines de type B48 pour former des chylomicrons. Du cholestérol exogène peut également être associé aux

chylomicrons en formation dans les entérocytes. 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 sont prises en charge par la lipoprotéine lipase qui les hydrolyse en AG et 2-mono-acylglycérols. Cette enzyme est activée une apoprotéine (apoCII), les héparines et l'insuline. Les AG (transitoirement liés à l'albumine) et quelques MG pénètrent dans les cellules adjacentes (musculaires ou adipeuses) par diffusion grâce au gradient de concentration entre les deux compartiments ou avec l'aide de protéines spécialisées. Les chylomicrons résiduels (« *remnant chylomicrons* ») sont capturés par le foie.



**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<sub>R</sub> : récepteur au LDL, IDL : *intermediary density lipoprotein*, HDL : *high density lipoprotein*.

La seconde voie de transport des AG est dite **voie endogène** car elle concerne les différentes formes d'AG 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 d'une molécule d'Apo B100 sont sécrétées dans le sang par exocytose (Figure 4). Dans le sang, elles s'enrichissent en esters de cholestérol, en apolipoprotéines C (C2, C3) et en apolipoprotéine E venant des HDL. Dans les capillaires sanguins, les VLDL sont hydrolysées par la lipoprotéine lipase comme les chylomicrons. Les AG ainsi libérés sont destinés au stockage au sein du TA et à la production d'énergie via la  $\beta$ -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 en gagnant des esters de cholestérol. Les LDL se fixent sur des récepteurs spécifiques appelés « récepteurs ubiquitaires des LDL » ou « récepteurs aux Apo B/E ». Elles pénètrent alors dans les cellules par endocytose où a lieu l'hydrolyse des esters de cholestérol et la libération du cholestérol. Ce dernier participe à la structure des membranes cellulaires. La fraction restante est recaptée par le foie.

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

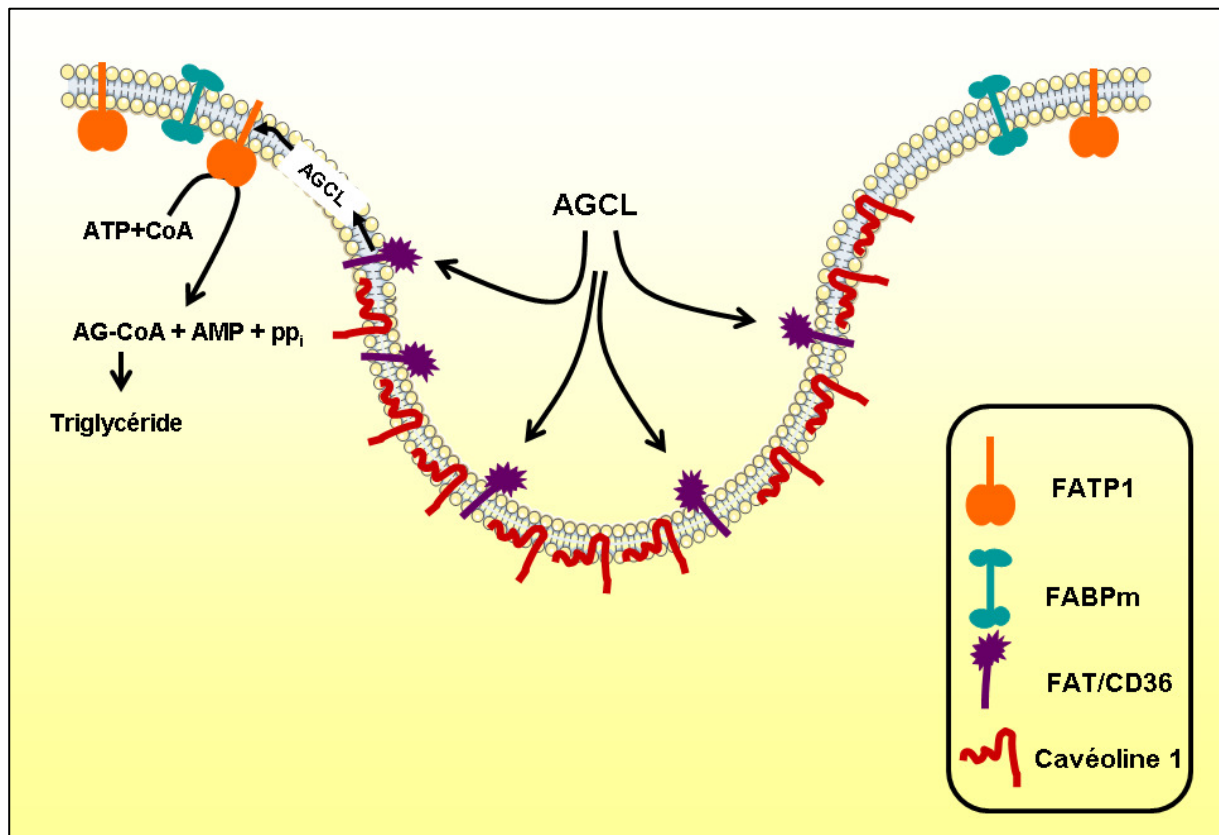
Enfin, les AG qui sont synthétisés par le TA ou libérés suite à la lipolyse, et qui ne sont pas sous forme de lipoprotéines, sont transportés dans le sang liés à l'albumine.

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

Depuis la circulation sanguine, l'entrée des AGLC dans la cellule inclut cinq étapes : 1) la dissociation de l'albumine, 2) la diffusion dans la phase aqueuse externe, 3) l'insertion dans le feuillet externe de la membrane plasmique, 4) la translocation ou le passage par *flip flop* du feuillet externe vers le feuillet membranaire interne, et 5) la dissociation du feuillet interne vers le milieu aqueux interne. L'étape de ce transport la plus controversée est le passage vers le feuillet interne de la membrane plasmique qui pourrait se réaliser soit par un transport passif (*flip-flop*) ou par un mécanisme saturable, dépendant de protéines plus ou moins

associées à des domaines membranaires spécifiques appelés « radeaux lipidiques ». Plusieurs protéines liant les AG seraient impliquées dans ce trafic (Figure 5) :

- une protéine de liaison des AG, FABPm (*plasma membrane-bound fatty acid binding protein*)
- une translocase des acides gras, FAT/CD36 (*fatty acid translocase, FAT*)
- une protéine présente dans des micro-domaines spécifiques, la Cavéoline 1
- une protéine de transport des acides gras : FATP1 (*fatty acid transport protein 1*).



**Figure 5 : Protéines impliquées dans le transport membranaire des acides gras à longue chaîne.**

Au sein des cavéoles, les AGLC peuvent être liés par le transporteur FAT/CD36 et par les cavéolines. En dehors de ces micro-domaines lipidiques spécialisés, FABPm et FATP1 peuvent également lier les AGLC. FATP1 est aussi doué d'une activité AcylCoA synthétase et on parle alors de transport vectorisé, les AG sont en même temps transportés et métabolisés. AGLC : acide gras à longue chaîne, ATP : adénosine triphosphate, CoA : coenzyme A, AG : acide gras, AMP : adénosine monophosphate, PPi : pyrophosphate inorganique, CoA : coenzyme A, FATP1 : *fatty acid transport protein 1*, FABPm : *fatty acid binding protein membrane*, FAT : *fatty acid translocase*.

La récente revue de Thompson et al. discutent l'implication de chacune de ses protéines dans le transport des AG (Thompson et al., 2010).

FABPm est exprimée à la surface des adipocytes mais aussi d'autres cellules comme les hépatocytes, les entérocytes ou les cardiomyocytes. L'implication de FABPm dans le transport des AG a été proposée suite à l'inhibition de l'entrée de l'oléate dans les cellules 3T3-L1 après traitement par des anticorps anti-FABPm et à l'augmentation de l'entrée d'AG dans des cellules surexprimant FABPm. D'autre part, la régulation de son expression dans des situations connues pour moduler les flux d'AG (obésité, exercice...) a renforcé cette hypothèse. Le mécanisme d'action de FABPm n'est à ce jour pas encore connu mais une action conjointe avec la translocase FAT/CD36 a été proposée.

La translocase FAT/CD36 est une glycoprotéine trans-membranaire. FAT/CD36 serait localisée au sein de micro-domaines, mais aussi dans les membranes du réticulum endoplasmique, des vésicules intra-cytoplasmiques et des mitochondries d'où elles pourraient être transloquées vers la membrane plasmique. Des études fonctionnelles chez la souris impliquent cette protéine dans le transport des AG. Les animaux sur-exprimant FAT/CD36 présentent des dépôts adipeux diminués tandis que ceux invalidés pour cette protéine présentent un défaut de l'entrée des AG dans différents tissus, dont le TA. Des travaux *in vitro* viennent confirmer ces observations. Le mécanisme d'action de FAT/CD36 est encore à l'étude. La protéine faciliterait le passage des AGLC à travers la membrane du capillaire sanguin. 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 (Stahl, 2004). Eehalt et al. (Eehalt et al., 2006) 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 FABPm. Par ces liaisons, ces complexes pourraient glisser au sein de radeaux lipidiques où le processus de translocation aurait lieu. Les différents transporteurs opèrent donc en créant un environnement spécial autour de la membrane plasmique, favorable au transport des AGCL.

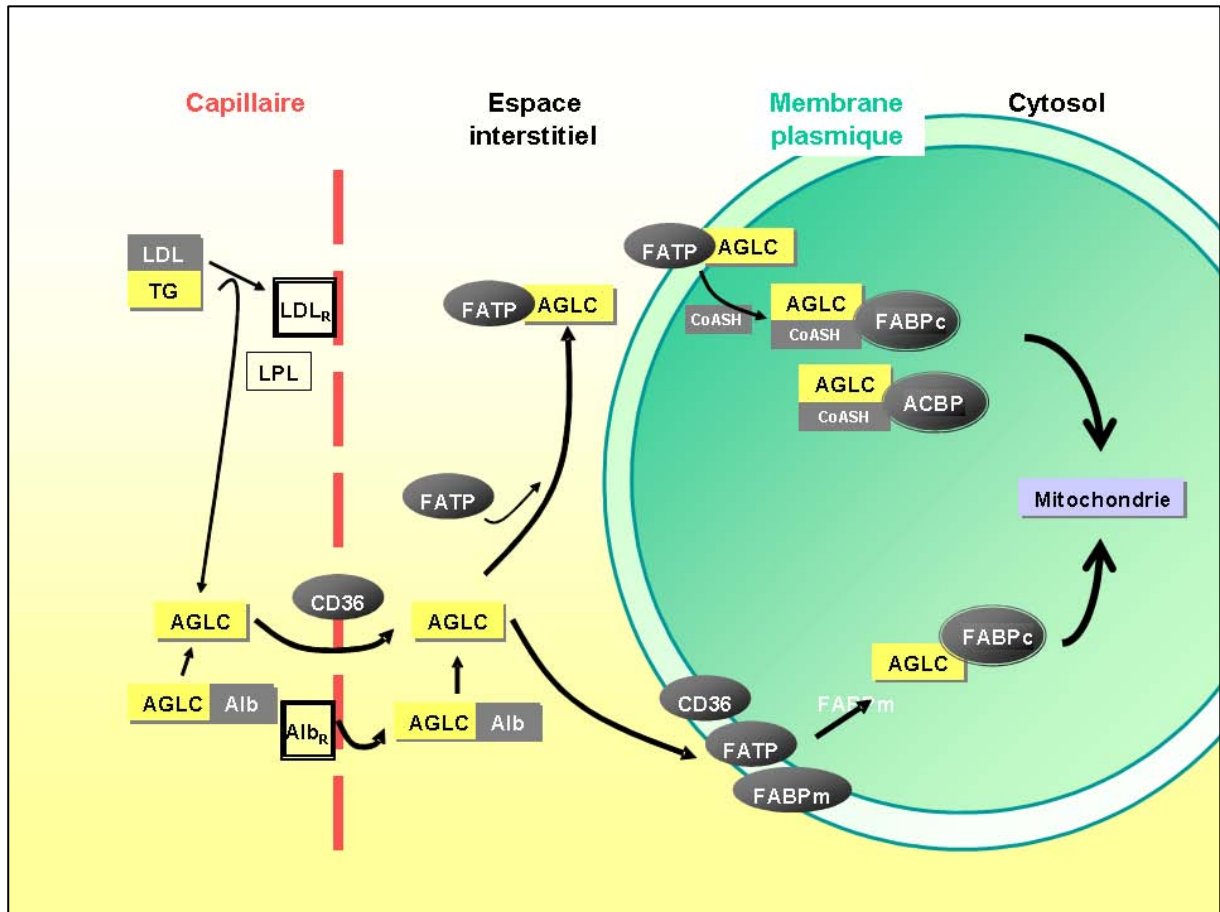
Les cavéoles représentent des micro-domaines membranaires spécialisés formés par l'assemblage de radeaux lipidiques. Les cavéolines sont les protéines structurelles des cavéoles. Deux formes sont exprimées dans l'adipocyte, cavéoline 1 et 2. Les cavéolines ont été impliquées dans les processus de transport cellulaire (notamment pour le cholestérol), de



transcytose et de la transmission du signal. Le rôle des cavéoles dans le transport des AGLC est encore débattu. Différentes observations *in vitro* et *in vivo* sont en faveur d'un tel rôle : 1) la cavéoline 1 peut lier les AGLC, 2) elle peut migrer à la membrane plasmique en présence d'AGLC, 3) sa disparition entraîne une diminution de l'entrée des AGLC et est également associée à une disparition de FAT/CD36 de la membrane. Les cavéolines pourraient jouer un rôle direct dans le transport des AG (par liaison cavéoline/AGLC) ou indirect, en maintenant les lipides dans un environnement favorable à l'action d'autres transporteurs (par exemple FAT/CD36).

FATP1 est une protéine membranaire capable (tout comme l'ACLS) de lier les AGLC et de les activer, sous leur forme acylCoA. FATP1 pourrait être transloquée à la membrane plasmique, dans des domaines distincts des radeaux lipidiques en réponse à l'insuline. Elle extrairait les AGLC du feuillet membranaire externe puis les estérifierait en acylCoA prévenant ainsi leur efflux. Cette hypothèse est appelée « acylation vectorisée » et couple le transport des AGLC à leur métabolisation.

Le transport intracellulaire des AGCL est assuré par FABPc (*cytosolic fatty acid binding protein*) et ACBP (*cytoplasmic acyl-CoA binding protein*) (Figure 6). Ces protéines empêchent les AG 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 (Bezair et al., 2006). 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 6 : Transport cellulaire des acides gras.**

AGCL : acide gras à longue chaîne, VLDL : very low density lipoprotein, TG : triglycérides, LPL : lipoprotéine lipase, Alb : albumine, Alb<sub>R</sub> : récepteur de l'albumine, CD36 : transporteur d'acides gras CD36, 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 (Kiens, 2006).

## 2- Stockage adipocytaire des acides gras

### *Synthèse des triglycérides*

Les TG représentent la forme de stockage des AG. La biosynthèse des TG a lieu au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique. Chez les eucaryotes, les TG sont synthétisés selon deux voies majeures, la voie du glycérol-3P et la voie du monoacylglycérol (MG), résumées dans la figure 7 (adaptée de (Large et al., 2004)). Ils sont fabriqués dans les cellules adipeuses mais également dans les hépatocytes et les entérocytes.

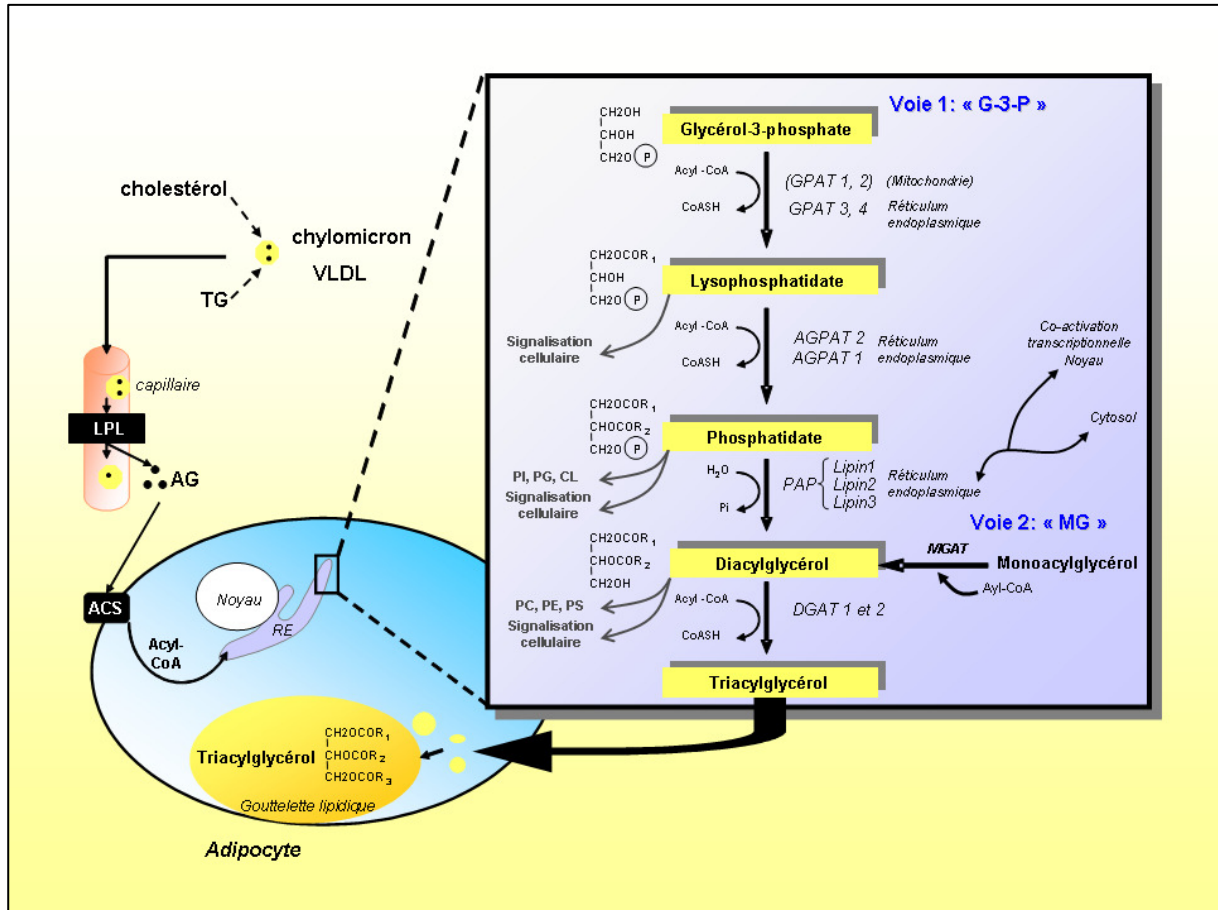
Dans le foie, le glycérol est phosphorylé en glycérol-3-phosphate (glycérol-3P) par la glycérol-kinase. En revanche, les adipocytes humains et murins n'expriment quasiment pas cette enzyme ; le glycérol-3P provient alors seulement de la réduction de la phosphodihydroxyacétone obtenue pendant la glycolyse anaérobie et de la glycéronéogenèse (production de glycérol-3P à partir de substrats gluconogéniques comme le pyruvate) (Reshef et al., 2003). La proportion de glycérol-3P produit par la glycolyse et par la glycéronéogenèse varie avec le statut nutritionnel.

Les AG destinés au stockage proviennent des chylomicrons et des VLDL hydrolysés par la lipoprotéine lipase endothéliale. Dans le cytoplasme, les AG sont activés en acyl-CoA par les acyl-coenzyme A synthétases (ou par la protéine de transport FATP1, pour les AGLC).

La voie du glycérol-3P est majoritaire dans la plupart des types cellulaires. Elle consiste en l'estérification successive des deux fonctions alcool du glycérol-3P catalysée par des enzymes distinctes. En revanche, la voie du MG est prédominante dans l'intestin grêle, elle assure la formation des TG à partir des MG dérivés de l'alimentation.

La première étape de la synthèse des TG dans la **voie du glycérol-3P** est l'acylation du glycérol-3P par les enzymes glycérol-3P acyl transférases (GPAT) localisées dans le réticulum endoplasmique (isoformes 3 et 4) ou bien dans la mitochondrie (isoformes 1 et 2), qui conduit à la formation de l'acide lysophosphatidique. Un AG supplémentaire est transféré sur l'acide phosphatidique par la famille des 1-acylglycérol-3-phosphate acyltransférases (AGPAT) pour former de l'acide phosphatidique (ou phosphatidate). L'acide phosphatidique occupe une place charnière dans la synthèse des lipides. Il peut servir de précurseur pour les phospholipides ou des diacylglycérols (DG). La troisième réaction d'estérification nécessite au préalable l'hydrolyse de l'ester phosphate situé en position 3 du glycérol par une famille de phosphatases (Phosphatidate phosphohydrolase, PAP), les lipines, conduisant à la libération de l'alcool primaire : le DG. Il est intéressant de noter que les lipines possèdent en outre une activité transcriptionnelle lorsqu'elles se situent dans le noyau ; elles augmentent l'expression de gènes pro-adipogéniques dans l'adipocyte (Reue and Brindley, 2008) et des gènes de l'oxydation des lipides dans le foie (Finck et al., 2006). Cette troisième étape peut être réversée, par l'action des DG-kinases capables de catalyser la phosphorylation d'un DG pour produire de l'acide phosphatidique. La quatrième étape de synthèse des TG consiste en la réaction du DG avec un troisième acylCoA pour former un TG ; cette réaction est catalysée par des acyl transférases appelées diacylglycérol acyltransférases, DGATs. Chez les rongeurs, 2 isoformes catalysent cette réaction. DGAT2 apparaît jouer un rôle prépondérant dans de multiples tissus puisque sa délétion *in vivo* n'est pas viable (Stone et al., 2004). Cao et al.

affirment que l'acylCoA :monoacylglycérol acyltransférase 3 (MGAT3), dont le gène est exprimé seulement chez les mammifères supérieurs dont l'Homme, possède aussi une activité DGAT (Cao et al., 2007). Elle se différencierait de la DGAT1 par ses propriétés catalytiques et sa localisation sub-cellulaire.



**Figure 7 : 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, G-3-P : Glycérol-3-phosphate, MG : monoacylglycérol, GPAT : glycérol-3-phosphate-acyl-transférase, AGPAT : lysophosphatidate acyltransférase, PAP : (Kim et al., 2009), PI :phosphatidylinositol, PG :phosphatidylglycérol, CL :cardiolipin, DGAT : diacylglycérol-acyl-transférase, PC :phosphatidylcholine, PE :phosphatidylétanolamine, PS :phosphatidylsérine, MGAT : monoacylglycérol-acyl-transférase, R : chaîne aliphatique.

Les enzymes de la voie de synthèse des TG interviennent sous de multiples isoformes, dont les activités enzymatiques sont comparables (Coleman and Lee, 2004; Yen et al., 2008). Trois principales hypothèses ont été proposées pour expliquer cette observation:

- i) la redondance assurerait le processus anabolique. Cependant, le développement de maladies associées à l'absence de certaines isoformes telles que AGPAT2 ou lipin1 remet en doute cette hypothèse.
- ii) les différentes isoformes auraient un profil d'expression spatial et temporel distinct ou une distribution subcellulaire différente. Cependant les profils d'expression tissulaires de la majorité de ces enzymes se superposent.
- iii) chaque enzyme pourrait être spécialisée dans la catalyse d'une combinaison de substrat particulière. Cette hypothèse paraît cependant difficile à étudier.

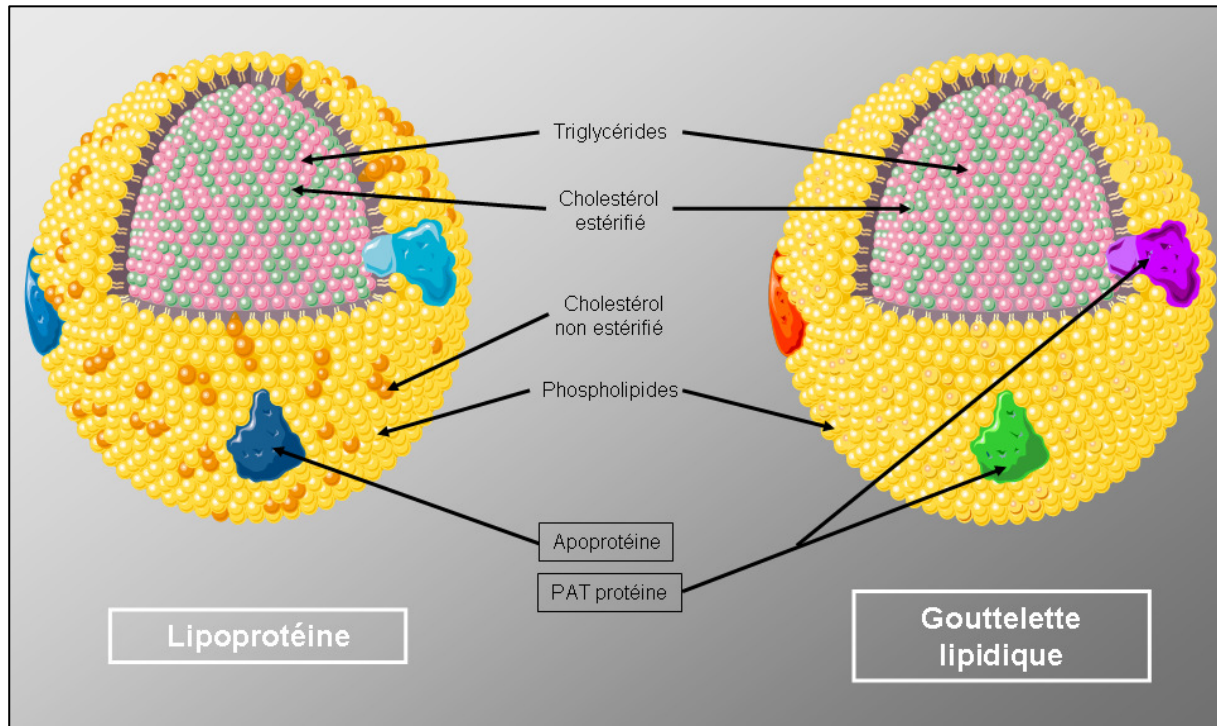
La question de l'intérêt de ces multiples isoformes enzymatiques reste aujourd'hui encore à l'étude.

Les TG formés sont utilisés dans de multiples procédés métaboliques, incluant la synthèse des VLDL dans le foie et des chylomicrons dans l'intestin, la mise en réserve dans les adipocytes ou les cellules épithéliales mammaires.

Le stockage des TG est régulé. En période alimentaire, l'apport en nutriments et l'hyperinsulinémie amplifient les réactions d'estérification par activation des acyls transférases. L'insuline agit au niveau transcriptionnel en induisant l'expression de GPAT1 par l'intermédiaire du facteur de transcription SREBP-1. La régulation peut aussi se faire au niveau de l'activité de la GPAT1 : l'insuline augmente l'activité enzymatique tandis que l'AMPK la diminue. En situation de jeûne, ces réactions sont inhibées.

### ***La gouttelette lipidique (GL)***

Les GL sont des organelles cellulaires spécialisés dans le stockage des lipides neutres (TG, esters de stérols) composés d'une simple couche de phospholipides (phosphatidylcholine et phosphatidyléthanolamine) entourant un cœur de lipides neutres comparable à la structure d'une lipoprotéine (Figure 8). De nombreuses protéines sont réparties à la surface des GL, leur quantité variant en fonction du type cellulaire (dans les cellules hépatiques et intestinales, les TG sont enveloppés d'une véritable couche de protéines).

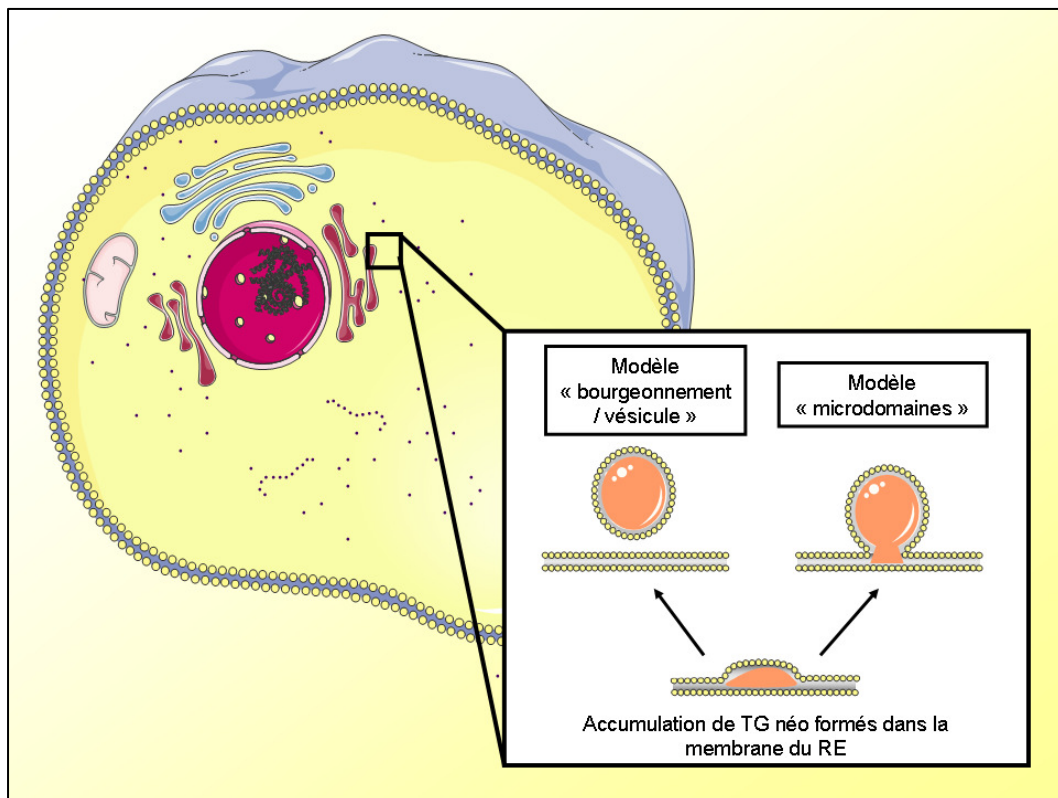


**Figure 8 : Comparaison structurale d'une lipoprotéine et d'une gouttelette lipidique.**

Les protéines majoritairement représentées à la surface des GL des adipocytes sont regroupées sous le nom de « *PAT family* » en référence aux trois premières protéines identifiées : périlipines, adipophiline (aussi connue sous le nom de *adipocyte differentiation-related protein*, ADRP) et *tail-interacting protein of 47 kD* (TIP47). Cette famille compte aujourd'hui de nouveaux membres : S3-12 et *oxidative tissues-enriched PAT protein* (OXPAT). Ces protéines présentent des similarités de séquence et sont localisées à la surface des GL de manière constitutive (périlipines, adipophiline) ou en réponse à des stimuli lipogéniques ou lipolytiques (TIP47, S3-12, OXPAT). La protéine majoritaire est la périlipine; l'adipocyte en exprime deux isoformes, A et B. Les périlipines ont initialement été identifiées comme les protéines adipocytaires phosphorylées par la protéine kinase A. Leur localisation périphérique sur la GL suggérait un rôle de barrière (régulée par les hormones) entre les lipases cytosoliques et le cœur de lipides neutres. Cependant, le rôle des périlipines ne se limite pas à protéger l'accès des lipases à leurs substrats lipidiques ; ces protéines coordonnent aussi le recrutement et l'activation des lipases et de leurs co-lipases. En effet, différentes interactions ont pu être établies entre des lipases, co-lipases et périlipines qui conditionnent le niveau lipolyse. La revue de Ducharme et Bickel résume ces différentes

données (Ducharme and Bickel, 2008). D'autres protéines d'intérêt ont été récemment décrites à la surface des GL. Fsp27, jouerait un rôle similaire à celui des périlipines en tant que « barrière » mais permettrait aussi la stabilisation de la gouttelette mature puisque les animaux déficients en Fsp27 présentent un contenu lipidique multi-loculaire (Nishino et al., 2008; Puri and Czech, 2008; Toh et al., 2008). Le complexe COPI régulerait quant à lui la composition en PAT protéines à la surface de la GL et interagirait avec certaines lipases (Beller et al., 2008).

Le mécanisme de formation des GL est encore incertain. Le modèle actuel retenu propose une formation des gouttelettes à la surface du réticulum endoplasmique, où les enzymes catalysent la synthèse des TG (Figure 9). Les TG néo synthétisés s'accumulent entre les deux feuillets de la membrane du réticulum endoplasmique. S'en suit un bourgeonnement de cette membrane et une vésiculation ou alors, les lipides accumulés restent en contact avec la membrane du réticulum endoplasmique et forment des micro-domaines spécialisés (Farese and Walther, 2009). Cependant, les mécanismes de formation des bourgeons ou des micros-domaines sont encore mal connus.



**Figure 9 : Hypothèse de formation des gouttelettes lipidiques**

TG : triglycéride, RE : réticulum endoplasmique.



Le grossissement des GL requiert l'addition simultanée de lipides polaires à la surface de la GL et de lipides neutres dans le cœur. L'addition de TG pourrait résulter d'une synthèse locale à la surface de la GL ou dans les membranes du réticulum endoplasmique adjacentes à la GL. D'autre part, la croissance de la GL pourrait être assurée par fusion de petites gouttelettes entre elles (médiée par simple coalescence ou par des protéines spécifiques comme SNARE), cependant ce phénomène resterait relativement rare et certaines études le remettent en cause. En effet, Farese et Walther pensent que la présence de certaines protéines à la surface des GL s'opposerait à leur fusion (Farese and Walther, 2009).

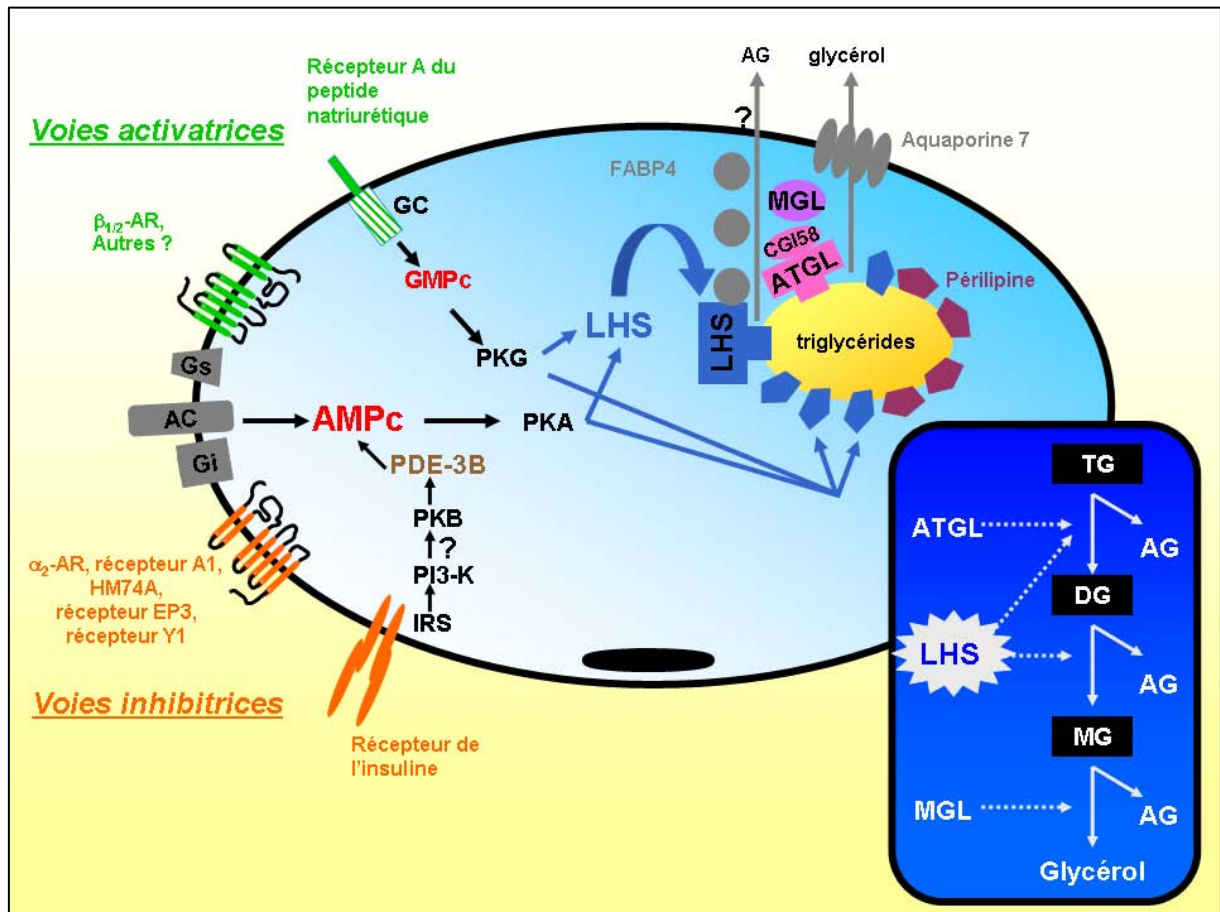
### 3- Lipolyse adipocytaire

La lipolyse adipocytaire représente la mobilisation, par **hydrolyse enzymatique**, des TG stockés au sein de la GL. En effet, si à la suite d'un repas, l'énergie excédentaire est emmagasinée sous forme de TG dans l'adipocyte, en période de jeûne ou lors d'un exercice cette énergie est restituée sous forme d'AG, utilisables par les organes énergétiquement demandeurs. Le TA joue donc un rôle de réservoir d'énergie sollicitable en fonction des besoins de l'organisme. De récentes revues synthétisent les connaissances actuelles sur la lipolyse adipocytaire (Lafontan, 2008; Zechner et al., 2009; Zimmermann et al., 2009).

#### *Les acteurs de la lipolyse*

La lipolyse fait intervenir séquentiellement différentes **lipases** (Figure 10, cartouche). L'*Adipose Triglyceride Lipase* (ATGL) assure l'hydrolyse de la première liaison sur le squelette de glycérol et aboutit à la formation d'un DG et à la libération d'un AG. La LHS hydrolyse essentiellement le DG en MG et libère un second AG. Enfin, la *Monoglyceride Lipase* (MGL) libère une molécule de glycérol et un dernier AG à partir du MG. Au terme de cette cascade enzymatique, si ce processus enzymatique est complet, la lipolyse produit une molécule de glycérol et trois molécules d'AG.





**Figure 10 : Modèle de la lipolyse adipocytaire chez l'Homme**

AR : adrenoceptor, AC : adénylate cyclase, Gs : protéine G stimulatrice, Gi : protéine G inhibitrice, AMPc : adénosine monophosphate cyclique, GC : guanosyl cyclase, GMPc : guanosyl monophosphate cyclique, PKA : protéine kinase A, PKG : protéine kinase G, PDE : phosphodiesterase, PKB : protéine kinase B, PI3-K : phosphoinositide 3 kinase, IRS : *insulin substrate 1*, LHS : lipase hormono-sensible, ATGL : *adipose triglyceride lipase*, MGL : *monoglycerol lipase*, FABP4 : *fatty acid binding protein 4*, CGI-58 : *comparative gene identification 58*, AG : acide gras, TG : triglycéride, DG : diglycéride, MG : monoglycéride.

L'activité des lipases est largement régulée par leur interaction avec i) des co-lipases, ii) des protéines associées à la GL et iii) des protéines cytosoliques. En effet, l'activation de l'ATGL n'est pas, comme celle de la LHS, directement régulée par phosphorylation, mais par son interaction avec *Comparative Gene Identification-58* (CGI-58), un membre de la famille des estérases/lipases. CGI-58 n'a pas d'activité lipase propre mais augmente l'activité de l'ATGL par une interaction protéine/protéine. Les périlipines régulent également de manière indirecte l'activité des lipases, en séquestrant par exemple CGI-58 à la surface de la GL et en réduisant ainsi son accès à l'ATGL. Enfin, certaines protéines comme *Fatty Acid Binding Protein 4*

(FABP4) facilitent la lipolyse en prenant en charge les AG issus de l'hydrolyse des substrats lipidiques.

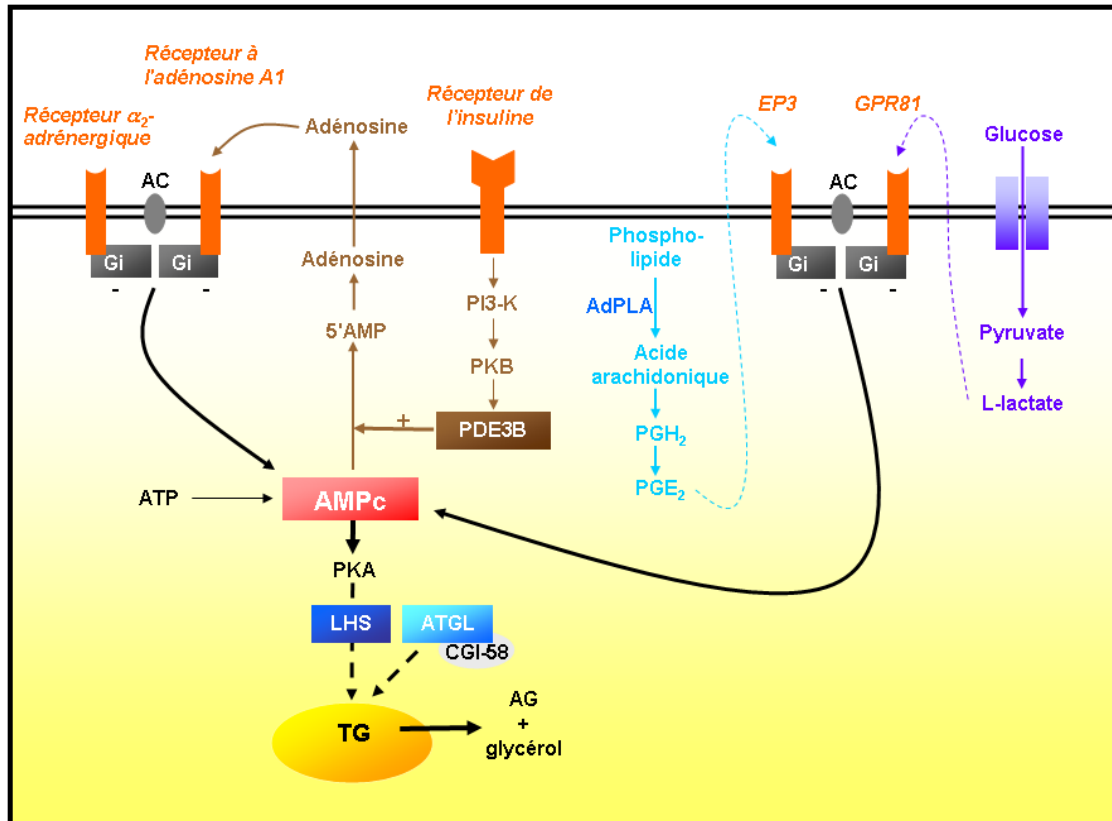
### ***Régulation de la lipolyse***

La figure 10 présente une vue générale de la lipolyse dans l'adipocyte humain. De nombreux agents lipolytiques et anti-lipolytiques contrôlent le catabolisme des TG ; des hormones, des cytokines et des adipokines. Au sein du TA les stimulateurs les plus puissants sont les catécholamines qui agissent sur les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques (Lafontan and Berlan, 1993). Il existe trois sous-types de récepteurs  $\beta$ -adrénergiques ( $\beta$ -ARs):  $\beta_1$ -AR,  $\beta_2$ -AR et  $\beta_3$ -AR ; les adipocytes murins expriment ces trois sous-types alors que dans les adipocytes humains seulement les deux premiers sous-types lient les catécholamines. Cette liaison induit l'activation de l'adénylate cyclase par les protéines  $G_s$  entraînant une augmentation des taux d'AMPc et de l'activité de la PKA (Collins et al., 2004). Une seconde voie stimulatrice, uniquement représentée dans les adipocytes de primates, permet l'activation de la PKG suite à l'augmentation des taux intracellulaires de GMPc en réponse à la liaison du peptide natriurétique atrial (*atrial natriuretic peptide*, ANP) sur son récepteur (Sengenès et al., 2000; Sengenès et al., 2003; Sengenès et al., 2002). PKA et PKG modulent alors directement ou indirectement par phosphorylation l'activité des lipases ainsi que des protéines associées à la GL et conduisent à la dégradation des TG.

Les facteurs anti-lipolytiques agissent *via* les récepteurs couplés aux protéines (RCP) inhibitrices  $G_i$  et regroupent les catécholamines (agissant sur les récepteurs  $\alpha_2$ -AR), l'adénosine (récepteur A1 à l'adénosine), les prostaglandines (récepteur EP3), le NPY (récepteur-1 du NPY), l'acide nicotinique (récepteur HM74A/GPR109A) et le lactate (récepteur GPR81) (Langin, 2006) (Figures 10 et 11). Les adipocytes humains présentent une plus forte expression des récepteurs  $\alpha_2$ -AR que les adipocytes murins. Les inhibiteurs de la lipolyse les plus puissants sont l'insuline et l'*insulin-like growth factor* (IGF); ils agissent par l'intermédiaire du récepteur à l'insuline, phosphorylation des *insulin receptor substrates* (IRS), activation de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) et induction de la protéine kinase B/Akt. Les effets de cette cascade de signalisation sont multiples et la lipolyse est notamment affectée par l'augmentation de la phosphorylation de la phosphodiesterase (PDE) 3B qui entraîne la dégradation de l'AMPc en AMP et ainsi la diminution de l'activité de la PKA. Le GMPc est quant à lui dégradé par la PDE-5A. Si la régulation endocrine de la lipolyse a été largement étudiée, des données récentes soulignent l'importance des régulations auto- et

paracrine de la lipolyse. De nouveaux RCP couplés à  $G_i$  ont été identifiés dans le TA. GPR109A, récepteur de l'acide nicotinique fût le premier caractérisé (Ahmed et al., 2009a). Le  $\beta$ -hydroxybutyrate est également capable d'activer ce récepteur à des concentrations observée durant le jeûne. Le récepteur du L-lactate, GPR81 ressemble au récepteur GPR109A. Amhed et al. ont montré que des concentrations physiologiques de L-lactate étaient capables d'inhiber la lipolyse dans des adipocytes humain et murins (Ahmed et al., 2009b). Le L-lactate et son récepteur GPR81 seraient impliqués dans l'action anti-lipolytique de l'insuline (Ahmed et al., 2010). L'entrée de glucose dans l'adipocyte stimulée par l'insuline aboutit à la formation de L-lactate qui serait capable d'agir de manière autocrine sur son récepteur ayant pour conséquence l'inhibition de l'adénylate cyclase et la chute des taux intracellulaires d'AMPc. L'action de l'insuline *via* le lactate représente une voie supplémentaire à celle de la PDE-3B de contrôle des taux intracellulaires d'AMPc. Enfin, les travaux de Jaworski et al. sur les souris invalidées pour la phospholipase adipocytaire A2 (AdPLA) ont révélé le rôle majeur des prostaglandines dans l'inhibition de la lipolyse faisant intervenir les récepteurs EP3 (Jaworski et al., 2009).

Globalement, la répartition et la proportion des différents récepteurs déterminent donc l'activité ou « tonus » lipolytique de l'adipocyte.

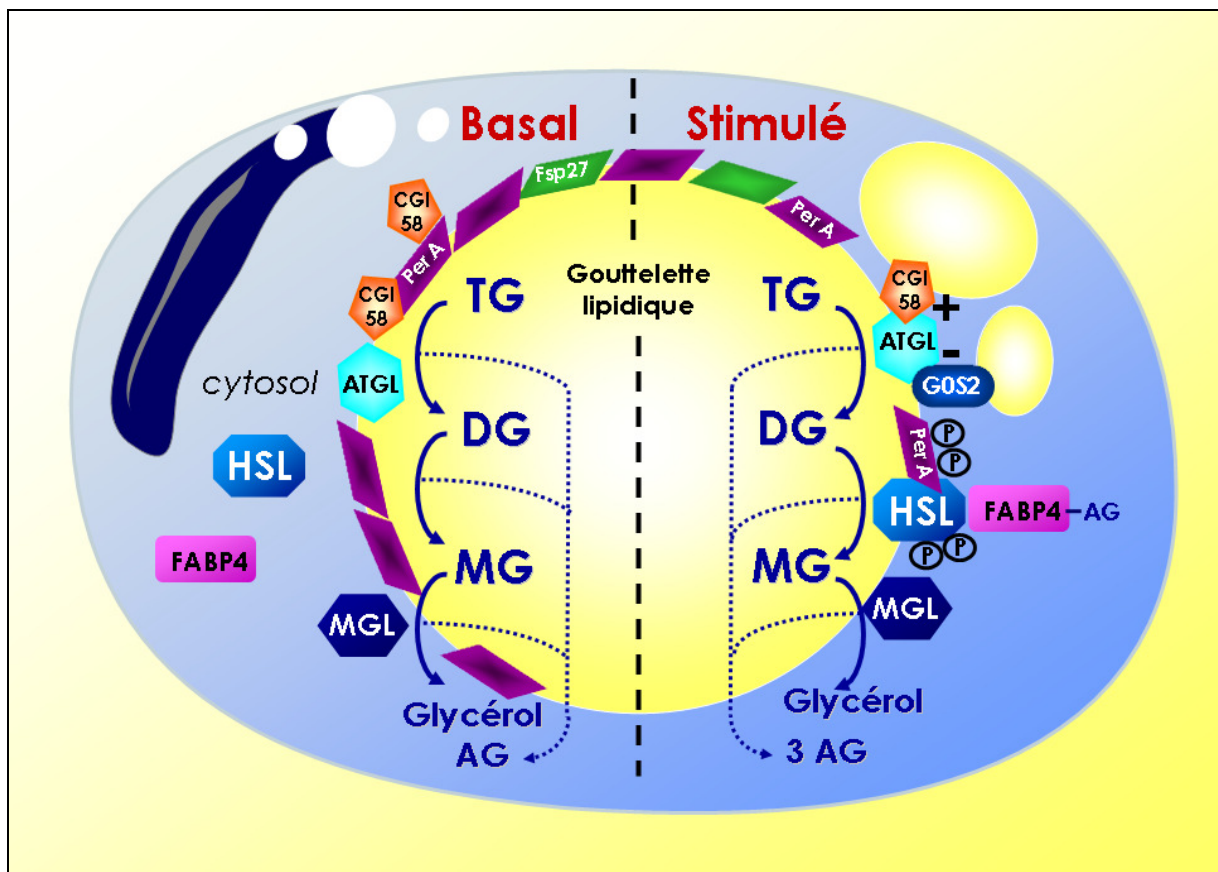


**Figure 11 : Voies antilipolytiques.**

AC : adénylate cyclase, Gi : protéine G inhibitrice, AMPc : adénosine monophosphate, AMPc : adénosine monophosphate cyclique, PKA : protéine kinase A, PDE : phosphodiesterase, PKB : protéine kinase B, PI3-K : phosphoinositide 3 kinase, IRS : *insulin substrate 1*, LHS : lipase hormono-sensible, ATGL : *adipose triglyceride lipase*, MGL : *monoglycerol lipase*, FABP4 : *fatty acid binding protein 4*, CGI-58 : *comparative gene identification 58*, AG : acide gras, TG : triglycéride, AdPLA : *adipose specific phospholipase*, PGH<sub>2</sub> : prostaglandine H<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> : prostaglandine E<sub>2</sub>, EP3 : récepteur aux prostaglandines, GPR81 : récepteur au lactate.

On décrit classiquement deux états d'activité de l'adipocyte : l'état stimulé et l'état basal (Figure 12). L'état stimulé correspond à l'activation des voies lipolytiques par des agents pro-lipolytiques comme les catécholamines ou l'ANP et correspond à une hydrolyse massive des TG. L'état basal représente en revanche une situation plus difficilement perceptible car résultant globalement de freins anti-lipolytiques. Ainsi l'adipocyte est continuellement soumis à des stimuli dont l'intégration déclenche ou pas la lipolyse. Durant ces différentes phases, la localisation des lipases, leur interaction avec leurs co-facteurs ainsi que l'état des protéines associées à la GL varient. La figure 12 schématise ces événements. A l'état basal, l'ATGL se situe à la fois dans le cytosol et à la surface de la GL. Au niveau de la GL, l'ATGL serait activée par CGI-58 qui serait également lié à la périlipine. l'ATGL et CGI-58 participent donc

à la libération basale d'AG et à la formation de DG. La LHS quant à elle est majoritairement cytosolique, bien qu'elle puisse prendre en charge les DG formés à l'issue de l'action de l'ATGL. En **situation de lipolyse stimulée**, suite à la phosphorylation de la PKA, la phosphorylation de la périlipine A conduit à la fragmentation de la GL et à la libération de CGI-58. L'ATGL et CGI-58 forment alors un complexe actif qui catalyse l'hydrolyse des TG. Une fois phosphorylée, la LHS s'associe à FABP4 et est transloquée depuis le cytosol vers la GL où elle hydrolyse les DG issus de l'activité de l'ATGL. La MGL achève l'hydrolyse des MG tandis que FABP4 assure le transport des AG vers la membrane plasmique. Le glycérol est exporté hors de l'adipocyte par des systèmes aquaporines. L'aquaporine est une protéine trans-membranaire formant un canal, et qui également impliquée dans le transport de l'eau. L'expression de l'aquaporine adipocytaire est stimulée au cours du jeûne (Kishida et al., 2000) et réprimée en situation post-prandiale par l'insuline (Kishida et al., 2001).



**Figure 12 : Lipolyses basale et stimulée**

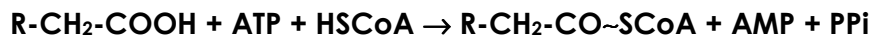
LHS : lipase hormono-sensible, ATGL : *adipose triglyceride lipase*, MGL : *monoglycerol lipase*, FABP4 : *fatty acid binding protein 4*, CGI-58 : *comparative gene identification 58*, Cav-1 : cavéoline 1, PerA : périlipine A, ADRP : *adipose differentiation related protein*, Fsp27 : *fat specific protein of 27 kDa*, AG : acide gras, TG : triglycéride, DG : diglycéride, MG : monoglycéride.

#### 4- Catabolisme des acides gras

L'oxydation des AG a lieu dans la **mitochondrie** et conduit à la formation d'acétyl-CoA et de coenzymes réduits NADH, H<sup>+</sup> et FADH<sub>2</sub>. Le passage des AG dans la mitochondrie est un élément régulateur essentiel :

- ils doivent être préalablement **activés** en acyl-CoA
- les acyl-CoA à longue chaîne (>12C) 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.

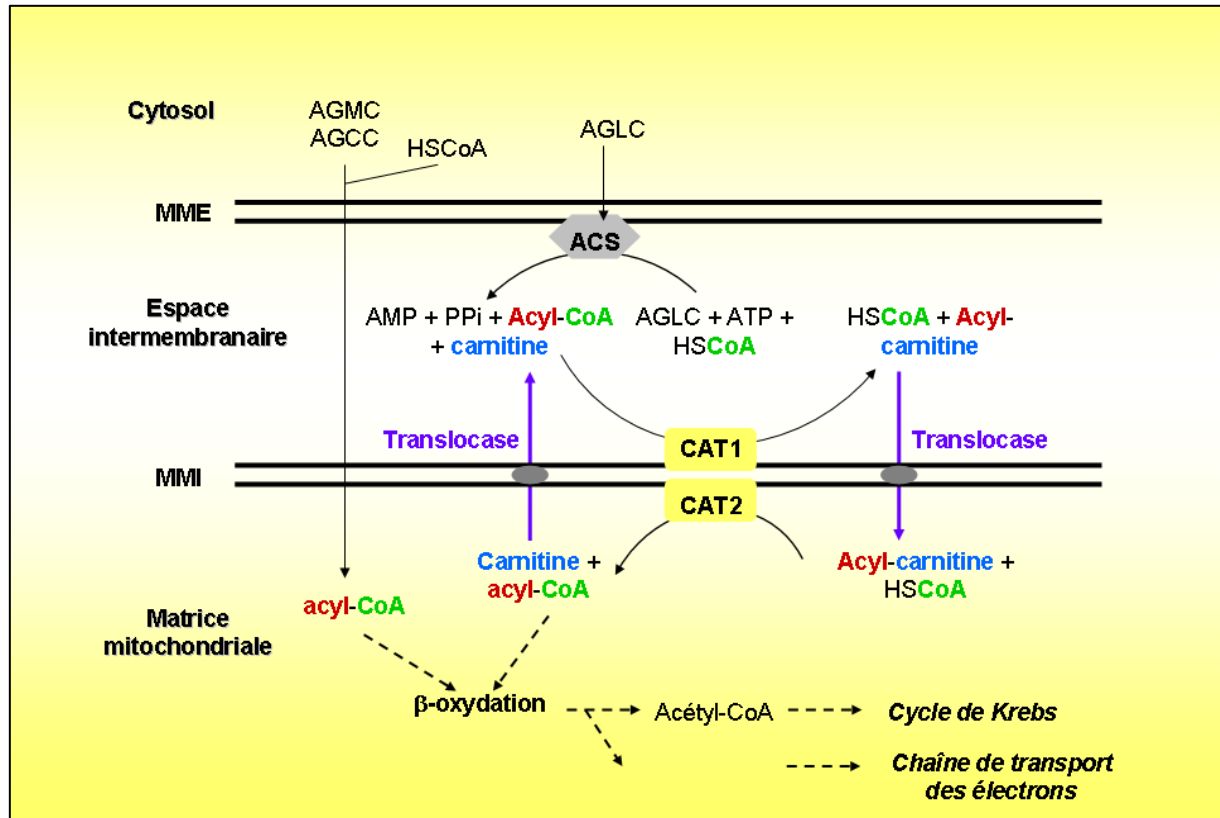
Les AG sont activés par thioestérification avec le Coenzyme A (HSCoA). L'activation est catalysée principalement par l'*acyl-CoA synthétase* selon la réaction est la suivante :



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 AG 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 AGLC (>12C) ne peuvent traverser la membrane mitochondriale interne. Le transport mitochondrial de ces acyl-CoA s'effectue par l'intermédiaire de la carnitine et implique trois enzymes (Figure 13) :

- 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 vers la matrice et transport simultané d'une carnitine libre vers l'espace inter-membranaire.
- la *carnitine-acyl-CoA-transférase 2* (CAT2), localisée sur le feuillet interne de la membrane interne mitochondriale, transfère l'acyl de l'acyl-carnitine sur le coenzyme A de la matrice mitochondriale: **acyl-carnitine + HSCoA → carnitine + acyl-CoA.**



**Figure 13 : 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 : coenzyme A, NADH : nicotinamide-adénine-dinucléotide (réduit), FADH<sub>2</sub> : flavine-adénine-dinucléotide (réduit).

Dans la majorité des cas, l'oxydation des AG se situe sur le carbone  $\beta$  ou carbone 3 de l'AG. La séquence des réactions d'oxydation des AG se déroule en quatre étapes (1 tour), qui raccourcit l'acyl-CoA de deux carbones et libère un acétyl-CoA. Pour un AG à n carbones, (n-1) tours seront donc nécessaires pour son oxydation complète en n acétyl-CoA.

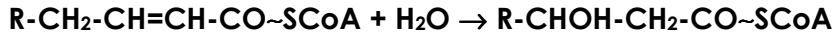
Les quatre étapes sont les suivantes (Figure 14) :

- première **oxydation** d'un acyl-CoA à nC par des *acyl-CoA-déshydrogénases* (flavoprotéines à FAD) produisant un dérivé insaturé, le  $\Delta_2$ trans-énoyl-CoA et un

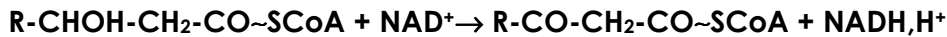
FADH<sub>2</sub> :



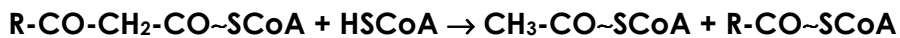
- **hydratation** de la double liaison par l'*énoyl-CoA-hydratase* produisant le  $\beta$ -hydroxy-acyl-CoA :



- deuxième **oxydation** par la  *$\beta$ -hydroxy-acyl-CoA-déshydrogénase* qui produit un  $\beta$ -cétoacyl-CoA et un NADH,H<sup>+</sup> :



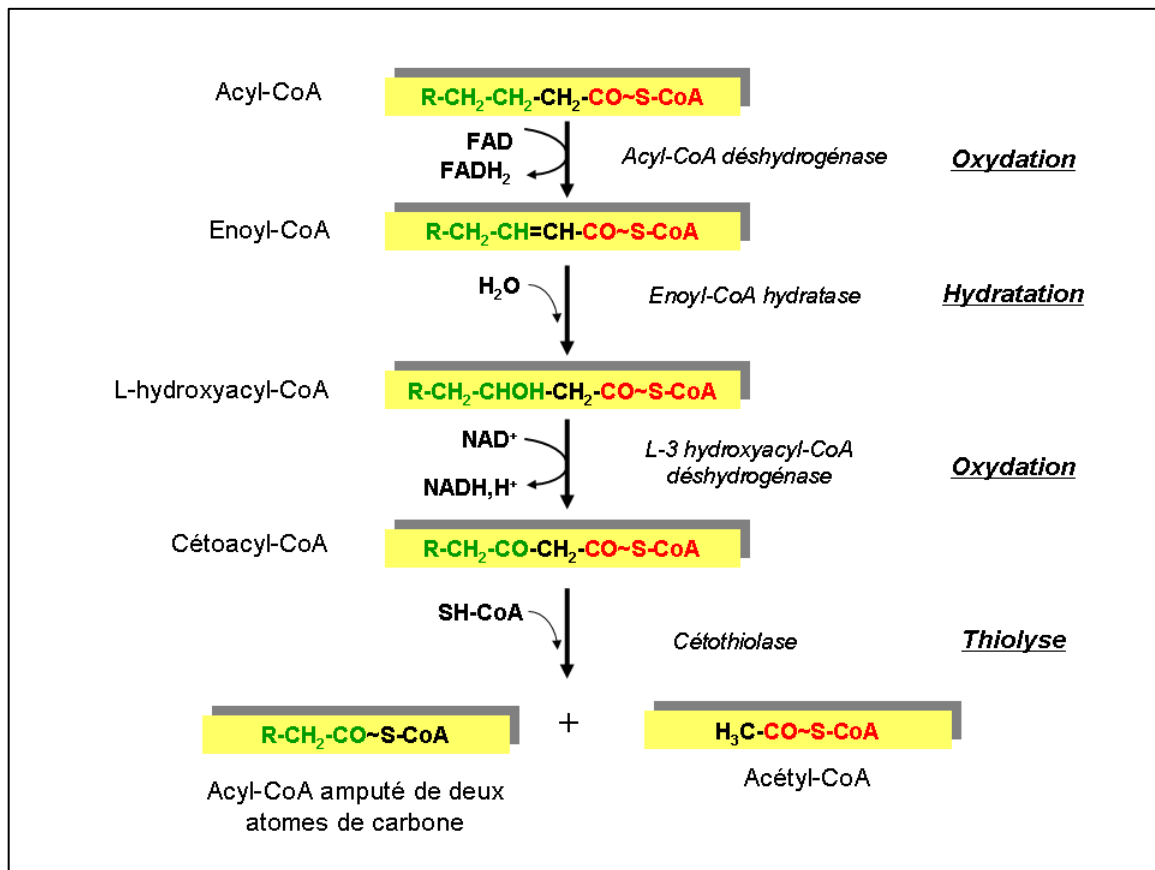
- **clivage** du  $\beta$ -cétoacyl-CoA, après le carbone  $\beta$ , par la *thiolase* qui libère l'acyl-CoA raccourci (n-2) et un acétyl-CoA :



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 FADH<sub>2</sub> et 1 NADH,H<sup>+</sup>. Les acétyl-CoA sont oxydés dans le **cycle de Krebs** et les coenzymes réduites par la **chaîne respiratoire**.

Les rares AG 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 14 : Séquence de réactions de la  $\beta$ -oxydation des acides gras.**

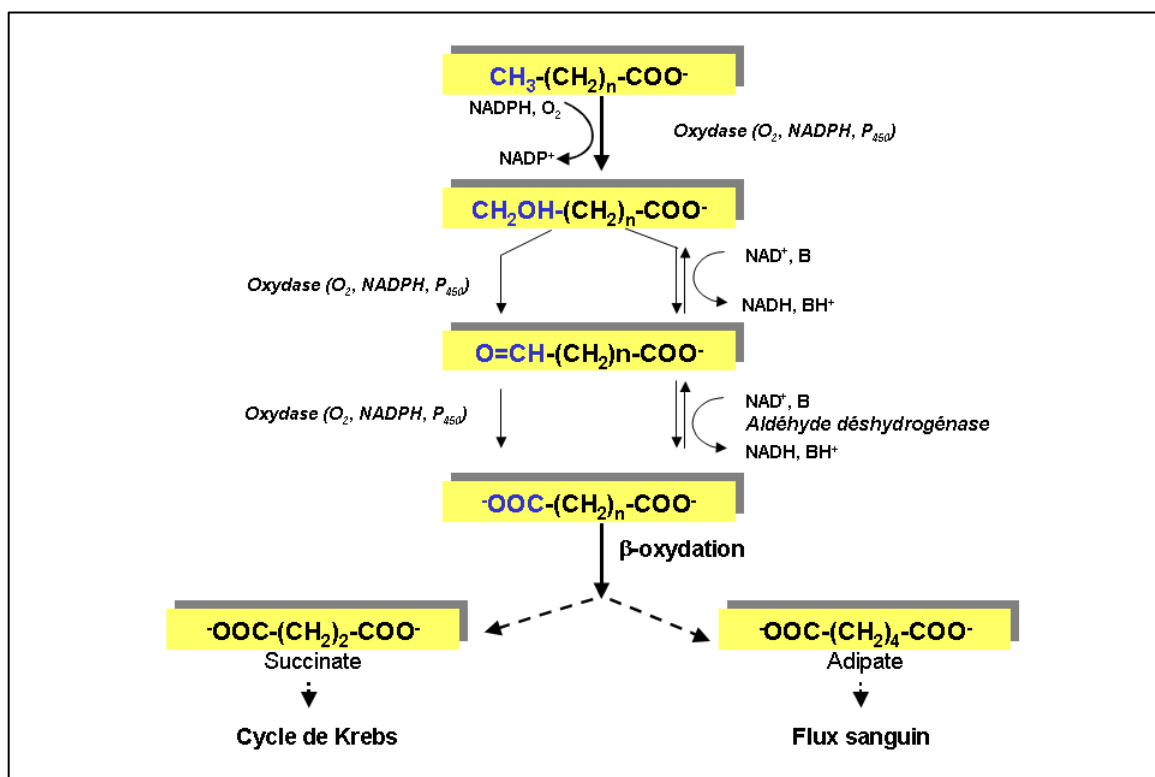
CoA : Coenzyme A, FAD : flavine-adénine-dinucléotide (oxydé), FADH<sub>2</sub> : flavine-adénine-dinucléotide (réduit), H<sub>2</sub>O : eau, NAD<sup>+</sup> : nicotinamide-adénine-dinucléotide (oxydé), NADH,H<sup>+</sup> : nicotinamide-adénine-dinucléotide (réduit)

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

Pour les AG saturés à très longue chaîne (>18C), il existe une oxydation préalable dans les peroxysomes. La  **$\beta$ -oxydation peroxysomale** libère également deux groupes acétyls des AG. Bien que les enzymes impliquées soient différentes de celles de la mitochondrie, les transformations chimiques des AG sont les mêmes. Ces AG raccourcis (12 à 14C) poursuivent alors leur oxydation dans la mitochondrie.

Alors que la voie majeure d'oxydation des AG se situe sur le carbone  $\beta$ , des voies métaboliques mineures telle l' **$\omega$ -oxydation** contribuent également au métabolisme des AG. L' $\omega$ -oxydation a lieu préférentiellement dans le réticulum endoplasmique plutôt que dans la

mitochondrie. Dans l'AG, le carbone  $\omega$  est celui de l'extrémité méthyle. 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 (Figure 15). Si le substrat initial est un AGLC, l'acide carboxylique résultant pourra entrer dans la voie de la  $\beta$ -oxydation pour être raccourci d'un résidu acétylCoA à chaque extrémité en même temps. Quand la  $\beta$ -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.

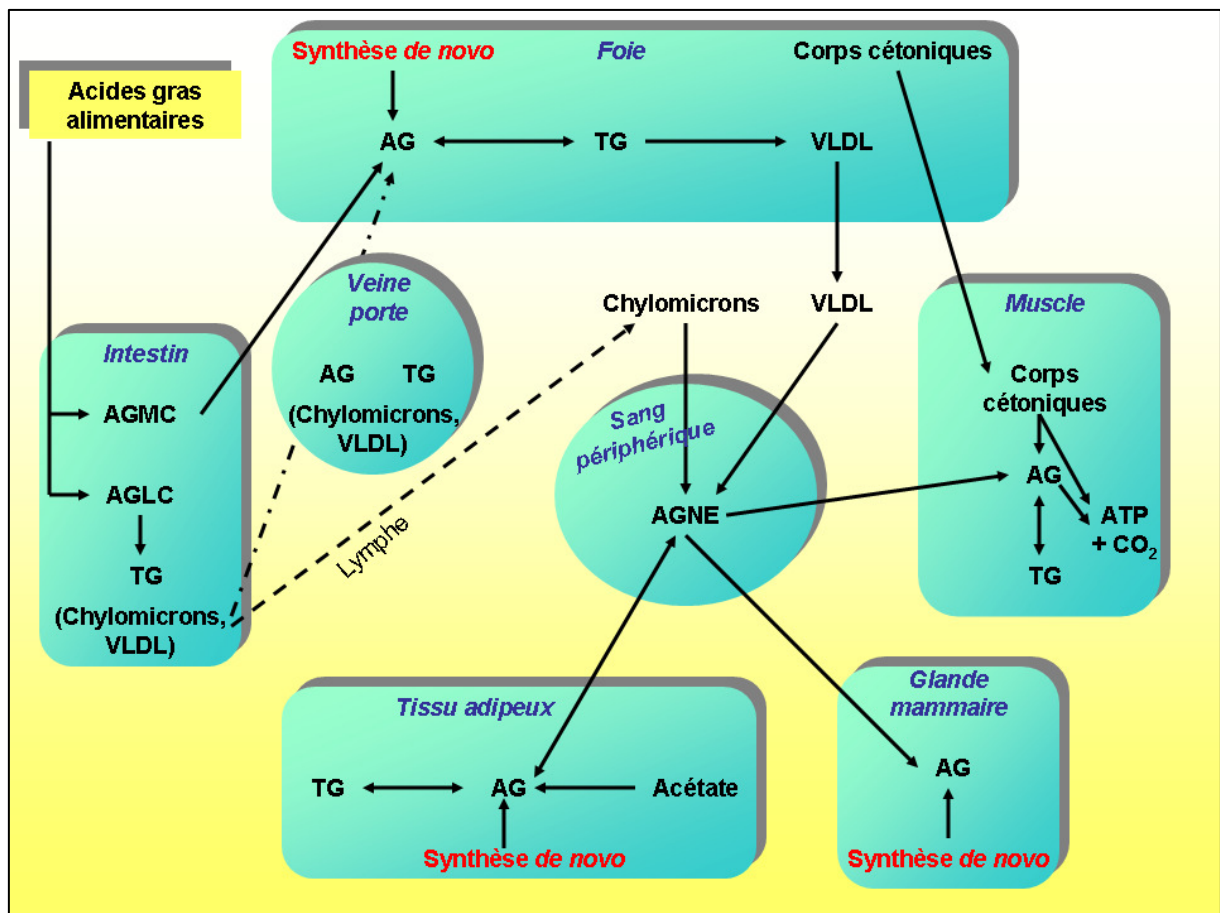


**Figure 15 : Les étapes de l' $\omega$  oxydation.**

NADPH : nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate (réduit), NADP<sup>+</sup> : nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate (oxydé), NAD<sup>+</sup> : nicotinamide-adénine-dinucléotide (oxydé), NADH : nicotinamide-adénine-dinucléotide (réduit). D'après *Biocarta*, [www.biocarta.com](http://www.biocarta.com).

## 5- Lipotoxicité ou la menace des acides gras

L'origine des AG présents dans l'organisme est soit exogène (AG provenant de l'alimentation) soit endogène (synthèse *de novo* dans le foie, le TA et la glande mammaire) (Figure 16). 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. Le TA, 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 ( $\beta$ -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 TA.



**Figure 16 : 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.

En situation physiologique une « communication inter-organes » maintient l'équilibre entre les différentes formes d'AG assurant ainsi l'homéostasie lipidique plasmatique. Cependant, une attention particulière est récemment portée sur les dysfonctions causées par un excès d'AG. En ce sens, les adipocytes peuvent alors être perçus comme des cellules qui protégeraient les autres cellules d'une exposition aux AG. En effet, l'accumulation d'AG intracellulaires suite à un apport nutritionnel excédentaire répété peut détourner ces derniers de la  $\beta$ -oxydation vers la formation de composés lipo-toxiques. La **lipotoxicité** se définit alors comme une accumulation ectopique de lipides dans les cellules non adipeuses, ayant des répercussions fonctionnelles. Les modifications fonctionnelles liées à la lipotoxicité ont deux principales conséquences: l'apoptose ou la perturbation de la voie de signalisation de l'insuline. Ces événements ne sont pas forcément liés et dépendent du type cellulaire dans lequel ils ont lieu.

### 5.1- L'hypothèse initiale de Randle

La conséquence finale de l'insulino-résistance est un défaut d'utilisation du glucose par les tissus cibles de l'insuline. Au niveau moléculaire, deux grands axes sont proposés pour expliquer cette altération fonctionnelle : le premier basé sur une inhibition directe des principales enzymes du métabolisme du glucose et l'autre sur une altération de la voie de signalisation de l'insuline.

L'hypothèse de Randle, définie en 1963, repose sur la notion d'un cycle « glucose-acides gras » selon laquelle ces deux composés entreraient en compétition pour leur oxydation ; une oxydation préférentielle des AG conduirait à un défaut d'utilisation du glucose par inhibition des activités enzymatiques clés de la glycolyse (pyruvate déshydrogénase et phospho-fructokinase) (Randle et al., 1963). Chez l'Homme, ce cycle serait moins important que chez le rongeur et l'observation de l'absence d'accumulation musculaire de glucose-6-phosphate chez le sujet insulino-résistant ne s'accorde pas avec cette hypothèse (Shulman, 2004). Ainsi, la modification de l'activité enzymatique de ces protéines ne suffit pas à expliquer les défauts fonctionnels observés lors d'une présence excessive d'AG et l'altération de la voie de signalisation de l'insuline, en amont de l'activité de ces enzymes, doit être envisagée.

## 5.2- Quelles sont les espèces moléculaires à l'origine de la lipotoxicité ?

En situation d'abondance nutritionnelle prolongée, les AG peuvent s'accumuler sous forme de TG non seulement dans le TA mais également dans des cellules non adipeuses comme, le myocyte, l'hépatocyte, la cellule  $\beta$ -pancréatique ou le cardiomyocyte. On observe alors des dysfonctions métaboliques associées à cette accumulation de lipides ; mais quelles sont les espèces moléculaires à l'origine de la lipotoxicité ?

### *Les triglycérides*

Les AG estérifiés sous forme de TG ne semblent pas représenter un danger pour la cellule, cependant, les mécanismes de formation et de mobilisation des TG peuvent produire des AG et des intermédiaires lipidiques ayant des effets délétères. Nous avons défini précédemment la notion de transport vectoriel des AG, qui couple leur entrée à leur métabolisation. Une entrée d'AG trop importante peut mener à une incorporation de ces derniers dans des voies métaboliques différentes et aboutir à la formation de composés lipotoxiques si les capacités d'activation des AG (nécessaire à la métabolisation en TG) sont dépassées.

### *Les acyl-CoA*

Les acyl-CoA sont des intermédiaires de la synthèse des TG dont le caractère amphipathique a suggéré un rôle délétère en tant que détergent. Cependant, cette caractéristique ne semble plus mise en cause aujourd'hui. Dans la cellule musculaire, la corrélation entre le contenu en acyl-CoA et l'insulino-résistance est plus forte qu'avec celui des TG (Ellis et al., 2000). Ces composés pourraient influencer la voie de signalisation de l'insuline en inhibant l'hexokinase et par là même diminueraient alors l'entrée de glucose (Hoy et al., 2009). Le rôle des acyl-CoA dans le foie ou le pancréas semble moins clair ; l'implication de ces composés dans l'insulino-résistance apparaît donc tissu-spécifique, dépendante des capacités de chaque tissu à les métaboliser en composés à potentiel lipotoxique moindre (Li et al.). D'autre part, les acyl-CoA sont des précurseurs de céramides et de DG.

### *Les céramides*

Les céramides sont des sphingolipides formés dans le réticulum endoplasmique par estérification d'une sphingosine et d'un AG (Bartke and Hannun, 2009). Les manipulations *in vivo* et *in vitro* des enzymes contrôlant la synthèse ou la dégradation des sphingolipides (sérine

palmitoyl transférase, dihydrocéramide désaturase, glucosylcéramide synthase, sphingomyélinases) ont permis de dégager plusieurs mécanismes moléculaires à l'origine de l'insulino-résistance (Holland and Summers, 2008). Les conséquences fonctionnelles d'une accumulation de céramides sont présentées dans la récente revue de Chavez (Chavez and Summers, 2010). Les céramides sont capables de déclencher l'apoptose par le recrutement à la membrane mitochondriale de protéines pro-apoptotiques telles que Bax. Ils sont également responsables de l'augmentation de la perméabilité de la membrane mitochondriale et de l'augmentation de la production d'ERO. D'autre part, les céramides perturbent la voie de signalisation de l'insuline. Ils inhibent l'activation de la protéine kinase B/Akt nécessaire à la translocation du transporteur de glucose GLUT4. L'entrée de glucose dans la cellule s'en trouve réduite. Enfin, les céramides sont capables d'activer de multiples voies de signalisation pro-inflammatoires (JNK, IKK/NFκB, mTOR, PKCθ) qui à leur tour perturbent la voie de signalisation de l'insuline. Cependant, certains dérivés des céramides, les glucosylcéramides, pourraient présenter un potentiel toxique supérieur. Ces composés pourraient interférer dans la liaison de l'insuline sur son récepteur ou même perturber les étapes initiales de sa voie de signalisation.

### ***Les diacylglycérols***

Les DG sont des intermédiaires de la synthèse *de novo* des TG et de la lipolyse qui présentent aussi un rôle dans la signalisation intra-cellulaire ; ces derniers sont également suspectés de présenter un fort potentiel lipotoxique. L'accumulation de DG a été corrélée de nombreuses fois avec l'insulino-résistance. Ces composés seraient capables d'activer différentes isoformes de la PKC aboutissant à la phosphorylation de l'*insulin receptor substrate 1* (IRS1) sur un résidu sérine ayant pour conséquence son incapacité à recruter et à activer la *phosphaatidyl inositol-3-phosphate* (PI3K) (Samuel et al., 2007; Yu et al., 2002). La translocation du transporteur de glucose GLUT4 à la surface de la membrane plasmique est diminuée, limitant ainsi l'entrée de glucose. Le degré d'insaturation des AG du DG pourrait influencer le potentiel lipotoxique (Wakelam, 1998).

### ***Les acides gras non estérifiés***

L'accumulation d'AG non estérifiés dans la cellule résultent de la lipolyse intracellulaire ou d'une incapacité à les activer pour les diriger vers le stockage ou l'oxydation mitochondriale. Parmi eux, le palmitate présente un fort potentiel lipotoxique car il ne constitue pas un

substrat préférentiel pour les DGAT, enzymes catalysant la dernière étape de la synthèse des TG (Coleman and Bell, 1976). La métabolisation du palmitate aboutit alors plutôt à la production de céramides ou de DG dont nous venons d'évaluer les potentiels lipotoxiques. D'autre part, le palmitate favoriserait la formation de précurseurs de la cardiolipine et l'engagement de la cellule dans la voie apoptotique (Li et al.). Les AG non estérifiés sont également capables d'activer des récepteurs impliqués dans l'apoptose (Malhi and Gores, 2008). D'autre part, la peroxydation des AG polyinsaturés favorise la production mitochondriale d'ERO et le stress du réticulum endoplasmique. Les ERO sont capables de promouvoir la synthèse des céramides. Les effets transcriptionnels des AG non estérifiés peuvent également perturber le fonctionnement métabolique de la cellule. Ils peuvent moduler la synthèse de nombreux gènes *via* leur effet sur les *peroxisome proliferator-activated receptors* (PPAR) et le *sterol regulatory element binding protein* (SREBP-1). La régulation de la transcription de SREBP participe aussi à l'altération de la voie de signalisation de l'insuline en réprimant la transcription d'IRS2 dans le foie et le pancréas (Shimano, 2009). Par leurs effets transcriptionnels, les AG pourraient aussi activer l'expression d'enzymes gluconéogéniques et diminuer celle d'enzymes de la glycolyse, contribuant à l'insulino-résistance (Olefsky and Saltiel, 2000).

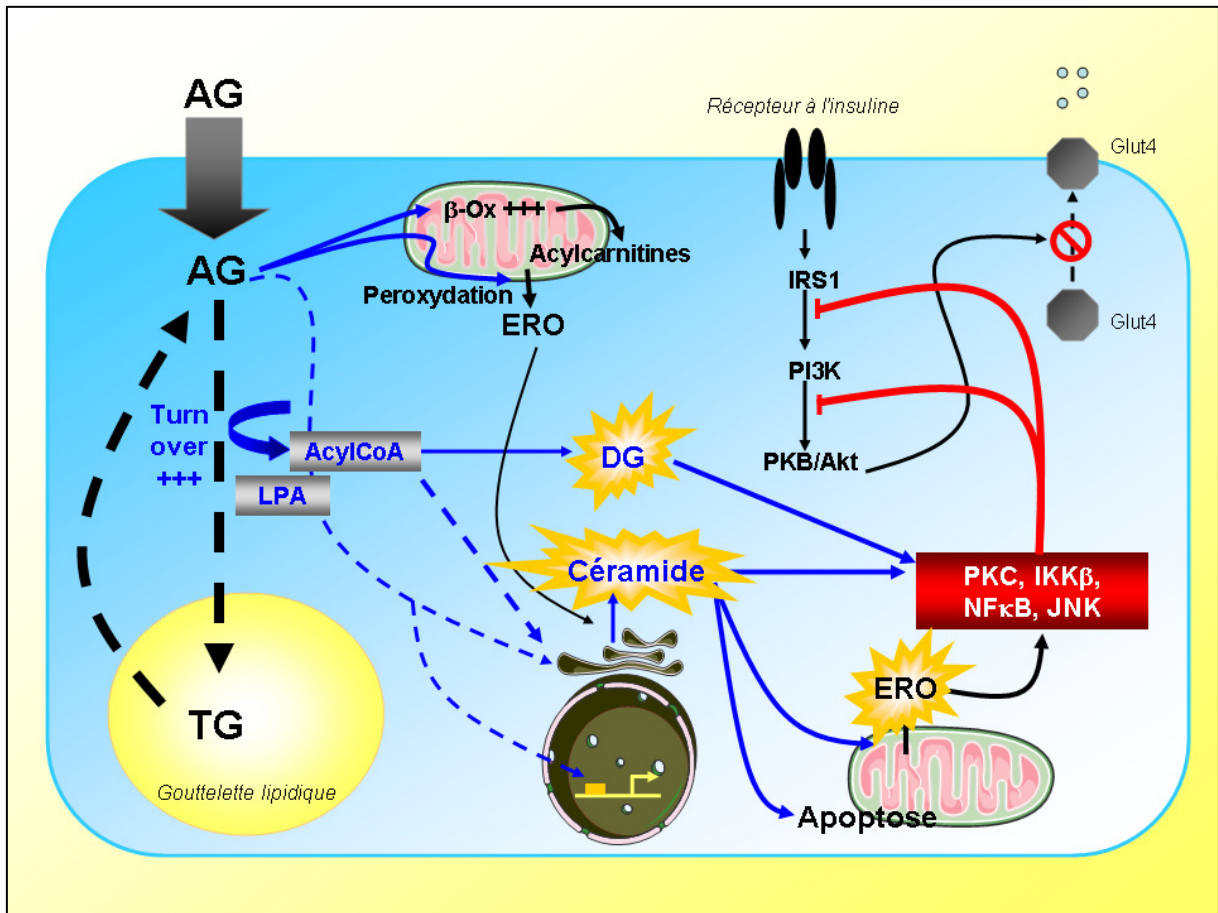
### ***Les acylcarnitines***

Depuis de nombreuses années, les relations entre l'accumulation de TG intra-cellulaires (notamment dans la cellule musculaire) et l'insulino-sensibilité ont été étudiées. Plusieurs études chez l'Homme et le rongeur mettent en évidence une corrélation inverse entre ces deux paramètres. Cependant, le « paradoxe de l'athlète », décrivant une augmentation des stocks intramusculaires de TG associée à une insulino-sensibilité améliorée remet en cause les observations précédemment décrites et suggère que l'accumulation de TG en elle-même ne suffit pas à altérer le métabolisme cellulaire. L'augmentation des capacités oxydatives des cellules musculaires de l'athlète pourrait être impliquée dans ce phénotype. En corrolaire, l'insulino-résistance pourrait être expliquée par la théorie de la dysfonction mitochondriale qui prédit qu'une entrée et une oxydation insuffisante des AG aboutirait à leur utilisation comme substrat pour générer des dérivés lipidiques toxiques. Cette hypothèse est encore largement débattue aujourd'hui mais D. Muoio propose que la lipotoxicité résulte plus d'un excès d'oxydation que d'un défaut (Muoio, 2010). Ainsi lorsque le flux entrant de carbone dans la  $\beta$ -oxydation surpasse l'utilisation de l'acétylCoA (produit final de la  $\beta$ -oxydation) par

le cycle de Krebs, l'oxydation des AG peut être incomplète et mener à la formation d'acyl-carnitines. Différents travaux ont montré une association entre l'intolérance au glucose et des niveaux élevés d'oxydation incomplète (Koves et al., 2005; Koves et al., 2008; Muoio, 2010). Les mécanismes moléculaires initiés par l'accumulation d'acyl-carnitines à l'origine de l'insulino-résistance sont encore à l'étude. Il a été observé d'autre part, que des niveaux élevés d'oxydation pouvaient également perturber la gestion mitochondriale des pools de carnitine libre aboutissant à un défaut de l'oxydation et de l'action de l'insuline (Noland et al., 2009). Ils pourraient également favoriser la formation d'ERO, capables de moduler la voie de signalisation de l'insuline par activation de différentes kinases (JNK, IKK $\beta$ , PKC) (Bloch-Damti and Bashan, 2005; Schrauwen and Hesselink, 2004a).

En conclusion, il apparaît que les entités lipidiques et les mécanismes moléculaires mis en jeu soient multiples et redondants (Figure 17). La prévention de la lipotoxicité pourrait passer par la diminution de l'influx d'AG, l'augmentation de stockage sous une forme non toxique (TG) et l'augmentation du catabolisme des acyl-CoA.





**Figure 17 : Lipotoxicité : facteurs et mécanismes moléculaires.**

AG : acides gras, TG : triglycérides, LPA : acide lysophosphatidique, CoA : coenzyme A, ERO : espèces réactives de l'oxygène,  $\beta$ -ox :  $\beta$ -oxydation, DG : diglycéride, IRS1 : *insulin substrate 1*, PI3K : *phosphoinositide-3-kinase*, PKB : protéine kinase B, PKC : protéine kinase C, IKK $\beta$  : *Ikkappa B kinase*, NF $\kappa$ B : *nuclear factor-kappa B*, JNK : *Jun N-terminal kinase*.



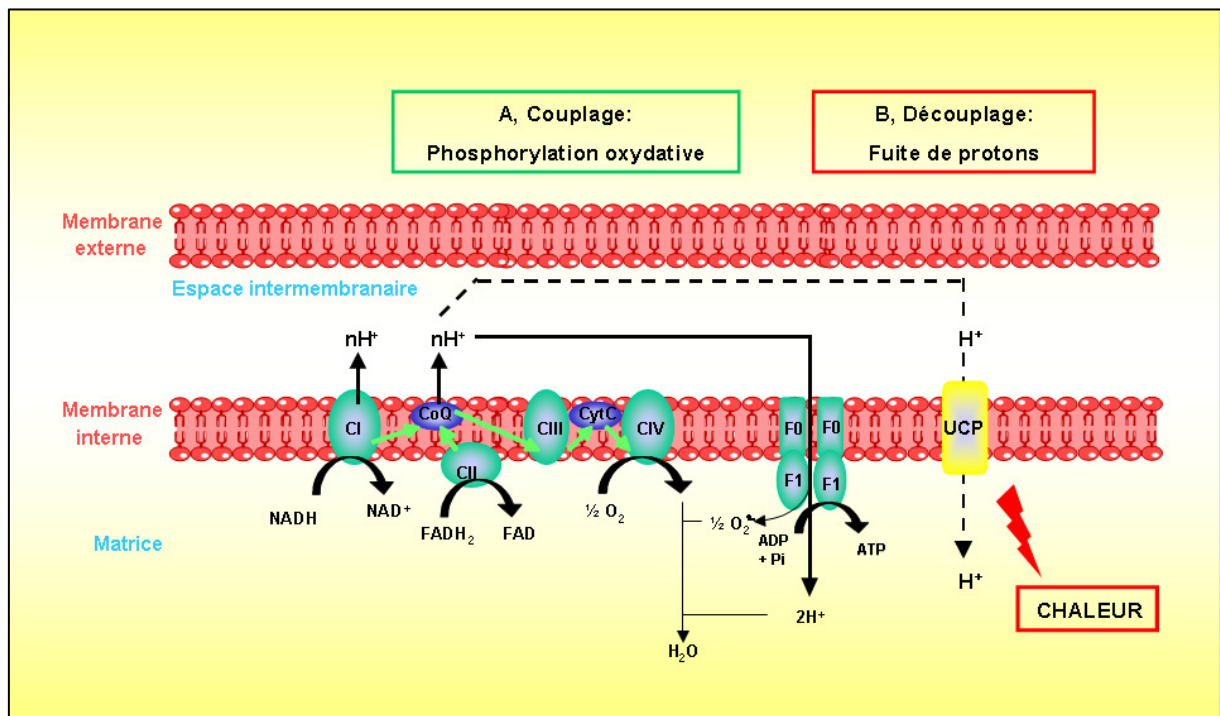
# PARTIE 1 : REGULATION DE L'EXPRESSION DE LA PROTEINE DECOUPLANTE UCP3

## I Introduction : 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 18). 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 F<sub>0</sub>, 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 F<sub>1</sub> de l'ATP synthase qui catalysent la phosphorylation de l'ADP (Nicholls et al., 1984). La production d'ATP est donc 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, FADH<sub>2</sub>). Une diminution des rapports NAD<sup>+</sup>/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 (Brand et al., 1999). 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 18). La fuite de protons représente jusqu'à 50% de la dépense énergétique de base pour des préparations de muscles squelettiques perfusés de rats (Brand et al., 1994; Rolfe and Brand, 1996).



**Figure 18 : 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), FADH<sub>2</sub> : 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 b<sub>2</sub>, b<sub>5</sub> et protéines FeS, CIV : complexe IV formé par les cytochromes a et a<sub>3</sub>, CoQ : coenzyme Q, CytC : cytochrome C, UCP : *uncoupling protein*.

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 (Ricquier and Kader, 1976; Rolfe and Brand, 1996). 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 TA brun (TAB) chez les animaux exposés au froid ou sortant d'hibernation, chez les mammifères nouveaux-nés. Elle aurait pu représenter 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 TAB et donc d'UCP1. La revue de littérature de Nedergaard en 2007 (Nedergaard et al., 2007) ainsi que trois articles nouvellement publiés dans le *New England Journal of Medicine*, basés sur la technique d'absorption de glucose radiomarqué, amènent la preuve de la présence de TAB actif chez l'Homme adulte en situation physiologique et ravive les espoirs des chercheurs quant à la modulation de la dépense énergétique chez les patients obèses (Cypess et al., 2009; van Marken Lichtenbelt et al., 2009; Virtanen et al., 2009).

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 (Fleury et al., 1997) ou de rates (Gimeno et al., 1997). UCP3 a été clonée peu de temps après UCP2 (Boss et al., 1997; Vidal-Puig et al., 1997). Des ARN totaux de muscles squelettiques de rat ont été amplifiés par RT-PCR avec des amorces choisies dans des domaines conservés d'UCP1. 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 (Boss et al., 1997). 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 *brain mitochondrial carrier protein 1* (BMCP1) également appelée UCP5 (Sanchis et al., 1998). Cette protéine pourrait être impliquée dans la modulation du ratio ADP/ATP ou du niveau d'ERO. Dans le même temps, une équipe américaine identifiait

et caractérisait partiellement une nouvelle protéine mitochondriale spécifique du cerveau et qu'ils nommèrent UCP4. UCP4 pourrait être impliquée dans la thermorégulation au sein du cerveau, ou bien dans les phénomènes d'apoptose induits par les ERO (Mao et al., 1999). 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 ERO. Leur activité pourrait profondément moduler la fonction neuronale. En régulant la biogenèse mitochondriale (formation des mitochondries), les flux de  $Ca^{2+}$  et la production d'ERO, 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 (Andrews et al., 2005). L'existence des protéines découplantes n'est pas limitée aux mammifères. Deux nouvelles séquences d'UCP2 ont été trouvées chez des vertébrés ectothermiques, la carpe (*Ciprinus caprio*) et le poisson zèbre (*Danio rerio*) (Stuart et al., 1999). Les oiseaux présentent également une UCP nommée *AvianUCP* (AvUCP) identique à 73% à la protéine UCP3 et restreinte au muscle squelettique (Stuart et al., 1999; Vianna et al., 2001). L'UCP aviaire 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) (Raimbault et al., 2001; Toyomizu et al., 2002; Vianna et al., 2001). Une protéine découplante a également été découverte dans les mitochondries de *Acanthamoeba castellanii*, protozoaire terrestre amiboïde non photosynthétique (Jarmuszkiewicz et al., 1999). 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 (Jarmuszkiewicz et al., 2000). Enfin, des UCP ont également été retrouvées dans les trophozoïtes du parasite responsable de la malaria, *Plasmodium Berghei* (Uyemura et al., 2000) et dans les plantes (StUCP) (Laloi et al., 1997). Le tableau I résume l'ensemble de ces données. La revue de Ricquier et Bouillaud présente également une vue globale des différentes protéines découplantes (Ricquier and Bouillaud, 2000).

**Tableau 1 : Expression tissulaire des différentes protéines découplantes.**

<b>UCP</b>	<b>Espèces</b>	<b>Localisation tissulaire</b>	<b>Références</b>
<i>UCP1</i>	Mammifères	Tissu adipeux brun	(Cadrin et al., 1985)
		Thymocyte	(Klaus et al., 1998)
		Cellule $\beta$ pancréas	(Carroll et al., 2005)
			(Adams et al., 2008a), (Adams et al., 2008b)
			(Sale et al., 2007)
<i>UCP2</i>	Mammifères	Ubiquitaire	(Fleury et al., 1997)
	Poissons		(Gimeno et al., 1997)
			(Lengacher et al., 2004)
<i>UCP3</i>	Mammifères	Muscle	(Boss et al., 1997)
		Tissu adipeux brun	(Vidal-Puig et al., 1997)
		Coeur	
<i>UCP4</i>	Mammifères	Système nerveux central	(Sanchis et al., 1998)
		Préadipocyte	(Mao et al., 1999)
			(Zhang et al., 2006)
<i>UCP5/ BMCP1</i>	Mammifères	Système nerveux central	(Sanchis et al., 1998)
		Muscles squelettiques	(Yu et al., 2000)
		Estomac, poumon, testicules,	(Kim-Han et al., 2001)
		utérus, rate, tissus adipeux,	(Lengacher et al., 2004)
		prostate, pancréas, glandes	(Ho et al., 2005)
		surrénales, thyroïde, foie	(Ho et al., 2006)
<i>AvUCP</i>	Oiseaux	Muscles squelettiques	(Raimbault et al., 2001)
		Ubiquitaire	(Evock-Clover et al., 2002)
<i>UCP6</i>	Invertébrés		(Sokolova and Sokolov, 2005)
	Poissons		
<i>Autres UCPs</i>	Levures		(Sokolova and Sokolov, 2005)
	Bactéries		
	Plantes		

D'un point de vue phylogénique, une étude menée par Hanak et Jezek en 2001 (Hanak and Jezek, 2001), 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 (Sokolova and Sokolov, 2005). 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.

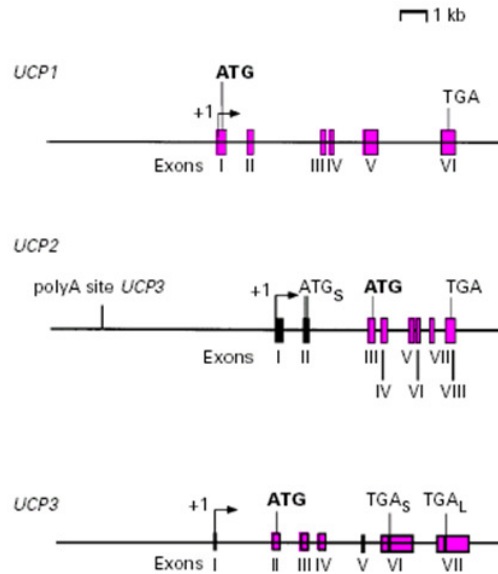
## **2- Etude générale des protéines découplantes**

### **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 pour un domaine membranaire de la protéine (Figure 19).

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 leur extrémité 5' (Gong et al., 1999; Pecqueur et al., 1999; Solanes et al., 2005; Tu et al., 1999; Yoshitomi et al., 1998).





**Figure 19 : 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<sub>S/L</sub> : codon de terminaison de la traduction de la forme courte (*small*) ou longue (*long*) du transcrite Ucp3, +1 : point de départ de la transcription.

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 avait été observé que les deux gènes étaient distants l'un de l'autre de moins de 100 kb. Il a été démontré ultérieurement 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 respectivement. L'étroite juxtaposition d'Ucp2 et Ucp3 suggère fortement un événement de duplication à l'origine des deux gènes.

**Tableau 2 : Localisation chromosomique des gènes codant pour les principales protéines découplantes chez la Souris, le Rat et l'Homme**

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

## 2.2- UCP1 et UCP2 : données structurales

La protéine découplante UCP1 a été découverte simultanément par Ricquier et collaborateurs (Ricquier and Kader, 1976) et le groupe de Nicholls (Heaton et al., 1978). Son ADNc a été cloné en 1985 (Bouillaud et al., 1985; Jacobsson et al., 1985). C'est une protéine de 33 kDa, insérée dans la membrane interne mitochondriale. UCP1 est quasi exclusivement exprimée dans le TAB des mammifères. La fonction primaire du TA est de produire de la chaleur en réponse à une exposition au froid (Himms-Hagen, 1990; Rothwell and Stock, 1979). Le rôle d'UCP1 dans le découplage de la phosphorylation oxydative et la production de chaleur ont clairement été démontré dans les expériences utilisant des souris transgéniques invalidées pour le gène *Ucp1* (« knock out » KO *Ucp1*) (Matthias et al., 1999). Les mitochondries du TAB des souris KO *Ucp1* ont présenté une intensité de thermogénèse inférieure à celle des souris contrôles.

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'AG protonés.

UCP2 a été clonée en 1997 (Fleury et al., 1997; Gimeno et al., 1997). Cette protéine de 33 kilodalton (kDa) présente une expression ubiquiste (Langin et al., 1999). Son ARNm est exprimé dans de nombreux tissus mais la détection 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 TA blanc (Pecqueur et al., 2001). UCP2 est également présente dans les cellules  $\beta$  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 (Chan et al., 2001; Zhang et al., 2001). Mais UCP2 pourrait également avoir un rôle dans la prévention de la production d'ERO et de leurs dérivés dans les cellules  $\beta$  pancréatiques comme le suggèrent les souris invalidées pour le gène *Ucp2* chez qui une élévation permanente d'ERO peut être constatée (Krauss et al., 2003). En dernier lieu, une implication d'UCP2 dans l'immunité est aussi proposée (Arsenijevic et al., 2000).

### 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<sub>small</sub> et Ucp3<sub>long</sub>, codant pour deux protéines UCP3, une courte et l'autre longue, différant seulement par l'absence de 37 résidus en partie C terminale, correspondant à l'exon 7 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 AATAAAL (localisé environ 1,1 kb en aval de l'exon 7), et forme UCP3L. L'épissage alternatif d'UCP3 est régulé de manière originale, par une coopération entre le facteur d'épissage ASF/SF2 (*alternative-splicing factor 2 / splicing-factor-2*) et le facteur transcriptionnel PPAR $\gamma$  (Kim et al., 2009).

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 kDa, localisée dans la membrane interne mitochondriale. Elle est composée de 6 hélices  $\alpha$  hydrophobes. La séquence protéique humaine d'UCP3 présente 73% d'homologies avec celle d'UCP2 et 57% avec celle d'UCP1 (Boss et al., 1997). 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 (Lin et al., 1998; Masaki et al., 2000a; Wang et al., 2003), d'autres n'ont pas révélé de modification cette expression (Boss et al., 1998; Boss et al., 1997; Larkin et al., 1997) ; enfin, une dernière étude a même présenté une diminution de l'expression d'UCP3 par le froid (Wang et al., 2003). Au niveau protéique, UCP3 diminue ou n'est pas modifiée par l'exposition au froid (Jakus et al., 2002; Schrauwen et al., 2002; Wang et al., 2003). Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait qu'UCP3 serait requise 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 (Boss et al., 1998; Denjean et al., 1999; Jakus et al., 2002; Larkin et al., 1997; Masaki et al., 2000a; Yamashita et al., 1999). 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 (Wang et al., 2003). D'autre part, les souris KO *Ucp3* résistent bien à une exposition de 24 heures à 6°C (Giacobino, 1999; Gimeno et al., 1997; Goglia and Skulachev, 2003). 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 (Schrauwen et al., 2002). 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 (Echtay et al., 2003; Echtay et al., 2002) 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 identique à 70% à UCP3 des mammifères présente également une expression tissulaire restreinte aux muscles squelettiques (Raimbault et al., 2001; Vianna et al., 2001). L'exposition au froid entraîne une augmentation de l'expression des ARNm de AvUCP chez

le colibri, le canard et le poulet (Raimbault et al., 2001; Toyomizu et al., 2002; Vianna et al., 2001). Ces observations confortent l'hypothèse d'un rôle majeur de l'AvUCP dans la thermogénèse chez les oiseaux.

Le tableau 3 présente une synthèse des différents travaux réalisés.

**Tableau 3 : Régulation par le froid d'UCP3 (arguments expérimentaux).**

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

Auteurs	Conditions	Espèce	TAB	Muscles
(Larkin et al., 1997)	4°C 10 jours	Rat	Aug. des ARNms	Pas de modification des ARNms
(Boss et al., 1997)	6°C 20 jours	Rat	ND	Pas de modification des ARNms (muscle <i>tibialis</i> )
(Boss et al., 1998)	6°C 48 heures	Rat	Aug. des ARNms	Pas de modification des ARNms (muscle <i>tibialis</i> )
(Lin et al., 1998)	6°C 6 à 24 heures 6°C après 6 jours	Rat	ND	Aug. des ARNms Dim. des ARNms
(Denjean et al., 1999)	4°C 7 jours	Rat	Aug. des ARNms	ND
(Yamashita et al., 1999)	4°C 3, 24, 72h	Rat 10 à 14 semaines Rat 26 mois	Aug. des ARNms Dim. des ARNms	ND ND
(Masaki et al., 2000a)	4°C 12 et 24 heures	Souris	Aug. des ARNms	Aug. des ARNms ( <i>soleus</i> )
(Jakus et al., 2002)	5°C 7 jours	Rat	Aug. des ARNms Dim. de la protéine	Dim. de la protéine (muscle gastrocnémien)
(Wang et al., 2003)	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)
(Schrauwen et al., 2002)	16°C 60 heures	Homme	ND	Dim. des ARNms et de la protéine ( <i>soleus</i> ) Dim. des ARNms sans modification de la protéine

### *Exercice physique*

L'exercice physique, de manière ponctuelle (« en aigu ») ou régulière, joue un rôle important dans la prévention de l'obésité en augmentant soit le métabolisme énergétique soit l'oxydation des AG. 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 les parties glycolytique et oxydative du *gastrocnemius* (Cortright et al., 1999). Ce résultat est également retrouvé par Zhou et al. chez le Rat (Zhou et al., 2000). Ces travaux montrent aussi que l'augmentation des ARNm<sub>s</sub> 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% (Pilegaard et al., 2000). 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 (Cortright et al., 1999). 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* (Boss et al., 1998). La production d'ARNm codant pour UCP3 (Schrauwen et al., 1999a) et l'expression de la protéine UCP3 (Russell et al., 2003; Schrauwen et al., 2005) sont significativement réduites chez des sujets entraînés par rapport à des personnes non entraînés.

Ainsi, seul 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'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 (Hesselink et al., 2001).

### ***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 squelettiques (Boss et al., 1998). Ce résultat a également été retrouvé par Giacobino et al. avec une restriction alimentaire de 40% sur une semaine dans le muscle *tibialis anterior* (Giacobino, 1999). 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 (Millet et al., 1997; Millet et al., 1998). La perte de poids entraîne quant à elle une diminution de l'expression d'UCP3 dans les muscles squelettiques (Esterbauer et al., 1999).

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) (Samec et al., 1998). L'équipe de Boss a même mis en évidence une augmentation supérieure des ARNm d'UCP3 dans le *soleus* (x 3 à 5) après un période de jeûne identique (Boss et al., 1998). De nombreux autres travaux montrent des résultats comparables pour l'expression d'UCP3 dans la muscle suite à un jeûne (Cadenas et al., 1999; Gong et al., 1997; Jucker et al., 2000; Sivitz et al., 1999; Weigle et al., 1998) 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 (Jimenez et al., 2002). Au niveau protéique, l'expression d'UCP3 dans le muscle *gastrocnemius* n'est que modérément augmentée (x 1,5) par le jeûne (Boss et al., 1998). 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 (Gong et al., 1997; Weigle et al., 1998). D'autre part, les travaux de Weigle et al. (Weigle et al., 1998) 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 AG 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'AG 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. (Brun et al., 1999a) 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'AG 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* (Tunstall et al., 2002).

Le tableau 4 résume les différents travaux cités ci-dessus.

**Tableau 4 : Régulation par le jeûne d'UCP3 (arguments expérimentaux).**

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

Référence	Conditions	Espèce	TAB	Muscles
(Giacobino, 1999)	Restriction calorique	Rat	ND	Dim. des ARNms (dans le muscle <i>tibialis</i> )
(Boss et al., 1998)	Restriction calorique Jeûne 48h	Rat	ND	Dim. des ARNms Aug. des ARNms
(Millet et al., 1997)	Restriction sévère 5 jours	Homme	ND	Aug. des ARNms
(Esterbauer et al., 1999)	Perte de poids	Homme	ND	Dim. des ARNms
(Gong et al., 1999)	Jeûne 48h	Rat	Dim. des ARNms	Aug. des ARNms
(Samec et al., 1998)	Jeûne 48h	Rat	ND	Aug. des ARNms (dans les muscles <i>gastrocnémien.</i> et <i>soleus</i> )
(Boss et al., 1998)	Jeûne 24 et 48 h	Rat	Dim. des ARNms	Aug. des ARNms ( dans les muscles <i>tibialis</i> et <i>soleus</i> )
(Weigle et al., 1998)	Jeûne 24, 48, 72h	Rat	ND	Aug. des ARNms (dans le muscle <i>gastrocnémien</i> )
(Samec et al.,	Jeûne 46h	Rat	ND	Aug. des ARNms (dans les



1998)				muscles <i>tibialis</i> , <i>gastrocnémien</i> et <i>soleus</i> )
(Cadenas et al., 1999)	Jeûne 24h	Rat	ND	Aug. des ARNms et de la protéine
(Sivitz et al., 1999)	Jeûne 48h	Rat	Dim. Des ARNm et protéines	Aug. des ARNms et de la protéine (dans le muscle <i>gastrocnémien</i> )
(Jucker et al., 2000)	Jeûne 48h	Rat	ND	Aug. des ARNms et de la protéine (dans le muscle <i>gastrocnémien</i> )
(Iossa et al., 2001)	Jeûne 24h	Rat	Aug. des ARNms	ND
(Jimenez et al., 2002)	Jeûne 24h	Souris	ND	Pas de modification des ARNms mais Aug. de la protéine (dans le muscle <i>gastrocnémien</i> )
(Pilegaard et al., 2000)	Jeûne 20h	Homme	Aug. des ARNms	ND
(Tunstall et al., 2002)	Jeûne 15 et 40h	Homme	ND	Aug. ARNm (dans le muscle <i>vastus lateralis</i> )

### ***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 (Gong et al., 1997; Larkin et al., 1997; Masaki et al., 2000b). 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 ARNm 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'AG (Barbe et al., 2001). 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 (Clement et al., 2002). 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 (Nagase et al., 1999). 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 (Barbe et al., 2001).

Néanmoins, comme un traitement aigu par les hormones thyroïdiennes iodées exacerbe la lipolyse et modifie les concentrations plasmatiques d'AG, il est possible que l'expression d'UCP3 résulte indirectement des variations plasmatiques d'AG plutôt que de la régulation directe par la T3 (et T4) du gène Ucp3. Les travaux de Barbe et al. (Barbe et al., 2001) 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 (Tu et al., 2000). Cette seconde hypothèse est confortée par plusieurs travaux : Acin et al. (Acin et al., 1999) 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 (Tu et al., 2000). 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 (Solanes et al., 2005). *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 (peroxisome 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 en restriction calorique (Cusin et al., 1998; Gomez-Ambrosi et al., 1999; Gong et al., 1997). 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 (Pedraza et al., 2001; Xiao et al., 2004) 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 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 (Cortright et al., 1999). 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 (Brun et al., 1999b). Chez le Rat, la transcription du gène *Ucp3* est accrue dans les muscles squelettiques (*extensor digitorum longus* et *soleus*) après perfusion d'AG. 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* (Samec et al., 1998). 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 (Samec et al., 1999).

*In vivo* chez l'Homme, une restriction calorique sévère, caractérisée par une augmentation des AG plasmatiques conduit à une surexpression d'UCP3 (Millet et al., 1997; Millet et al., 1998).

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 (Sbraccia et al., 2002), et chez des sujets obèses non diabétiques et des patients diabétiques (Vidal et al., 1999). Enfin, chez les athlètes entraînés, un régime gras induit l'expression d'UCP3 (Schrauwen et al., 2001b).

Khalfallah et al. (Khalfallah et al., 2000) ont démontré l'intervention directe des AG dans la régulation de l'expression d'UCP3 en perfusant pendant quelques heures une émulsion de 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 TG 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 (Liposyn<sup>TM</sup>, 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 TG, 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-dépendants (Hwang and Lane, 1999).

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 (Acin et al., 1999; Tu et al., 2000). *In vitro*, Hwang et al. (Hwang and Lane, 1999) observent une activation de l'expression d'UCP3 après traitement des myocytes C2C12 par le BRL 49653, un agoniste de PPAR $\gamma$ . *In vivo* chez les rongeurs, un traitement aigu par des fibrates, capables d'activer PPAR $\alpha$  ou PPAR $\gamma$  et PPAR $\delta$ , peut mimer les effets des AG sur l'expression d'UCP3 dans le muscle squelettique en période néonatale (Brun et al., 1999b) et chez l'adulte (Pilegaard et al., 2000). Des études sur le contrôle transcriptionnel du gène humain Ucp3 ont montré que non seulement PPAR $\alpha$  mais aussi PPAR $\delta$  étaient capables d'activer la transcription d'UCP3 via un PPRE (Solanes et al., 2003). Il n'y a pas de consensus sur le médiateur préférentiel de la réponse du gène Ucp3 aux AG. *In vivo*, PPAR $\alpha$  paraît plus puissant pour activer UCP3 (Son et al., 2001), cependant les myocytes restent très sensibles à PPAR $\delta$  *in vitro* (Cabrero et al., 2001). Les souris invalidées

pour le gène  $ppar\alpha$  (KO  $ppar\alpha$ ) 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 contrôles (Kersten et al., 1999). Différents travaux tendent à montrer l'existence de mécanismes compensatoires entre les PPAR (Muio et al., 2002; Pilegaard et al., 2000). PPAR $\delta$  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 (Hoeks et al., 2003). 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  $\omega$ -6 semble prépondérante par rapport aux autres types d'AG (Chevillotte et al., 2001). 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 d'UCP3

Ce paragraphe ainsi que la Figure 20 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. (Acin et al., 1999) 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. (Tu et al., 2000) le situent au nt T, 187 pb en amont du site d'initiation de la traduction. Enfin Esterbauer et al. (Esterbauer et al., 2000) ainsi que Solanes et al. (Solanes et al., 1997) 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. (Esterbauer et al., 2000) définissent des sites d'initiation de transcription avec une spécificité tissulaire. Leur étude a révélé l'existence de deux sites de transcription pour chacun des deux tissus où UCP3 serait exprimé, le TAB et le muscle squelettique. Contrairement aux tissus

humains, les tissus des rongeurs (TAB et muscle squelettique) présentent un site d'initiation de la transcription unique.

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 quatre TRE, sites de liaison des récepteurs aux hormones thyroïdiennes, trois PPRE, sites de liaison des PPAR et un CRE, site de fixation de l'AMPC. Ces différents éléments sont positionnés sur la figure 20. 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 (Solanes et al., 2005). Kim et al. ont mis en évidence la liaison de PPAR $\gamma$  sur les séquences *cis* régulatrices positionnées aux nucléotides -71/-59 du promoteur du gène humain d'Ucp3 (Kim et al., 2009). La description de la région promotrice du gène Ucp3 facilite la compréhension de son contrôle transcriptionnel. Une régulation par les hormones thyroïdiennes ou les AG peut légitimement être envisagée, conformément aux arguments expérimentaux présentés dans les paragraphes précédents.

D'autre part, plusieurs motifs retrouvés dans des gènes d'expression restreinte aux muscles squelettiques ont été identifiés. Le promoteur présente ainsi de nombreux motifs (une douzaine) de liaison pour les facteurs de transcription musculaires de la famille MyoD, appelés *Ebox* (Acin et al., 1999; Solanes et al., 1997; Tu et al., 2000). Les *Ebox* sont en général formées d'une séquence nucléotidique de type CANNTG. MyoD serait nécessaire à l'expression muscle spécifique *in vitro* (Solanes et al., 2003) mais serait également nécessaire à la régulation par les PPAR lors de l'hétérodimérisation des ces derniers avec RXR sur leurs éléments de réponse (Solanes et al., 2005).



### **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 TA blanc, la thyroïde et la moelle osseuse de l'Homme, et dans le TA blanc, le cerveau, les reins, le foie et le côlon des rongeurs (Boss et al., 1997). Dans les muscles squelettiques, l'expression d'UCP3 n'est pas uniforme. Elle varie selon la composition en 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 5). 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 5).

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. (Jimenez et al., 2002) 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 milligramme 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. (Hesselink et al., 2001) 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 5).

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 thermogenèse adaptative avait alors été proposé. Cependant, il semblerait aujourd'hui que cette protéine soit plutôt impliquée dans la défense contre la production d'ERO et/ou le métabolisme des AG.

**Tableau 5 : Caractéristiques biochimiques des fibres musculaires.**

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

### 3.3.2-UCP3 et activité thermogénique

Les premiers travaux ont donc essayé de montrer les capacités découplantes d'UCP3 *in vitro*. Cependant aucun d'entre eux n'a mis en évidence de fuite de protons en présence d'UCP3 (Bezaire et al., 2001; Cadenas et al., 1999). D'autres travaux vont encore à l'encontre d'un rôle d'UCP3 dans la thermogenèse adaptative. L'injection de T3 ou d'un agoniste  $\beta$ -adrénergique augmente la consommation d'oxygène et la température de manière identique chez les animaux contrôles et invalidés pour le gène *Ucp3* (KO *Ucp3*) (Gong et al., 2000) 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* (Mills et al., 2003). Cependant, cette situation reste supra physiologique. Néanmoins, UCP3 pourrait participer à la correction de l'intolérance au froid lors d'un traitement T3 chez les souris déficientes pour les trois types de récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, ravivant ici l'idée d'une implication potentielle d'UCP3 dans le contrôle de l'homéostasie énergétique (Flandin et al., 2009).

### 3.3.3- UCP3 et le transport de calcium

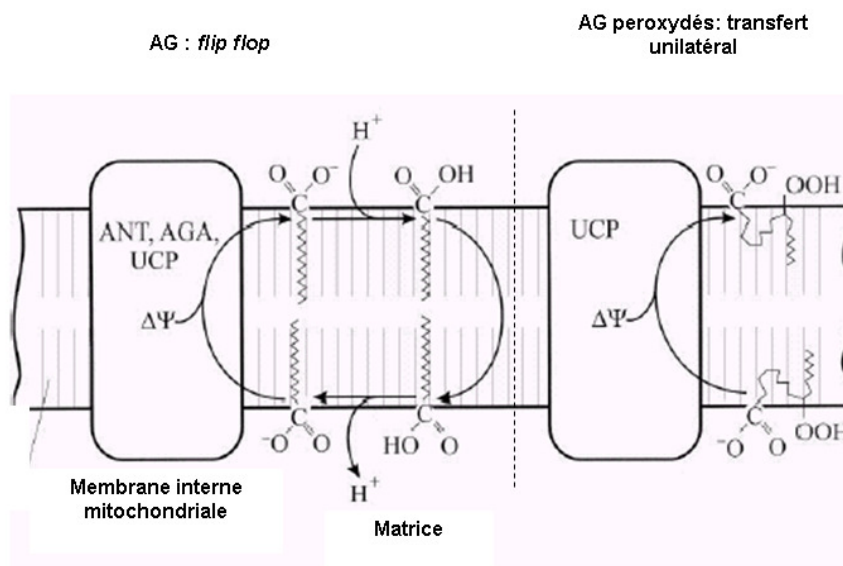
La gestion des flux calciques est déterminante pour la régulation des niveaux de phosphorylation oxydative. Les protéines impliquées dans l'entrée de calcium dans la mitochondrie sont encore inconnues. Cette fonction a été proposée pour UCP3 et UCP2 ; ces dernières pouvant alors constituer des sous-unités de canaux ioniques calciques (Trenker et al., 2007). Cependant cette fonction est largement controversée par le groupe de MD Brand mettant en avant des limites techniques et le choix du modèle cellulaire (Brookes et al., 2008).

### 3.3.4- UCP3 et la production d'ERO

La respiration cellulaire est associée à la production d'ERO : en effet, les transferts électroniques entre les complexes mitochondriaux des crêtes conduisent à la réduction de l'O<sub>2</sub> en anion superoxyde puis en ion peroxy. Les anions ainsi obtenus peuvent réagir avec les H<sup>+</sup> transloqués dans la matrice pour former de l'eau, mais ces ERO présentant un pouvoir oxydant élevé interviennent également dans de nombreuses réactions d'oxydation des lipides, 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 d'ERO de la cellule, notamment à travers l'activité des complexes I et III de la chaîne respiratoire (Figure 18). Les dommages provoqués par les ERO 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 d'ERO 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 altérer la production d'ERO par les complexes I et III (Korshunov et al., 1997).

UCP3 pourrait intervenir de deux manières dans la régulation de la production d'ERO dans la mitochondrie. Premièrement, UCP3 interviendrait par sa fonction découplante. Les ions superoxydes attaquent les AG  $\omega$ -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 HNE 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 d'ERO par un mécanisme de rétrocontrôle négatif local (Brand et al., 2002; Echtay et al., 2003; Echtay et al., 2002; Skulachev, 1996; Skulachev, 1998; Talbot and Brand, 2005; Vidal-Puig et al., 2000). Cette hypothèse semble récemment confirmée par les travaux de Toime et al. (Toime and Brand, 2010); la capacité d'UCP3 à diminuer la production d'ERO serait 90 à 500 fois plus élevée que celle de l'*adenine nucleotide translocase* (ANT). Chez les KO Ucp3, la production d'ERO dans les muscles squelettiques est plus élevée (Vidal-Puig et al., 2000) et les mitochondries de ces souris ont tendance à présenter plus de marqueurs des dommages oxydatifs (Brand et al., 2002). Mais le découplage de la phosphorylation oxydative n'est pas le seul mécanisme d'action d'UCP3 dans la diminution de la production d'ERO.



**Figure 21 : Implication d'UCP3 dans les mécanismes de translocation des acides gras (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 ( $\Delta\Psi$ ), 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 en 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 anti-oxydante protège le matériel matriciel. D'après (Goglia and Skulachev, 2003). AG : acide gras, UCP : uncoupling protein

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. Les auteurs prétendent que ces composés ne peuvent pas revenir dans le feuillet interne par mécanisme de *flip flop* comme le font les AG intacts. L'évacuation des AG peroxydés par UCP3 préserve donc l'ADN mitochondrial et les enzymes matricielles de leur pouvoir d'oxydation (Goglia and Skulachev, 2003) (Figure 21). Cette même équipe affirme dans un récent travail que l' $O^{2-}$  produit dans la matrice jouerait un rôle dans l'export des lipides peroxydés (Lombardi et al., 2010). Leur hypothèse du devenir des lipides exportés est cependant révisée. En effet, une partie de ces molécules pourraient être métabolisées par une glutathione peroxydase tandis que les autres pourraient réintégrer la membrane mitochondriale interne par *flip flop*. Les mouvements de lipides anioniques de part et d'autre de ce feuillet seraient à l'origine du découplage. Cette hypothèse est confortée par les données de Jaburek et al. montrant que des liposomes incluant UCP2 sont capables de transporter des anions d'AG peroxydés (Jaburek et al., 2004).

Enfin, Bouillaud et al. expliquent la diminution de la production d'ERO par UCP3 et UCP2 par une hypothèse métabolique. Au sein des cellules à fort métabolisme glycolytique, le pyruvate exerce une pression *redox* importante sur la chaîne respiratoire entraînant une production d'ERO. L'export de pyruvate anionique assuré par UCP3 et UCP2 permettrait de diminuer l'entrée de glucose dans sa voie oxydative et donc la production d'ERO (Mozo et al., 2006). La cellule se trouverait ainsi protégée par le détournement du pyruvate du cycle de Krebs, sans activation réelle d'une fonction découplante. Néanmoins, il manque encore à ce jour la preuve de ce transport uniport de pyruvate (Bouillaud, 2009).

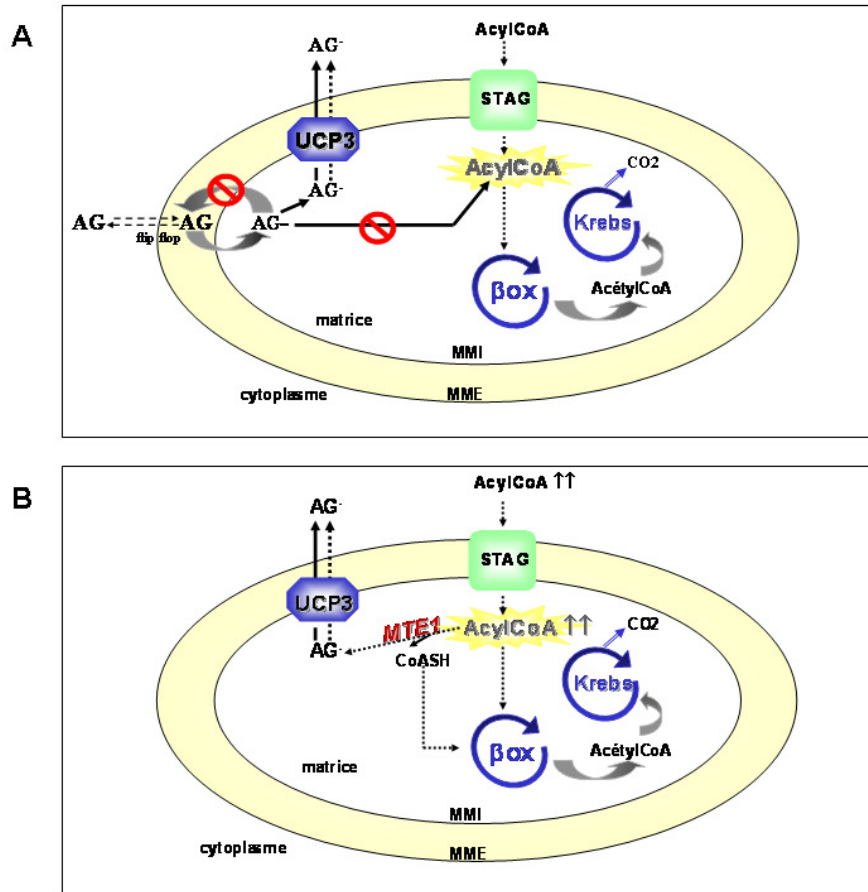
A une plus large échelle, le pouvoir potentiel des UCP limitant la production d'ERO, fait de ces protéines des cibles d'étude privilégiée du vieillissement cellulaire (Dietrich and Horvath, 2010).

### **3.3.5- UCP3 et le métabolisme des acides gras**

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

Selon Schrauwen et al. (Schrauwen et al., 2003), lorsque les capacités d'oxydation des AG 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 22A). 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 (Schrauwen and Hesselink, 2004b).

Dans le modèle proposé par Himms-Hagen et Harper (Himms-Hagen and Harper, 2001) 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  $\beta$ -oxydation (Figure 22B). Une partie est hydrolysée par une thioestérase mitochondriale (MTE1). Le CoASH issu de cette hydrolyse est redirigé vers différentes étapes de la  $\beta$ -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 (Moore et al., 2001).



**Figure 22 : Rôles 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, βox : cycle de βoxydation 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'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 (Bezaire et al., 2005). 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 (Moreno et al., 2003).

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.

### 3.3.6- UCP3, obésité et diabète de type 2

L'expression d'UCP3 dans les muscles squelettiques, organes à pouvoir thermogénique, 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 » (Millet et al., 1998; Nordfors et al., 1998). La proximité des gènes *Ucp2* et *Ucp3* sur la région du chromosome 11q13 rend difficile l'interprétation des études de liaison car les deux gènes sont transmis sans recombinaison. De nombreux polymorphismes du gène *Ucp3* ont été décrits et étudiés sans pour autant être reliés de manière univoque à un phénotype d'obésité (Comuzzie et al., 2000; Lanouette et al., 2001; Walder et al., 1998).

Certains variants (substitution -55 c/t) d'*Ucp3* ont été identifiés chez des sujets obèses de la tribu indienne Pima. Le génotype c/c est associé avec une expression plus faible d'UCP3 dans le muscle squelettique des Indiens Pima (Schrauwen et al., 1999b) 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 (IMC : poids en kg divisé par la taille en m<sup>2</sup>). De récentes études dans des populations Espagnole et Caucasienne associent ce polymorphisme (-55t) à une diminution du risque d'obésité (Alonso et al., 2005; Liu et al., 2005). La revue de Jia synthétise les résultats des études de polymorphisme (Jia et al., 2009).

Finalement, les études cherchant à corréler les polymorphismes du gène *Ucp3* avec l'obésité ou l'IMC n'ont 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 dépendante du sexe a été mise en évidence chez les animaux sur-exprimant UCP3 (Tiraby et al., 2007). Dans un autre modèle transgénique de sur-expression physiologique, UCP3 protège également de la prise de masse grasse induite par un régime enrichi en graisses (Costford et al., 2008). 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-dépendant 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 (Krook et al., 1998). Cette diminution de l'expression d'UCP3 chez des patients diabétiques a également été confirmée au niveau protéique (Schrauwen et al., 2001a). Les sujets prédiabétiques (diminution de la tolérance au glucose) présentent aussi une diminution de la protéine UCP3 dans les muscles squelettiques (Schrauwen et al., 2006b).

Cependant, des résultats inverses ont été obtenus. Bao et al. (Bao et al., 1998) ont observé une augmentation de 85-170% des ARNms d'UCP3 dans les muscles squelettiques des patients diabétiques. De manière similaire, Vidal et al. (Vidal et al., 1999) 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 ainsi que dans le type de muscle analysé. 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 AG (production d'acétylCoA utilisé dans le cycle de Krebs ultérieurement).
- Le contrôle de l'utilisation des AG dans la mitochondrie par UCP3 en intervenant dans leur transfert mitochondrie / cytosol.

- Le rôle potentiel d'UCP3 dans les systèmes anti-oxydants de la cellule par la diminution de la production d'ERO.
- L'expression musculaire d'UCP3 préférentiellement dans les fibres à contraction rapide et à métabolisme glycolytique.
- La régulation de l'expression d'UCP3 par les AG et les hormones thyroïdiennes.
- La probable implication d'UCP3 dans le diabète de type II.

Les revues très détaillées de Bézaire et al. et Cioffi et al. synthétisent les différents rôles proposés pour UCP3 et en discutent leur « véracité » (Bezaire et al., 2007; Cioffi et al., 2009).

## II Objectifs

Chez l'Homme, l'expression d'UCP3 est majoritaire dans les muscles à contraction rapide et métabolisme glycolytique. Différents travaux ont démontré la régulation de l'expression d'UCP3 par des situations métaboliques modulant les concentrations d'AG.

Nos objectifs ont été de :

- 1) caractériser les séquences *cis* régulatrices à l'origine de la **spécificité musculaire d'expression** d'UCP3,
- 2) caractériser les séquences *cis* régulatrices à l'origine de la **régulation par le jeûne**, par l'établissement de différentes lignées d'animaux transgéniques.

## III Résultats expérimentaux

### **ARTICLE I : La régulation de l'expression de la protéine découplante-3 (UCP3) humaine est gouvernée par une interaction complexe entre le promoteur et les séquences introniques**

#### **Introduction**

Peu d'études ont été menées sur la régulation de l'expression de UCP3 humain (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. (Riquet et al., 2003) 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 de 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 d'agents pharmacologiques sur l'expression de hUCP3. En réponse à ces différentes limites, notre équipe a utilisé la **transgénèse additive** pour étudier *in vivo* les séquences régulatrices du gène hUcp3. 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.

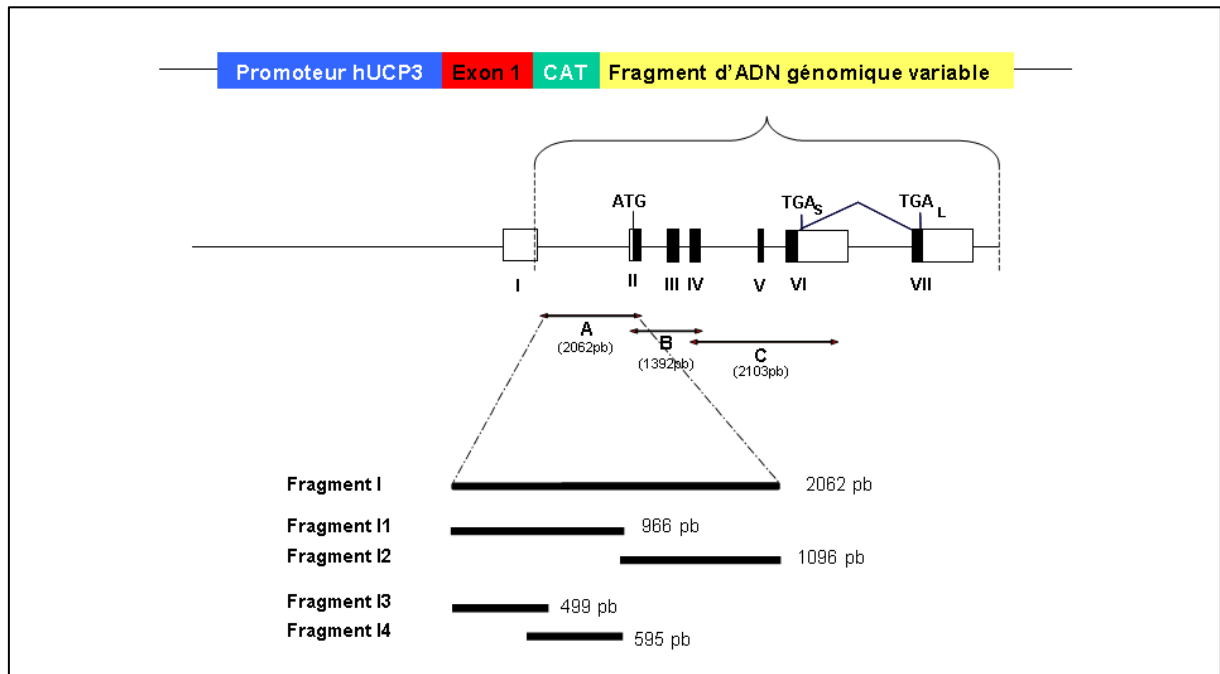
Au laboratoire, lors d'une première approche, l'utilisation d'un transgène comprenant 16 kb de hUcp3 a montré une expression marquée de l'ARNm de hUcp3 dans les muscles squelettiques des souris transgéniques, expression comparable à celle observée dans les échantillons musculaires murins ou humains (Tiraby et al., 2007). D'autre part, l'expression de l'ARNm de 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. (Hesselink et al., 2001). 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 diriger 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 du gène codant pour la *chloramphenicol acetyl transferase* (cat) n'a pas permis d'obtenir de lignées de souris présentant d'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 d'autres séquences régulatrices des gènes comme la partie 5' non traduite ou les séquences introniques.

Des fragments de transgénèse de taille décroissante (Figure 23) ont été générés afin de caractériser la plus petite séquence intronique conférant la spécificité d'expression musculaire de hUcp3 à travers le gène rapporteur cat. De manière générale, pour chaque fragment de transgénèse, deux lignées de souris présentant une expression musculaire de la CAT ont été établies. Les animaux transgéniques sont euthanasiés à l'âge adulte et différents tissus sont

prélevés. Une mesure d'activité CAT a été réalisé avec un animal représentatif de chacune de ces lignées afin d'établir une comparaison des différents profils d'expression tissulaire.

I4 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 (Frith et al., 2004; Sandelin et al., 2004). Un alignement de séquences nucléotidiques entre différentes espèces a été réalisé avec le programme *blastz/Threaded Blockset Aligner* afin de rechercher des séquences conservées.

Nous avons voulu d'autre part caractériser les séquences génomiques responsables de la réponse au jeûne. Nous avons donc soumis les différentes lignées obtenues précédemment à un jeûne de 48 heures à l'issue duquel l'activité du gène rapporteur a été dosée dans différents muscles et les organes. Nous avons ainsi pu montrer que la moitié 3' de l'intron 1, bien que non nécessaire pour l'expression spécifiquement musculaire de hUCP3, était importante pour la réponse au jeûne.



**Figure 23 : Constructions de transgènes.**

Construction promoteur-gène rapporteur présentant la séquence d'ADN génomique de 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 courte d'UCP3 (TGAs) ou longue (TGA<sub>L</sub>) d'UCP3.



**Article**

**La régulation de l'expression de la protéine découplante-3 (UCP3) humaine est gouvernée par une interaction complexe entre le promoteur et les séquences introniques**

**Amandine Grousse, Geneviève Tavernier, Claire Tiraby, Laetitia Lichtenstein, Jason S Iacovoni, Aline Mairal, Francesc Villarroya et Dominique Langin**

Inserm U858, Institut de Médecine Moléculaire de Rangueil, Laboratoire de Recherche sur les Obésités, Equipe 4, F-31432 Toulouse, France.

Université Paul Sabatier, Institut Louis Bugnard IFR150, F-31432 Toulouse, France.

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular et Institut de Biomedicina, Universitat de Barcelona (IBUB), Barcelone, Espagne

Diabetologia (2009) 52:1638-164





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

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

Received: 23 February 2009 / Accepted: 17 April 2009 / Published online: 26 May 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.

A. Girousse · 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. Girousse · 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

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

## Abbreviations

CAT Chloramphenicol acetyl transferase  
MyoD Myogenic differentiation 1 factor  
PPAR Peroxisome proliferator-activated receptor  
UCP Uncoupling protein

## 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) $\alpha$  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' TGCACAC 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  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) or vehicle and killed 15 h later. Tissues were dissected out, rapidly frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**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  $\mu\text{g}$  of the plasmids  $-3.2\text{ kb}/\text{hUCP3promLuc}$  or the  $-3.2\text{ kb}/\text{hUCP3promLuc}/\text{intron1}$  (where ‘h’ stands for ‘human’ and ‘Luc’ for ‘luciferase’) and, when required, 0.3  $\mu\text{g}$  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  $\beta$ -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).

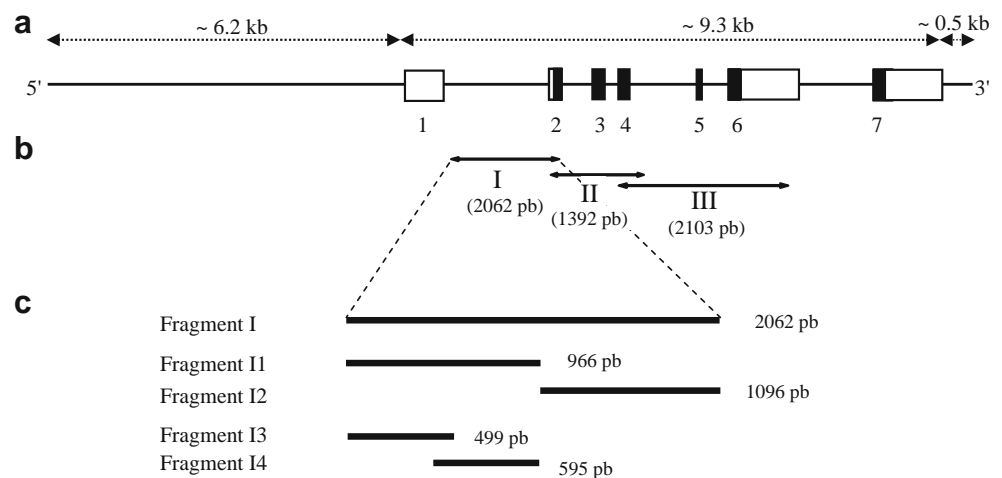
**Computer-assisted analysis** Genomic regions encompassing the *UCP3* loci were extracted from the UCSC Genome database (available at <http://genome.ucsc.edu>, accessed 9 October 2007) for human, mouse, rat, chimpanzee, rhesus, dog and cow. Human intron 1 and various subsequence fragments were fed in 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 $\pm$ 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

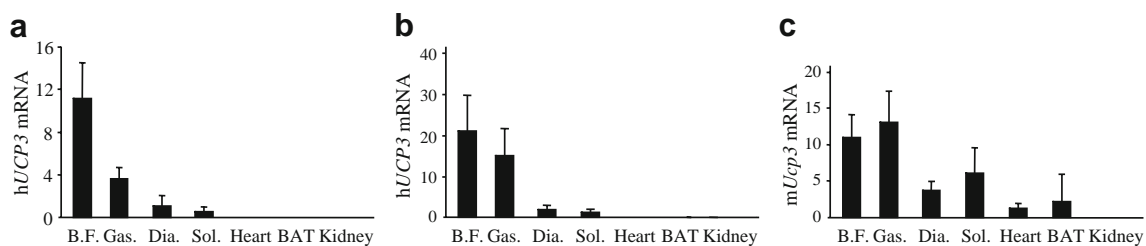
**Fig. 1** Genomic organisation of human *UCP3* and of intronic fragments used in transgenesis. **a** A 16 kb region including the promoter region, exons, introns and a short 3' flanking region. White boxes, non-coding sequences in exons; black boxes, coding regions. **b** Fragments from intronic and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



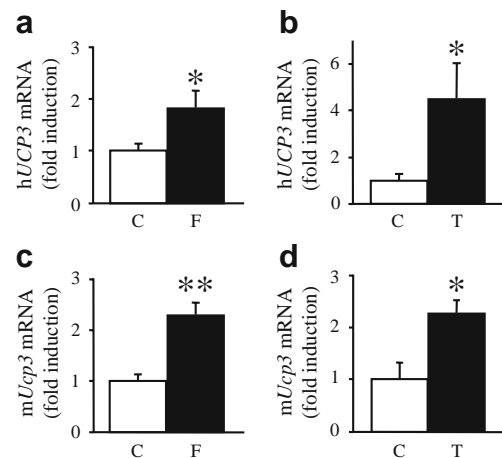
mice were produced with a 16 kb human *UCP3* transgene containing 6.2 kb of the promoter and the entire exon–intron sequences. Human and murine *UCP3* mRNA amounts were quantified in various tissues (Fig. 2a–c). In the two transgenic lines, human *UCP3* was expressed at higher levels in glycolytic (biceps 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. 2** Expression profile of human and mouse *UCP3* mRNA in lines expressing the human *UCP3* 16 kb transgene. **a** Human *UCP3* (*hUCP3*) mRNA level in transgenic line A. **b** Human *UCP3* mRNA level in transgenic line B. **c** Mouse *Ucp3* (*mUcp3*) mRNA level in the



**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* (*hUCP3*) and murine *Ucp3* (*mUcp3*) 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/*hUCP3* 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/*hUCP3*-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 ( $6.5 \pm 0.5$ ,  $p<0.05$ ,  $n=4$ ). Further induction was observed with retinoic acid receptor in the presence of retinoic acid ( $9.2 \pm 1.1$ ,  $p<0.05$ ,  $n=4$ ). 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  $\beta$ -galactosidase activity in skeletal muscles. Consequently, promoter sequences are not sufficient to drive skeletal muscle expression of human *UCP3* in vivo.

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 ( <i>n</i> )	Total transgenic lines ( <i>n</i> )	Expressing lines ( <i>n</i> )	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 ( <i>n</i> )	Expressing lines ( <i>n</i> )
I	8	2
II	3	0
III	3	0
I1	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

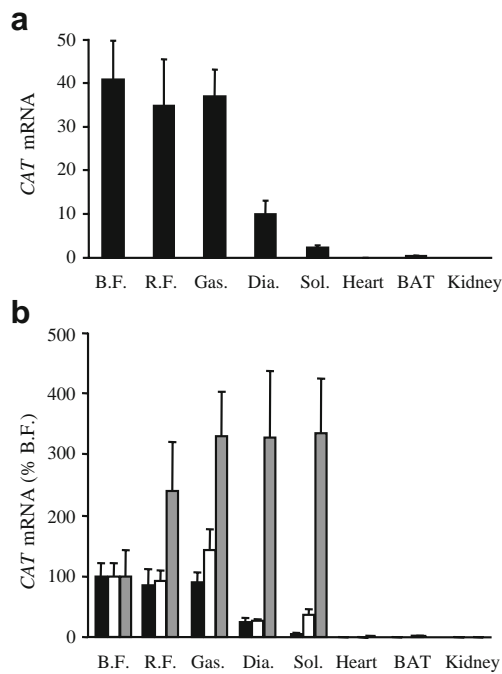
CAT activity was determined on hindlimb muscles from three to six mice per transgenic line

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 I1) 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 I1) 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

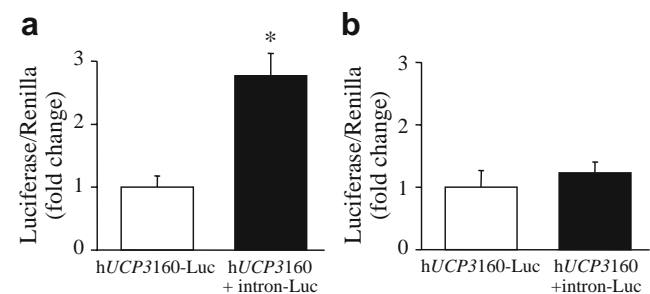
that a larger 5' region (fragment II) is necessary for proper distribution according to fibre types.

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 $\alpha$ , NRF2 $\beta$ , v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homologue 2 [ETS]2, PPAR $\alpha$ ), or in combination (MyoD and FOXO3A, FOXC2, NRF2 $\alpha$ , NRF2 $\beta$ , ETS2 or PPAR $\alpha$ ), on the  $-3.2$  kb/h*UCP3*prom–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).

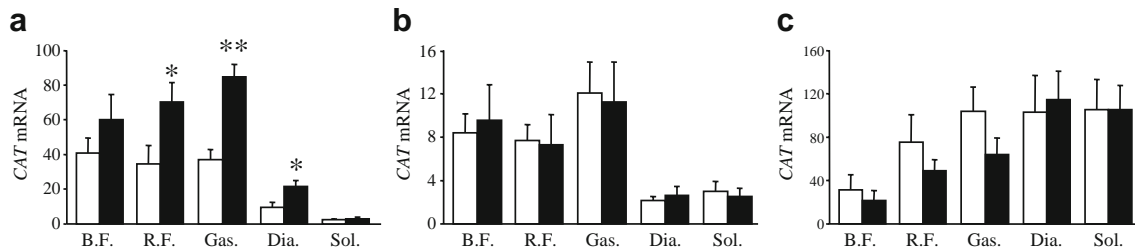
*Intron 1 is essential for the response to fasting* The transgenic mouse lines with expression of the *CAT* gene in skeletal muscle were submitted to 48 h fasting to identify the region of intron 1 involved in the response to fasting (Fig. 6). In transgenic mice bearing the entire intron 1 (fragment 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 h*UCP3160*-Luc activity and are given as means  $\pm$  SE ( $n=4-6$ ). \* $p<0.05$



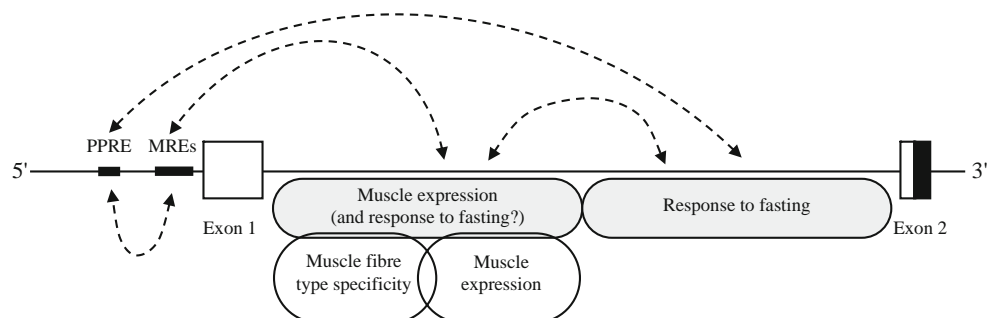
**Fig. 6** Effect of 48 h fasting on *CAT* mRNA expression in transgenic lines with various fragments of intron 1. **a** Transgenic mice with fragment I. **b** Transgenic mice with fragment II. **c** Transgenic mice with fragment I4. Black bars, fasted animal; white bars, control fed animal. The location 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  $2^{-\Delta C_t}$  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/IIIX > 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 $\alpha$  and  $\beta$ . 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, Tavernier 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- $\gamma$ /C57BL/6J 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. Acín A, Rodríguez 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, Tavernier 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, Viguierie 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. Khalfallah 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, Carmona 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



## Discussion

La réalisation et la micro-injection de constructions portant différents fragments introniques a permis de préciser la position intronique des séquences conférant la spécificité d'expression musculaire de hUCP3. En effet, une expression musculaire spécifique a été observée chez les animaux transgéniques pour des constructions contenant tout ou une partie de l'intron 1 à savoir les fragments I, II et I4, ce qui n'a pas été le cas les animaux portant les fragments nommés I2 ou I3 du premier intron. Mon travail a permis de mettre en évidence l'importance des régions internes de la partie 5' de l'intron 1 pour l'expression de hUCP3 dans les muscles squelettiques. Ce type de régulation, faisant intervenir à la fois des séquences promotrices et *cis* régulatrices d'un intron, est également observé dans d'autres gènes musculaires comme la dystrophine (Marshall et al., 2002) ou le gène de l'acétylcholinestérase (Chan et al., 1999).

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 $\alpha$  s'hétérodimérise avec RXR $\alpha$  et interagissant avec MyoD, activerait la transcription du gène Ucp3 (Solanes et al., 2003). Cependant les lignées ou les cultures primaires de muscle expriment des niveaux très faibles par rapport aux muscles *in vivo*. *In vivo*, par transgénèse additive ce même promoteur demeure inactif 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 II. Une analyse bioinformatique comparative de l'intron 1 entre sept espèces de mammifères a montré des modules conservés entre différentes espèces au sein du fragment I3 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 cette expression.

Deux des trois lignées établies pour le fragment I4 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 I4 diffère de ceux obtenus chez les lignées transgéniques pour les fragments I et II. Dans ce dernier cas, l'expression d'UCP3 n'est pas majoritaire dans les muscles de type 2B (*biceps femoris*, *rectus femoris*). L'expression de hUCP3 dans le muscle de type 2A *soleus* est très importante. Cela signe peut être une perte de l'expression spécifique du type de fibres chez les animaux exprimant le transgène avec le fragment I4. 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 I4. Les séquences introniques de sept espèces de mammifères ont été alignées. La partie I4 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 $\alpha$ , NRF2 $\beta$ , MyoD, FOXO1, FOXO3, FOXC2, Myf 5, ETS2, PPAR $\alpha$  ou combinés : MyoD+FOXC2, MyoD+FOXO3A, MyoD+ETS2, MyoD+NRF2, MyoD+PPAR $\alpha$ ). 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 de hUCP3. En effet, d'autres protéines *trans*-régulatrices dans un contexte *in vivo* pourraient jouer un rôle. Une équipe suédoise a récemment décrit un nouvel élément *cis* régulateur au sein de l'intron 1 du gène murin UCP3 (Bugge et al., 2010). Ce site de liaison pour PPAR $\gamma$  régulerait, au-delà de

l'expression d'UCP3, celle d'UCP2. En effet, grâce à un repliement chromatinien, PPAR $\gamma$  pourrait lier le site intronique d'UCP3 en même temps qu'une région promotrice d'UCP2. Ces travaux mettent encore en avant le rôle régulateur de l'intron 1 d'UCP3. Cependant, l'analyse *in silico* ne nous avait pas permis de déceler cette séquence *cis* régulatrice parmi les séquences conservées de l'intron 1 de hUCP3. Ainsi, cette régulation serait propre aux rongeurs.

Différents projets pourraient être envisageables à moyen terme afin de tester la pertinence des régions conservées au sein du fragment I4. 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 hUCP3 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 transgène 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.

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 type 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 (Schrauwen et al., 2006a). 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 de hUCP3 chez des souris semble

augmenter les capacités d'oxydation des AG, 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  $\beta$ -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'insulino-sensibilité, 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 » en atténuant les effets délétères de l'accumulation des AG.

L'étude *in vivo* de hUCP3 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.

## PARTIE II : CONSEQUENCES D'UNE DIMINUTION GENIQUE OU PHARMACOLOGIQUE DE LA LIPASE HORMONO-SENSIBLE SUR L'INSULINO-SENSIBILITE ET L'INFLAMMATION DU TISSU ADIPEUX

### I Introduction

#### 1- Lipolyse adipocytaire et modèles animaux

#### ARTICLE II : Les modèles animaux au service de l'étude de la lipolyse adipocytaire

##### Introduction

L'étude de la lipolyse adipocytaire connaît encore aujourd'hui de nombreuses évolutions. Longtemps considérée comme l'enzyme principale et majoritaire de la lipolyse, la LHS a vu son rôle réévalué depuis la description des modèles murins invalidés pour ce gène. En effet, l'observation des souris KO Lhs (Haemmerle et al., 2002; Harada et al., 2003; Osuga et al., 2000; Wang et al., 2001) a mis en lumière un phénotype surprenant : les mâles sont stériles mais surtout, ces souris ne sont pas obèses, elles résistent à l'effet d'un régime gras, elles présentent une accumulation marquée de DG dans de nombreux tissus et les adipocytes de ces animaux possèdent une lipolyse résiduelle. L'ensemble de ces caractéristiques a fait émerger deux idées principales :

- l'existence d'une autre lipase, capable d'hydrolyser les TG,
- le caractère limitant de la LHS pour l'hydrolyse des DG.

En 2004, trois équipes indépendantes ont décrit une nouvelle lipase du TA, l'ATGL, capable d'hydrolyser les TG (Jenkins et al., 2004; Villena et al., 2004; Zimmermann et al., 2004). Des régulateurs, activateur ou inhibiteur de l'ATGL ont été décrits comme pouvant moduler l'activité de la lipase. Différentes équipes de recherche dont la nôtre ont travaillé sur l'importance relative de la LHS et l'ATGL dans le TA (Bezaire et al., 2009; Mairal et al., 2006; Ryden et al., 2007). De plus, des études cliniques ont montré la dérégulation de l'expression de ces enzymes chez le sujet obèse, renforçant ainsi l'intérêt de la communauté scientifique pour l'étude des lipases (Langin et al., 2005; Large et al., 1999). Le

fonctionnement des enzymes peut nécessiter l'intervention de co-facteurs. C'est notamment le cas pour l'ATGL dont l'activité enzymatique peut être augmentée par le co-activateur CGI-58 (Lass et al., 2006) ou diminuée par la protéine récemment décrite GOS2 (Yang et al., 2010).

L'autre avancée majeure dans l'étude de la lipolyse réside dans la re-considération d'un organelle longtemps méprisé par le passé, la GL. La structure de la GL est aujourd'hui largement étudiée. Sa surface présente de nombreuses protéines, dont la plus connue est sans doute la périlipine. Si les périlipines ont dans un premier temps été cantonnées dans un rôle de « protection » du cœur de lipides neutres, on leur attribue également à présent un rôle majeur dans les interactions avec les lipases (Granneman et al., 2009; Miyoshi et al., 2006; Shen et al., 2009; Wang et al., 2009) ou co-lipases (Subramanian et al., 2004; Yamaguchi et al., 2004), faisant d'elles des acteurs majeurs dans la régulation de la lipolyse. D'autres protéines sont également présentes à la surface de la GL et l'étude de leur invalidation dans des modèles murins met en avant leur importance dans la stabilité de cet organelle ou dans la régulation de la lipolyse. Des travaux sont également focalisés sur la compréhension de la formation de la GL.

Depuis la description des animaux invalidés pour le gène de la Lhs, en 2000, de très nombreux travaux basés sur la création de modèles animaux ont permis de faire évoluer la connaissance de la lipolyse adipocytaire. A ce jour, aucun travail de synthèse n'avait été entrepris afin de résumer l'apport de ces modèles animaux dans l'étude de la lipolyse. L'opportunité d'effectuer ce travail pour *l'International Journal of Obesity* m'a semblée intéressante. Pour la rédaction de ce mémoire de thèse, j'ai donc fait le choix de présenter la partie introductive bibliographique de ce chapitre par le biais de cet article.



**Article**

# **Lipases adipocytaires et protéines associées à la gouttelette lipidique: étude des modèles murins transgéniques**

**Amandine Girousse<sup>1, 2</sup> et Dominique Langin<sup>1, 2, 3</sup>**

From <sup>1</sup> Inserm, U858, Obesity Research Laboratory, Team 4, Ranguel Institute of Molecular Medicine, BP 84225, F-31432 Toulouse Cedex 4, France

<sup>2</sup> University of Toulouse, IFR150, Paul Sabatier University, France

<sup>3</sup> Laboratory of clinical biochemistry, Toulouse University Hospitals, France

**Running head:** Animal models for the study of lipolysis

International Journal of Obesity (2010)

Diminution génique ou pharmacologique de la lipase hormono-sensible

1           **ADIPOCYTE LIPASES AND LIPID-DROPLET ASSOCIATED PROTEINS:**  
2                           **INSIGHT FROM TRANSGENIC MOUSE MODELS**

3  
4                           **Amandine Girousse<sup>1,2</sup> and Dominique Langin<sup>1,2,3</sup>**

5  
6   Amandine Girousse DVM

7   Dominique Langin DVM PhD

8   From <sup>1</sup>Laboratoire de Recherche sur les Obésités, INSERM U858-I2MR, Equipe 4, Toulouse, France

9   <sup>2</sup>University Paul Sabatier, Toulouse, France

10   <sup>3</sup>Laboratoire de biochimie, Institut Fédératif de Biologie, CHU de Toulouse, France

11   Address correspondance to: Dominique Langin, Laboratoire de Recherche sur les Obésités, INSERM  
12   U858-I2MR, Equipe 4, 1 avenue du Prof. Jean Poulhès, BP 84225, 31432 Toulouse Cedex 4. Phone:  
13   +33(0)5 61325628; Fax: +33(0)561325623; E-mail: [dominique.langin@inserm.fr](mailto:dominique.langin@inserm.fr)

14  
15   Running title: Animal models for the study of lipolysis

1 **Abstract**

2 Lipolysis is the catabolic process leading to the breakdown of stored triglycerides (TG) by  
3 lipases into fatty acids and glycerol. Recent advance in the study of this enzymatic cascade  
4 has led to a renewed and more complete view at lipolysis. Here we present an overview of  
5 transgenic mouse models that have changed the perspective of lipolysis. First, are presented  
6 genetic manipulations affecting lipases and then animal models concerning lipase co-factors  
7 and non-lipase lipid droplet-associated proteins. The role of hormone-sensitive lipase (HSL),  
8 long considered as the rate-limiting enzyme of TG hydrolysis, has been revisited by the  
9 discovery of adipose triglyceride lipase (ATGL). It is now accepted that ATGL initiates TG  
10 breakdown producing diglycerides that in turn are degraded by HSL. Furthermore, lipase  
11 activities are modulated by co-factors which deletions cause severe metabolic disturbances.  
12 Another major advance came from description of the involvement of non-lipase proteins in  
13 the regulation of lipolysis. The role of perilipins has extensively been investigated. Other  
14 newly discovered lipid droplet-associated proteins have also been shown to regulate lipolysis.  
15

16 **Keywords**

17 Transgenic mice, lipolysis, adipocyte, lipase, PAT protein, lipid droplet, obesity

## 1 **Introduction**

2 Adipose tissue (AT) is an organ specialized in energy storage as fat. During the postprandial  
3 state, excess of glucose and fatty acids (FA) are converted into triglyceride (TG), an  
4 energetically efficient storage form. When energy is needed (fasting, exercise) AT converts  
5 the stored TG into fuel molecules, FA, to be metabolized by requiring tissues, such as skeletal  
6 muscle and liver. AT can also be viewed as a buffer system preserving peripheral tissues from  
7 FA exposure. When AT can no more support its buffering role, other tissues can accumulate  
8 fat as a result. This ectopic fat deposition, mainly in skeletal muscle and liver, is well known  
9 to cause lipotoxic effects and metabolic disturbances commonly leading to insulin resistance.  
10 An imbalance in fat deposition/mobilization can therefore lead to obesity and associated  
11 disorders such as diabetes or metabolic syndrome.

12 Adipocyte may be considered as a functional unit controlling the balance between stored TG  
13 and released FA. TG are stored into a sub-unit called lipid droplet (LD) so that other  
14 intracellular organites are protected from lipotoxicity caused by FA. LD presents a core of TG  
15 and is surrounded by a monolayer of phospholipids and specific proteins. Lipolysis represents  
16 the sequential enzymatic breakdown of TG involving lipases and leading to the formation of  
17 one molecule of glycerol and three molecules of FA when the process is complete. The first  
18 ester bond of TG is preferentially hydrolyzed by adipose triglyceride lipase (ATGL) (also  
19 called desnutrin, PNPLA2 or IPLA<sub>2</sub>ζ). Hormone sensitive lipase (HSL) can also hydrolyze  
20 this first bond of TG in vitro but it has been shown that its preferential substrate are  
21 diglycerides (DG) leading to the formation of monoglycerides (MG). The final step of  
22 lipolysis is operated by monoglyceride lipase (MGL); however it has been described that HSL  
23 could also catalyze this final step in vitro. Furthermore, HSL presents hydrolase activity  
24 against cholesteryl and retinyl esters. Human lipolysis is a highly regulated process. In the  
25 basal state (unstimulated adipocyte) HSL remains in the cytosol while ATGL, and, the  
26 perilipin and comparative gene identification 58 (CGI-58) complex are located at the LD  
27 surface maintaining CGI-58 inactive and limiting basal ATGL-mediated lipolysis (Fig.1) <sup>1</sup>.  
28 Upon stimulation, activating and inhibiting pathways converge on protein kinase A or G  
29 phosphorylation that lead to HSL and perilipin phosphorylation. Phosphorylated HSL  
30 migrates from cytosol to the LD where it is enzymatically active while LD surface undergoes  
31 major rearrangements and fragmentation due to protein kinase-mediated phosphorylation of  
32 perilipin <sup>2</sup>. Perilipin phosphorylation is also responsible for CGI-58 release that can in turn  
33 play its cofactor role in contact with ATGL to initiate TG breakdown <sup>3-5</sup>. Thus, besides lipase  
34 intrinsic activity, adipocyte lipolysis is also determined by the control of lipase access to the  
35 lipid droplet. Over the past decade, many works have highlighted the importance of non-  
36 enzymatic proteins in lipolysis. CGI-58 is a protein that per se does not have enzymatic  
37 lipolytic properties but enhance ATGL activity in vitro and in vivo <sup>6</sup>. In addition, lipolysis is  
38 limited by LD-coating proteins such as perilipins, ADRP and CIDEC/Fsp27 forming a  
39 physical barrier between TG and lipases. LD proteins can also favour lipolysis by complexing  
40 with lipases and enhancing their access to TG. The structure comprising the lipases, lipase  
41 enzyme activity modulators and lipid associated proteins have been coined "lipolysome" <sup>7</sup>;  
42 LD must be considered as a site where complex fine tuned mechanisms control TG  
43 breakdown involving lipases and non-lipase proteins.

44 Over the past 10 years, several transgenic mouse models have been produced. This review  
45 will first focus on the models with genetically modified lipase expression and then on LD-  
46 associated protein models.

## 48 **I Genetic alteration of lipase expression**

49  
50 I.1- Hormone-sensitive lipase: the historic lipase.

1  
2 HSL is the lipase which has been the most intensively investigated through animal models of  
3 gene deletion or overexpression.  
4

5 **HSL gene invalidation models.** Four HSL-null mouse models have been created during the  
6 past decade. Yamada's and Holm's groups deleted the genomic region corresponding to the  
7 catalytic domain of HSL protein, while the Mitchell's group deleted a portion of exon 1 and  
8 intron 1<sup>8-10</sup>. Zechner's group deleted a larger region between exon 2 and 7<sup>11</sup>. In all models  
9 HSL mRNA and protein were undetectable.

10 **Functional consequences.** Enzymatic TG hydrolase activity assessed in vitro was decreased  
11 (50-60%) in WAT and testis but was not altered in other tissues suggesting differences in the  
12 relative importance of HSL and other TG hydrolases in these tissues<sup>8,11</sup>.

13 **Adipose tissue metabolism and inflammation.** Concerning adipocyte metabolism and  
14 lipolysis all studies (except that of Osuga et al.) showed an increase in basal glycerol release  
15 (50-80%)<sup>9-11</sup>. Data on non esterified FA (NEFA) release upon basal lipolysis were less  
16 coherent perhaps due to protocol differences which influence re-esterification. During  
17 stimulated lipolysis, glycerol and NEFA release was markedly decreased (28-44%) meaning  
18 reduced in vitro lipolytic capacity. In vivo lipolysis was reduced in the basal and  $\beta$ -adrenergic  
19 agonist-stimulated states<sup>8</sup>. In vivo and in vitro data well match together indicating blunted  
20 stimulated lipolysis. It is interesting to note that blunted stimulated lipolysis was also  
21 surprisingly observed in mice overexpressing HSL<sup>12</sup>.

22 Zechner's group highlighted defective cellular diglyceride (DG) catabolism in HSL null mice  
23 resulting in DG accumulation in several tissues (Fig. 2) with 5-fold increase in WAT and 2-  
24 fold increase in BAT<sup>11</sup> that can be completely restored by adipose-specific HSL rescue<sup>13</sup>. No  
25 MG accumulation was observed. Tissue TG were not modified except in BAT where they  
26 were increased. All together these experiments show a major role of HSL as a DG hydrolase  
27 in WAT<sup>8,11</sup>.

28 Ex vivo radiolabelled NEFA incorporation into TG and in vitro de novo lipogenesis were  
29 reduced in WAT of HSL-null mice. WAT mRNA expression and enzymatic activities of  
30 several genes involved in FA esterification were decreased in HSL-null mice. Expression of  
31 adipogenic and lipogenic genes were altered contributing to reduced TG synthesis and WAT  
32 mass in HSL-null mice<sup>14-16</sup>. The nuclear receptor PPAR $\gamma$  controls these pathways. It may  
33 therefore be hypothesized that HSL produces lipid-derived ligands activating PPAR $\gamma$ . Defect  
34 of PPAR $\gamma$  signalling may explain decreased TG synthesis and impairment of WAT  
35 development in HSL-null mice. However it is unlikely that HSL is involved in early stage of  
36 adipocyte differentiation since mouse embryonic fibroblasts derived from HSL-null mice  
37 differentiate well in mature adipocytes; HSL may be more important in terminal  
38 differentiation and cell hypertrophy<sup>17</sup>. Adipocyte differentiation could also be altered by DG  
39 accumulation or by the lack of HSL derived ligand for PPAR $\gamma$ <sup>15</sup>. Retinoic acid (RA)  
40 metabolites have been implicated in adipogenesis notably through the action of the nuclear  
41 receptor RXR $\alpha$ <sup>18</sup>. Since HSL can hydrolyse retinyl esters and therefore produces RA  
42 metabolites, Holm and colleague proposed that the defect of adipose mature differentiation in  
43 HSL-null mice could originate from the lack of RA metabolites<sup>19</sup>.

44 Reduced WAT mass is associated with heterogeneity in adipocyte size<sup>20</sup> or 3-fold  
45 enlargement of adipocytes<sup>10</sup> depending on AT localization and genetic background. Unlike  
46 WAT, brown adipose tissue (BAT) is increased (from 67 to 108%) in several models of HSL-  
47 null mice and present univocally enlarged adipocytes<sup>8,10,15</sup>.

48 Only a few studies investigated AT inflammation in HSL-null mice. AT inflammation of  
49 Mitchell's group HSL-null mouse model was undertaken in 2005 by Cinti and colleagues who  
50 have shown before that AT of ob/ob mice was massively infiltrated by macrophages

1 physically grouped around dead adipocytes, the so-called “crown like structures” (CLS)<sup>20</sup>.  
2 AT of HSL-deleted mice presented, as ob/ob mice, increased macrophage infiltration  
3 surrounding necrotic adipocytes. In these CLS, macrophages may act as scavengers of FA  
4 released by dead hypertrophied adipocytes. However, if AT is undoubtedly infiltrated by  
5 immune cells in HSL-null mice, one can not assert that this phenomenon is only and directly  
6 related to adipocyte hypertrophy. AT of these mice also presented smaller adipocytes whose  
7 metabolic features could be implicated in a recruitment process. Macrophage infiltration was  
8 confirmed in an independent model of HSL-null mouse bred in a mixed genetic background  
9 (C57BL/6 SV129) by galectin-3 immunohistochemistry in normal chow and high fat diet (HFD)  
10 fed mice<sup>21</sup>. The authors offer the hypothesis that in these mice, lack of HSL (endowed of  
11 retinyl ester hydrolase activity) could lead to a lack of production of retinoic acid (RA).  
12 Retinoic acid can act as an anti-inflammatory molecule by suppressing NFκB activity. As a  
13 result, the decrease in RA level in AT of HSL-null mice could lead to an increase of TNFα  
14 production and macrophage recruitment. To conclude HSL-null mice remain an unusual  
15 model of pronounced AT inflammation not associated with obesity (see below).

### 16 ***Global phenotype.***

17 Male infertility has been described in all models. Alteration of spermatid maturation and  
18 oligospermia but not hormonal status caused abnormalities in spermatogenesis leading to  
19 sterility<sup>8, 22</sup>. Indeed, specific expression of HSL in testis under the control of its own  
20 promoter rescued the phenotype of HSL-null mice<sup>23</sup>.

21 The major metabolic characteristic of HSL-null mice is that they are not obese. Indeed no  
22 differences in total body weight between HSL-null and wild type mice fed a normal chow diet  
23 were observed<sup>8-11</sup>. A single study showed 6 month-old HSL-null male mice leaner than WT  
24 animals with total weight recovery under adipose-specific HSL rescue<sup>13</sup>.

25 Furthermore, whatever enrichment of fat (31, 36 or 55% fat) and the duration of the diet (3, 6  
26 or 15 weeks), HSL-null mice fed a HFD failed to become obese and presented reduced WAT  
27 depots while BAT depot is systematically increased<sup>15, 24, 25</sup>. Weight of HSL-null mice is on  
28 average reduced by 15-25% versus WT mice at the end of the diet. Weight curves show that  
29 HSL-null mice gain as much weight as the WT mice at the early stages of the diet but  
30 suddenly stop putting on more weight. The weight gain stop occurs earlier in studies made  
31 with older mice<sup>25</sup>. This dissociation in weight curves is not dependent on gender or genetic  
32 background and has been observed in different models of HSL-null mice. Sekiya et al. also  
33 showed that HSL-null mice were resistant to genetic-induced obesity when they were bred on  
34 the ob/ob background<sup>26</sup>. What could drive the impairment in WAT development different in  
35 the case of HSL deficiency? Authors focused on three principal mechanisms influencing fat  
36 deposition: 1) food intake, 2) energy metabolism and 3) adipogenesis. Reduced weight gain in  
37 HSL-null mice is not consecutive to decreased food intake as it been observed to be increased  
38 or unchanged in two independent models. Unfortunately, the influence of leptin in this  
39 process was not investigated. Fat absorption was described to be normal in HSL-null mice<sup>15,</sup>  
40<sup>16</sup>. Secondly, weight gain could be modulated by changes in energy expenditure (EE). EE can  
41 be directly measured by indirect calorimetry or indirectly estimated via thermogenesis  
42 parameters. A single direct measurement of EE was performed on HSL-null male mice fed  
43 HFD. Whole body oxygen consumption was increased by 30% in HSL-null mice fed HFD for  
44 6 months without any modification in physical activity<sup>16</sup>. The authors depicted HSL-null  
45 HFD-fed mice as a “fat-burning model” presenting WAT with metabolic brown-like features:  
46 increased mitochondrial size in adipocyte, induction of UCP-1 expression, increased O<sub>2</sub>  
47 consumption in WAT. Harada et al. observed a delay in decreasing temperature and increased  
48 body weight loss in fasted HSL-null mice compared to WT mice speculating on an increase in  
49 EE. As described above, deletion in HSL also seems to drive impairment in adipogenesis  
50 during HFD. To conclude, the impairment to gain fat mass of HSL-null mice on HFD is

1 probably due to a defect in terminal adipocyte differentiation but direct in vitro evidence are  
2 lacking today. Lipid malabsorption is still debated and complementary calorimetric  
3 measurements are needed to confirm the potential rise in EE.

4 Zechner's group also investigated the consequences of HSL-null mice on plasmatic lipid  
5 profiles. In the fasted state, HSL-null mice presented an improved lipid profile (reduced TG,  
6 NEFA and VLDL-cholesterol, increased HDL-cholesterol)<sup>27</sup>. The reduced plasma TG levels  
7 could result from a rise of LPL activity in several tissues (WAT, BAT) resulting in an  
8 increased use of TG in the fasted state or modification in global FA re-esterification.

9 Typical in vivo tests for the assessment of glucose homeostasis and insulin sensitivity in HSL-  
10 null mice fed chow diet gave inconsistent results. Whole body glucose uptake measured by  
11 euglycaemic hyperinsulinemic clamp in the mouse lines of Zechner, Mitchell and Holm was  
12 not modified in HSL-null mice<sup>9, 24, 28</sup>. It was not assessed in Yamada line<sup>8</sup>. Responses to  
13 intraperitoneal glucose tolerance test (ipGTT) in Mitchell line differed depending on age,  
14 HSL-null mice being glucose intolerant at 5-month while showing unaltered or mildly  
15 improved glucose tolerance respectively at 4-month or 7-month. In Holm line, glycaemia  
16 during GTT was identically maintained in HSL-null mice while insulin concentration of HSL-  
17 null mice was markedly increased meaning reduced peripheral insulin efficiency<sup>9</sup>. Insulin  
18 tolerance test (ITT) revealed insulin-resistance in HSL-null mice in both models of Mitchell  
19 and Holm. However insulin sensitivity investigated in different organs showed conflicting  
20 results. Hepatic insulin sensitivity is improved in Zechner and Mitchell lines<sup>11, 24</sup> but  
21 decreased in Holm line<sup>9</sup>. Insulin-stimulated glucose uptake evaluated in skeletal muscle was  
22 intact in Zechner line but decreased in Holm line. In WAT, insulin-stimulated glucose uptake  
23 only investigated in Holm line was decreased making this model insulin resistant in different  
24 organs. In vitro experiments allowed the assessment of pancreatic insulin secretion in HSL-  
25 null models. Pancreatic islets challenges revealed reduced or intact glucose-stimulated insulin  
26 secretion respectively in Mitchell line<sup>29, 30</sup> and Holm line of HSL-null mice<sup>9</sup>. Recent data in  
27 mice presenting specific HSL deletion in pancreatic beta cells showed a major role of HSL in  
28 beta cell stimulus-secretion coupling and insulin secretion<sup>31</sup>. Beta cell-specific depletion of  
29 HSL resulted in hyperglycaemia due to impaired insulin secretion.

30 As a conclusion, the effects of HSL deficiency on glucose homeostasis and insulin sensitivity  
31 are still controversial. The results overviewed here suffer from heterogeneity in genetic  
32 background, ages of animal, standard diet composition or technical protocols (e.g. glucose or  
33 insulin dose in in vivo tests) that make them difficult to compare and to identify a global  
34 unique phenotype. Each transgenic model seems to present original characteristics,  
35 summarized in Figure 3, that make them more or less insulin sensitive.

36  
37 ***HSL overexpression models.*** In 2003, Lucas et al. produced a transgenic model of HSL  
38 overexpression<sup>12</sup>. Animals were microinjected with a fragment of 21kb of human HSL gene  
39 encompassing the exons encoding the adipocyte form of HSL. Another model of human HSL  
40 gene overexpression was created by Mitchell and colleagues in order to rescue the adipose  
41 expression of HSL in their model of HSL-null mice<sup>13</sup>. To this end a fragment containing all  
42 exon and intron sequences drove by the adipose specific promoter aP2 was injected into  
43 mouse oocytes.

44 ***Functional consequences. Adipose tissue metabolism.*** HSL activities against TG, DG or CE  
45 were increased in transgenic mice<sup>12</sup> but not fully restored in HSL-null mice<sup>13</sup>. Unexpectedly,  
46 stimulated in vitro lipolysis was blunted in mice over expressing HSL and in vivo lipolysis  
47 was not affected<sup>12</sup>. This intriguing result could arise from other TG lipases, such as ATGL or  
48 TGH whose expression could be perturbed by HSL over expression.

49 ***Global phenotype.*** Body weight and fat mass were slightly affected (14% decrease)  
50 depending on genetic background and diet<sup>12</sup>. HSL-rescued mice had the same weight as WT



1 mice while HSL KO mice were leaner<sup>13</sup>. Abdominal fat mass remained lower than in WT  
2 mice but more than 3-fold higher than in KO mice while subcutaneous fat was completely  
3 restored suggesting modifications in fat distribution after adipose HSL rescue.

#### 4 5 I.2- Adipose Triglyceride Lipase: the revolutionary lipase

6  
7 Studies on HSL-null mice lent support for the existence of a TG lipase besides HSL. In 2004,  
8 three independent groups characterized this new lipase. In silico screening for murine and  
9 human proteins with structural homologies to known lipases and presenting the lipase  
10 catalytic site consensus GX SXG and calcium-independent phospholipases A2 dual signature  
11 nucleotide (G/A) XGXXG was used to identify new lipases, termed adipose triglyceride  
12 lipase (ATGL) by Zimmermann and colleagues and iPLA<sub>2</sub>ζ by Jenkins et al.<sup>32, 33</sup>. At the  
13 same time, Villena et al. identified from a screen for adipocyte-specific genes using rat cDNA  
14 microarrays a protein specifically expressed in WAT that they named desnutrin as its mRNA  
15 expression varied with nutritional status in vivo<sup>34</sup>. The three candidates are identical and  
16 display TG hydrolase activity. Transacylase activity was reported for iPLA<sub>2</sub>ζ. The murine  
17 form of the lipase encodes a 486 amino acid protein (~54kDa). ATGL is predominantly  
18 expressed in WAT and BAT and to a lesser extent in testis, cardiac muscle and skeletal  
19 muscles.

20  
21 **ATGL deletion model.** Genetic manipulations affecting exon 1 including the translational  
22 start codon and the lipase consensus sequence motif results in the knock out of ATGL in mice  
23 with no protein production.

24 **Functional consequences.** TG hydrolase activity is markedly blunted by ATGL deletion  
25 since a decrease of more than 80% is observed in WAT and BAT. ATGL appears as a rate  
26 limiting enzyme for the initiation of TG catabolism as also shown in humans<sup>3</sup>.

27 **Adipose tissue metabolism.** Concerning lipolytic capacity of adipocytes, ATGL-null mice  
28 presented a marked blunted in vitro stimulated lipolysis while basal lipolysis was not affected.  
29 Accordingly, adipocyte size was largely increased in WAT and BAT.

30 **Global phenotype.** The major phenotypic consequence of ATGL depletion is a massive TG  
31 accumulation in several adipose and non adipose organs with the cardiac muscle being the  
32 most affected organ (20 fold increase in TG content) (Fig. 2). ATGL-null mice are 10%  
33 heavier than WT mice and present an important increase in WAT and BAT weight. Supra-  
34 physiological TG accumulation in cardiac muscle that leads to lethal impairment of the  
35 cardiac function from 12 weeks of age is completely prevented in ATGL-null mice with  
36 specific rescue of the protein in cardiac muscle<sup>35</sup>. Defect in thermoregulation and reduced EE  
37 during fasting is another feature of ATGL-null mice depicting an inability of mobilizing  
38 enough FA as fuel. Global insulin sensitivity tested in vivo was improved in ATGL-null mice.  
39 Glucose tolerance was also improved in the first mixed genetic background but not affected in  
40 pure C57BL/6 ATGL-null mice<sup>36, 37</sup>. Glucose utilization could be induced as FA availability  
41 is reduced. Fasting plasma insulin and glucose were reduced in ATGL-null mice. In vivo and  
42 ex vivo experience realized by Peyot and colleagues provided evidence that fuel and non-fuel  
43 stimulated insulin secretory function was altered in mice when ATGL is deleted<sup>37</sup>. Changes  
44 in signalling lipids derived from islet lipolysis rather than islet TG accumulation is thought to  
45 be implicated in the impairment of stimulated insulin secretion.

46 As a conclusion, ATGL-null mice represent an interesting model but interpretation of the  
47 phenotypes is still uneasy since no discrimination of ATGL deletion consequences can be  
48 made between adipose and other tissues. The best example resides in the interpretation of  
49 global insulin sensitivity improvement that can mainly results from a peripheral adaptation to  
50 pancreatic ATGL-related alteration. However, it is not questionable that ATGL play a major

1 role in adipose and non-adipose lipolysis, and represents the rate limiting enzyme for the first  
2 step of TG breakdown. Table 1 summarizes the major phenotypic features of both HSL and  
3 ATGL-null mice.

4  
5 **ATGL overexpression model.** ATGL overexpression was performed by Ahmadian and  
6 colleagues creating a mouse model of adipose specific ATGL overexpression under the  
7 control of the FABP4 promoter<sup>38</sup>. ATGL mRNA was more than 4-fold and 3-fold increased  
8 respectively in WAT and BAT. At the protein level, ATGL was doubled in both tissues.

9 **Functional consequences.** The rise in ATGL expression in WAT was accompanied by a  
10 marked increase in TG hydrolase activity in vitro. Notably, ATGL over expression in WAT  
11 led to the increase in the expression of its co-activator CGI-58.

12 **Adipose tissue metabolism.** Major features reside in increase of basal lipolysis while  
13 stimulated lipolysis is half blunted. The reduced adipocyte size observed in the transgenic  
14 animals agrees well with in vitro data showing that LD size is decreased following ATGL  
15 overexpression<sup>39</sup>.

16 **Global phenotype.** Fed a normal chow diet, transgenic mice grew up normally and did not  
17 present any weight difference while, upon HFD, ATGL overexpression led to leaner animals  
18 with reduced fat pads. The decreased fat deposition was not due to a diminution in food intake  
19 or a defect in adipogenesis but rather to a rise in EE. Indeed transgenic animals are more  
20 thermogenic and present a “brown-like” WAT whose oxidative capacities are increased.  
21 Skeletal muscle did not seem to be involved in the increase of EE. However, skeletal muscle  
22 oxidative capacities have not been studied. Lipid metabolism investigated in vitro and in vivo  
23 is slightly affected by ATGL over expression. Intriguingly no change in fasted plasma NEFA,  
24 glycerol or TG was associated with lipolytic defect in ATGL overexpressing mice fed chow  
25 diet or HFD raising the possibility of changes in re-esterification fluxes in transgenic mice.  
26 The other characteristic of this model was the improvement of insulin sensitivity assessed by  
27 hyperinsulinemic euglycaemic clamp. The rise in whole body glucose uptake is mainly due to  
28 skeletal muscle while WAT does not seem to play part in this phenomenon. Hepatic insulin  
29 sensitivity is also improved. Changes in insulin sensitivity observed in transgenic animals can  
30 not be explained by plasma NEFA, adiponectin or leptin level as these parameters were not  
31 affected whatever the diet and the nutritional status. Fasted glucose and insulin levels together  
32 with GTT would have provided information about glucose tolerance and insulin secretion.

33  
34 I.3- Other lipases: unsuspected players?

35  
36 I.3.1- Monoglyceride lipase

37  
38 MGL catalyzes the final step of TG breakdown by hydrolyzing MG to glycerol and FA. This  
39 33kDa lipase belongs to the serine hydrolase superfamily<sup>40</sup>. In vitro studies provided the  
40 evidence that MGL specifically hydrolyzes MG (1(3) and 2-ester bonds equivalently) and has  
41 no activity against TG or DG. MGL is therefore essential for complete TG hydrolysis. At a  
42 cellular level, MGL stands in the cytoplasm, plasma membrane and on LD. MGL presents a  
43 broad expression profile including WAT, lung, liver, kidneys, testes, brain and heart<sup>41</sup>. It is  
44 unlikely that MGL is limiting in lipolysis as it is very abundant in WAT and is not extensively  
45 regulated by nutritional status in this tissue<sup>42</sup>. Unfortunately consequences of deletion of over  
46 expression in vivo are unknown due to the lack of transgenic models.

47  
48 I.3.2- Triacylglycerol hydrolases

49

1 Triacylglycerol hydrolases including TGH-1 (first described as TGH/Ces3) and TGH-2 (Ces-  
2 ML1) are members of the carboxyl esterase family presenting several similarities in protein  
3 structure and function<sup>43,44</sup>. Concerning tissue distribution both TGH-1 and TGH-2 are mainly  
4 expressed in liver but also substantially in AT, small intestine and kidney (TGH-1 is also  
5 expressed in cardiac muscle, however this has not been explored for TGH-2). These enzymes  
6 hydrolyze preferentially TG (short chain more than long chain TG) and do not present any  
7 activity towards DG, phospholipids or cholesteryl esters. In vitro experiments implicating  
8 TGH-1 and TGH-2 in TG mobilization remain conflicting<sup>44-49</sup>. Although the respective roles  
9 of ATGL and TGH in lipolysis were not explored in these experiments, one could speculate  
10 that TGH-1 and TGH-2 could take part in the lipolytic process.

11  
12 **TGH-1 invalidation model.** TGH-1-null mice resulting from exon 5 disruption did not present  
13 any TGH protein in tissues where its expression has been reported<sup>50</sup>.

14 **Functional consequences.** Total in vitro hydrolase activity of AT is 70% decrease when  
15 THG-1 is lacking (Fig. 2). However the substrate used in vitro by the authors is a MG analog  
16 rather than a real TG; in vitro hydrolase activity against TG should be reevaluated in order to  
17 ascertain the real impact of adipose TGH-1 deletion on TG breakdown. Moreover in vitro  
18 extinction of ATGL and HSL leads to negligible residual TG hydrolase activity minimizing  
19 TGH implication in TG breakdown<sup>3,49</sup>.

20 **Adipose tissue metabolism.** Enlarged WAT depot (70%) observed in TGH-1-null mice is  
21 associated with increased adipocyte size. Plasma FA and glycerol levels measured in both fed  
22 and fasted states suggest an impairment of fat mobilization.

23 **Global phenotype.** TGH-1 deletion affects predominantly the liver. The liver phenotype is  
24 characterized by decreased liver weight, TG accumulation, lipolysis and VLDL secretion  
25 mainly due to increased FA oxidation. The regulation of energy balance in TGH-1-null mice  
26 remains elusive. The mice showed increased fat mass and increased food intake but no change  
27 in body weight. As TGH is expressed in the intestine, lack of the enzyme could affect lipid  
28 absorption and / or food intake through modulation of gastrointestinal peptide production.  
29 Global improvement of glucose tolerance and insulin sensitivity was observed in TGH-1-null  
30 mice. Nevertheless, given the importance of 1) liver in insulin sensitivity and 2) the major  
31 expression of TGH-1 in this organ, no obvious conclusion can be drawn about the importance  
32 of AT TGH-1 deletion on insulin sensitivity.

33 The authors mentioned that tissue-specific TGH-1-null mice were being produced. Adipose  
34 specific double TGH-1/TGH-2-null mice associated with in vitro extinctions could represent  
35 useful models to completely abrogate TGH activity in adipocyte and settle the importance of  
36 these lipases in lipolysis.

## 37 38 **II Genetic modulation of co-lipase and lipid droplet associated proteins**

39  
40 Besides lipases, other proteins play an essential role in the control of AT lipolysis. Here we  
41 review the different animal models exploring deletion or over expression of lipase-associated  
42 proteins and lipid droplet-associated proteins.

### 43 44 **II.1- ATGL regulators**

45  
46 Recent works revealed that ATGL activity could be positively or negatively regulated by  
47 proteins with no lipolytic capacity per se and called co-factors. The precise mechanisms by  
48 which they regulate ATGL activity are still unclear but in vitro and in vivo experiments  
49 suggest their importance in the lipolytic process.

1 CGI-58 also called ABHD5 ( $\alpha/\beta$ -hydrolase domain containing-5) has first been described in  
2 humans as its deletion causes neutral lipid storage disease also called Chanarin Dorfman  
3 Syndrome that differs from ATGL deletion only by additional ichthyosis<sup>51</sup>. This rare genetic  
4 disease is characterized by abnormal intracellular lipid accumulation in several tissues. Lass et  
5 al. demonstrated the role of CGI-58 in stimulated lipolysis as a specific activator of ATGL,  
6 but not HLS<sup>6</sup>. In vitro experiments highlighted the interaction of CGI-58 with LD-associated  
7 proteins such as perilipin (PLIN) 1 or PLIN2 (ADRP)<sup>52</sup>. When lipolysis is stimulated by  
8 hormonal factors in vitro, PKA stimulation and PLIN1 phosphorylation leads to CGI-58  
9 release from LD and translocation near ATGL<sup>52-54</sup>. Yamagushi and colleagues showed that  
10 CGI-58 is not a lipase per se but is rather a co-activator of ATGL that facilitates lipolysis.  
11 CGI-58 also present a transacylase enzyme activity. Yang et al. have recently reported a  
12 splicing variant isoform of murine CGI-58, called mCGI-58S that lacks the capability to  
13 activate ATGL but maintains its transacylase function<sup>55</sup>. It can therefore be postulated that  
14 the control of CGI-58 pre mRNA splicing could play a role in the modulation of lipolysis.

15  
16 **CGI-58 invalidation model.** Zechner's group produced animals deleted for abhd5 gene  
17 coding for CGI-58. Deleted animal did not present CGI-58 protein in adipose tissue<sup>56</sup>.

18 **Functional consequences.** TG hydrolase activity measured in murine embryonic fibroblasts  
19 (MEF) was markedly reduced in the absence of CGI-58.

20 **Adipose tissue metabolism.** In vitro TG accumulation was increased in CGI-58-null MEF  
21 indicating rise in lipogenesis. Defective lipolysis was also observed.

22 **Global phenotype.** CGI-58-null newborns presented two major features: 1) ectopic TG  
23 accumulation in several tissues including non adipose tissues and 2) impaired development of  
24 the skin permeability barrier that led to premature death just after birth limiting the metabolic  
25 phenotyping of the animals. TG accumulation was not likely due to inability of CGI-58 to  
26 activate ATGL as is the case in human disease<sup>6</sup> but rather involves another undescribed  
27 lipase. This phenotype clearly points out a major role of CGI-58 in TG metabolism. An  
28 adipose specific deletion of CGI-58 or a time specific CGI-58 deletion would be valuable to  
29 further dissect the role of this protein in vivo. On the other hand, it would be interesting to  
30 compare an AT-specific over expression of CGI-58 in ATGL over expressing mice.

31  
32 G0/G1 switch gene 2 (G0S2) encodes a protein first described in human mononuclear cells  
33 and suspected to be involved in cell cycle regulation although this function has never been  
34 really established. G0S2 is ubiquitously expressed at high levels in WAT and BAT and to a  
35 lesser extent in liver, skeletal muscle and heart. G0S2 intracellular localization is still a matter  
36 of debate and is certainly linked to cell type and to cellular metabolic status. In adipocyte,  
37 G0S2 colocalizes with ATGL on LD<sup>57</sup>. Several putative roles have been ascribed to G0S2.  
38 However, the recent work of Yang and colleagues shows that G0S2 plays an important role in  
39 lipolysis by inhibiting ATGL activity. G0S2 binds directly to ATGL and dose dependently  
40 inhibits its TG hydrolase activity in the presence and absence of the co-activator CGI-58.  
41 Different hypothesis could illustrate this inhibitory mechanism: 1) G0S2 could affect  
42 substrate accessibility to ATGL, 2) G0S2 could alter ATGL conformation or 3) G0S2 could  
43 divert ATGL primary TG hydrolase function to an acyl transferase activity. Other questions,  
44 discussed by D. Brasaemle, emerge from this work namely G0S2 implication at the LD,  
45 competition with CGI-58 or additional function<sup>58</sup>. As a conclusion it is puzzling to note the  
46 contrast between the ubiquitous expression of G0S2 and its involvement in a tightly  
47 mechanistic process such as adipocyte lipolysis. Animal models of G0S2 over expression or  
48 deletion are missing to gain further insights into G0S2 function in AT.

49  
50 II.2- Adipose tissue fatty acid-binding proteins

1  
2 Fatty acid-binding proteins (FABP) represent a large family of intracellular proteins capable  
3 to selectively bind hydrophobic ligands such as fatty acids. Two forms of FABP are expressed  
4 in adipose tissue: the most abundant form is the adipose-FABP/FABP4 (or aP2 which is the  
5 product of the fabp4 gene) and the minor form is epithelial or epidermal-FABP/FABP5 the  
6 product of the fabp5 gene. Different works have shown FABP upregulation associated with  
7 obesity and brought out the question of implication of FABP in the development of the  
8 metabolic syndrome<sup>59, 60</sup>. FABP4 has been implicated in solubility of hydrophobic  
9 intracellular compounds and in long-chain FA trafficking. Furthermore, FABP4 bound to FA  
10 can complex with activated HSL via the regulating docking domain of the enzyme<sup>61</sup>. This is  
11 supposed to facilitate lipolysis by clearing out product FA<sup>62, 63</sup>. However, FABP4 role may be  
12 more complex. Besides its role in FA efflux FABP4 could be implicated in the regulation of  
13 lipolysis either through delivering of FA provoking a feedback inhibition of HSL or affecting  
14 HSL dimerization position on the LD<sup>64</sup>.

15 **FABP4 invalidation model.** By a null mutation in the fabp4 gene, Hotamisligil and  
16 Spiegelman created animal that completely lacked FABP4 protein in AT<sup>65</sup>. FABP4 deletion  
17 was partially compensated by FABP5.

18 **Functional consequences.** The effect of FABP4 deletion on TG hydrolase activity was not  
19 determined.

20 **Adipose tissue metabolism.** In vitro and in vivo lipolysis were reduced in FABP4-null mice<sup>59,</sup>  
21 <sup>66-68</sup>. Furthermore, FA efflux is markedly reduced in FABP4-null mice.

22 **Global phenotype.** FABP4-deleted mice did showed normal weight when fed a standard chow  
23 diet. Upon HFD, FABP4 depletion did not lead to heavier animals; however adipose mass is  
24 enlarged<sup>59, 65</sup>. Increase in AT mass despite similar food intake and normal or diminished EE  
25 can result from gene expression re-programming promoting de novo lipogenesis from  
26 lipolysis. Surprisingly the diet-induced obesity developed by FABP4-null mice was  
27 uncoupled from insulin resistance and AT inflammation<sup>65</sup>. Increase in adiponectin and  
28 reduced expression of TNF $\alpha$  have been proposed to participate in the mechanism of insulin  
29 sensitivity protection<sup>59, 65</sup>. This model points that besides direct enzyme activity modification  
30 and lipid droplet protein content alteration other lipolysis regulatory nodes exist such as FA  
31 handling.

32

### 33 II.3- PAT proteins and other lipid droplet associated proteins

34

#### 35 *PAT family*

36 Lipid droplets are surrounded by a phospholipid monolayer and coated with several proteins  
37 collectively grouped in the PAT family. This group includes perilipins, adipose  
38 differentiation-related protein (also called adipophilin), Tip-47 (Tail-Interacting Protein of  
39 47kDa), S3-12 and OXPAT (for PAT family protein expressed in oxidative tissues but also  
40 termed MLDP or LSDP5). A recent unified nomenclature has been adopted for these proteins;  
41 they should be respectively named PLIN1, PLIN2, PLIN3, PLIN4 and PLIN5<sup>69</sup>. The tissue  
42 expression of PLIN1 (perilipin, products of the Plin gene) and PLIN 4 (S3-12) is chiefly  
43 limited to WAT while PLIN1 is also expressed in BAT. PLIN1 is expressed at lower levels in  
44 steroidogenic tissues and PLIN4 in heart and skeletal muscles. PLIN1 presents 3 isoforms;  
45 PLIN1a and PLIN1b are respectively the major and the minor forms on LD of adipocytes  
46 while PLIN1c is only expressed in non-adipose tissues. PLIN5 (OXPAT) expression is  
47 essentially in tissues with high oxidative capacities such as BAT and skeletal muscles  
48 whereas PLIN2 (ADRP) and PLIN3 (Tip-47) are more ubiquitously expressed in cells  
49 containing LD.

1 **Perilipin invalidation models.** Two independent animal models of perilipin deletion (PLIN1-  
2 null mice) targeting exon 2 or exons 5 and 6 were produced and lead to the complete absence  
3 of PLIN1 in AT<sup>70,71</sup>.

4 **Functional consequences.** PLIN1 deletion is associated with increased DG hydrolase activity  
5 in WAT whereas the level of HSL protein is constant<sup>70</sup>.

6 **Adipose tissue metabolism.** PLIN1-null mice showed increased basal lipolysis (Fig. 4) and  
7 blunted stimulated lipolysis. The rise in basal lipolysis have first been attributed to increased  
8 HSL activity, however there are still discrepancies about HSL quantification in the tissue and  
9 involvement of other TG hydrolases had not been evaluated at the time of the experiment. In  
10 light of new knowledge about the relations between PLIN1 and CGI-58 and the activator role  
11 of CGI-58 on ATGL activity one can think that PLIN1 depletion could impact on ATGL  
12 activity in basal lipolysis. In vivo basal lipolysis on the other hand is not modified indicating  
13 other regulatory mechanisms implicated at the organism level. In the two models, PLIN1-null  
14 mice have reduced body fat (with a marked decrease in WAT fat pads, reduced adipocyte size  
15 and TG content) while muscular mass is increased.

16 **Global phenotype.** Fed a normal chow diet, PLIN1-null mice did not present any modification  
17 of body weight compared to WT littermates<sup>70,71</sup>. However, PLIN1-null mice are resistant to  
18 HFD and genetic-induced obesities. Food intake has been reported as increased or unchanged.  
19 Increase in EE is responsible for WAT reduction observed in PLIN1-null mice. WAT also  
20 presented a pro-oxidative profile as several genes involved in  $\beta$ -oxydation are upregulated in  
21 these mice<sup>72</sup>. This result has been confirmed at the functional level by the rise in palmitate  
22 oxidation in adipocyte (also observed in soleus muscle and hepatocyte)<sup>73</sup>. The ATGL  
23 overexpression model also show increased basal lipolysis, decreased stimulated lipolysis  
24 associated with a rise of oxidative capacity. It could be speculated that the adipose tissue  
25 phenotype observed in PLIN1-null mice result from increased ATGL /CGI-58 activity.

26 Because PLIN1-null mice were more oxidative, insulin sensitivity could have been improved  
27 in these animals. That is the case for young animals (until 14 weeks); however glucose  
28 intolerance and insulin resistance is observed with age in PLIN1-deleted mice. It is unknown  
29 whether the deterioration in insulin sensitivity is not-associated with an impairment in  
30 oxidative capacity.

31  
32 Miyoshi and colleagues have investigated the effects of adipose-specific human or murine  
33 PLIN1a overexpression in mice<sup>74</sup>.

34 **Perilipin overexpression model.** Thanks to the murine FABP4 promoter, human or murine  
35 PLIN1a was overexpressed in AT and led to a two-fold and five-fold increase of PLIN1a  
36 protein expression in WAT and BAT, respectively.

37 **Functional consequences.** The effect of PLIN1a overexpression on TG hydrolase activity  
38 was not determined.

39 **Adipose tissue metabolism.** Basal lipolysis assessed in isolated adipocytes from mice fed  
40 normal chow diet was not altered in transgenic mice whereas it was decreased in HFD-fed  
41 transgenic mice. PLIN1 overexpression led to reduced stimulated lipolysis in transgenic mice  
42 whatever the diet (except for the murine transgene in HFD condition).

43 **Global phenotype.** The consequences on body weight were gender and transgene dependent  
44<sup>74</sup>. Fed normal chow diet transgenic mice present a weight comparable to WT control mice  
45 whereas upon HFD they were 20 % leaner and showed reduced fat pads despite as similar  
46 food intake. Both deletion and overexpression leads to a protection against diet-induced  
47 obesity. Similarly to PLIN1-null mice, increase in oxygen consumption and up regulation of  
48  $\beta$ -oxydation gene expression was observed in WAT and BAT of mice over expressing PLIN1  
49 and was thought to play part into the lean phenotype. Glucose homeostasis was not modified

1 in transgenic mice fed chow diet but PLIN1 overexpression protected mice against HFD-  
2 induced glucose intolerance and insulin intolerance.  
3 Finally, it is interesting to note that reduction and increase in PLIN1 expression result in  
4 blunted stimulated lipolysis implying that a fine tune regulation of this protein at the surface  
5 of the LD is essential for the lipolytic process. The reduced basal lipolysis when PLIN1 is  
6 over expressed on a HFD fits with its functional role of LD barrier.

7  
8 Although PLIN2 is expressed in WAT its deletion in mice has no major impact on this tissue  
9 as lipolysis was not affected in PLIN2-null mice <sup>75</sup>. These experiments also informed about  
10 the fact that 1) PLIN2 is not implicated in lipolysis regulation and 2) absence of PLIN2 was  
11 not compensated by other PAT proteins. On the other hand PLIN2 deletion impacted more  
12 profoundly the liver as PLIN2-null mice fed HFD were protected from HFD-induced hepatic  
13 steatosis.

14  
15 PLIN3 deletion or overexpression has not been yet investigated in transgenic models.  
16 However, such models could be of interest regarding promising results obtained in vitro that  
17 showed increased lipolysis due to increased ATGL localization to the LD consecutive to  
18 reduced expression of PLIN3 <sup>76</sup>. Furthermore, Beller and colleagues highlighted a new protein  
19 trafficking around LD that implicates reduced PLIN3 LD localization mediated by COPI <sup>77</sup>.  
20 As a result of COPI trafficking, ATGL LD localization is prevented and lipolysis is reduced.  
21 Together these results reinforce the potential role of LD-associated proteins in the control of  
22 lipolysis and emphasize the need of novel animal models to investigate integrated  
23 mechanisms.

#### 24 25 *CIDE family*

26 Over the past few years, new LD associated proteins have been described such as protein of  
27 the CIDE family (Cell death-Inducing DNA Fragmentation Factor- $\alpha$ -like Effector) and Arf /  
28 Cop proteins.

29 The CIDE family includes three members (Cidea, Cideb and Cidec/Fsp27) presenting  
30 specificity in tissue expression <sup>78</sup>. While Cidea and Cideb are not expressed in mouse WAT,  
31 their deletion in vivo led to leaner phenotype and resistance to diet-induced obesity associated  
32 with insulin sensitivity <sup>79, 80</sup>. In both models the rise in global EE is driven by improvement of  
33 metabolic features of a unique organ, respectively BAT and liver. Cidea depletion could  
34 stabilize AMPK complex thus enhancing its activity promoting FA oxidation <sup>81</sup>. The lean  
35 phenotype of Cideb-null mice could result from decrease of hepatic VLDL secretion and de  
36 novo FA synthesis associated with enhancement of hepatic oxidative capacities <sup>82</sup>. Cidec was  
37 first described up regulated during adipogenesis and highly expressed in WAT and BAT <sup>79, 83</sup>.  
38 Puri and colleagues demonstrated in vitro that Cidec subcellular localization in adipocyte was  
39 restricted around the LD as PLIN1 but constituting a more discontinued ring <sup>84</sup>.

40 ***Cidec deletion models.*** Two in vivo models of Cidec deletion (targeting either the first two  
41 exons or the initiation site ATG in exon 2) led to the complete absence of Cidec protein in  
42 WAT and BAT <sup>85, 86</sup>.

43 ***Adipose tissue metabolism.*** Cidec depletion massively affected white adipocyte metabolism:  
44 1) basal lipolysis was increased while stimulated lipolysis was not affected <sup>85</sup> or decreased <sup>86</sup>.  
45 Furthermore both groups depicted changes in WAT morphology: increased vascularization,  
46 brown color and interestingly multilocularization of LD (Fig. 4).

47 ***Global phenotype.*** While no major effects of Cidec deletion at the whole body level was  
48 pointed out when mice were fed a normal chow diet besides an age-related reduction in WAT,  
49 HFD-fed Cidec-null mice failed to become obese because of increase in EE associated with  
50 increased mitochondriogenesis and oxidative capacities. Reduction of weight was associated

1 with WAT and lipid content reduction. The WAT phenotype was thought to favour improved  
2 insulin sensitivity in Cidec null mice. Together these results emphasize a major role of Cidec  
3 in LD metabolism regulation and at a larger scale in energy homeostasis.

#### 4 *Caveolins*

5 Caveolae are specialized membrane microdomains enriched in cholesterol and  
6 glycosphingolipids highly present in adipocytes, endothelial cells, fibroblasts and type I  
7 pneumocytes. Caveolin 1 (Cav-1) is the major protein of these organelles. They have been  
8 implicated in cell signal transduction, metabolite trafficking or endocytosis/transcytosis. Pol  
9 and colleagues have described, in the adipocyte, the migration of Cav-1 from plasma  
10 membrane to the surface of LD in response to FA treatment leading to the emerging idea that  
11 Cav-1 could play a role in lipid transport or storage in the LD <sup>87</sup>.

12 ***Caveolin deletion model.*** Deletion of Cav-1 gene through disruption of the first two exons  
13 and a small portion of the 5' promoter sequence led to the complete loss of Cav-1 protein  
14 expression in mice <sup>88</sup>.

15 ***Functional consequences.*** Adipocytes of Cav-1 null mice did not exhibit modification of  
16 HSL protein content <sup>89</sup>. However, although PKA activity is enhanced, PLIN1 phosphorylation  
17 is largely reduced in these animals. As a result, Cav-1 null mice presented markedly reduced  
18 lipolytic activity. Cav-1 appears therefore implicated in the physical coupling of PKA to  
19 perilipin.

20 ***Adipose tissue metabolism and global phenotype.*** Cav-1-null mice showed resistance to HFD  
21 and reduced WAT associated with adipocyte size heterogeneity and interstitial fibrosis and  
22 hypercellularity <sup>88,90</sup>. Reduced WAT of Cav-1-null mice likely resulted of adipogenesis defect  
23 and impaired lipid storage possibly due to blunted insulin signalling in adipocyte <sup>89,91</sup>.

### 24 **III A transversal view**

25  
26  
27  
28 During the last decade, the study of these animal models has greatly changed the perspectives  
29 on AT lipolysis and highlighted the importance of lipases and associated proteins including in  
30 non adipose tissues. HSL invalidation first led to the concept of an additional TG hydrolase  
31 and then to the characterization of ATGL whose importance in basal and stimulated lipolysis  
32 has now been established both in vitro and in vivo. Another major step forward was the  
33 recognition of the importance of proteins devoid of lipase activity in the control of lipolysis.  
34 Co-factors such as CGI-58, G0S2 or even FABP4 can modulate lipolytic activity by direct or  
35 indirect interaction with lipases. Furthermore, LD coating proteins have been implicated in  
36 regulation of both basal and stimulated lipolysis in vivo. However differences between mice  
37 and human concerning the regulation of lipolysis should be kept in mind when interpreting  
38 results <sup>92</sup>.

39 Most of the models presented in this review revealed moderate or strong resistance to diet-  
40 induced obesity underlying the importance of basal lipolysis in the modification of body  
41 weight and fat mass (Fig. 5). However, obesity is characterized by the alteration of more than  
42 one of the lipases or associated proteins <sup>93, 94</sup>. On the other hand, complete invalidation  
43 models do not well reproduce alteration of expression level observed during obesity since  
44 only partial decrease in expression are observed. Moreover, knock-out strategy leads to  
45 drastic phenotypes that could develop compensatory mechanisms. They answer more  
46 appropriately to mechanistic issues than to global physiopathological questions. Use of  
47 multiple deletion models and/or heterozygous model represents attractive approaches.  
48 Pharmacological inhibition of lipolysis would also be a valuable strategy. In vivo experiments  
49 showed that HFD-fed animals treated with acipimox, the nicotinic receptor agonist, presented  
50 reduced plasma FA along with improved insulin sensitivity <sup>95</sup>. In the line of limiting



1 deleterious FA release characterizing the metabolic syndrome, several pharmaceutical groups  
2 started to develop small-molecule modulators of lipolysis including HSL inhibitors<sup>96, 97</sup>.  
3 MGL and TGH inhibitors are also available for in vitro purposes<sup>98-100</sup>. As an alternative to  
4 transgenic models one could consider in vivo pharmacological chronic treatments with such  
5 molecules. However pharmacological approaches do not address caveats linked to tissue  
6 specificity.

7 Associated with resistance to diet-induced obesity discussed before, one feature of some of  
8 the models reviewed here is the more or less pronounced “BAT-like” phenotype acquired by  
9 WAT consecutive to lipase or associated protein deletion. WAT presented increased oxidative  
10 capacities that were accompanied by improvement of insulin sensitivity. Making white  
11 adipocyte browner may be viewed as the Holy Grail<sup>101</sup>. However, the links between FA  
12 fluxes in adipocyte and mitochondrial metabolism reprogramming still needs to be studied in  
13 depth. To this end double deletion of lipase and PPAR $\alpha$  could be useful. Another attractive  
14 axis resides in studying besides lipid droplet stabilization, the lipid droplet formation itself  
15 (reviewed in<sup>102</sup>).

16 Establishment of a transversal view of these models concerning lipolysis regulation, energy  
17 metabolism or even insulin sensitivity suffers from i) the multiplicity of genetic backgrounds  
18 and backcross level observed among the different models and even within the same model of  
19 gene deletion; ii) age at the time of the experiment and gender, and iii) differences in fat  
20 content in the diet and duration of the diet. Moreover, lipases such as HSL possess different  
21 enzyme activities that confuse the global interpretation of the phenotype. The relative  
22 importance of the various enzymatic activities is often tissue-dependent.

23 Transgenic animal models present a number of limitations that complicate the interpretation  
24 of phenotypes in vivo. Since lipases are not only expressed in AT but also often in several non  
25 adipose organs such as liver, skeletal muscles or steroidogenic tissues, complete deletion of  
26 these proteins in animals drives complex metabolic consequences not only resulting from  
27 alteration of AT lipolysis. AT specific deletion, classically employing a 5.4-kb FABP4  
28 promoter segment<sup>103</sup> and the Cre-loxP system, could bypass this issue. This method could be  
29 of a great interest in case of premature death or growth defect such as with CGI-58-null mice.  
30 In the case of HSL and ATGL, both significantly expressed in muscle and in pancreas,  
31 specific targeting in AT could help to discriminate peripheral effects on insulin sensitivity.  
32 Over expression model are less concerned by this issue since transgene expression is led by  
33 an adipose specific promoter. However, specific AT expression of the FABP4 promoter has  
34 been questioned as ectopic recombination may occur in the central and peripheral nervous  
35 system<sup>104, 105</sup>, macrophage<sup>106, 107</sup> and endothelial cells<sup>108</sup>. A promoter cassette of the  
36 adiponectin gene recently identified and characterized by Scherer’s group may convey a  
37 unique AT specificity<sup>109</sup>. This work offers new perspectives for adipose specific functional  
38 studies.

39 As a conclusion, despite the problems listed above, animal models still represent powerful  
40 tools to define gene functions and keep a place of interest making irreplaceable link between  
41 in vitro approaches and clinical studies. Adipose biology understanding remains a major  
42 challenge in order to delineate new preventive and therapeutic strategies to address the  
43 medical issues related to obesity and associated complications.

#### 44 **Acknowledgements**

45 AG was supported by INSERM and the Fondation pour la Recherche Médicale  
46 ([www.frm.org](http://www.frm.org)). The laboratory of the authors was supported by Inserm, Fondation pour la  
47 Recherche Médicale ([www.frm.org](http://www.frm.org)) and the Commission of the European Communities  
48 (Integrated Project HEPADIP ([www.hepadip.org](http://www.hepadip.org)), Contract No. LSH-2003-1.1.3-1, and

1 Collaborative Project ADAPT ([www.adapt-eu.net](http://www.adapt-eu.net)), Contract No. HEALTH-F2-2008-2011  
2 00).

#### 4 **Conflict of interest**

5 The authors declare no duality of interest.

#### 7 **References**

- 9 1. Bezaire V, Langin D. Regulation of adipose tissue lipolysis revisited. *Proc Nutr Soc*  
10 2009; **68**(4): 350-60.
- 11 2. Marcinkiewicz A, Gauthier D, Garcia A, Brasaemle DL. The phosphorylation of  
12 serine 492 of perilipin a directs lipid droplet fragmentation and dispersion. *J Biol*  
13 *Chem* 2006; **281**(17): 11901-9.
- 14 3. Bezaire V, Mairal A, Ribet C, Lefort C, Girousse A, Jocken J *et al.* Contribution of  
15 adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase to lipolysis in hMADS  
16 adipocytes. *J Biol Chem* 2009; **284**(27): 18282-91.
- 17 4. Subramanian V, Rothenberg A, Gomez C, Cohen AW, Garcia A, Bhattacharyya S *et*  
18 *al.* Perilipin A mediates the reversible binding of CGI-58 to lipid droplets in 3T3-L1  
19 adipocytes. *J Biol Chem* 2004; **279**(40): 42062-71.
- 20 5. Yamaguchi T, Omatsu N, Matsushita S, Osumi T. CGI-58 interacts with perilipin and  
21 is localized to lipid droplets. Possible involvement of CGI-58 mislocalization in  
22 Chanarin-Dorfman syndrome. *J Biol Chem* 2004; **279**(29): 30490-7.
- 23 6. Lass A, Zimmermann R, Haemmerle G, Riederer M, Schoiswohl G, Schweiger M *et*  
24 *al.* Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by  
25 CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell Metab* 2006; **3**(5): 309-  
26 19.
- 27 7. Zechner R, Kienesberger PC, Haemmerle G, Zimmermann R, Lass A. Adipose  
28 triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. *J Lipid Res* 2009;  
29 **50**(1): 3-21.
- 30 8. Osuga J, Ishibashi S, Oka T, Yagyu H, Tozawa R, Fujimoto A *et al.* Targeted  
31 disruption of hormone-sensitive lipase results in male sterility and adipocyte  
32 hypertrophy, but not in obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**(2): 787-92.
- 33 9. Mulder H, Sorhede-Winzell M, Contreras JA, Fex M, Strom K, Ploug T *et al.*  
34 Hormone-sensitive lipase null mice exhibit signs of impaired insulin sensitivity  
35 whereas insulin secretion is intact. *J Biol Chem* 2003; **278**(38): 36380-8.
- 36 10. Wang SP, Laurin N, Himms-Hagen J, Rudnicki MA, Levy E, Robert MF *et al.* The  
37 adipose tissue phenotype of hormone-sensitive lipase deficiency in mice. *Obes Res*  
38 2001; **9**(2): 119-28.

- 1 11. Haemmerle G, Zimmermann R, Hayn M, Theussl C, Waeg G, Wagner E *et al.*  
2 Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in  
3 adipose tissue, muscle, and testis. *J Biol Chem* 2002; **277**(7): 4806-15.  
4
- 5 12. Lucas S, Tavernier G, Tiraby C, Mairal A, Langin D. Expression of human hormone-  
6 sensitive lipase in white adipose tissue of transgenic mice increases lipase activity but  
7 does not enhance in vitro lipolysis. *J Lipid Res* 2003; **44**(1): 154-63.  
8
- 9 13. Fortier M, Soni K, Laurin N, Wang SP, Mauriege P, Jirik FR *et al.* Human hormone-  
10 sensitive lipase (HSL): expression in white fat corrects the white adipose phenotype of  
11 HSL-deficient mice. *J Lipid Res* 2005; **46**(9): 1860-7.  
12
- 13 14. Zimmermann R, Haemmerle G, Wagner EM, Strauss JG, Kratky D, Zechner R.  
14 Decreased fatty acid esterification compensates for the reduced lipolytic activity in  
15 hormone-sensitive lipase-deficient white adipose tissue. *J Lipid Res* 2003; **44**(11):  
16 2089-99.  
17
- 18 15. Harada K, Shen WJ, Patel S, Natu V, Wang J, Osuga J *et al.* Resistance to high-fat  
19 diet-induced obesity and altered expression of adipose-specific genes in HSL-deficient  
20 mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; **285**(6): E1182-95.  
21
- 22 16. Strom K, Hansson O, Lucas S, Nevsten P, Fernandez C, Klint C *et al.* Attainment of  
23 brown adipocyte features in white adipocytes of hormone-sensitive lipase null mice.  
24 *PLoS One* 2008; **3**(3): e1793.  
25
- 26 17. Okazaki H, Osuga J, Tamura Y, Yahagi N, Tomita S, Shionoiri F *et al.* Lipolysis in  
27 the absence of hormone-sensitive lipase: evidence for a common mechanism  
28 regulating distinct lipases. *Diabetes* 2002; **51**(12): 3368-75.  
29
- 30 18. Wood RJ. Vitamin D and adipogenesis: new molecular insights. *Nutr Rev* 2008; **66**(1):  
31 40-6.  
32
- 33 19. Strom K, Gundersen TE, Hansson O, Lucas S, Fernandez C, Blomhoff R *et al.*  
34 Hormone-sensitive lipase (HSL) is also a retinyl ester hydrolase: evidence from mice  
35 lacking HSL. *Faseb J* 2009; **23**(7): 2307-16.  
36
- 37 20. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E *et al.* Adipocyte death  
38 defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and  
39 humans. *J Lipid Res* 2005; **46**(11): 2347-55.  
40
- 41 21. Hansson O, Strom K, Guner N, Wierup N, Sundler F, Hoglund P *et al.* Inflammatory  
42 response in white adipose tissue in the non-obese hormone-sensitive lipase null mouse  
43 model. *J Proteome Res* 2006; **5**(7): 1701-10.  
44
- 45 22. Chung S, Wang SP, Pan L, Mitchell G, Trasler J, Hermo L. Infertility and testicular  
46 defects in hormone-sensitive lipase-deficient mice. *Endocrinology* 2001; **142**(10):  
47 4272-81.  
48

- 1 23. Vallet-Erdtmann V, Tavernier G, Contreras JA, Mairal A, Rieu C, Touzalin AM *et al.*  
2 The testicular form of hormone-sensitive lipase HSLtes confers rescue of male  
3 infertility in HSL-deficient mice. *J Biol Chem* 2004; **279**(41): 42875-80.  
4
- 5 24. Park SY, Kim HJ, Wang S, Higashimori T, Dong J, Kim YJ *et al.* Hormone-sensitive  
6 lipase knockout mice have increased hepatic insulin sensitivity and are protected from  
7 short-term diet-induced insulin resistance in skeletal muscle and heart. *Am J Physiol*  
8 *Endocrinol Metab* 2005; **289**(1): E30-9.  
9
- 10 25. Fortier M, Wang SP, Mauriege P, Semache M, Mfuma L, Li H *et al.* Hormone-  
11 sensitive lipase-independent adipocyte lipolysis during beta-adrenergic stimulation,  
12 fasting, and dietary fat loading. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; **287**(2): E282-  
13 8.  
14
- 15 26. Sekiya M, Osuga J, Okazaki H, Yahagi N, Harada K, Shen WJ *et al.* Absence of  
16 hormone-sensitive lipase inhibits obesity and adipogenesis in Lep ob/ob mice. *J Biol*  
17 *Chem* 2004; **279**(15): 15084-90.  
18
- 19 27. Haemmerle G, Zimmermann R, Strauss JG, Kratky D, Riederer M, Knipping G *et al.*  
20 Hormone-sensitive lipase deficiency in mice changes the plasma lipid profile by  
21 affecting the tissue-specific expression pattern of lipoprotein lipase in adipose tissue  
22 and muscle. *J Biol Chem* 2002; **277**(15): 12946-52.  
23
- 24 28. Voshol PJ, Haemmerle G, Ouwens DM, Zimmermann R, Zechner R, Teusink B *et al.*  
25 Increased hepatic insulin sensitivity together with decreased hepatic triglyceride stores  
26 in hormone-sensitive lipase-deficient mice. *Endocrinology* 2003; **144**(8): 3456-62.  
27
- 28 29. Roduit R, Masiello P, Wang SP, Li H, Mitchell GA, Prentki M. A role for hormone-  
29 sensitive lipase in glucose-stimulated insulin secretion: a study in hormone-sensitive  
30 lipase-deficient mice. *Diabetes* 2001; **50**(9): 1970-5.  
31
- 32 30. Peyot ML, Nolan CJ, Soni K, Joly E, Lussier R, Corkey BE *et al.* Hormone-sensitive  
33 lipase has a role in lipid signaling for insulin secretion but is nonessential for the  
34 incretin action of glucagon-like peptide 1. *Diabetes* 2004; **53**(7): 1733-42.  
35
- 36 31. Fex M, Haemmerle G, Wierup N, Dekker-Nitert M, Rehn M, Ristow M *et al.* A beta  
37 cell-specific knockout of hormone-sensitive lipase in mice results in hyperglycaemia  
38 and disruption of exocytosis. *Diabetologia* 2009; **52**(2): 271-80.  
39
- 40 32. Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R,  
41 Riederer M *et al.* Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose  
42 triglyceride lipase. *Science* 2004; **306**(5700): 1383-6.  
43
- 44 33. Jenkins CM, Mancuso DJ, Yan W, Sims HF, Gibson B, Gross RW. Identification,  
45 cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent  
46 phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol  
47 transacylase activities. *J Biol Chem* 2004; **279**(47): 48968-75.  
48
- 49 34. Villena JA, Roy S, Sarkadi-Nagy E, Kim KH, Sul HS. Desnutrin, an adipocyte gene  
50 encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and

- 1 glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. *J*  
2 *Biol Chem* 2004; **279**(45): 47066-75.
- 3
- 4 35. Schoiswohl G, Schweiger M, Schreiber R, Gorkiewicz G, Preiss-Landl K, Taschler U  
5 *et al.* Adipose triglyceride lipase plays a key role in the supply of the working muscle  
6 with fatty acids. *J Lipid Res* 2010; **51**(3): 490-9.
- 7
- 8 36. Haemmerle G, Lass A, Zimmermann R, Gorkiewicz G, Meyer C, Rozman J *et al.*  
9 Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride  
10 lipase. *Science* 2006; **312**(5774): 734-7.
- 11
- 12 37. Peyot ML, Guay C, Latour MG, Lamontagne J, Lussier R, Pineda M *et al.* Adipose  
13 triglyceride lipase is implicated in fuel- and non-fuel-stimulated insulin secretion. *J*  
14 *Biol Chem* 2009; **284**(25): 16848-59.
- 15
- 16 38. Ahmadian M, Duncan RE, Varady KA, Frasson D, Hellerstein MK, Birkenfeld AL *et*  
17 *al.* Adipose overexpression of desnutrin promotes fatty acid use and attenuates diet-  
18 induced obesity. *Diabetes* 2009; **58**(4): 855-66.
- 19
- 20 39. Smirnova E, Goldberg EB, Makarova KS, Lin L, Brown WJ, Jackson CL. ATGL has  
21 a key role in lipid droplet/adiposome degradation in mammalian cells. *EMBO Rep*  
22 2006; **7**(1): 106-13.
- 23
- 24 40. Tornqvist H, Nilsson-Ehle P, Belfrage P. Enzymes catalyzing the hydrolysis of long-  
25 chain monoacylglycerols in rat adipose tissue. *Biochim Biophys Acta* 1978; **530**(3):  
26 474-86.
- 27
- 28 41. Karlsson M, Contreras JA, Hellman U, Tornqvist H, Holm C. cDNA cloning, tissue  
29 distribution, and identification of the catalytic triad of monoglyceride lipase.  
30 Evolutionary relationship to esterases, lysophospholipases, and haloperoxidases. *J*  
31 *Biol Chem* 1997; **272**(43): 27218-23.
- 32
- 33 42. Fredrikson G, Tornqvist H, Belfrage P. Hormone-sensitive lipase and  
34 monoacylglycerol lipase are both required for complete degradation of adipocyte  
35 triacylglycerol. *Biochim Biophys Acta* 1986; **876**(2): 288-93.
- 36
- 37 43. Dolinsky VW, Gilham D, Alam M, Vance DE, Lehner R. Triacylglycerol hydrolase:  
38 role in intracellular lipid metabolism. *Cell Mol Life Sci* 2004; **61**(13): 1633-51.
- 39
- 40 44. Okazaki H, Igarashi M, Nishi M, Tajima M, Sekiya M, Okazaki S *et al.* Identification  
41 of a novel member of the carboxylesterase family that hydrolyzes triacylglycerol: a  
42 potential role in adipocyte lipolysis. *Diabetes* 2006; **55**(7): 2091-7.
- 43
- 44 45. Gao J, Simon M. Identification of a novel keratinocyte retinyl ester hydrolase as a  
45 transacylase and lipase. *J Invest Dermatol* 2005; **124**(6): 1259-66.
- 46
- 47 46. Dolinsky VW, Sipione S, Lehner R, Vance DE. The cloning and expression of a  
48 murine triacylglycerol hydrolase cDNA and the structure of its corresponding gene.  
49 *Biochim Biophys Acta* 2001; **1532**(3): 162-72.
- 50

- 1 47. Soni KG, Lehner R, Metalnikov P, O'Donnell P, Semache M, Gao W *et al.*  
2 Carboxylesterase 3 (EC 3.1.1.1) is a major adipocyte lipase. *J Biol Chem* 2004;  
3 **279**(39): 40683-9.  
4
- 5 48. Wei E, Gao W, Lehner R. Attenuation of adipocyte triacylglycerol hydrolase activity  
6 decreases basal fatty acid efflux. *J Biol Chem* 2007; **282**(11): 8027-35.  
7
- 8 49. Schweiger M, Schreiber R, Haemmerle G, Lass A, Fledelius C, Jacobsen P *et al.*  
9 Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase are the major enzymes in  
10 adipose tissue triacylglycerol catabolism. *J Biol Chem* 2006; **281**(52): 40236-41.  
11
- 12 50. Wei E, Ben Ali Y, Lyon J, Wang H, Nelson R, Dolinsky VW *et al.* Loss of TGH/Ces3  
13 in mice decreases blood lipids, improves glucose tolerance, and increases energy  
14 expenditure. *Cell Metab* 2010; **11**(3): 183-93.  
15
- 16 51. Lefevre C, Jobard F, Caux F, Bouadjar B, Karaduman A, Heilig R *et al.* Mutations in  
17 CGI-58, the gene encoding a new protein of the esterase/lipase/thioesterase subfamily,  
18 in Chanarin-Dorfman syndrome. *Am J Hum Genet* 2001; **69**(5): 1002-12.  
19
- 20 52. Granneman JG, Moore HP, Krishnamoorthy R, Rathod M. Perilipin controls lipolysis  
21 by regulating the interactions of AB-hydrolase containing 5 (Abhd5) and adipose  
22 triglyceride lipase (Atgl). *J Biol Chem* 2009; **284**(50): 34538-44.  
23
- 24 53. Granneman JG, Moore HP, Granneman RL, Greenberg AS, Obin MS, Zhu Z.  
25 Analysis of lipolytic protein trafficking and interactions in adipocytes. *J Biol Chem*  
26 2007; **282**(8): 5726-35.  
27
- 28 54. Yamaguchi T, Omatsu N, Morimoto E, Nakashima H, Ueno K, Tanaka T *et al.* CGI-  
29 58 facilitates lipolysis on lipid droplets but is not involved in the vesiculation of lipid  
30 droplets caused by hormonal stimulation. *J Lipid Res* 2007; **48**(5): 1078-89.  
31
- 32 55. Yang X, Lu X, Liu J. Identification of a novel splicing isoform of murine CGI-58.  
33 *FEBS Lett* 2010; **584**(5): 903-10.  
34
- 35 56. Radner FP, Streith IE, Schoiswohl G, Schweiger M, Kumari M, Eichmann TO *et al.*  
36 Growth retardation, impaired triacylglycerol catabolism, hepatic steatosis, and lethal  
37 skin barrier defect in mice lacking comparative gene identification-58 (CGI-58). *J Biol*  
38 *Chem* 2010; **285**(10): 7300-11.  
39
- 40 57. Yang X, Lu X, Lombes M, Rha GB, Chi YI, Guerin TM *et al.* The G(0)/G(1) switch  
41 gene 2 regulates adipose lipolysis through association with adipose triglyceride lipase.  
42 *Cell Metab* 2010; **11**(3): 194-205.  
43
- 44 58. Brasaemle DL. Lipolysis control: the plot thickens. *Cell Metab* 2010; **11**(3): 173-4.  
45
- 46 59. Hertzel AV, Bennaars-Eiden A, Bernlohr DA. Increased lipolysis in transgenic  
47 animals overexpressing the epithelial fatty acid binding protein in adipose cells. *J*  
48 *Lipid Res* 2002; **43**(12): 2105-11.  
49

- 1 60. Maeda K, Uysal KT, Makowski L, Gorgun CZ, Atsumi G, Parker RA *et al.* Role of  
2 the fatty acid binding protein mall1 in obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2003;  
3 **52**(2): 300-7.  
4
- 5 61. Jenkins-Kruchten AE, Bennaars-Eiden A, Ross JR, Shen WJ, Kraemer FB, Bernlohr  
6 DA. Fatty acid-binding protein-hormone-sensitive lipase interaction. Fatty acid  
7 dependence on binding. *J Biol Chem* 2003; **278**(48): 47636-43.  
8
- 9 62. Shen WJ, Sridhar K, Bernlohr DA, Kraemer FB. Interaction of rat hormone-sensitive  
10 lipase with adipocyte lipid-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**(10):  
11 5528-32.  
12
- 13 63. Smith AJ, Sanders MA, Thompson BR, Londos C, Kraemer FB, Bernlohr DA.  
14 Physical association between the adipocyte fatty acid-binding protein and hormone-  
15 sensitive lipase: a fluorescence resonance energy transfer analysis. *J Biol Chem* 2004;  
16 **279**(50): 52399-405.  
17
- 18 64. Smith AJ, Thompson BR, Sanders MA, Bernlohr DA. Interaction of the adipocyte  
19 fatty acid-binding protein with the hormone-sensitive lipase: regulation by fatty acids  
20 and phosphorylation. *J Biol Chem* 2007; **282**(44): 32424-32.  
21
- 22 65. Hotamisligil GS, Johnson RS, Distel RJ, Ellis R, Papaioannou VE, Spiegelman BM.  
23 Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the  
24 adipocyte fatty acid binding protein. *Science* 1996; **274**(5291): 1377-9.  
25
- 26 66. Coe NR, Simpson MA, Bernlohr DA. Targeted disruption of the adipocyte lipid-  
27 binding protein (aP2 protein) gene impairs fat cell lipolysis and increases cellular fatty  
28 acid levels. *J Lipid Res* 1999; **40**(5): 967-72.  
29
- 30 67. Baar RA, Dingfelder CS, Smith LA, Bernlohr DA, Wu C, Lange AJ *et al.*  
31 Investigation of in vivo fatty acid metabolism in AFABP/aP2(-/-) mice. *Am J Physiol*  
32 *Endocrinol Metab* 2005; **288**(1): E187-93.  
33
- 34 68. Uysal KT, Scheja L, Wiesbrock SM, Bonner-Weir S, Hotamisligil GS. Improved  
35 glucose and lipid metabolism in genetically obese mice lacking aP2. *Endocrinology*  
36 2000; **141**(9): 3388-96.  
37
- 38 69. Kimmel AR, Brasaemle DL, McAndrews-Hill M, Sztalryd C, Londos C. Adoption of  
39 PERILIPIN as a unifying nomenclature for the mammalian PAT-family of  
40 intracellular lipid storage droplet proteins. *J Lipid Res* 2010; **51**(3): 468-71.  
41
- 42 70. Martinez-Botas J, Anderson JB, Tessier D, Lapillonne A, Chang BH, Quast MJ *et al.*  
43 Absence of perilipin results in leanness and reverses obesity in Lepr(db/db) mice. *Nat*  
44 *Genet* 2000; **26**(4): 474-9.  
45
- 46 71. Tansey JT, Sztalryd C, Gruia-Gray J, Roush DL, Zee JV, Gavrilova O *et al.* Perilipin  
47 ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin  
48 production, and resistance to diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;  
49 **98**(11): 6494-9.  
50

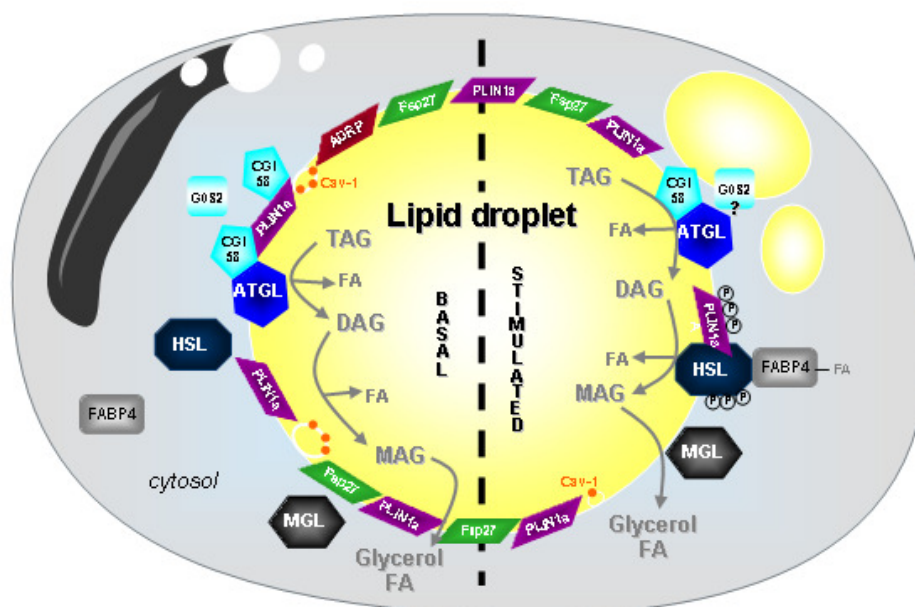
- 1 72. Castro-Chavez F, Yechoor VK, Saha PK, Martinez-Botas J, Wooten EC, Sharma S *et al.* Coordinated upregulation of oxidative pathways and downregulation of lipid  
2 biosynthesis underlie obesity resistance in perilipin knockout mice: a microarray gene  
3 expression profile. *Diabetes* 2003; **52**(11): 2666-74.  
4  
5
- 6 73. Saha PK, Kojima H, Martinez-Botas J, Sunehag AL, Chan L. Metabolic adaptations in  
7 the absence of perilipin: increased beta-oxidation and decreased hepatic glucose  
8 production associated with peripheral insulin resistance but normal glucose tolerance  
9 in perilipin-null mice. *J Biol Chem* 2004; **279**(34): 35150-8.  
10
- 11 74. Miyoshi H, Souza SC, Endo M, Sawada T, Perfield JW, 2nd, Shimizu C *et al.*  
12 Perilipin overexpression in mice protects against diet-induced obesity. *J Lipid Res*  
13 2010; **51**(5): 975-82.  
14
- 15 75. Chang BH, Li L, Paul A, Taniguchi S, Nannegari V, Heird WC *et al.* Protection  
16 against fatty liver but normal adipogenesis in mice lacking adipose differentiation-  
17 related protein. *Mol Cell Biol* 2006; **26**(3): 1063-76.  
18
- 19 76. Bell M, Wang H, Chen H, McLenithan JC, Gong DW, Yang RZ *et al.* Consequences  
20 of lipid droplet coat protein downregulation in liver cells: abnormal lipid droplet  
21 metabolism and induction of insulin resistance. *Diabetes* 2008; **57**(8): 2037-45.  
22
- 23 77. Beller M, Sztalryd C, Southall N, Bell M, Jackle H, Auld DS *et al.* COPI complex is a  
24 regulator of lipid homeostasis. *PLoS Biol* 2008; **6**(11): e292.  
25
- 26 78. Inohara N, Koseki T, Chen S, Wu X, Nunez G. CIDE, a novel family of cell death  
27 activators with homology to the 45 kDa subunit of the DNA fragmentation factor.  
28 *Embo J* 1998; **17**(9): 2526-33.  
29
- 30 79. Zhou Z, Yon Toh S, Chen Z, Guo K, Ng CP, Ponniah S *et al.* Cidea-deficient mice  
31 have lean phenotype and are resistant to obesity. *Nat Genet* 2003; **35**(1): 49-56.  
32
- 33 80. Li JZ, Ye J, Xue B, Qi J, Zhang J, Zhou Z *et al.* Cideb regulates diet-induced obesity,  
34 liver steatosis, and insulin sensitivity by controlling lipogenesis and fatty acid  
35 oxidation. *Diabetes* 2007; **56**(10): 2523-32.  
36
- 37 81. Qi J, Gong J, Zhao T, Zhao J, Lam P, Ye J *et al.* Downregulation of AMP-activated  
38 protein kinase by Cidea-mediated ubiquitination and degradation in brown adipose  
39 tissue. *Embo J* 2008; **27**(11): 1537-48.  
40
- 41 82. Ye J, Li JZ, Liu Y, Li X, Yang T, Ma X *et al.* Cideb, an ER- and lipid droplet-  
42 associated protein, mediates VLDL lipitation and maturation by interacting with  
43 apolipoprotein B. *Cell Metab* 2009; **9**(2): 177-90.  
44
- 45 83. Danesch U, Hoeck W, Ringold GM. Cloning and transcriptional regulation of a novel  
46 adipocyte-specific gene, FSP27. CAAT-enhancer-binding protein (C/EBP) and  
47 C/EBP-like proteins interact with sequences required for differentiation-dependent  
48 expression. *J Biol Chem* 1992; **267**(10): 7185-93.  
49



- 1 84. Puri V, Konda S, Ranjit S, Aouadi M, Chawla A, Chouinard M *et al.* Fat-specific  
2 protein 27, a novel lipid droplet protein that enhances triglyceride storage. *J Biol*  
3 *Chem* 2007; **282**(47): 34213-8.  
4
- 5 85. Toh SY, Gong J, Du G, Li JZ, Yang S, Ye J *et al.* Up-regulation of mitochondrial  
6 activity and acquirement of brown adipose tissue-like property in the white adipose  
7 tissue of fsp27 deficient mice. *PLoS One* 2008; **3**(8): e2890.  
8
- 9 86. Nishino N, Tamori Y, Tateya S, Kawaguchi T, Shibakusa T, Mizunoya W *et al.*  
10 FSP27 contributes to efficient energy storage in murine white adipocytes by  
11 promoting the formation of unilocular lipid droplets. *J Clin Invest* 2008; **118**(8): 2808-  
12 21.  
13
- 14 87. Pol A, Luetterforst R, Lindsay M, Heino S, Ikonen E, Parton RG. A caveolin  
15 dominant negative mutant associates with lipid bodies and induces intracellular  
16 cholesterol imbalance. *J Cell Biol* 2001; **152**(5): 1057-70.  
17
- 18 88. Razani B, Zhang XL, Bitzer M, von Gersdorff G, Bottinger EP, Lisanti MP. Caveolin-  
19 1 regulates transforming growth factor (TGF)-beta/SMAD signaling through an  
20 interaction with the TGF-beta type I receptor. *J Biol Chem* 2001; **276**(9): 6727-38.  
21
- 22 89. Cohen AW, Razani B, Schubert W, Williams TM, Wang XB, Iyengar P *et al.* Role of  
23 caveolin-1 in the modulation of lipolysis and lipid droplet formation. *Diabetes* 2004;  
24 **53**(5): 1261-70.  
25
- 26 90. Razani B, Combs TP, Wang XB, Frank PG, Park DS, Russell RG *et al.* Caveolin-1-  
27 deficient mice are lean, resistant to diet-induced obesity, and show  
28 hypertriglyceridemia with adipocyte abnormalities. *J Biol Chem* 2002; **277**(10): 8635-  
29 47.  
30
- 31 91. Cohen AW, Razani B, Wang XB, Combs TP, Williams TM, Scherer PE *et al.*  
32 Caveolin-1-deficient mice show insulin resistance and defective insulin receptor  
33 protein expression in adipose tissue. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; **285**(1): C222-  
34 35.  
35
- 36 92. Lafontan M, Langin D. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog*  
37 *Lipid Res* 2009; **48**(5): 275-97.  
38
- 39 93. Jocken JW, Langin D, Smit E, Saris WH, Valle C, Hul GB *et al.* Adipose triglyceride  
40 lipase and hormone-sensitive lipase protein expression is decreased in the obese  
41 insulin-resistant state. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; **92**(6): 2292-9.  
42
- 43 94. Langin D, Dicker A, Tavernier G, Hoffstedt J, Mairal A, Ryden M *et al.* Adipocyte  
44 lipases and defect of lipolysis in human obesity. *Diabetes* 2005; **54**(11): 3190-7.  
45
- 46 95. Ahren B. Reducing plasma free fatty acids by acipimox improves glucose tolerance in  
47 high-fat fed mice. *Acta Physiol Scand* 2001; **171**(2): 161-7.  
48
- 49 96. Wang M, Fotsch C. Small-molecule compounds that modulate lipolysis in adipose  
50 tissue: targeting strategies and molecular classes. *Chem Biol* 2006; **13**(10): 1019-27.

- 1  
2 97. Ebdrup S, Refsgaard HH, Fledelius C, Jacobsen P. Synthesis and structure-activity  
3 relationship for a novel class of potent and selective carbamate-based inhibitors of  
4 hormone selective lipase with acute in vivo antilipolytic effects. *J Med Chem* 2007;  
5 **50**(22): 5449-56.  
6  
7 98. Long JZ, Nomura DK, Cravatt BF. Characterization of monoacylglycerol lipase  
8 inhibition reveals differences in central and peripheral endocannabinoid metabolism.  
9 *Chem Biol* 2009; **16**(7): 744-53.  
10  
11 99. Gilham D, Ho S, Rasouli M, Martres P, Vance DE, Lehner R. Inhibitors of hepatic  
12 microsomal triacylglycerol hydrolase decrease very low density lipoprotein secretion.  
13 *Faseb J* 2003; **17**(12): 1685-7.  
14  
15 100. Leung D, Hardouin C, Boger DL, Cravatt BF. Discovering potent and selective  
16 reversible inhibitors of enzymes in complex proteomes. *Nat Biotechnol* 2003; **21**(6):  
17 687-91.  
18  
19 101. Langin D. Recruitment of brown fat and conversion of white into brown adipocytes:  
20 strategies to fight the metabolic complications of obesity? *Biochim Biophys Acta*  
21 2010; **1801**(3): 372-6.  
22  
23 102. Farese RV, Jr., Walther TC. Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T. *Cell*  
24 2009; **139**(5): 855-60.  
25  
26 103. Ross SR, Graves RA, Greenstein A, Platt KA, Shyu HL, Mellovitz B *et al.* A fat-  
27 specific enhancer is the primary determinant of gene expression for adipocyte P2 in  
28 vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; **87**(24): 9590-4.  
29  
30 104. Martens K, Bottelbergs A, Baes M. Ectopic recombination in the central and  
31 peripheral nervous system by aP2/FABP4-Cre mice: implications for metabolism  
32 research. *FEBS Lett* 2010; **584**(5): 1054-8.  
33  
34 105. Urs S, Harrington A, Liaw L, Small D. Selective expression of an aP2/Fatty Acid  
35 Binding Protein 4-Cre transgene in non-adipogenic tissues during embryonic  
36 development. *Transgenic Res* 2006; **15**(5): 647-53.  
37  
38 106. Makowski L, Boord JB, Maeda K, Babaev VR, Uysal KT, Morgan MA *et al.* Lack of  
39 macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E  
40 against atherosclerosis. *Nat Med* 2001; **7**(6): 699-705.  
41  
42 107. Mao J, Yang T, Gu Z, Heird WC, Finegold MJ, Lee B *et al.* aP2-Cre-mediated  
43 inactivation of acetyl-CoA carboxylase 1 causes growth retardation and reduced lipid  
44 accumulation in adipose tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**(41): 17576-81.  
45  
46 108. Van Dyck F, Scroyen I, Declercq J, Sciote R, Kahn B, Lijnen R *et al.* aP2-Cre-  
47 mediated expression activation of an oncogenic PLAG1 transgene results in cavernous  
48 angiomas in mice. *Int J Oncol* 2008; **32**(1): 33-40.  
49

- 1 109. Wang ZV, Deng Y, Wang QA, Sun K, Scherer PE. Identification and characterization  
2 of a promoter cassette conferring adipocyte-specific gene expression. *Endocrinology*  
3 2010; **151**(6): 2933-9.



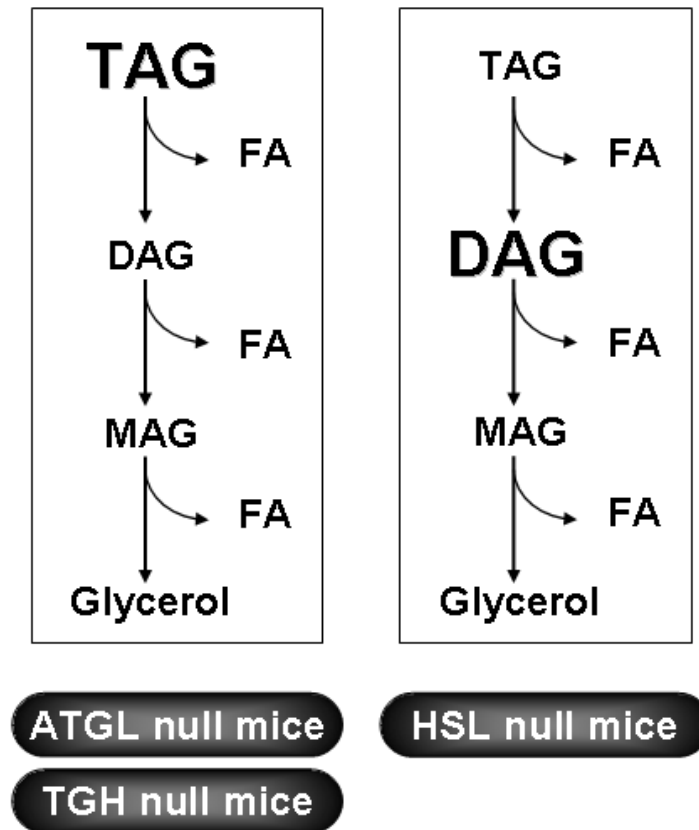
2

3 **Figure 1. Adipocyte “lipolysome” in basal and stimulated states.**

4 The lipid droplet (LD) represents the functional sub-unit of adipocytes. They are formed by  
 5 a phospholipid monolayer in which different proteins are anchored: PLIN1a (perilipin),  
 6 PLIN2 (ADRP) and Fsp27/Cidec. LD membrane also presents plasma membrane-specific  
 7 specialized microdomains called caveola. Caveolin 1 (Cav-1) is the major protein found in  
 8 caveolae. In the unstimulated basal state, ATGL, perilipin and CGI-58 are forming a complex  
 9 at the surface of the LD. These protein interactions maintain CGI-58 inactive and as a  
 10 consequence limit basal ATGL-mediated lipolysis. HSL and FABP4 are in the cytosol. In the  
 11 stimulated state, HSL is phosphorylated by protein kinases (PK); the active form of HSL  
 12 migrates to the surface of the LD. PK also phosphorylate PLIN1a that undergoes structural  
 13 modification and rearrangement leading to fragmentation of the LD. CGI-58 released from  
 14 phosphorylated PLIN1a activates ATGL to initiate TG hydrolysis. G0S2 can limit ATGL  
 15 enzyme activity. DG are then transformed into MG by active HSL. MGL ends the lipolytic  
 16 process and releases glycerol and FA. FA-complexed FABP4 can interact with HSL to  
 17 modulate lipolysis. ADRP, adipose differentiation related protein; ATGL, adipose triglyceride  
 18 lipase; CGI-58, comparative gene identification 58; HSL, hormone sensitive lipase; MGL,

1 monoglyceride lipase; G0S2, G0/G1 switch gene 2; FABP4, fatty acid binding protein 4;  
2 PLIN1a, perilipin A; Fsp27, fat-specific protein 27, also called Cidec; Cav-1, caveolin 1; FA,  
3 fatty acid; TAG, triacylglycerol; DAG, diacylglycerol; MAG, monoacylglycerol. Adapted  
4 from <sup>1</sup>.

FIGURE 2

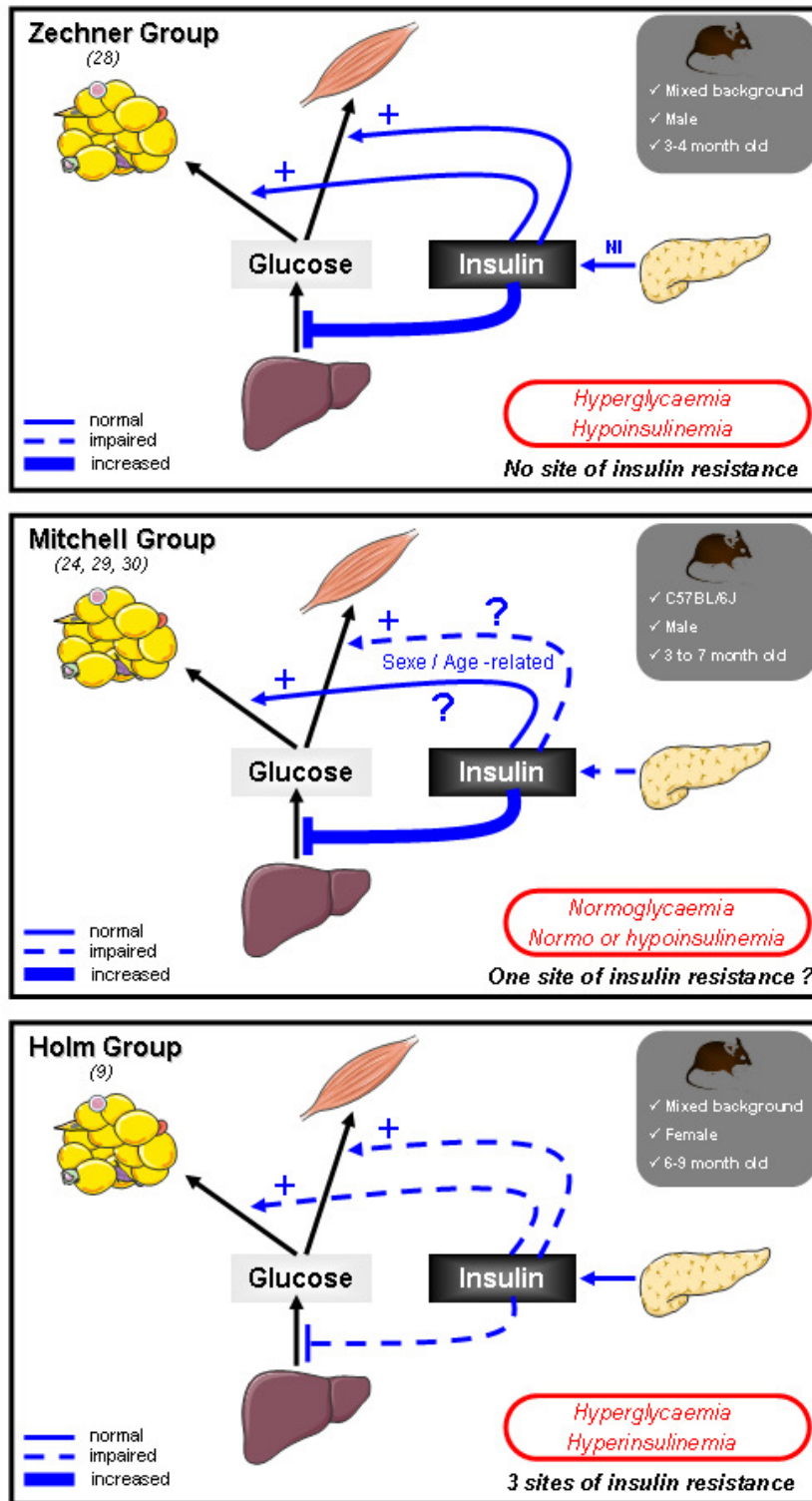


1  
2

3 **Figure 2. Neutral lipid accumulation in lipase-deleted animal models.**

4 ATGL and TGH deletion lead to TAG accumulation whereas DG accumulation is observed in  
5 HSL-null animals. FA, fatty acid; TAG, triacylglycerol; DAG, diacylglycerol; MAG,  
6 monoacylglycerol; ATGL, adipose triglyceride lipase; HSL, hormone sensitive lipase; TGH,  
7 triglyceride hydrolase.

FIGURE 3

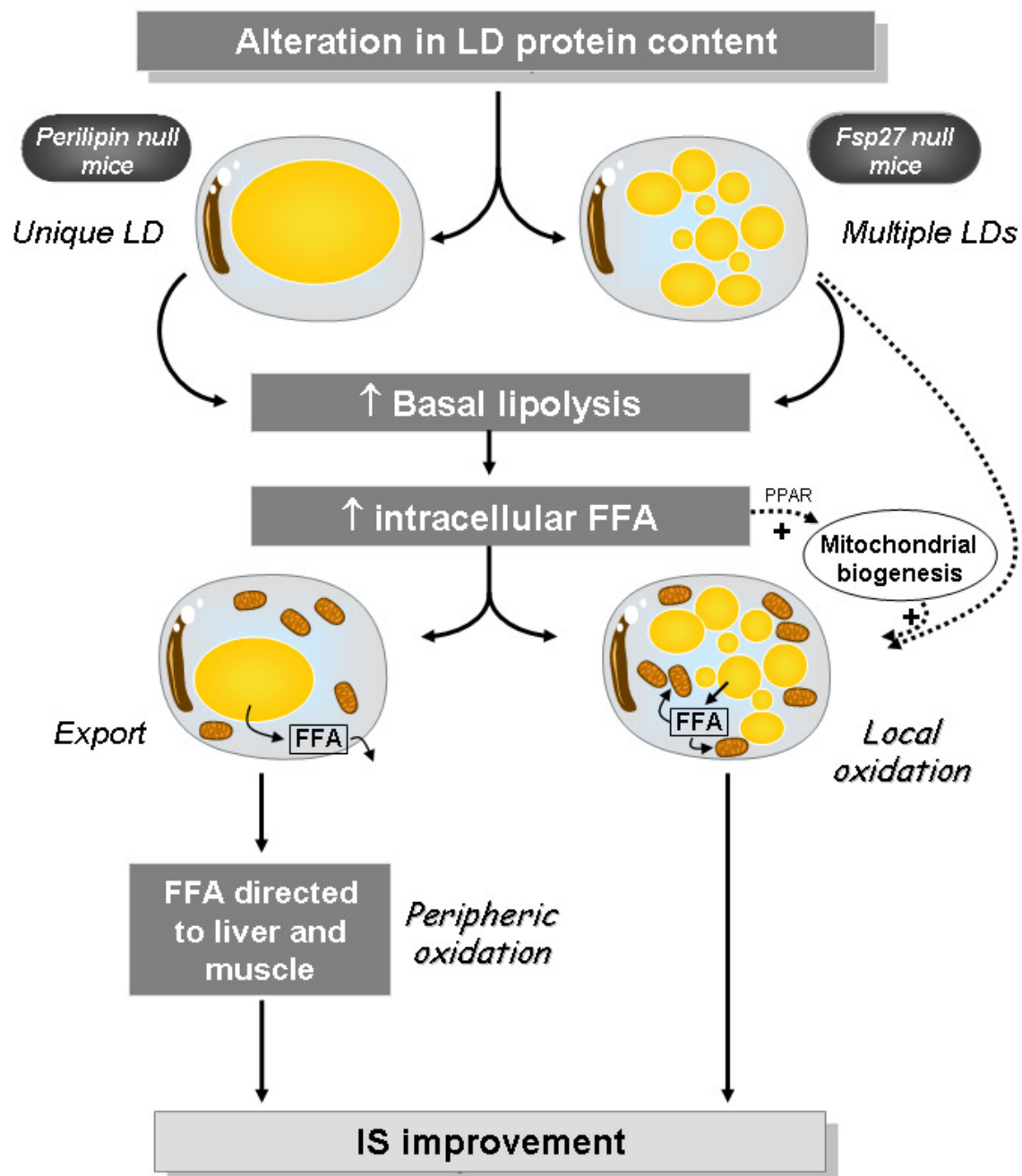


1  
 2 Figure 3. **Insulin sensitivity assessment in the different HSL-null lines.**  
 3 *Upper panel*, HSL-null mice from Zechner group bred on a mixed genetic background show  
 4 hyper glycaemia and hypoinsulinemia. Liver, skeletal muscles and adipose tissue are insulin-  
 5 sensitive. Pancreatic insulin secretion has not been evaluated. *Middle panel*, HSL-null mice  
 6 from Mitchell group bred on a C57BL/6 genetic background show normoglycaemia and  
 7 normo or hypoinsulinemia. Liver and adipose tissue (remains to be elucidated) are insulin

1 sensitive whereas skeletal muscles display age and sex-related insulin resistance. Pancreatic  
2 insulin secretion is altered. *Lower panel*, HSL-null mice from Holm group bred on a mixed  
3 genetic background show hyperglycaemia and hyperinsulinemia. Liver, adipose tissue and  
4 skeletal muscles are sites of insulin resistance. Pancreatic insulin secretion is normal. NI, non  
5 investigated. FFA, free fatty acid; LD, lipid droplet; PPAR, peroxysome proliferation  
6 activated receptor; IS, insulin sensitivity.

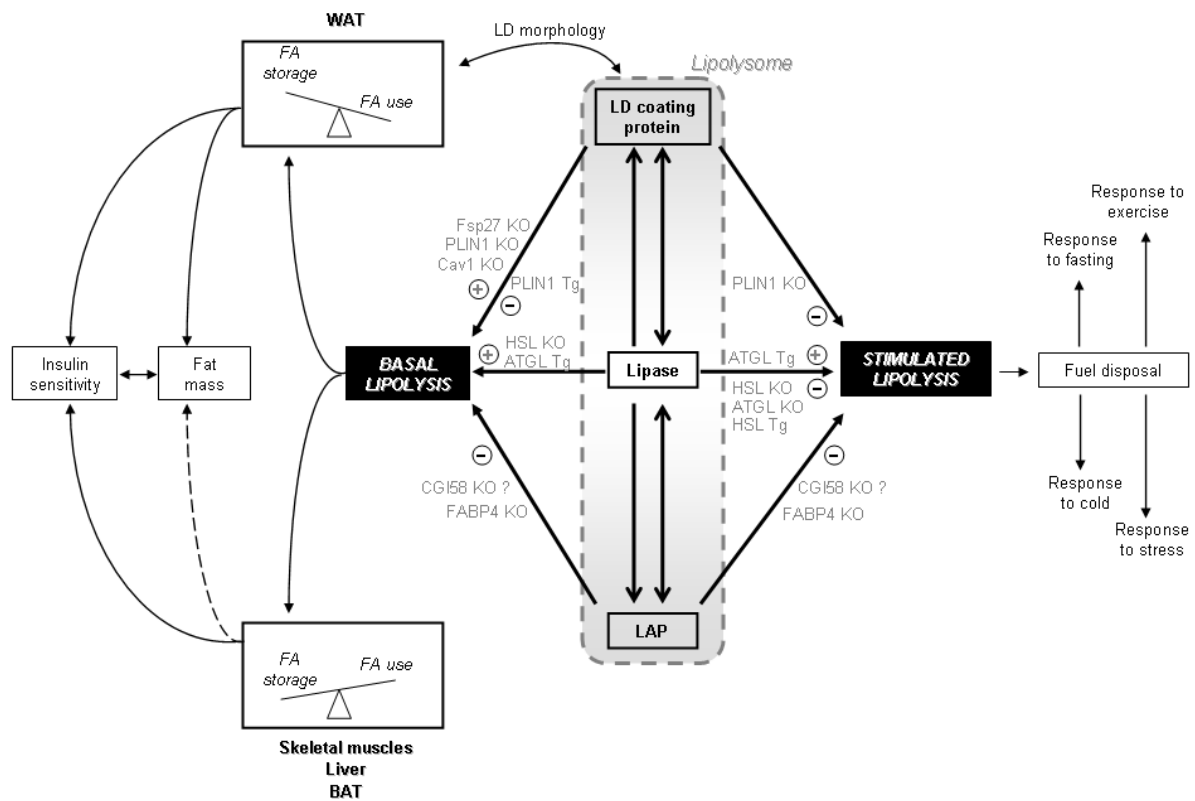


FIGURE 4



1  
 2 Figure 4. **Phenotypic consequences of alteration in LD-associated protein content.**  
 3 Alteration of both PLIN1 and Cidec/Fsp27 content affect LD morphology. In both cases basal  
 4 lipolysis is increased leading to the rise of intracellular concentration of FA. PLIN1-null and  
 5 Cidec-null mice adipocytes present mitochondrial biogenesis that is linked only in Cidec-null  
 6 mice to local increased FA mitochondrial oxidation. In PLIN1-null mice, FA are exported out  
 7 the adipocyte and handled and oxidized in liver and skeletal muscles. Whatever the site of FA  
 8 oxidation, insulin sensitivity is improved. LD, lipid droplet; FFA, free fatty acid; PPAR,  
 9 peroxisome proliferator-activated receptor; PLIN1, perilipin; FSP27, fat-specific protein 27  
 10 (Cidec); IS, insulin sensitivity.

FIGURE 5



1  
 2 **Figure 5. Integrated view of functional consequences due to lipolysome alteration.**  
 3 KO, knock out (model of genetic ablation); Tg, transgenic (model of overexpression); ATGL,  
 4 adipose triglyceride lipase; HSL, hormone sensitive lipase; TGH, triglyceride hydrolase;  
 5 CGH-58, comparative gene identification 58; PLIN1, perilipin; FSP27, fat-specific protein 27  
 6 (Cidec); Cav1, caveolin1; FABP4, fatty acid binding protein 4; WAT, white adipose tissue;  
 7 BAT, brown adipose tissue; LD, lipid droplet, FA, fatty acid; LAP, lipase-associated protein.

1 **Tables**

2

	<i>Lipase deletion</i>		<i>Lipase overexpression</i>	
	<i>HSL</i>	<i>ATGL</i>	<i>HSL</i>	<i>ATGL</i>
<i>Basal lipolysis</i>	increased	not affected	not affected	increased
<i>Stimulated lipolysis</i>	decreased	decreased	decreased	increased
<i>Body weight</i>	normal	increased	decreased in young mice	not affected
<i>Fat mass</i>	decreased	increased	decreased or not affected	not affected
<i>Ectopic fat storage</i>	no	yes (cardiac muscle ++)	no	no
<i>DG accumulation</i>	massive	normal	ND	ND
<i>Oxidative capacities</i>	increased in WAT		ND	increased
<i>Insulin sensitivity</i>	impaired	improved	ND	improved
<i>Resistance to DIO</i>	yes		no	yes, moderate

3

4 Table I. **Phenotypes comparison in HSL and ATGL mouse models.**

5 HSL, hormone-sensitive lipase ; ATGL, adipose triglyceride lipase ; DG, diglyceride ; WAT, white adipose tissue ; DIO, diet-induced obesity ; ND, not determined. Basal and stimulated lipolysis represented by glycerol release in vitro. Body weight and fat mass are observed on standard chow diet.

8

9



## 2- Inflammation du tissu adipeux associée à l'obésité

Cette partie a pour objectif de résumer les principaux travaux concernant l'inflammation du TA associée à l'obésité. L'augmentation exponentielle de la littérature récente reflète l'engouement de la communauté scientifique pour ce sujet qui a donné une nouvelle dimension aux relations entre développement de la masse grasse et désordres métaboliques qui y sont associés. Depuis les premières observations cliniques et sur modèles animaux, nous verrons ensuite les acteurs cellulaires de cette inflammation avant de présenter les communications établies entre ces différents acteurs et les mécanismes moléculaires mis en jeu.

### 2.1- Les observations associant obésité/insulino-résistance et inflammation.

Les premières observations expérimentales (en 1876) permettant d'établir un lien entre insulino-résistance et inflammation furent la normalisation des paramètres métaboliques (glucosurie) chez le sujet diabétique après traitement à l'acide acétyl salicylique (Shoelson et al., 2006). On sait aujourd'hui que cette amélioration passe par l'inhibition de la voie du NFκB (Yuan and Varga, 2001). Plus tard, un nombre important d'études cliniques a présenté des corrélations positives entre l'insulino-résistance et des marqueurs inflammatoires plasmatiques comme l'*interleukin 6* (IL6) ou le *tumor necrosis factor α* (TNFα) (de Luca and Olefsky, 2008; Kolb and Mandrup-Poulsen, 2005; Pickup and Crook, 1998). En 1993, Hotamisligil montrait que les taux circulants de TNFα ainsi que son expression dans le TA étaient augmentés chez la souris obèse et qu'une neutralisation de cette protéine améliorait l'insulino-sensibilité des animaux (Hotamisligil et al., 1993). Dans le même temps, la vision du TA a évolué et cet organe n'a plus seulement été considéré comme un organe de stockage des TG mais aussi comme un véritable organe endocrine capable de sécréter de nombreuses molécules bioactives, appelées adipokines (Galic et al., 2010). Dix ans après l'observation d'Hotamisligil, Weisberg et Xu ont mis en évidence une infiltration macrophagique au sein du TA de souris ou de patients obèses (Weisberg et al., 2003; Xu et al., 2003). Ces observations ont permis d'effectuer un premier lien entre obésité et inflammation. Par la suite de nombreuses études ont montré l'accumulation de cellules immunes au sein du TA en présence d'obésité et une corrélation positive peut être établie entre prise de poids, accumulation macrophagique et insulino-résistance, la revue de V. Bourlier présente ces travaux (Bourlier and Bouloumie, 2009).

Il est désormais admis que l'expansion de la masse grasse reliée à l'obésité s'associe avec une inflammation chronique dite « à bas bruit ».

## 2.2- Les acteurs cellulaires de l'inflammation du TA.

Le TA est constitué de nombreux types cellulaires, les adipocytes et pré-adipocytes représentant la majorité de ces cellules. Mais il comporte aussi une fraction non adipeuse, appelée fraction stroma-vasculaire (SVF) qui inclut des cellules immunes (macrophages, lymphocytes, cellules dendritiques...), des cellules endothéliales, des fibroblastes et des cellules dites progénitrices. Au cours de l'obésité on assiste à une augmentation des cellules immunes, par recrutement à partir de la circulation sanguine.

### *Les macrophages*

#### *Recrutement des macrophages*

L'infiltration macrophagique du TA se fait par recrutement et différenciation de monocytes circulants. La revue de Bourlier et al. (Bourlier and Bouloumie, 2009) et des travaux récents permettent de recenser les facteurs potentiels du recrutement macrophagique au sein du TA pendant l'obésité :

- la sécrétion de **facteurs chémo-attractants** suite à l'hypertrophie adipocytaire. La taille adipocytaire est un déterminant majeur de la sécrétion de nombreuses cytokines par l'adipocyte. La *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1/CXCL2) est un des facteurs chémo-attractants impliqués dans le recrutement macrophagique. On observe une augmentation de l'expression et des concentrations circulantes de MCP1 pendant l'obésité (Chen et al., 2005) et la surexpression de MCP-1 spécifiquement dans le TA entraîne une augmentation de l'infiltration macrophagique ainsi qu'une diminution de la sensibilité à l'insuline chez la Souris (Kamei et al., 2006; Kanda et al., 2006). D'autre part, l'inactivation de MCP-1 (Ito et al., 2008; Kanda et al., 2006) ou de son récepteur CCR2 (Weisberg et al., 2006) chez la Souris élevée en régime gras protège de l'infiltration macrophagique et de l'insulino-résistance ; mais certains de ces résultats ont été remis en cause (Inouye et al., 2007; Kirk et al., 2008).

L'ostéopontine, adipokine nouvellement décrite, amplifie l'infiltration macrophagique stimulée par MCP-1 (Kiefer et al., 2010; Kiefer et al., 2008; Nomiyama et al., 2007). Si l'observation d'une augmentation de la *macrophage inflammatory protein 1 alpha* (MIP1 $\alpha$ ) a été plusieurs fois corrélée à celle de l'obésité, son invalidation dans un modèle murin ne protège pas de l'infiltration macrophagique du au régime gras (Surmi et al., 2010), indiquant que cette chémokine n'est pas majoritairement responsable du recrutement macrophagique. De nombreux autres facteurs (en revue dans (Bourlier and Bouloumie, 2009)) sont capables d'activer le recrutement de macrophages dans le TA [leptine, TNF $\alpha$  et le (*C-C*) *motif ligand 5* (CCL5) (Keophiphath et al., 2010)].

- la **mort cellulaire** de type **nécrotique ou apoptotique**. L'expansion de la masse grasse chez l'Homme et la Souris est associée à l'apparition d'adipocytes nécrotiques (dont la perte de fonctionnalité est révélée par la disparition de l'intégrité de la GL par marquage immunohistochimique de la périlipine) (Cinti et al., 2005; Murano et al., 2008). Ces adipocytes morts sont entourés de cellules immunitaires (majoritairement des macrophages) et forment des structures en couronne (« *crown like structure* »). A ce jour, les mécanismes moléculaires reliant hypertrophie adipocytaire, nécrose adipocytaire, et recrutement macrophagique ne sont pas totalement connus. La mort cellulaire par apoptose est également capable de déclencher le recrutement de macrophages (Alkhouri et al., 2010). Cependant les adipocytes blancs sont relativement résistants à l'apoptose.

- la **production exagérée d'AG** par les adipocytes. L'hypertrophie adipocytaire entraîne, outre une libération de facteurs pro-inflammatoires, une production exagérée d'AG dont la capacité à recruter les macrophages a été mis en évidence par les modèles animaux invalidés ou mutés pour le *Toll like receptor 4* (TLR4) (Kim et al., 2007; Poggi et al., 2007; Shi et al., 2006; Suganami et al., 2007a; Tsukumo et al., 2007).

- la production de **vésicules exosomiques** par les adipocytes qui seraient capables d'activer les macrophages résidents et de stimuler la différenciation des monocytes circulants en macrophage activés (Deng et al., 2009) Tout comme les AG, les vésicules exosomiques exercent leurs effets sur les macrophages par l'intermédiaire de la voie du TLR4 (Deng et al., 2009).

- le **stress cellulaire**, notamment du réticulum endoplasmique (Hotamisligil, 2010).

- l'**hypoxie** tissulaire. L'hypoxie peut augmenter la production d'adipokines pro-inflammatoires par l'adipocyte (MCP-1, MIP-1 $\alpha$ ...) *via* le facteur de transcription *Hypoxia-inducible factor 1 alpha* (HIF-1 $\alpha$ ) (Wang et al., 2007).
- l'**endotoxémie métabolique** nutritionnelle, dont l'acteur moléculaire principal est le lipopolysaccharide (LPS). Le LPS peut moduler la production de cytokines pro-inflammatoires par l'adipocyte (leptine, MCP-1) (Leuwer et al., 2009). La revue de Li et Hotamisligil en présente les concepts (Li and Hotamisligil, 2010).

### *Polarisation*

Par comparaison avec l'activation des lymphocytes T helper et la classification Th1/Th2, l'activation des macrophages a été définie de manière classique par les états M1 et M2 (pour revue (Olefsky and Glass, 2010)). La polarisation M1 (par des cytokines de type Th1 comme l'interféron gamma, IFN $\gamma$ ) confère aux macrophages un phénotype pro-inflammatoire, caractéristique des macrophages recrutés. Ces derniers ont un pouvoir inflammatoire élevé, par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires interleukines ou autres (TNF $\alpha$ , IL6, IL12) ou d'ERO. En opposition, les macrophages résidents du TA présentent un phénotype M2, anti-inflammatoire et seraient impliqués dans les phénomènes de réparation et de remodelage tissulaire, ils sécrètent des cytokines anti-inflammatoires, comme IL10. On parle d'activation alternative, qui est conditionnée par les cytokines de type Th2, IL4 et IL13. La désignation M2 englobe aussi d'autres phénotypes macrophagiques. Différents facteurs orientent la polarisation des macrophages. Les vésicules exosomiques produites par les adipocytes influencent la polarisation macrophagique vers le type M1 (Deng et al., 2009). L'adiponectine est capable d'induire un phénotype M2 dans le TA humain et murin (Lovren et al., 2010; Ohashi et al., 2010). D'autre part, PPAR $\delta$  semble indispensable à la polarisation M2 (Kang et al., 2008; Odegaard et al., 2008). La polarisation des macrophages M2 peut également être orientée par d'autres cellules immunitaires comme les lymphocytes T régulateurs (Liu et al., 2010) ou même par des cellules souches mésenchymateuses chez l'Homme (Kim and Hematti, 2009). Chez la Souris, le groupe de Saltiel a montré qu'un régime enrichi en graisse provoquait le recrutement de macrophages de type M1 (Lumeng et al., 2007b) possiblement impliqués dans l'altération de la sensibilité à l'insuline (Lumeng et al., 2007b; Nguyen et al., 2007) ainsi qu'un changement de polarisation M2 vers M1 des macrophages résidents (Lumeng et al., 2007a). Ces macrophages présentent les marqueurs de surface F4/80, CD11b



et CD11c (Strissel et al., 2007). Les macrophages du TA humain présenteraient des caractéristiques à la fois M1 et M2 (Bourlier et al., 2008; Zeyda et al., 2007; Zeyda et al., 2010).

Cependant différents travaux semblent aujourd'hui remettre en cause le dogme M1/M2 chez la Souris et décrivent l'existence de « sous-types » de macrophages, aux phénotypes intermédiaires. L'étude de différents marqueurs de surface tels que *macrophage galactose-type C-type lectin 1* (MGL1) (Shaul et al., 2010), *mannose receptor* (MR) (Zeyda et al., 2010) ou CD206 (Fujisaka et al., 2009; Wentworth et al., 2010) ont permis de décrire des phénotypes mixtes au sein des classes M1 et M2. Il existerait ainsi des macrophages recrutés qui présenteraient des marqueurs de surface de type M2 (CD11<sup>+</sup>/MGL1<sup>med</sup>) ou même des macrophages recrutés CD11c<sup>-</sup>/MGL1<sup>+</sup> (Shaul et al., 2010) ou CD11c<sup>-</sup>/MR<sup>-</sup> (Zeyda et al., 2010). Enfin, la pertinence du marqueur CD11c pour l'identification des macrophages M1 est elle aussi controversée par les récents travaux de Li et al. montrant une hétérogénéité phénotypique au sein de la population CD11c positive après passage d'un régime gras à un régime standard (Li et al., 2010b). A la vue de ces récents travaux, on voit d'autant plus l'intérêt d'une nouvelle classification des macrophages non plus sur leur phénotype M1/M2 mais sur leurs fonctions (défense, remodelage, régulation) comme l'ont proposé Mosser and Edwards (Mosser and Edwards, 2008).

### *Rôles des macrophages*

Les macrophages pourraient être impliqués dans la prise en charges de lipides. Le fait que les macrophages soient préférentiellement observés autour d'adipocytes mourant en cours de délipidation soutiendrait cette hypothèse (Cinti et al., 2005). D'autre part, l'augmentation des capacités de stockage des lipides au sein du macrophage l'orientent vers un phénotype M2. Ainsi, la surexpression de DGAT1 chez la Souris favorise la prise de poids mais protège de l'infiltration et de l'activation des macrophages (Koliwad et al., 2010). Une surexpression spécifique de cette enzyme dans les macrophages suffit à produire les effets cités précédemment et à contrecarrer l'insulino-résistance. Les effets d'un traitement PPAR $\gamma$  agoniste soutiennent également cette hypothèse (Stienstra et al., 2008). Gu et al. ont récemment montré que la voie du TLR9 stimulait l'expression de TIP47, une protéine de la GL et induisait l'accumulation de lipides dans le macrophage (Gu et al., 2010).

D'autre part, les macrophages pourraient être impliqués dans le remodelage du TA comme le suggèrent Strissel et al. (Strissel et al., 2007). Par leurs relations avec les préadipocytes ils favoriseraient la production de matrice extra-cellulaire menant à la fibrose bien qu'ils puissent eux-mêmes sécréter des molécules pro-fibrosantes (Bouloumie et al., 2005). Comme le rappellent Bourlier et Bouloumié, les macrophages du TA humain présentent également un phénotype pro-angiogénique favorisant le remodelage tissulaire et influencent aussi l'adipogenèse en limitant la différenciation des cellules progénitrices. Ces observations suggèrent que les capacités d'expansion du TA peuvent être en partie contrôlées par les macrophages.

### ***Les lymphocytes***

L'infiltration du TA par les lymphocytes n'a été décrite que plus récemment. Kintscher et al. ont mis en évidence la présence de lymphocytes (cellules CD4 positives) au sein du TA de sujets diabétiques, quantité corrélée avec le tour de taille des patients. De plus, des souris soumises à un régime enrichi en graisse présentent une infiltration marquée de lymphocytes T dans le TA viscéral (Kintscher et al., 2008). Cependant, l'étude des souris obèses déficientes en lymphocytes ( $\text{rag}^{-/-}$ ) (Duffaut et al., 2009b) a montré que l'absence de lymphocytes ne suffisait pas à normaliser les paramètres métaboliques comme cela avait pu être montré avec les macrophages (Patsouris et al., 2008). Chez la Souris, le développement de la masse grasse s'accompagne d'une augmentation des lymphocytes T CD8 et d'une diminution des lymphocytes T CD4 helper et lymphocytes régulateurs (Feuerer et al., 2009) suggérant alors un rôle initiateur et propagateur pour les lymphocytes T CD8 (Nishimura et al., 2009) tandis que les lymphocyte CD4 seraient plutôt protecteurs et garants de la sensibilité à l'insuline (Nishimura et al., 2009; Winer et al., 2009). L'induction des lymphocytes T régulateurs chez la souris obèse permet de diminuer l'infiltration macrophagique et le  $\text{TNF}\alpha$  au sein du TA attribuant un rôle central à ce type cellulaire dans l'orchestration de la réponse immunitaire associée au développement de la masse grasse (Ilan et al., 2010).

### ***Les autres types cellulaires***

Les préadipocytes sont des cellules très sensibles à l'hypoxie associée à l'expansion de la masse grasse. Dans cette condition, elles sécrètent le facteur HIF-1 qui va réguler l'expression de gènes pro-inflammatoires (Wood et al., 2009). La sécrétion d'IL6 est très supérieure chez les préadipocytes par rapport aux adipocytes matures. Ces cellules, dont le rôle est encore peu

étudié dans la genèse de l'inflammation du TA associée à l'obésité, semblent pouvoir tenir un rôle important. D'autre part, les préadipocytes seraient également victimes de l'environnement pro-inflammatoire puisque dans ces conditions leur différenciation est inhibée (Poulain-Godefroy and Froguel, 2007). Enfin, Zhou et al. ont montré que des produits dérivés de l'oxydation pouvaient activer les préadipocytes (Zhou et al., 2010).

L'équipe d'A. Bouloumié propose également une hypothèse selon laquelle les cellules endothéliales pourraient être impliquées dans le processus inflammatoire. Des facteurs pro-angiogéniques pourraient faire entrer les cellules endothéliales en sénescence et entraîner leur vieillissement prématuré, ceci ayant pour conséquence d'orienter ces cellules vers un phénotype inflammatoire qui, associées aux conditions hypoxiques, favoriserait le recrutement de cellules immunes au sein du TA (Villaret et al., 2010).

### ***La cinétique d'infiltration des cellules immunes pendant le développement de la masse grasse***

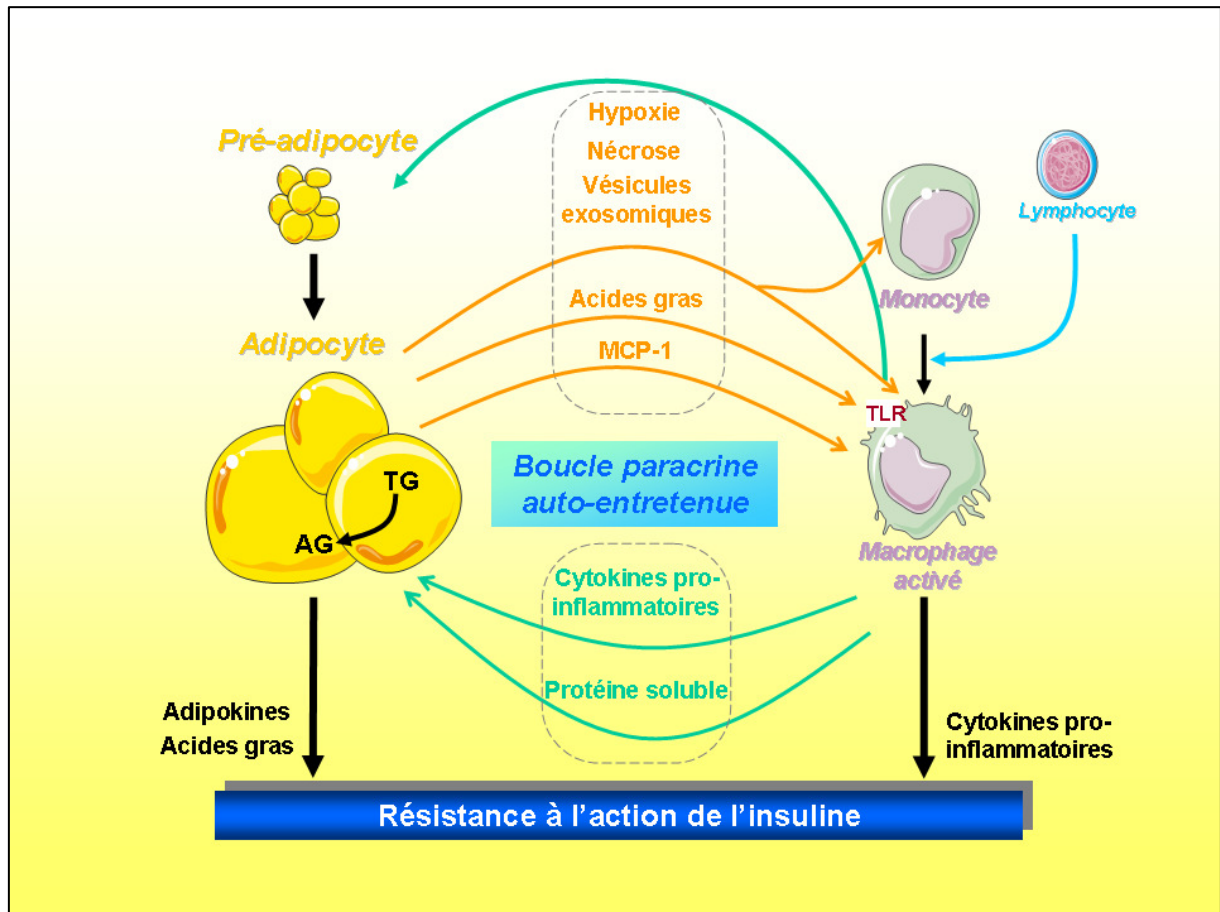
Si la présence de cellules immunes a été montrée dans le cadre d'une obésité établie, qu'en est-il de la cinétique d'apparition de ces cellules au cours du développement de la masse grasse ? Différents travaux ont rapporté une apparition précoce des macrophages après la mise en régime gras (dès 8 semaines) (Strissel et al., 2010). Cependant une autre étude a montré une infiltration maximale de ces cellules après 16 semaines de régime, corrélée à la nécrose adipocytaire (Strissel et al., 2007). Concernant les lymphocytes, plusieurs travaux décrivent l'infiltration lymphocytaire avant celles des macrophages, dès 5 ou 8 semaines de régime gras (Duffaut et al., 2009b; Kintscher et al., 2008; Nishimura et al., 2009). L'étude récente de Strissel relate même une infiltration des lymphocytes encore plus tardive, vers 22 semaines de régime gras, qui serait associée au remodelage tissulaire (Strissel et al., 2010). On voit que ces résultats sont aujourd'hui très controversés et qu'ils doivent certainement être influencés par le fond génétique des animaux, le type de régime, les marqueurs de surface utilisés...

## **2.3- Communications intercellulaires**

### ***Le dialogue adipocyte / macrophage***

Une communication de type paracrine a été décrite entre adipocytes et macrophages faisant intervenir les AG et les cytokines pro-inflammatoires. Ainsi, les AG produits en excès par les

adipocytes hypertrophiés sont capables d'activer les macrophages par la voie du TLR4 (Suganami et al., 2005). De plus, nous avons vu précédemment que des vésicules exosomiques produites par les adipocytes pouvaient participer au dialogue adipocyte/macrophage (Deng et al., 2009). En retour les macrophages sécrètent des cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ ) qui vont moduler le métabolisme de l'adipocyte. Un nouveau mode de communication entre macrophages et adipocytes a récemment été décrit par Kurokawa et al. faisant intervenir les protéines solubles macrophagiques AIM (Kurokawa et al., 2010). Ces dernières seraient captées par l'adipocyte par endocytose dépendante du CD36 puis inhiberaient l'activité de la *fatty acid synthase* (FAS), et augmenteraient la lipolyse. La Figure 24 résume des interactions.



**Figure 24 : Le dialogue entre les adipocytes et les macrophages pendant l'obésité et l'insulino-résistance.**

D°: degré, AIM : *apoptosis inhibitor of macrophage*, MCP-1: *monocyte chemotactic protein 1*, TLR: *toll like receptor*, AG: acide gras, TG: triglycéride.

### ***Le dialogue adipocyte / lymphocyte***

Duffaut et al. proposent un dialogue entre adipocytes et lymphocytes dans lequel les cellules adipeuses par leurs sécrétions recrutent les lymphocytes T qui en retour modulent la lipogénèse (Duffaut et al., 2009b). Le recrutement des lymphocytes T CD8 par les adipocytes est également observé par Nishimura et al., ces auteurs postulent que les macrophages soient recrutés suite à ce dialogue, attribuant alors un rôle initiateur aux lymphocytes (Nishimura et al., 2009). Un contact cellule/cellule impliquant la voie CD40/CD40L participerait également aux dialogues entre adipocytes et lymphocytes à l'origine de l'altération du métabolisme adipocytaire (Poggi et al., 2009).

### ***Le dialogue préadipocyte / adipocyte / macrophage***

Kurokawa et al. montrent que les protéines AIM (décrites précédemment), produites par les macrophages sont capables d'inhiber la maturation des préadipocytes (Kurokawa et al., 2010). D'autre part, l'application de milieux conditionnés de macrophages sur des préadipocytes a permis de montrer que les sécrétions macrophagiques sont capables de promouvoir un phénotype pro-inflammatoire chez les préadipocytes et d'inhiber leur différenciation (Lacasa et al., 2007). Les remaniements de la matrice extra-cellulaire semblent jouer un rôle important dans l'inhibition de la différenciation au profit de la prolifération des préadipocytes (Keophiphath et al., 2009). Enfin, dans un environnement hypoxique, les préadipocytes sécrètent des cytokines chémoattractantes favorisant le recrutement des macrophages et l'installation de la communication paracrine entre les différents types cellulaires.

## **2.4- Mécanismes moléculaires**

### ***Des signaux extracellulaires à NF $\kappa$ B***

Les AG sont capables d'activer les macrophages par la voie des TLR. Les TLR sont des récepteurs trans-membranaires dont l'activation par stimulation microbienne conduit à l'activation de voies de signalisation intracellulaires participant à la production de cytokines nécessaires à la mise en place de la réponse immunitaire. Au delà de leur rôle dans l'immunité différents travaux ont impliqué les TLR dans la régulation du métabolisme énergétique, notamment par leur rôle dans le TA. En particulier TLR4 et TLR2 sont capables de lier les

AG sécrétés en excès par les adipocytes (Suganami et al., 2007b). Les expériences d'invalidation ou de mutation du TLR4 soutiennent cette hypothèse puisque les animaux sont alors protégés de l'infiltration macrophagique et des désordres métaboliques qui y sont associés (Kim et al., 2007; Poggi et al., 2007; Shi et al., 2006; Suganami et al., 2007a; Tsukumo et al., 2007). Une délétion de Tlr4 spécifiquement dans les cellules myéloïdes confère également la même protection attestant de l'importance de cette voie de signalisation (Saberri et al., 2009). La comparaison des simples KO Tlr4 avec doubles KO Tlr4/Tlr2 (Nguyen et al., 2007) suggèrent une redondance entre les deux récepteurs. La voie du TLR4 implique également le co-récepteur CD14 dont l'importance dans l'inflammation associée à l'obésité a été révélée par les études *in vivo* de perte de fonction (Roncon-Albuquerque et al., 2008).

La voie du TLR4 aboutit au recrutement et à l'activation du facteur de transcription NFκB dont l'implication dans la production de cytokines pro-inflammatoire est largement reconnue, et ceci après la mise en jeu d'une cascade de phosphorylation de différentes kinases. IKKβ active les voies Janus kinase (JNK) et MEK/ERK. Les modèles animaux d'invalidation des protéines CD14 (Roncon-Albuquerque et al., 2008), IKKβ (Solinas et al., 2007), JNK1 (Arkan et al., 2005) présentant tous une diminution de l'infiltration macrophagique soutiennent cette hypothèse.

D'autre part, la liaison des cytokines sur leurs récepteurs activent ces mêmes voies de signalisation. Les voies de signalisation classiquement activées sont : NFκB, JNK, p38MAP kinases ou ERK.

### ***Du NF κB à l'insulino-résistance***

Nous avons vu précédemment qu'inflammation et désordres métaboliques étaient associés. Quels mécanismes moléculaires sont mis en jeu ? En 1996, Hotamisligil démontrait que la stimulation par le TNFα menait à la phosphorylation de résidus sérines d'IRS1 et par là même à son inactivation (Hotamisligil et al., 1996). Le TNFα peut également réduire *in vitro* l'expression du récepteur à l'insuline, d'IRS1 et de GLUT4 (Stephens et al., 1997). D'autre part, des interactions existent entre la voie de signalisation des cytokines et celle de l'insuline (Tilg and Moschen, 2008) aboutissant principalement à l'inhibition d'IRS1 par les kinases (JNK, IKKβ). La voie du NFκB, initiée par les TLR, altère de la même manière la voie de

signalisation de l'insuline. L'entrée de glucose dans la cellule peut donc être affectée par l'activation de ces différentes voies pro-inflammatoires.

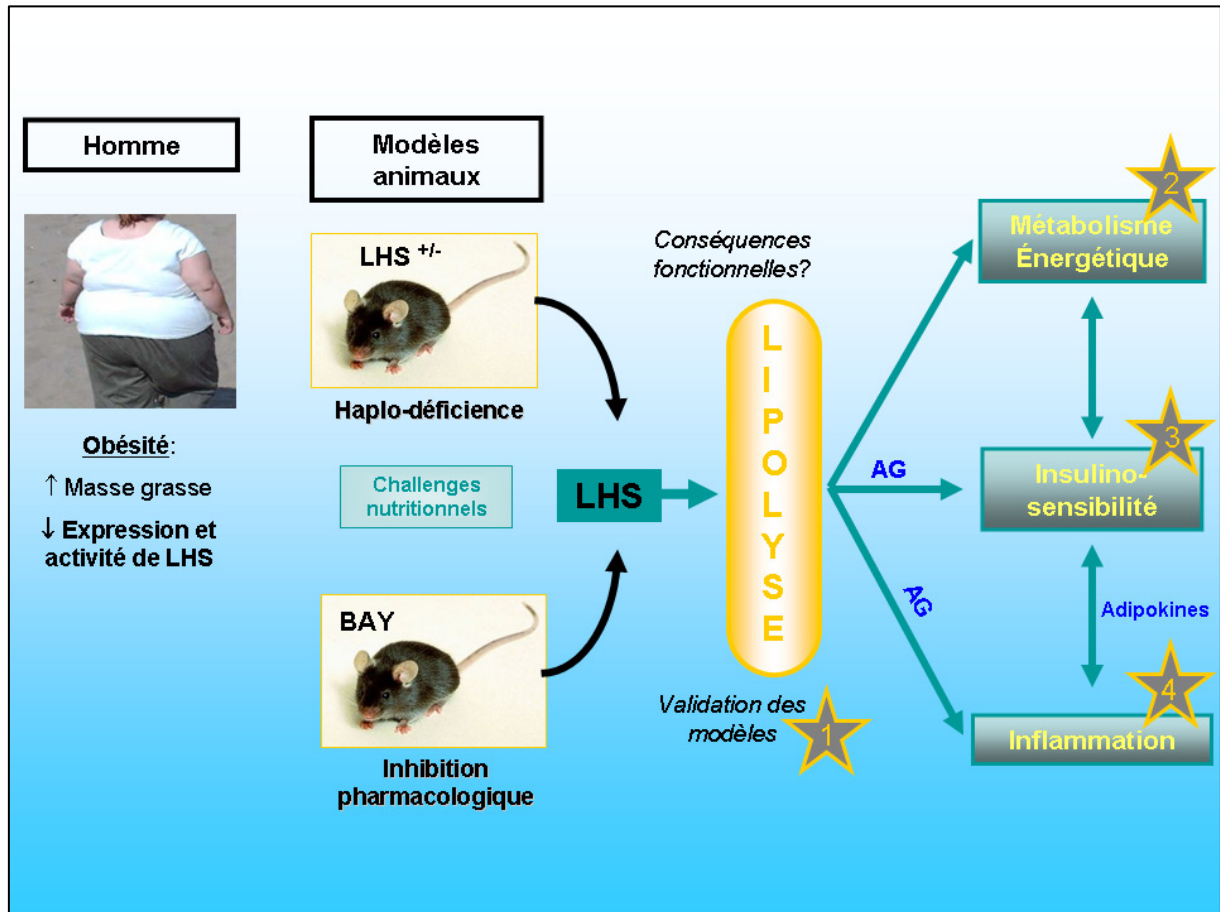
## II Objectifs

Partant du constat que:

- 1) chez le sujet obèse et insulino-résistant, l'augmentation de la masse grasse est associée à une diminution de l'expression et de l'activité de la LHS (Jocken et al., 2007; Langin et al., 2005; Large et al., 1999)
- 2) les souris Lhs KO, non obèses, ne représentent pas un bon modèle d'étude des dérégulations de la LHS pendant l'obésité,

nous avons imaginé que des souris haplo-déficientes pour le gène de la Lhs (hétérozygotes Lhs, LHS<sup>+/-</sup>) rendues obèses par une intervention nutritionnelle pouvait représenter un bon modèle d'étude des dérégulations de cette lipase. Nous disposions d'autre part en collaboration avec le groupe pharmaceutique Glaxo Smith Kline d'un inhibiteur spécifique de la LHS, le BAY. Un traitement chronique d'animaux obèses représente un second modèle d'étude de défaut d'activité de la LHS. Nos objectifs étaient les suivants (Figure 25) :

- 1) Valider les modèles : conséquences fonctionnelles de l'haplo-déficiéce pour le gène de la Lhs et mise au point des traitements chroniques au BAY,
- 2) Caractériser le métabolisme énergétique dans chacun de nos modèles,
- 3) Evaluer l'influence de l'inhibition de la LHS sur la sensibilité à l'insuline,
- 4) Caractériser l'inflammation du TA afin de déterminer son rôle potentiel dans les modifications de sensibilité à l'insuline.



**Figure 25 : Rationnel de l'étude et stratégie expérimentale**



### III Résultats expérimentaux

**ARTICLE III : Les souris hétérozygotes pour le gène de la lipase hormono-sensible (LHS<sup>+/-</sup>) présentent une diminution des flux d'acides gras et une amélioration de la sensibilité à l'insuline.**

#### Introduction

Lorsque j'ai débuté ma thèse, notre laboratoire possédait une lignée de souris Lhs KO (lignée de C. Holm, Suède) et des tests préliminaires *in vitro* avaient montré une activité enzymatique de la LHS diminuée chez les souris haplodéficientes. J'ai donc été en charge de valider cette observation et nous avons ensuite débuté un travail exploratoire de description du phénotype des souris LHS<sup>+/-</sup>. Les premières approches ont été réalisées en régime standard. Nous avons caractérisé le défaut lipolytique associé à l'haplodéficiência de la LHS. L'investigation de la sensibilité à l'insuline des animaux LHS<sup>+/-</sup> en régime standard a montré une amélioration de la tolérance à l'insuline (résultats non présentés). Cependant, la différence entre les souris LHS<sup>+/-</sup> et contrôles était très faible et a nécessité l'emploi d'un grand nombre d'animaux pour être statistiquement significative. Nous avons donc imaginé que le phénotype des souris LHS<sup>+/-</sup> pourrait être révélé par un régime enrichi en graisses. Des souris mâles B6D2/F1 soumises à un régime à 45% kCal de lipides (*high fat diet* : HFD) pendant 12 à 16 semaines, ont développé une obésité comparable à celle des animaux contrôles tandis que les souris Lhs KO, comme décrit dans la littérature (Harada et al., 2003), ont résisté à la prise de poids. Par une approche de fluxomique, nous avons étudié les flux d'AG dans ce modèle et montré que les souris LHS<sup>+/-</sup> présentaient un *turn-over* global des AG diminué. Nous avons également observé que les souris LHS<sup>+/-</sup>, même soumises à un régime gras montraient toujours une amélioration de la tolérance à l'insuline par rapport aux animaux contrôles. De plus, les animaux LHS<sup>+/-</sup> ont présenté une augmentation de l'utilisation du 2-désoxyglucose par le TA et les muscles révélant une augmentation de la sensibilité à l'insuline. Des données de calorimétrie indirecte viennent compléter le phénotype et nous informent sur une augmentation de l'utilisation du glucose comme substrat énergétique préférentiel chez les souris LHS<sup>+/-</sup>. Ce travail montre qu'une réduction des capacités lipolytiques peut modifier les flux lipidiques et influencer positivement la sensibilité à l'insuline.

Diminution génique ou pharmacologique de la lipase hormono-sensible

Article

# La diminution des capacités lipolytiques du tissu adipeux par l'haplodéficiencia de la lipase hormono-sensible diminue les flux d'acides gras et améliore l'insulino-sensibilité

**Amandine Grousse<sup>1,2</sup>, Geneviève Tavernier<sup>1,2</sup>, Laurent Monbrun<sup>1,2</sup>, Véronique Bézaire<sup>1,2</sup>, Cédric Moro<sup>1,2</sup>, Aurélie Waget<sup>2,3</sup>, Balbine Roussel<sup>1,2</sup>, Bénédicte Prunet Marcassus<sup>4</sup>, Sylvie Caspar-Bauguil<sup>1,2,5</sup>, Cecilia Holm<sup>6</sup>, Jean Galitzky<sup>2,7</sup>, Thierry Sulpice<sup>4</sup>, , Rémy Burcelin<sup>2,3</sup>, and Dominique Langin<sup>1,2,5</sup>.**

From <sup>1</sup> Inserm, U858, Obesity Research Laboratory, Team 4, Rangueil Institute of Molecular Medicine, BP 84225, F-31432 Toulouse Cedex 4, France

<sup>2</sup> University of Toulouse, IFR150, Paul Sabatier University, France

<sup>3</sup> Inserm, U858, Team 2, Rangueil Institute of Molecular Medicine, Toulouse, France <sup>4</sup>Physiogenex, Prologue Biotech, Rue Pierre et Marie Curie, Labège-Innopole, France

<sup>5</sup> Laboratory of clinical biochemistry, Toulouse University Hospitals, France

<sup>6</sup> Department of Experimental Medical Science, Lund University, Lund, Sweden

<sup>7</sup> Inserm, U858, Team 1, Rangueil Institute of Molecular Medicine, Toulouse, France

**Running head:** altered lipid metabolism in HSL<sup>+/-</sup> obese mice.

Diminution génique ou pharmacologique de la lipase hormono-sensible

# Impairment of Adipose Tissue Lipolysis Due to Hormone-Sensitive Lipase Haploinsufficiency Reduces Fatty Acid Fluxes and Improves Insulin Sensitivity

Amandine Girousse<sup>1,2</sup>, Geneviève Tavernier<sup>1,2</sup>, Laurent Monbrun<sup>1,2</sup>, Véronic Bézaire<sup>1,2</sup>, Cédric Moro<sup>1,2</sup>, Bénédicte Prunet Marcassus<sup>4</sup>, Aurélie Waget<sup>2,3</sup>, Balbine Roussel<sup>1,2</sup>, Sylvie Caspar Bauguil<sup>1,2,5</sup>, Jean Galitzky<sup>2,7</sup>, Cecilia Holm<sup>6</sup>, Thierry Sulpice<sup>4</sup>, Rémy Burcelin<sup>2,3</sup>, and Dominique Langin<sup>1,2,5</sup>.

From <sup>1</sup> Inserm, U858, Obesity Research Laboratory, Team 4, Ranguel Institute of Molecular Medicine, BP 84225, F-31432 Toulouse Cedex 4, France

<sup>2</sup> University of Toulouse, IFR150, Paul Sabatier University, France

<sup>3</sup> Inserm, U858, Team 2, Ranguel Institute of Molecular Medicine, Toulouse, France

<sup>4</sup> Physiogenex, Prologue Biotech, Rue Pierre et Marie Curie, Labège-Innopole, France

<sup>5</sup> Laboratory of clinical biochemistry, Toulouse University Hospitals, France

<sup>6</sup> Department of Experimental Medical Science, Lund University, Lund, Sweden

<sup>7</sup> Inserm, U858, Team 1, Ranguel Institute of Molecular Medicine, Toulouse, France

**Running title:** Altered lipid metabolism in HSL<sup>+/-</sup> obese mice

Correspondance: E-mail: dominique.langin@inserm.fr, Phone: +33(0)5 61325628; Fax: +33(0)561325623

## Abstract

Hormone-sensitive lipase (HSL) is one of the enzymes catalyzing acylglycerol degradation in adipose tissue (AT). Expression and activity of AT HSL are decreased in obesity and insulin resistance. To determine metabolic fluxes and insulin sensitivity with an inhibition of AT lipolysis comparable to the defect reported in human obesity, HSL heterozygous mice (HSL<sup>+/-</sup>) fed high fat diet were investigated. Blunted lipolytic capacities due to HSL haploinsufficiency was associated with global free fatty acid turn-over reduction and improvement of insulin sensitivity measured *in vivo* without modification of body weight and fat mass. This enhancement was not attributable to a modulation of AT inflammation. Treatment with a specific HSL inhibitor attenuated insulin resistance in high fat diet-fed mice. This work demonstrates that a reduction in lipolytic capacity can reshape lipid fluxes and improve insulin sensitivity without modification of fat mass.

## INTRODUCTION

White adipose tissue (WAT) ensures the control of energy stores according to the nutritional status. In the fed state, under the influence of insulin, WAT stores excess energy as triacylglycerols (TG) in the lipid droplet of adipocytes. When energy is needed between meals or during physical exercise, WAT delivers fuel to the peripheral organs in the form of fatty acids (FA). Lipolysis is the process by which stored TG are released as non esterified FA (NEFA) (Lafontan and Langin, 2009). It involves different players such as lipases, co-lipases and also proteins that coat the lipid droplet. It is now largely accepted that the enzymatic breakdown of TG is initiated by adipose triglyceride lipase (ATGL) and leads to the formation of diacylglycerols (DG) that are in turn hydrolyzed by hormone-sensitive lipase (HSL) (Bezaire et al., 2009; Zimmermann et al., 2004). Of note, HSL also shows TG hydrolase activity. The final step of this catabolic process is the hydrolysis of monoacylglycerols by monoglyceride lipase leading to the release of one molecule of glycerol and three molecules of FA. In human AT, HSL mRNA and protein content correlates with maximal stimulated lipolysis (Large et al., 1998). Reduction of WAT fat cell lipolysis and HSL activity has been observed in obesity (Large et al., 1999). Moreover, ATGL and HSL

expression are decreased in WAT of obese and insulin-resistant patients (Jocken et al., 2007; Langin et al., 2005). The defective HSL expression has also been observed in cultures of differentiated preadipocytes from obese individuals highlighting the primary nature of this impairment (Langin et al., 2005). The increase in fat mass seen in obesity is accompanied by increased plasma FA levels (Opie and Walfish, 1963) and FA have been postulated to play a critical role in the development of insulin resistance (McGarry, 1992). However, the influence of variation in fat cell lipolysis on insulin sensitivity remains elusive. From human data, it remains unclear whether decreased HSL expression and activity favours the development of obesity through retention of FA within adipocytes or is a protective mechanism to avoid excess NEFA release and consequent insulin resistance and metabolic abnormalities.

The role of HSL has been studied in knock-out (KO) mice (Haemmerle et al., 2002; Harada et al., 2003; Osuga et al., 2000; Wang et al., 2001). The major phenotypic features of HSL KO mice are male sterility, DG accumulation in various tissues, blunted stimulated WAT lipolysis and, surprisingly, resistance to diet-induced obesity. The unsuspected impairment of fat development during high-fat feeding was hypothetically attributed to a defect in adipocyte differentiation (Harada et al., 2003; Zimmermann et al., 2003). The absence of HSL could alter the release of PPAR $\gamma$  ligands necessary for complete fat cell differentiation. Furthermore, WAT of HSL KO mice have been described as hypermetabolic with enhanced fat oxidation capacity (Strom et al., 2008). Because of their resistance to diet-induced obesity, HSL KO mice are not a relevant model to study the impact of impaired HSL activity seen in human obesity.

HSL haploinsufficient (HSL<sup>+/-</sup>) mice showed reduced WAT lipase activity. These preliminary results prompted us to hypothesize that obese HSL<sup>+/-</sup> mice could appropriately mimic the HSL defect observed in obese subjects. HSL<sup>+/-</sup> mice had impaired HSL expression and enzymatic activity, and blunted stimulated lipolysis. When fed a high-fat diet, HSL<sup>+/-</sup> mice became as obese as WT control mice. Lipid metabolism studied dynamically *in vivo* revealed a global reduction of FA fluxes in HSL<sup>+/-</sup> mice. The slowdown of FA metabolism was accompanied by an improvement of insulin sensitivity.

## RESULTS

### Functional consequences of HSL haploinsufficiency in high fat diet-fed mice

HSL<sup>+/-</sup> mice were generated by mating WT and HSL<sup>-/-</sup> mice. HSL mRNA expression was 50% lower in WAT of HSL<sup>+/-</sup> mice compared to WT mice (Fig. 1A). mRNA expression of ATGL, its co-activator CGI-58 and PLIN1 were similar in WT and HSL<sup>+/-</sup> mice suggesting that no compensatory mechanism occurred as a result of the reduction in HSL expression (Fig. 1A). *In vitro* hydrolase activities against a cholesterol ester (Fig. 1B) and a TG (Fig. 1C) were both reduced (-60% and -45%, respectively) in WAT of HSL<sup>+/-</sup> mice indicating that reduced expression of HSL had the expected impact on cognate enzymatic activities. Reduced HSL activity was associated with blunted *in vitro* and *in vivo*  $\beta$ -adrenergic stimulated lipolysis (Fig. 1D and E). However, basal lipolysis was not altered. Therefore, decreased expression of HSL alters lipolytic function at the cellular level as well as *in vivo*.

### Body weight and fat mass in HSL heterozygous mice fed high-fat diet

On a standard chow diet, the growth curves of WT and HSL<sup>+/-</sup> mice were similar (Fig. 2A). Next, we examined the consequences of diminished HSL function in mice fed a high-fat diet. As previously reported (Harada et al., 2003), HSL<sup>-/-</sup> mice were resistant to diet-induced obesity whereas WT and HSL<sup>+/-</sup> mice gained weight at a comparable rate and became obese (Fig. 2B). After 12 weeks of high-fat diet, fat mass was assessed by quantitative nuclear magnetic resonance imaging. WT and HSL<sup>+/-</sup> presented similar weight and fat mass while fat mass of HSL<sup>-/-</sup> mice was two third lower (Fig. 2C). There was no difference in WAT TG content between HSL<sup>+/-</sup> and WT mice (523  $\pm$  21 vs 547  $\pm$  15 nmol/mg tissue in WT and HSL<sup>+/-</sup> mice, respectively). Accordingly, plasma levels of leptin were identical in the two genotypes (Table S1). Food intake was similar in HSL<sup>+/-</sup> and WT mice (Fig. 2D). Energy expenditure assessed by indirect calorimetry did not differ between the two genotypes (Fig.

2E). No difference in WAT morphology was observed by histochemistry (Fig. 2F). Mean adipocyte area was not modified in HSL<sup>+/-</sup> mice compared to control mice (Fig. 2G). The data show that decreased expression of HSL does not influence fat mass and WAT morphology during diet-induced obesity.

#### **Metabolic plasma parameters in HSL heterozygous mice**

Metabolic plasma parameters from HSL<sup>+/-</sup> and WT mice fed a high fat diet are presented in Table S1. Fasting plasma glucose and insulin were not different between HSL<sup>+/-</sup> and WT mice. The decreased expression of HSL does not affect basal fasted parameters of glucose homeostasis. Fasted plasma NEFA, glycerol, TG and total cholesterol were similar in both strains of mice.

#### **Modification of fatty acid fluxes in HSL heterozygous mice**

As no alteration of metabolic parameters was observed in steady state measurements, we determined FA fluxes in high fat diet-fed mice by stable perfusion of radiolabelled palmitate. Global tracer clearance that represents exit of the radioactive tracer from the blood compartment was markedly decreased in HSL<sup>+/-</sup> mice indicating that partial HSL depletion reduces peripheral FA uptake. Global FA oxidation represented by radioactive water measured in plasma was also reduced (Fig. 3A). Total radioactive FA storage, deduced from these measurements, was decreased in HSL<sup>+/-</sup> mice. Global FA turnover estimated through the evolution of plasma radioactive palmitate isotopic dilution (which is influenced by the clearance and dilution by cold and radioactive FA released from WAT in the fasted state) was in turn reduced in HSL<sup>+/-</sup> mice compared to WT mice. Tissue-specific radioactive FA incorporation in the TG pool was evaluated and showed reduction in WAT and heart of HSL<sup>+/-</sup> mice whereas esterification in *soleus* muscle was not affected (Fig. 3B). Total TG content was not affected in WAT of HSL<sup>+/-</sup> mice and whereas it was decreased in *soleus* and heart (Fig. 3C). Hence, the decreased lipolytic capacity in WAT induced by partial HSL deficiency provokes a compensatory diminution in FA uptake and storage, especially in WAT. These changes take place without influencing total WAT mass.

#### **HSL haploinsufficiency improves insulin sensitivity and glucose tolerance in obese mice**

Increased levels of plasma FA are known deleterious factors for insulin sensitivity. We therefore postulated that the alteration of FA fluxes could influence peripheral insulin sensitivity in HSL<sup>+/-</sup> mice. Insulin and glucose tolerance tests performed on high fat diet-fed mice revealed that partial HSL depletion improved insulin and glucose tolerance *in vivo* (Fig. 4A and 4B). Plasma measurements of adiponectin and palmitoleate, two insulin sensitizers produced by adipocytes, did not show any difference between HSL<sup>+/-</sup> and WT mice (Table S1). In order to gain further insights into the origin of the global improvement of insulin tolerance in HSL<sup>+/-</sup> mice, *in vivo* glucose utilization was determined in various tissues by 2-desoxy-D-[<sup>3</sup>H] glucose infusion. Insulin-stimulated glucose utilization was increased in *soleus* (oxidative) muscle and showed a tendency to increase in *biceps femoris* (glycolytic) muscle ( $p=0.10$ ) (Fig. 4C). An increase was also observed in WAT. Skeletal muscles and WAT may therefore participate in the global improvement of insulin tolerance seen in HSL<sup>+/-</sup> mice. Interestingly, respiratory quotient was increased in HSL<sup>+/-</sup> mice suggesting a shift from FA to glucose as substrate (Fig. 4D). Furthermore, substrate oxidation measured *ex vivo* in *soleus* muscle was increased for glucose but not for oleate in these mice (Fig. 4E). We wished to confirm that HSL haploinsufficiency protects against the development of insulin resistance in another model. To that end, WT and HSL<sup>+/-</sup> mice were fed a high fructose diet for 48 weeks. While no difference in body weight was observed between the genotypes (Fig. S1A), HSL<sup>+/-</sup> mice were more insulin sensitive than WT mice (Fig. S1B). Together these data suggest that the improvement in global insulin sensitivity is linked to the modification of FA metabolism due to partial HSL deficiency in WAT.

#### **HSL haploinsufficiency does not influence adipose tissue inflammation in obese mice**

As WAT inflammation may cause insulin resistance, we investigated WAT macrophages and inflammatory molecules. The number of macrophages in the stroma-vascular fraction of WAT did not differ between HSL<sup>+/-</sup> and WT mice fed a high fat diet (Fig. S2A). Accordingly, mRNA levels of macrophage markers were not different (Fig. S2B). Similarly, gene expression of

inflammatory markers was similar in WAT from HSL<sup>+/-</sup> and WT mice (Fig. S2C). Therefore, the resistance to obesity-induced insulin resistance of HSL<sup>+/-</sup> mice is not linked to a decrease in WAT inflammation compared to WT mice.

#### **Pharmacological HSL inhibition also improves insulin sensitivity of obese mice**

Diet-induced obese mice chronically treated with a specific HSL inhibitor, BAY, showed improved insulin tolerance (Fig 4F) without modification of body weight (Fig 4G).

## **DISCUSSION**

During the lipolytic process in WAT, FA are produced by the coordinated action of lipases. Obesity and insulin resistance are associated with decreased expression and activity of HSL correlated with blunted stimulated lipolysis (Jocken et al., 2007; Large et al., 1999). This defect seems to be a primary event as it is observed in non-obese first-degree relatives to obese subjects and *ex vivo* in differentiated preadipocytes from obese subjects (Hellström et al., 1996; Langin et al., 2005). Resistance to catecholamine-induced lipolysis has also been shown *in vivo* in obese subjects from childhood to adulthood (Bougnères et al., 1997; Enoksson et al., 2000). The physiological significance of lipolysis and HSL defects in obesity may be seen in two ways. A lipolytic defect could contribute to the development of obesity through impairment in the mobilization of fat stores. Alternatively, the defect may protect against excessive FA release and ensuing deleterious action of FA on insulin sensitivity (Samuel et al., 2010). To address these clinically relevant questions, we produced a mouse model similar to the human pathological condition, i.e. an obese mouse with reduced HSL activity in WAT. Phenotyping of the animals revealed that a partial defect in HSL expression and lipolysis did not have a major influence on fat mass and, hence, that chronic inhibition of FA release from WAT did not contribute to the development of obesity. However, it provoked a global slowdown of FA metabolism leading to an improvement of insulin tolerance (Fig. 4H).

The development of fat mass was not compromised in HSL<sup>+/-</sup> mice fed high fat diet. Surprisingly, complete HSL deficiency leads to a resistance to diet-induced obesity (Harada et al., 2003). It may be hypothesized that the presence of an active allele is sufficient to compensate for the defect in adipogenesis, e.g. through production of signalling lipolytic by-products (Kraemer and Shen, 2006). The identical fat mass in HSL<sup>+/-</sup> and WT mice was supported by similar food intake, energy expenditure and leptin levels in the two genotypes. Adipocyte size was not modified by HSL haploinsufficiency. In accordance with the observation that larger adipocytes show increased basal release of FA (Wueest et al., 2009), no modification in basal lipolysis was seen in HSL<sup>+/-</sup> mice. The normal development of WAT in a condition of decreased FA release raised questions on the dynamics of lipid fluxes. Using a fluxomics approach, we showed that HSL<sup>+/-</sup> mice presented altered global FA turnover, decreased WAT lipolysis being linked to reduced FA esterification in WAT. The new equilibrium of FA metabolism at a slower rate may explain the preservation of fat mass in HSL<sup>+/-</sup> mice. The data indicate that the HSL and consequent stimulated lipolysis defect seen in human obesity is unlikely to participate in the excessive development of WAT.

The data also shed new light on the mechanisms of lipid-induced insulin resistance. To date, there is a general agreement that FA cause deleterious effects on insulin signalling in peripheral organs. The mechanisms of lipid-induced insulin resistance have partly been unravelled (Samuel et al., 2010). The working models are based on overload of lipids from exogenous sources, i.e., dietary FA for high fat diet or FA produced by lipoprotein lipase-mediated hydrolysis of TG during lipid and heparin infusion (Samuel et al., 2010; Schenk et al., 2008). To date, little is known on the effect of FA released by WAT lipolysis on the modulation of insulin sensitivity. Here, we show that, when WAT lipolysis is diminished, a slowdown in FA metabolism is likely to contribute to the improvement of insulin tolerance in the obese state. This happens in a situation when FA and TG steady-state plasma levels remain unchanged. HSL haploinsufficiency in obese mice was associated with improved insulin and glucose tolerance. Results from insulin and glucose tolerance tests were supported by indirect calorimetry data showing increased utilization of glucose as energy



substrate and increased glucose oxidation in *soleus* muscle from HSL<sup>+/-</sup> mice. In accordance with insulin tolerance test, *in vivo* insulin-stimulated glucose uptake was increased in WAT and skeletal muscles of HSL<sup>+/-</sup> mice. Accumulation of TG in skeletal muscle of sedentary people is associated with impaired insulin-stimulated glucose metabolism (Galgani et al., 2008). The reduced TG level observed in soleus muscle of HSL<sup>+/-</sup> could therefore be involved in the improved metabolic performance of this tissue. The direct involvement of altered FA fluxes in the improvement of insulin resistance of obese mice is also supported by the lack of modifications in other potential contributors to the control of insulin sensitivity (Schenk et al., 2008). Plasma levels of two molecules with insulin-sensitizing properties, adiponectin, an established adipocytokine, and palmitoleate, a novel lipokine, were identical in HSL<sup>+/-</sup> and WT mice (Cao et al., 2008; Shetty et al., 2009). Increase in WAT macrophage number and expression of inflammatory molecules has been proposed to contribute to obesity-induced insulin resistance (Bourlier and Bouloumie, 2009). However, neither macrophage number nor gene expression of macrophage markers and inflammatory factors were modified in high fat diet-fed HSL<sup>+/-</sup> mice indicating that chronic inhibition of lipolysis, unlike acute stimulation, does not modify the content of macrophages in WAT (Kosteli et al., 2010).

This work has relevance on therapeutic strategies aimed at preventing the development of obesity-associated insulin resistance. The interest in antilipolytic drugs has been shown with nicotinic acid and derivatives which have been used for decades as lipid-lowering drugs. These compounds act through a G-protein-coupled receptor with antilipolytic action in fat cells (Lafontan and Langin, 2009). However, the receptor is expressed in other cell types than adipocytes. The use of the drugs has been impaired due to upper-body skin flushing. Moreover, data on insulin sensitivity are conflicting (Karpe and Frayn, 2004). Search for alternative drugs with antilipolytic effect has led to synthesis of several series of HSL inhibitors (Wang and Fotsch, 2006). The compounds are highly selective in part because of the low homology between HSL and known mammalian lipases (Langin et al., 1993). We show here that HSL haploinsufficiency improves insulin sensitivity and does not favour accumulation of fat. As a further proof of concept, chronic pharmacological inhibition of lipolysis using a selective HSL inhibitor attenuated insulin intolerance in high fat diet fed mice.

In summary, HSL haploinsufficiency leads to a decrease in WAT lipolysis and a slowdown of FA fluxes associated with improved insulin tolerance (Fig. 4H). Fat mass remains unchanged. Long term moderate inhibition of WAT lipolysis can therefore be beneficial in the treatment of obesity-related metabolic disturbances for maintaining FA fluxes that will not compromise insulin action.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Animal generation, treatments and phenotypic analyses

Targeted disruption of the HSL gene and generation of HSL<sup>-/-</sup> mice have been described elsewhere (Vallet-Erdtmann et al., 2004). All experimental procedures were performed according to INSERM and IFR150 animal core facility guidelines for the care and use of laboratory animals. Four to five-week-old B6D2/F1 mice were fed either a chow diet for 28 weeks (10%kCal, D12450B, Research Diets Inc.), a high fat diet for 12 to 16 weeks (45%kCal, D12451, Research Diets Inc.) or a fructose-enriched diet for 48 weeks (D11743, Research Diets Inc.), and had free access to water. For chronic HSL inhibition of HSL, BAY (synthesized by IDEALP PHARMA) was given orally in a solution of 5% of carboxymethylcellulose at the dose of 70mg/kg (Langin et al., 2005). Mice were treated at 13:00 h during 7 consecutive days. ITT was performed on the 7<sup>th</sup> day on 6h fasted mice, 2 hours post last dose. Animals were kept four per cage on 07:00-19:00 h light cycle and at a temperature of 21 °C. During the feeding period, body weight was measured weekly. Food intake was measured daily during four days in animal housed individually. Body mass composition was evaluated by quantitative nuclear magnetic resonance system (EchoMRI 3-in-1<sup>TM</sup>, Echo Medical Systems). Overnight fasted mice were euthanized at various weeks of age depending on experiments, blood was collected in EDTA tubes and various tissues were

removed, immediately weighed, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Epididymal fat samples were fixed in 1% formalin (Sigma), embedded in paraffin and processed to hematoxylin and eosin staining. Digital images were captured using light microscope coupled to a camera and analyzed using a morphometric programme (Lucia IMAGE, version 4.81; Laboratory Imaging). Adipocyte size was determined on histological preparation measuring area of at least 200 adipocytes.

*In vitro* triolein and cholesterol oleate hydrolase activities were performed as previously described (Bezaire et al., 2009). *In vitro* lipolysis on isolated adipocytes and *in vivo* lipolytic challenge by ip injection of the  $\beta$ -adrenergic agonist isoproterenol were performed as previously reported (Lucas et al., 2003).

For the measurement of *in vivo* glucose utilization in individual tissues, an intravenous bolus of 50 $\mu$ Ci 2-desoxy-D-[<sup>3</sup>H] glucose (Perkin Elmer) was given during a euglycemic hyperinsulinemic clamp. Disappearance of plasma 2-desoxy-D-[<sup>3</sup>H] glucose and glucose concentration were determined in 5 $\mu$ l blood samples from the tail vein at 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45 and 60 min after injection. Different tissues were dissected and dissolved in 1M NaOH during 1 hour. 2-desoxy-D-[<sup>3</sup>H] glucose 6-phosphate and 2-desoxy-D-[<sup>3</sup>H] glucose were differentially precipitated by the use of zinc sulfate (0.3M), barium hydroxide (0.3M) and perchloric acid solutions (6%).

To investigate FA fluxes catheter was inserted into the femoral vein in HSL<sup>+/-</sup> and WT animals under isoflurane anaesthesia 5 days before the experiment. Mice were allowed recovering 4-5 days more before assessing FA fluxes in awake free moving mice. Mice were then infused in fasting conditions (during 6 hours from 08:00 h) with a tracer solution freshly prepared each day. Infusate was prepared with 50 $\mu$ M palmitate, [9,10-<sup>3</sup>H] palmitic acids. Infusions were performed at a constant rate of 0.2 $\mu$ Ci/4 $\mu$ l/min for 2 hours. Blood samples (30 $\mu$ l) were collected from the tip of the tail at -30, 0, 60, 75, 90 and 120 min. Tracer infusion was stopped at 120 min and additional blood samples were collected at 125, 130 and 140 min. Blood samples were rapidly centrifuged to prepare plasma which was kept at -80°C until biochemical measurements. Total plasma NEFA and TG were measured with a colorimetric enzymatic method. Lipid extraction and separation procedure were performed to determine plasma <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O, <sup>3</sup>H-NEFA and <sup>3</sup>H-TG. Radioactivity was counted in each fraction. Whole body rate of FA clearance, appearance, oxidation and storage were determined. At 140 min, the last blood sample was collected from retroorbital sinus to constitute a plasma biobank (2 or 3 aliquots per animal). Mice were euthanized with an intra venous bolus of pentobarbital. Different tissues were collected and weighed before freezing in liquid nitrogen and storage at -80°C (at least 2 aliquots) for total TG content assessment.

## Acknowledgements

Amandine Girousse was supported by INSERM and the Fondation pour la Recherche Médicale ([www.frm.org](http://www.frm.org)). The Obesity Research Laboratory was supported by Inserm, Fondation pour la Recherche Médicale ([www.frm.org](http://www.frm.org)) and the Commission of the European Communities (Integrated Project HEPADIP ([www.hepadip.org](http://www.hepadip.org)), Contract No. LSH-2003-1.1.3-1, and Collaborative Project ADAPT ([www.adapt-eu.net](http://www.adapt-eu.net)), Contract No. HEALTH-F2-2008-2011 00). We gratefully acknowledge the Animal Care Facility and ANEXPLO services of IFR150. We especially thank Anne Bouloumié, Alexia Zakaroff-Girard, and Marie-Laure Renoud for flow cytometry experiments and Aline Mairal for discussions.

## REFERENCES

Bezaire, V., Mairal, A., Ribet, C., Lefort, C., Girousse, A., Jocken, J., Laurencikiene, J., Anesia, R., Rodriguez, A. M., Ryden, M., *et al.* (2009). Contribution of adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase to lipolysis in hMADS adipocytes. *J Biol Chem* *284*, 18282-18291.

Bougnères, P., Stunff, C. L., Pecqueur, C., Pinglier, E., Adnot, P., and Ricquier, D. (1997). In vivo resistance of lipolysis to epinephrine. A new feature of childhood onset obesity. *J Clin Invest* *99*, 2568-2573.

Bourlier, V., and Bouloumie, A. (2009). Role of macrophage tissue infiltration in obesity and insulin resistance. *Diabetes Metab* *35*, 251-260.

Cao, H., Gerhold, K., Mayers, J. R., Wiest, M. M., Watkins, S. M., and Hotamisligil, G. S. (2008). Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. *Cell* *134*, 933-944.

Enoksson, S., Talbot, M., Rife, F., Tamborlane, W. V., Sherwin, R. S., and Caprio, S. (2000). Impaired in vivo stimulation of lipolysis in adipose tissue by selective beta2-adrenergic agonist in obese adolescent girls. *Diabetes* *49*, 2149-2153.

Galgani, J. E., Moro, C., and Ravussin, E. (2008). Metabolic flexibility and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* *295*, E1009-1017.

Haemmerle, G., Zimmermann, R., Hayn, M., Theussl, C., Waeg, G., Wagner, E., Sattler, W., Magin, T. M., Wagner, E. F., and Zechner, R. (2002). Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis. *J Biol Chem* *277*, 4806-4815.

Harada, K., Shen, W. J., Patel, S., Natu, V., Wang, J., Osuga, J., Ishibashi, S., and Kraemer, F. B. (2003). Resistance to high-fat diet-induced obesity and altered expression of adipose-specific genes in HSL-deficient mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* *285*, E1182-1195.

Hellström, L., Langin, D., Reynisdottir, S., Dazats, M., and Arner, P. (1996). Adipocyte lipolysis in normal weight subjects with obesity among first-degree relatives. *Diabetologia* *39*, 921-928.

Jocken, J. W., Langin, D., Smit, E., Saris, W. H., Valle, C., Hul, G. B., Holm, C., Arner, P., and Blaak, E. E. (2007). Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase protein expression is decreased in the obese insulin-resistant state. *J Clin Endocrinol Metab* *92*, 2292-2299.

Karpe, F., and Frayn, K. N. (2004). The nicotinic acid receptor--a new mechanism for an old drug. *Lancet* *363*, 1892-1894.

Kosteli, A., Sgaru, E., Haemmerle, G., Martin, J. F., Lei, J., Zechner, R., and Ferrante, A. W., Jr. (2010). Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue. *J Clin Invest* *120*, 3466-3479.

Kraemer, F. B., and Shen, W. J. (2006). Hormone-sensitive lipase knockouts. *Nutr Metab (Lond)* *3*, 12.

Lafontan, M., and Langin, D. (2009). Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog Lipid Res* *48*, 275-297.

Langin, D., Dicker, A., Tavernier, G., Hoffstedt, J., Mairal, A., Ryden, M., Arner, E., Sicard, A., Jenkins, C. M., Viguier, N., *et al.* (2005). Adipocyte lipases and defect of lipolysis in human obesity. *Diabetes* *54*, 3190-3197.

Langin, D., Laurell, H., Holst, L. S., Belfrage, P., and Holm, C. (1993). Gene organization and primary structure of human hormone-sensitive lipase: possible significance of a sequence homology with a lipase of *Moraxella* TA144, an antarctic bacterium. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 4897-4901.

Large, V., Arner, P., Reynisdottir, S., Grober, J., Van Harmelen, V., Holm, C., and Langin, D. (1998). Hormone-sensitive lipase expression and activity in relation to lipolysis in human fat cells. *J Lipid Res* *39*, 1688-1695.

Large, V., Reynisdottir, S., Langin, D., Fredby, K., Klannemark, M., Holm, C., and Arner, P. (1999). Decreased expression and function of adipocyte hormone-sensitive lipase in subcutaneous fat cells of obese subjects. *J Lipid Res* *40*, 2059-2066.

Lucas, S., Tavernier, G., Tiraby, C., Mairal, A., and Langin, D. (2003). Expression of human hormone-sensitive lipase in white adipose tissue of transgenic mice increases lipase activity but does not enhance in vitro lipolysis. *J Lipid Res* *44*, 154-163.

McGarry, J. D. (1992). What if Minkowski had been ageusic? An alternative angle on diabetes. *Science* *258*, 766-770.

Opie, L. H., and Walfish, P. G. (1963). Plasma free fatty acid concentrations in obesity. *N Engl J Med* *268*, 757-760.

Osuga, J., Ishibashi, S., Oka, T., Yagyu, H., Tozawa, R., Fujimoto, A., Shionoiri, F., Yahagi, N., Kraemer, F. B., Tsutsumi, O., and Yamada, N. (2000). Targeted disruption of hormone-sensitive lipase results in male sterility and adipocyte hypertrophy, but not in obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 787-792.

Samuel, V. T., Petersen, K. F., and Shulman, G. I. (2010). Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *Lancet* *375*, 2267-2277.

Schenk, S., Saberi, M., and Olefsky, J. M. (2008). Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest* *118*, 2992-3002.

Shetty, S., Kusminski, C. M., and Scherer, P. E. (2009). Adiponectin in health and disease: evaluation of adiponectin-targeted drug development strategies. *Trends Pharmacol Sci* *30*, 234-239.

Strom, K., Hansson, O., Lucas, S., Nevsten, P., Fernandez, C., Klint, C., Moverare-Skrtic, S., Sundler, F., Ohlsson, C., and Holm, C. (2008). Attainment of brown adipocyte features in white adipocytes of hormone-sensitive lipase null mice. *PLoS One* *3*, e1793.

Vallet-Erdtmann, V., Tavernier, G., Contreras, J. A., Mairal, A., Rieu, C., Touzalin, A. M., Holm, C., Jégou, B., and Langin, D. (2004). The testicular form of hormone-sensitive lipase HSL $\alpha$  confers rescue of male infertility in HSL-deficient mice. *J Biol Chem* *279*, 42875-42880.

Wang, M., and Fotsch, C. (2006). Small-molecule compounds that modulate lipolysis in adipose tissue: targeting strategies and molecular classes. *Chem Biol* *13*, 1019-1027.

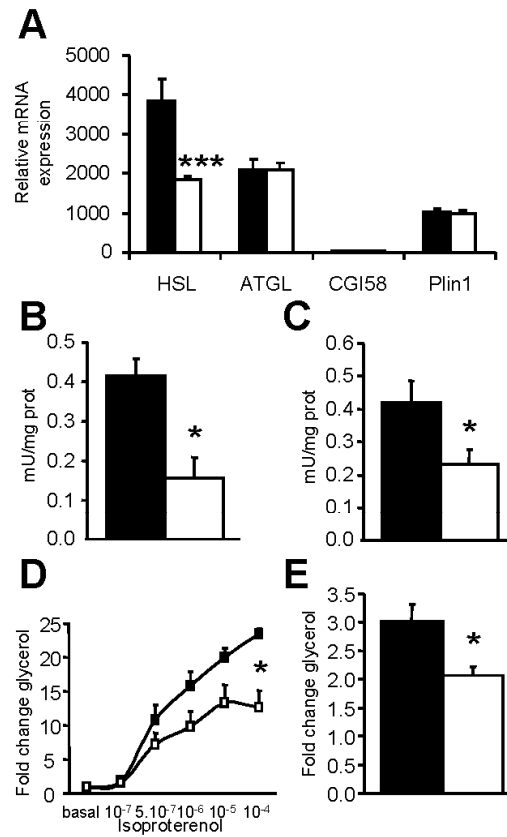
Wang, S. P., Laurin, N., Himms-Hagen, J., Rudnicki, M. A., Levy, E., Robert, M. F., Pan, L., Oligny, L., and Mitchell, G. A. (2001). The adipose tissue phenotype of hormone-sensitive lipase deficiency in mice. *Obes Res* *9*, 119-128.

Wueest, S., Rapold, R. A., Rytka, J. M., Schoenle, E. J., and Konrad, D. (2009). Basal lipolysis, not the degree of insulin resistance, differentiates large from small isolated adipocytes in high-fat fed mice. *Diabetologia* *52*, 541-546.

Zimmermann, R., Haemmerle, G., Wagner, E. M., Strauss, J. G., Kratky, D., and Zechner, R. (2003). Decreased fatty acid esterification compensates for the reduced lipolytic activity in hormone-sensitive lipase-deficient white adipose tissue. *J Lipid Res* *44*, 2089-2099.

Zimmermann, R., Strauss, J. G., Haemmerle, G., Schoiswohl, G., Birner-Gruenberger, R., Riederer, M., Lass, A., Neuberger, G., Eisenhaber, F., Hermetter, A., and Zechner, R. (2004). Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* *306*, 1383-1386.

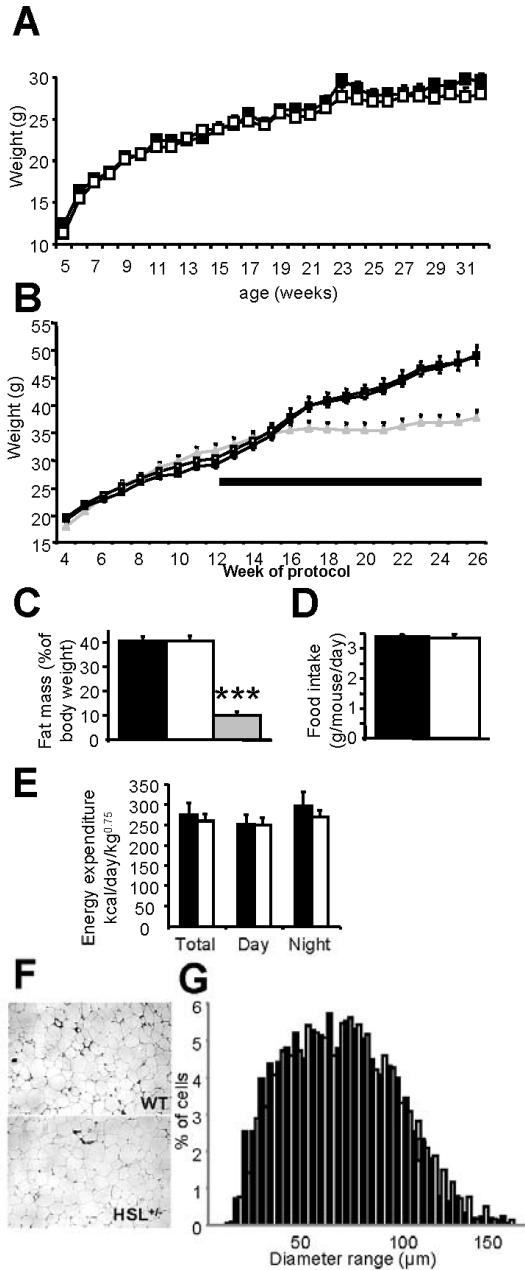
# FIGURE 1



**Figure 1. *In vivo* and *in vitro* lipolysis in high fat diet-fed HSL<sup>+/-</sup> and WT mice.**

(A) mRNA expression of HSL, ATGL, CGI-58 and PLIN1 in WAT. *In vitro* hydrolyase activities against a cholesterol ester (B) and a TG (C) were determined in WAT homogenates. (D) *In vitro* lipolysis in adipocytes isolated from WAT; glycerol release was measured from adipocytes either unstimulated or incubated with isoproterenol and expressed as fold increase over basal. (E) *In vivo* lipolysis after 7 h fast. Plasma glycerol levels were measured 15 min after saline and isoproterenol (10mg/kg) ip injection. Values are means  $\pm$  SEM. Wild type (■) n= 6-8 and HSL<sup>+/-</sup> (□) n=6-9.

**FIGURE 2**

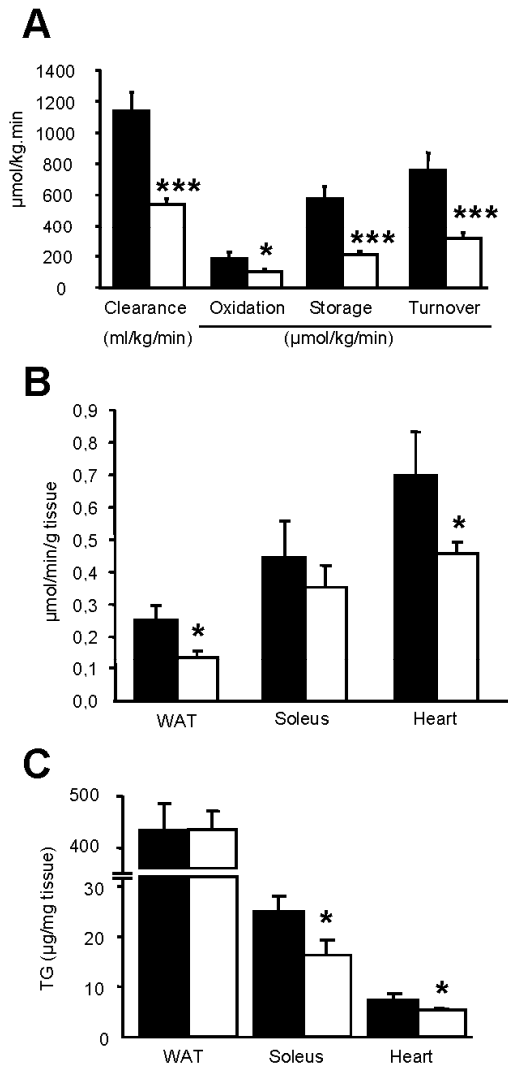


**Figure 2. Body weight, fat mass and adipose tissue morphology in normal chow and high fat diet-fed HSL<sup>+/-</sup> and WT mice.**

(A) Mice were fed a standard chow diet for 28 weeks after weaning. (B) Mice were weighed weekly. Mice were first fed a standard diet for 12 weeks after weaning. Then they received a high fat diet (shown by a thick line) for 12 weeks. (C) Fat mass was measured by EcoMRI and expressed as percent of body mass. (D) Food intake was assessed on individually

housed mice. (E) Energy expenditure was assessed in 12 week high fat diet-fed mice. (F) WAT histological morphology. (G) Frequency of adipocyte diameter observed on histological preparation of WAT from WT and HSL<sup>+/-</sup> mice. Values are means  $\pm$  SEM. Wild type (■) n= 5-10, HSL<sup>+/-</sup> (□) n=5-10 and HSL<sup>-/-</sup> (▲) n=4.

**FIGURE 3**

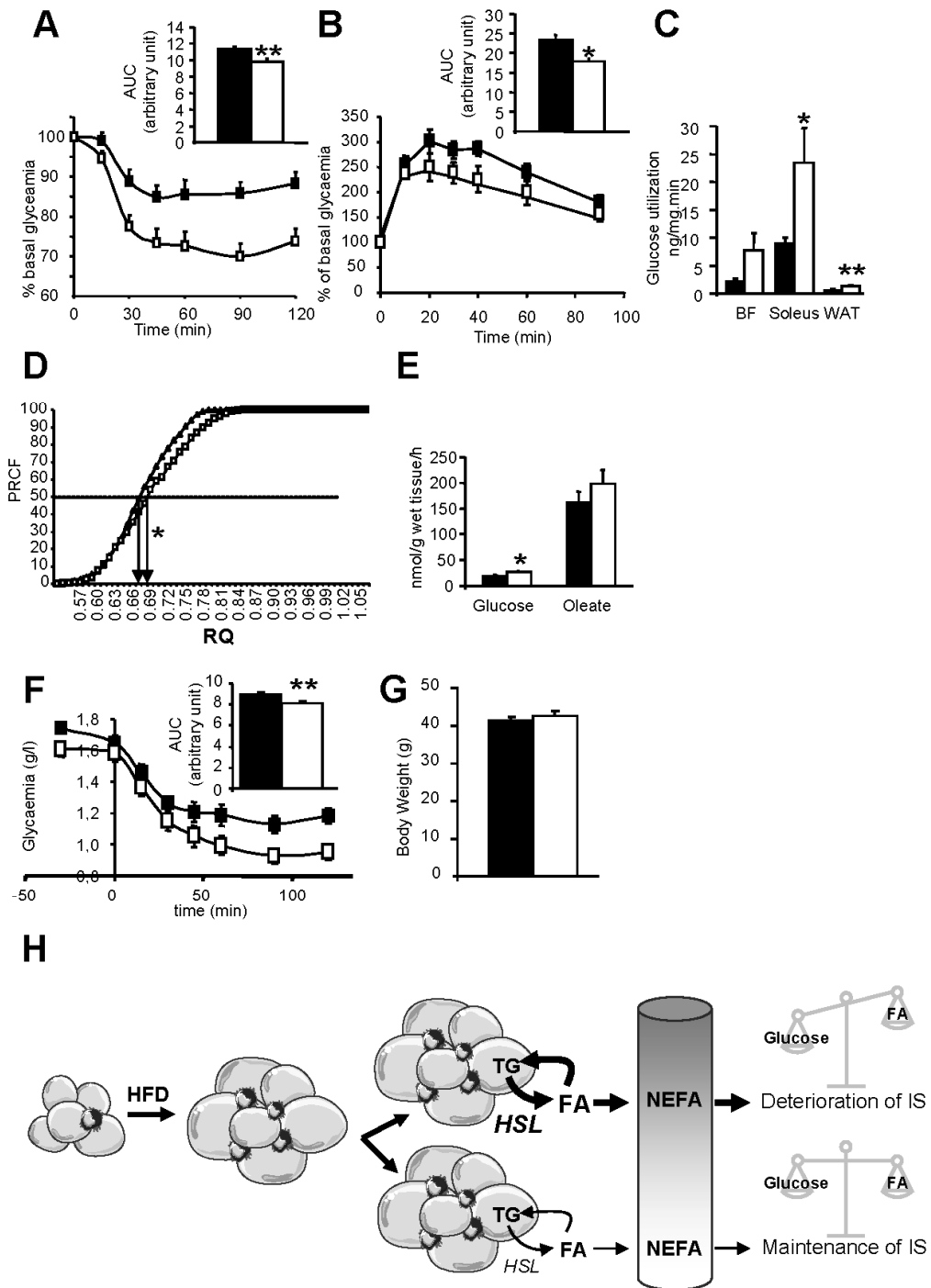


**Figure 3. *In vivo* fatty acid fluxes in high fat diet-fed HSL<sup>+/-</sup> and WT mice.**

(A) Plasma parameters of fatty acid fluxes. (B) Radiolabelled fatty acid incorporation in the triacylglycerol (TG) pool of tissues. (C) Total TG content in tissues. Values are means  $\pm$  SEM. Wild type (■) n= 5 and HSL<sup>+/-</sup> (□) n=6. WAT, WAT; Soleus, soleus muscle.



**FIGURE 4**



**Figure 4. Insulin sensitivity in high fat diet-fed HSL<sup>+/-</sup> and WT mice.**

(A) Left panel, intraperitoneal insulin tolerance test assessed in 12 week high fat diet-fed mice and expressed as percent of basal glycaemia. Right panel, area-under-curves (AUC). (B) Left panel, oral glucose tolerance test assessed in 12 week high fat diet-fed mice and expressed as percent of basal glycaemia. Right panel, area-under-curves (AUC). (C) 2-deoxy-D-[<sup>3</sup>H] glucose utilization under stimulation with insulin. (D) Respiratory quotient (RQ)

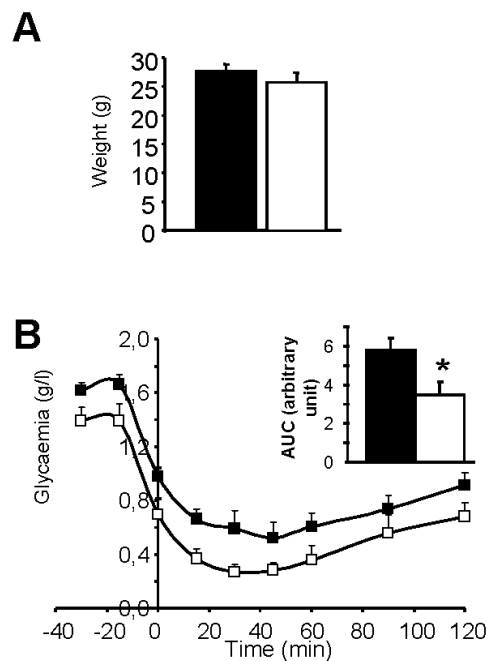
was assessed in 12 week high fat diet-fed mice. EC50 are represented by arrows. (E) Substrate oxidation was assessed *ex vivo* in *soleus* muscle of 12 week high fat diet-fed mice. (F) Intraperitoneal insulin tolerance test and (G) body weight after chronic treatment with vehicle or BAY. Values are means  $\pm$  SEM. Wild type (■ or ▲) n= 4-10 and HSL<sup>+/-</sup> (□) n= 4-10. (G) Consequence of adipose tissue hormone-sensitive lipase inhibition on fatty acid metabolism and insulin sensitivity; HFD, high fat diet; TG, triacylglycerol; HSL, hormone-sensitive lipase; FA, fatty acid; NEFA, non esterified fatty acid; IS, insulin sensitivity.

## Supplemental Information

# Impairment of Adipose Tissue Lipolysis Due to Hormone-Sensitive Lipase Haploinsufficiency Reduces Fatty Acid Fluxes and Improves Insulin Sensitivity

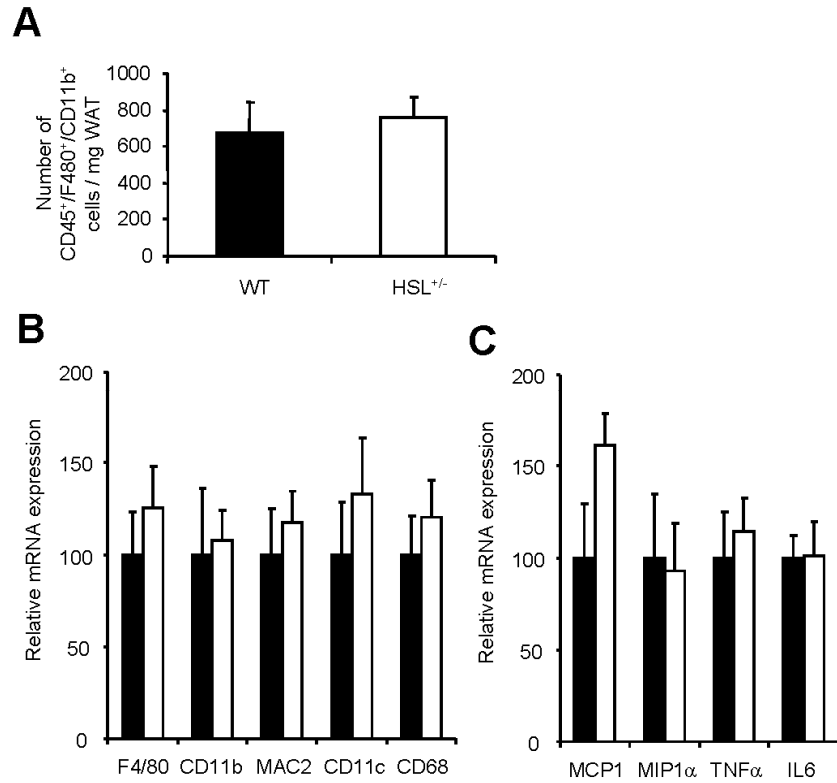
Amandine Girousse, Geneviève Tavernier, Laurent Monbrun, Véronique Bézaire, Cédric Moro, Aurélie Waget, Balbine Roussel, Bénédicte Prunet Marcassus, Sylvie Caspar Bauguil, Jean Galitzky, Cecilia Holm, Thierry Sulpice, Rémy Burcelin, and Dominique Langin.

## SUPPLEMENTAL FIGURES



**Figure S1. Insulin sensitivity in high fructose diet-fed HSL<sup>+/-</sup> and WT mice.**

(A) Body weight was assessed in 48 week high fructose diet-fed mice. (B) intraperitoneal insulin tolerance test (0.6U/kg) assessed in 45 week high fructose diet-fed mice. Values are means  $\pm$  SEM. Wild type (■) n= 6 and HSL<sup>+/-</sup> (□) n=8.



**Figure S2. Adipose tissue inflammation in high fat diet-fed HSL<sup>+/-</sup> and WT mice.**

(A) Macrophage (CD45/F480/CD11b triple positive cells) number per milligram of white adipose tissue (WAT) was assessed in 12 week high fat diet-fed fed mice by flow cytometry. (B) mRNA expression of macrophage surface markers in WAT of 12 week high fat diet-fed fed mice. (C) mRNA expression of inflammatory cytokines in WAT of 12 week high fat diet-fed fed mice. Values are means  $\pm$  SEM. Wild type (■) n= 7 and HSL<sup>+/-</sup> (□) n=9.

## SUPPLEMENTAL TABLE

**Table S1**

	WT	HSL <sup>+/-</sup>
Glucose (g/l)	1.54 ± 0.11	1.46 ± 0.07
Insulin (µg/l)	1.43 ± 0.17	1.18 ± 0.22
NEFA (mmol/l)	1.02 ± 0.02	0.98 ± 0.10
Glycerol (mmol/l)	0.87 ± 0.09	0.88 ± 0.08
Triacylglycerol (mmol/l)	1.43 ± 0.09	1.26 ± 0.10
Total cholesterol (mmol/l)	3.07 ± 0.25	3.02 ± 0.24
Adiponectin (µg/ml)	5.62 ± 0.20	5.75 ± 0.20
Leptin (ng/ml)	27.95 ± 0.94	28,31 ± 0.96
Palmitoleate (mmol/l)	0.037 ± 0.005	0.037 ± 0.007

Fasting plasma parameters assessed on 12-week wild type (WT) and HSL<sup>+/-</sup> high fat diet-fed mice. Values (n=7-9) are means ± SEM. None of the parameters showed statistical differences. NEFA, non esterified fatty acid.

## SUPPLEMENTAL EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Blood parameters

Plasma insulin was determined by ELISA (Mercodia). Plasma FFA concentrations were determined by an enzymatic colorimetric reaction (NEFA C, Wako). Plasma glycerol concentrations were measured with the hydrazine buffer method or with a commercial kit (Sigma). Plasma TG and cholesterol concentrations were determined with the COBA COBAS-MIRA + analyzer (ABX Diagnostics) of the Anexplo IFR 150 platform. Plasma adiponectin and leptin levels were measured with commercial Elisa kits (R&D Systems) and palmitoleate by gas chromatography.

### Gene expression analysis

Perigonadic WAT was homogenized in Qiazol buffer (Qiagen) using Precellys tissue homogenizer. Total RNA from WAT was extracted using RNeasy kit (Qiagen). RNA concentration and purity were assessed spectrophotometrically using NanoDrop (DigitalBio). After treatment with DNase I (Invitrogen) and reverse transcription of 1 µg of total RNA with Superscript II (Invitrogen), real time quantitative PCR was performed with ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems). For each amplification, a standard curve was obtained using serial dilutions of WAT cDNA prior to mRNA quantitation. 18s rRNA and HPRT mRNA were used as controls to normalize gene expression.

### Intraperitoneal insulin and glucose tolerance tests

An ip injection of 0.6U/kg insulin (Insuman Rapid, Sanofi Aventis) was given to 6h-fasted mice. Blood glucose levels were monitored from the tip of the tail with a glucometer (Accu-check, Roche) at 0, 15, 30, 45, 60, 90 and 120 min after insulin injection. An oral administration of 1.5mg/g α-D Glucose (Serva Feinbiochemica) was given to 16-h-fasted mice. Blood glucose levels were monitored from the tip of the tail with a glucometer (Accu-check) at 0, 10, 20, 30, 40, 60 and 90 min after glucose administration.

### Indirect calorimetry

Oxygen (VO<sub>2</sub>) and carbon dioxide (VCO<sub>2</sub>) production were measured using a four-chamber oxyliet system (Bioseb). Temperature was maintained at 21 °C and the light was on from 07:00 to 19:00. System setting included a flow rate of 0.3 l/min, a sample purge of 5 min and

a measurement period of 5 min every 25 min. Twenty-four hours prior to data collection, mice were placed in separate calorimetry chambers (each with a volume of 2.5 l) with free access to food and water. The respiratory quotient was calculated as the ratio of  $VCO_2/VO_2$ ; results were expressed as percent of relative cumulative frequency along the measurement period (dark period). Energy expenditure was expressed as  $kcal/day/kg^{0.75}$ .

### **Ex vivo oleate and glucose oxidation**

Soleus skeletal muscles were homogenized with a polytron homogenizer in a buffer containing 0.25M Sucrose, 1mM EDTA, 1 $\mu$ M Tris-HCl and 2mM ATP at pH7.4. 80  $\mu$ l of homogenized sample were incubated at 37°C for two h with 0.2mM cold oleate, 1 $\mu$ Ci/ml  $^{14}$ C oleate, 0.5% BSA, 125mM Sucrose, 25mM Potassium phosphate monobasic, 200mM Potassium chloride, 2.5mM Magnesium chloride, 2.5mM L-Carnitine, 0.25mM Malic acid, 20mM Tris-HCl, 2.5mM DTT, 0.25mM NAD $^{+}$ , 4mM ATP and 0.125mM Coenzyme A. For glucose oxidation, oleate was replaced by 1  $\mu$ Ci/ml [U- $^{14}$ C]glucose and D-glucose. Following incubation, 40 $\mu$ l of 70% perchloric acid was added to trap  $CO_2$  production for 1 additional h at room temperature. 200 $\mu$ l of NaOH, containing trapped  $CO_2$ , were counted using a scintillation counter (Tri-Carb2100TR; Pakard). An acidified portion was collected, placed at 4°C overnight, centrifuged at 15000g for 15 min at 4°C and the supernatant was counted. A sample of the incubation medium was used to quantify specific activity.

### **Flow cytometry analysis of adipose tissue**

The stromavascular fraction (SVF) cells were obtained by collagenase digestion of perigonadal AT as previously described (Duffaut et al., 2009). After digestion, the suspension was filtered with a 150 $\mu$ m filter and centrifuged (100g, 10 s) to collect the infranatant containing the SVF. The lower phase was centrifuged at 400g for 10 min and the pellet containing the SVF was incubated for 10 min in erythrocyte-lysis buffer (155mM  $NH_4Cl$ , 5.7mM  $KH_2PO_4$  and 0.1mM EDTA), filtered through 40 $\mu$ m filters and centrifuged again (400g, 10 min). The pellet was then resuspended in PBS containing 2mM EDTA and 0.5% bovine serum albumin. The total number of cells was counted using Trypan blue (Gibco, Courbevoie, France) and a Neubauer hemacytometer (Poly Labo, Paul Block & Cie, Strasbourg, France). The cell count was confirmed by DNA determination using fluorometric assay (Picogreen, Invitrogen, Cergy Pontoise, France). 100 000 cells of the SVF were incubated with FITC-conjugated antibodies (F4/80), PerCP-conjugated antibody (CD45), PE-Cy7-conjugated antibody (CD11b) and respective isotype control. Analyses were performed using a FACSCanto flow cytometer and the BD FACS Diva software (BD Bioscience). The total number of each cell population present in the AT depot was calculated as a product of the percentage of each cell type determined by the flow cytometry analyses and the total number of SVF cells. Results are presented per milligram of WAT.

### **Statistical analyses**

Results were expressed as mean  $\pm$  SEM. Student's *t* test for non-paired values and Mann Whitney test were used for group comparisons. Differences were considered significant for  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*), and  $p < 0.001$  (\*\*\*)

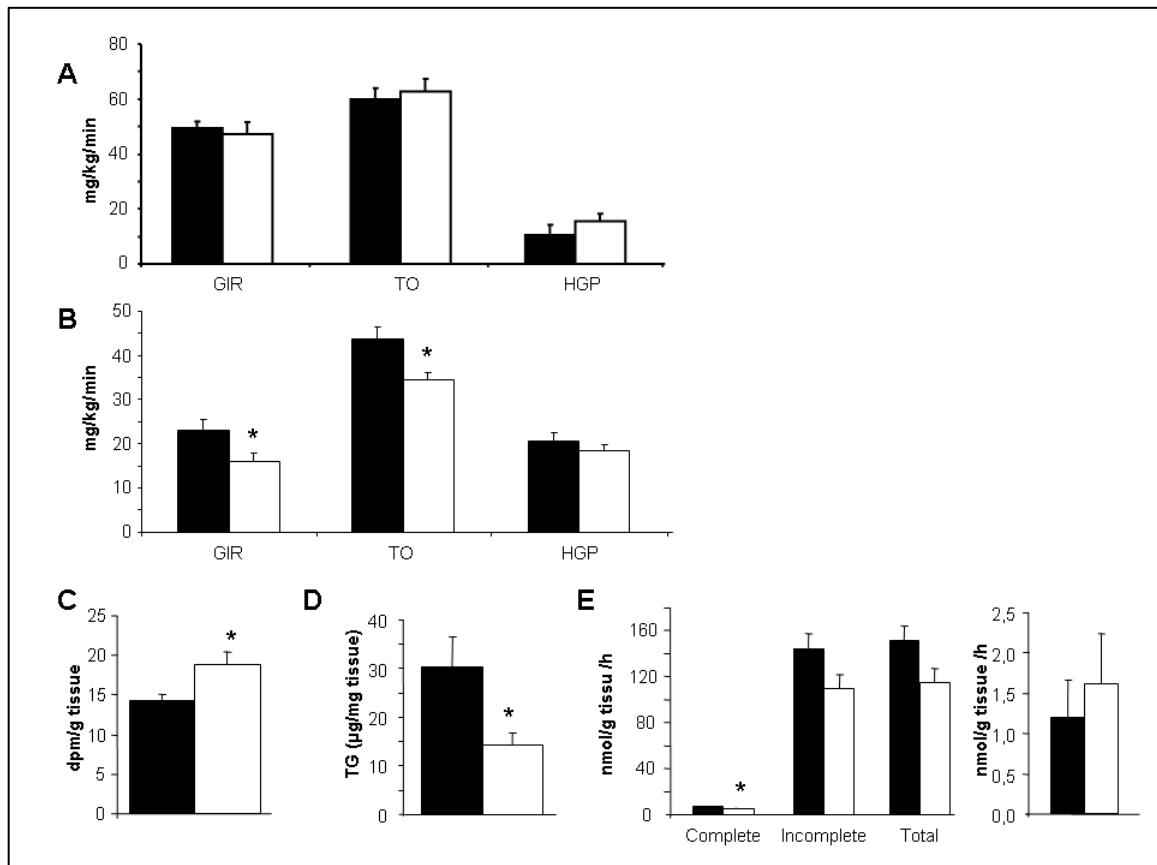
### **SUPPLEMENTAL REFERENCES**

Duffaut, C., Galitzky, J., Lafontan, M., and Bouloumie, A. (2009). Unexpected trafficking of immune cells within the adipose tissue during the onset of obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 384, 482-485.

## Résultats non publiés

### Résultats non publiés concernant l'étude de la sensibilité à l'insuline chez les animaux *LHS*<sup>+/-</sup>

Dans l'idée de caractériser plus précisément l'insulino-sensibilité des animaux *LHS*<sup>+/-</sup> nourries en HFD, nous avons réalisé en collaboration avec l'équipe du Professeur Rémy Burcelin des séries de clamps euglycémiques hyperinsulinémiques. Notre avons d'abord effectué un clamp à « forte dose » d'insuline (18mU) classiquement employé afin de mettre en évidence les modifications de sensibilité à l'insuline au niveau des muscles squelettiques. Malheureusement, cette expérience n'a pas permis de mettre en évidence de modification périphérique de la sensibilité à l'insuline chez les souris *LHS*<sup>+/-</sup> comme pouvaient laisser présager initialement les résultats obtenus en ITT. En effet, la Figure 26A ne montre aucune différence de *glucose infusion rate* (GIR). Le turnover de glucose et la production hépatique de glucose (HPG) ne sont pas affectés.



**Figure 26 : Evaluation de l'insulino-sensibilité des souris haplodéficientes pour la lipase hormono-sensible.**

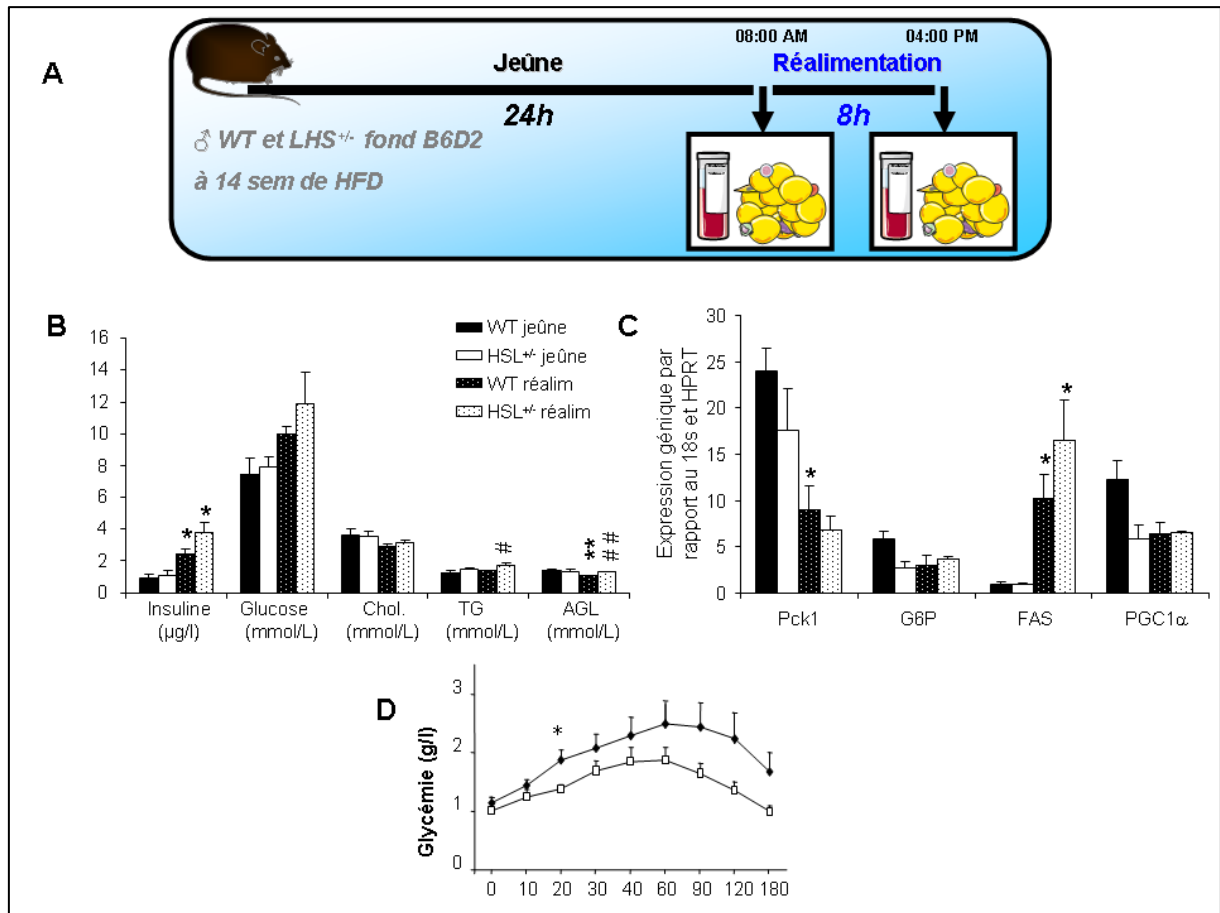
A, Clamp euglycémique hyperinsulinémique à forte dose (18mU) d'insuline. B, Clamp euglycémique hyperinsulinémique à faible dose (1,5mU) d'insuline. C, Mesure de la lipogénèse hépatique. D, contenu hépatique en triglycérides. E, Oxydation de l'oléate (à gauche) et du glucose (à droite) dans des homogénats de foie. En noir, animaux WT, n=6-8. En blanc, animaux LHS<sup>+/-</sup>, n=6-8. \* p<0.05 Test *t* de Student. GIR: glucose infusion rate, TO: turn over, HPG: hepatic glucose production, TG: triglycéride.

Nous avons alors imaginé que l'amélioration de sensibilité à l'insuline observée en ITT pouvait s'expliquer par un phénotype hépatique. Une nouvelle série de clamp euglycémique hyperinsulinémique a été réalisée avec une dose d'insuline dite « faible » (1,5mU), dans l'objectif de rester dans des concentrations d'insuline physiologiques et de ne pas inhiber totalement la production hépatique de glucose. Ce clamp n'a révélé aucune différence d'insulino-sensibilité hépatique chez les souris LHS<sup>+/-</sup> comme en témoigne la production hépatique de glucose qui est inhibée de manière identique chez les WT et les LHS<sup>+/-</sup> (Figure 26B). A cette dose d'insuline, l'utilisation du glucose stimulée par l'insuline dans les muscles peut être évaluée à 30-40% (Ayala et al., 2006). La diminution du *turn-over* et du GIR seraient en faveur d'une diminution de l'utilisation périphérique de glucose à cette dose d'insuline. L'exploration du phénotype hépatique a ensuite été complétée par la mesure de la lipogénèse hépatique. Sous influence de l'insuline, le foie capte le glucose et le stocke en partie sous forme de lipides. Le principe est donc mesurer le glucose radioactif que l'on retrouve dans les lipides du foie des animaux clampés. La quantité de radioactivité retrouvée dans le foie des animaux LHS<sup>+/-</sup> est supérieure à celle des animaux WT (Figure 27C). Cette métabolisation étant contrôlée par l'insuline, on peut penser que le foie des animaux LHS<sup>+/-</sup> est plus sensible à son action. L'expression génique de la FAS est également augmentée dans les échantillons des animaux LHS<sup>+/-</sup> (donnée non présentée). Le contenu en TG hépatique et les capacités d'oxydation des lipides sont d'autres marqueurs de la sensibilité hépatique à l'insuline. Si la diminution de la quantité hépatique de TG (Figure 26D) est en faveur d'un phénotype amélioré chez les animaux LHS<sup>+/-</sup>, la mesure de l'oxydation totale de l'oléate (très inférieure à l'oxydation incomplète) est en revanche diminuée dans les homogénats de foie (Fig 26E). L'expression des ARNm de divers gènes impliqués dans l'oxydation (ppar $\alpha$ , pgc1 $\alpha$ , pdk4 et cpt1b) n'est pas modifiée chez les animaux LHS<sup>+/-</sup> (données non présentées).

Le foie est l'organe de l'adaptation au jeûne. Dans cette situation, il produit du glucose à partir de deux origines : les stocks de glycogène et le glycérol issu de la lipolyse adipocytaire. Un autre moyen de tester la sensibilité du foie à l'action de l'insuline est de réaliser des



manipulations nutritionnelles de « mise à jeun - ré alimentation » à l'issue de laquelle l'expression génique de gènes de la néoglucogenèse et de la lipogenèse est dosée par RT PCR. Un petit groupe d'animaux WT et LHS<sup>+/-</sup> a été mis à jeun pendant 24h. Une partie des souris a été sacrifiée à l'issue de ce jeûne et l'autre partie à été ré alimentée pendant 8 heures selon les données de la littérature (Fig 27A). La figure 27B présente les paramètres plasmatiques des animaux. A jeun, tous les paramètres plasmatiques mesurés sont comparables entre les deux génotypes. La ré-alimentation entraîne une augmentation de l'insulinémie et de la glycémie identiques dans les deux groupes d'animaux. Le cholestérol diminue légèrement dans les deux groupes. Les animaux LHS<sup>+/-</sup> présentent une augmentation des TG après ré-alimentation par rapport aux animaux WT. Enfin les AG libres sont diminués seulement chez les animaux WT après ré-alimentation. L'augmentation de l'insulinémie s'accompagne d'une diminution de l'expression de la PEPCK (gène pck1) dans les deux groupes d'animaux, et de la Glucose-6 phosphatase et du co-activateur transcriptionnel PGC1 $\alpha$  seulement chez les animaux WT (Figure 27C). Elle influence aussi l'expression de la FAS; son expression augmente suite à la ré-alimentation mais de manière plus prononcée chez les animaux LHS<sup>+/-</sup>. L'action du frein insulinique sur l'expression des gènes de la néoglucogenèse semble incomplète chez les animaux LHS<sup>+/-</sup>, tandis que la stimulation de la lipogenèse semble améliorée. Nous avons enfin testé les capacités néoglucogéniques du foie *via* un test de tolérance au pyruvate. Suite à l'administration intrapéritonéale de pyruvate en condition de jeûne, les animaux LHS<sup>+/-</sup> ont présenté dès 20 min une glycémie inférieure pouvant refléter un défaut de néoglucogenèse (Figure 27D).



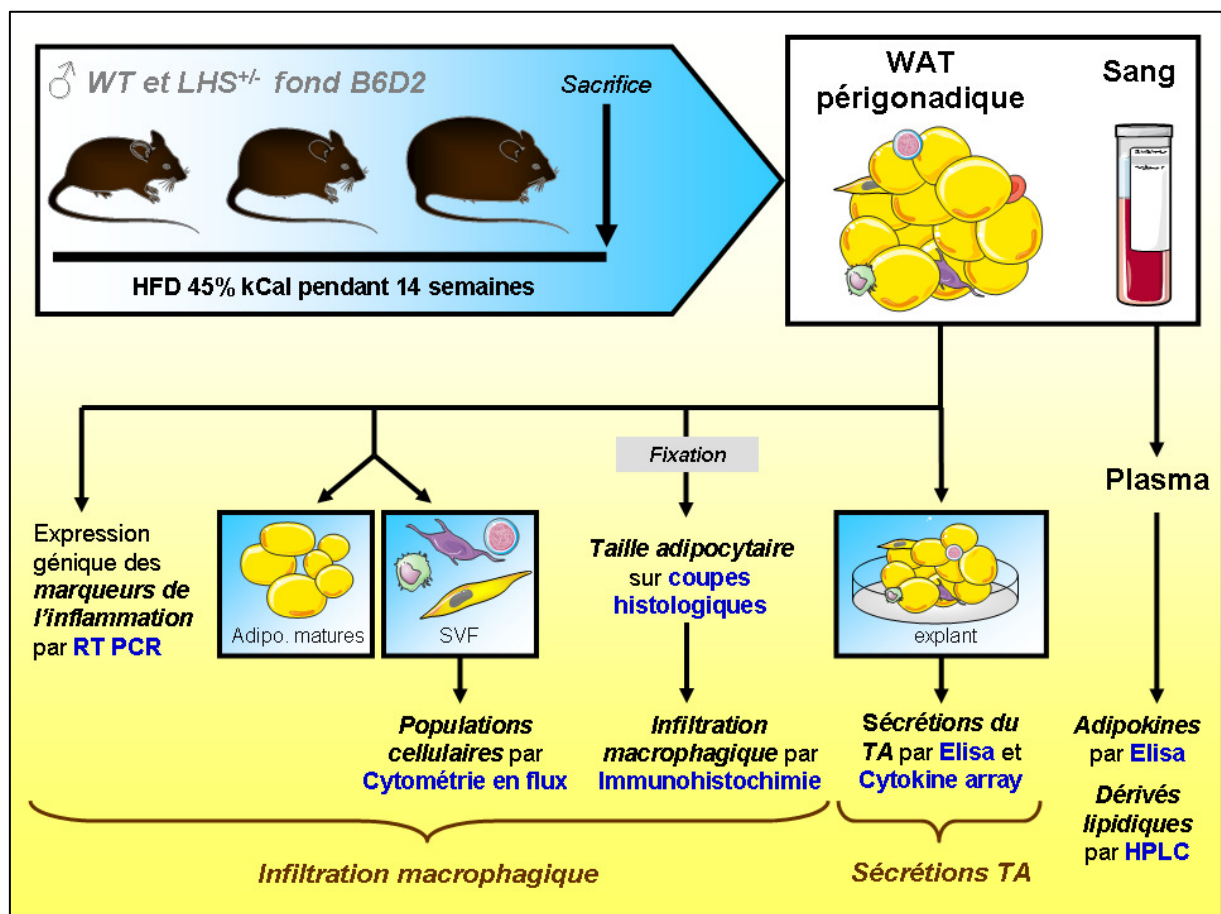
**Figure 27 : Challenge nutritionnel : mise à jeun – réalimentation**

**A**, Protocole expérimental. **B**, paramètres plasmatiques. En noir, animaux WT à jeun n=5. En blanc, animaux LHS<sup>+/-</sup> à jeun, n=3. En noir et points blancs, animaux WT réalimentés n=4. En blanc et points noirs, animaux LHS<sup>+/-</sup> réalimentés n=5-6. \* p<0.05, par rapport à la situation à jeun, # p<0.05, par rapport aux animaux WT réalimentés, Test *t* de Student. **C**, expression génique mesurée par RT PCR. **D**, Test de tolérance au pyruvate. En noir, animaux WT n=8. En blanc, animaux LHS<sup>+/-</sup> n=6. \* p<0.05 Test *t* de Student. HFD: *high fat diet*, Chol: cholestérol, TG: triglycéride, AGL: acide gras libre, Pck1: gène de la phosphoénolpyruvate carboxykinase, G6P : glucose-6-phosphatase, FAS : *fatty acid synthase*, PGC1α : *PPARγ coactivator 1 alpha*.

Résultats non publiés concernant l'étude de l'inflammation du TA chez les animaux LHS<sup>+/-</sup>

Nous avons vu en introduction de cette partie que l'expansion de la masse grasse engendrée par le régime gras était accompagnée d'une infiltration de cellules immunes, dont l'action peut être reliée à la détérioration de la sensibilité à l'insuline.

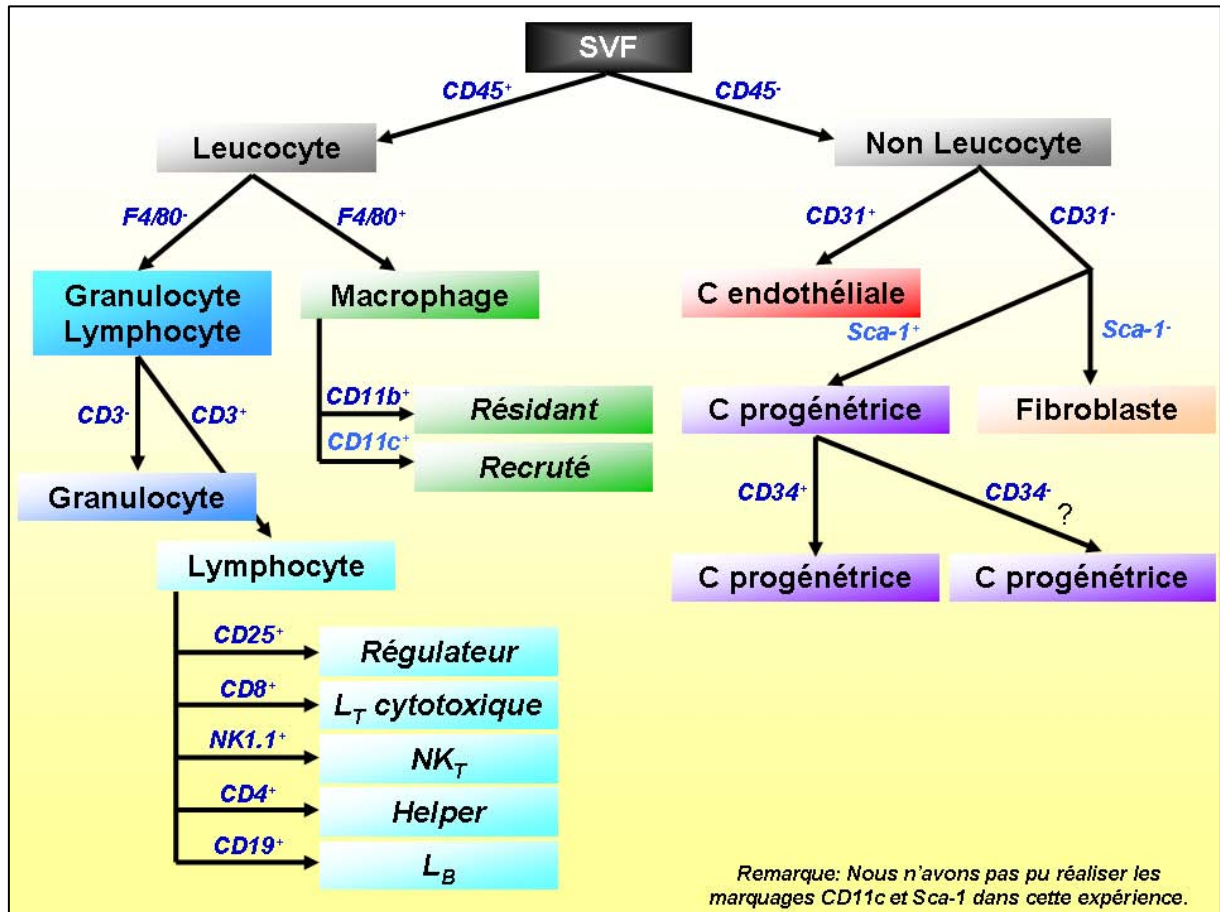
Ayant caractérisé le métabolisme lipidique dans notre modèle de souris LHS<sup>+/-</sup> et montré une diminution des flux d'AG associée à une amélioration de la sensibilité à l'insuline, nous nous sommes questionné quant à l'implication de l'inflammation du TA dans ce phénotype. L'étude du phénotype des souris LHS<sup>+/-</sup>, axée essentiellement dans l'article sur le métabolisme du TA et les conséquences sur l'insulino-sensibilité, a été donc complétée par la caractérisation de l'inflammation du TA par des méthodes variées. Seuls les résultats concernant le nombre total de macrophages et les données d'expression génique ont été inclus dans la publication. La figure 28 résume le protocole mis en place.



**Figure 28 : Protocole expérimental de l'étude de l'inflammation du tissu adipeux dans le modèle d'haplodéficié pour le gène de la lipase hormono-sensible.**

Le premier objectif était d'évaluer l'infiltration macrophagique au sein du TA. Sur TA total (adipocytes et SVF) nous avons mesuré l'expression génique de marqueurs de l'inflammation. A partir de la SVF, les différents types cellulaires ont été quantifiés par cytométrie en flux. Des marquages immunohistochimiques sur coupes histologiques sont encore en cours pour vérifier l'infiltration macrophagique. La mesure des tailles adipocytaires est également réalisée sur ces préparations. Le second objectif consistait à évaluer le profil sécrétoire du TA. A cette fin, des explants de TA ont été réalisés. Des mesures plasmatiques de cytokines viennent compléter ces résultats. Enfin, la mesure d'adipokines et l'établissement du profil d'AG plasmatiques représentaient nos derniers objectifs.

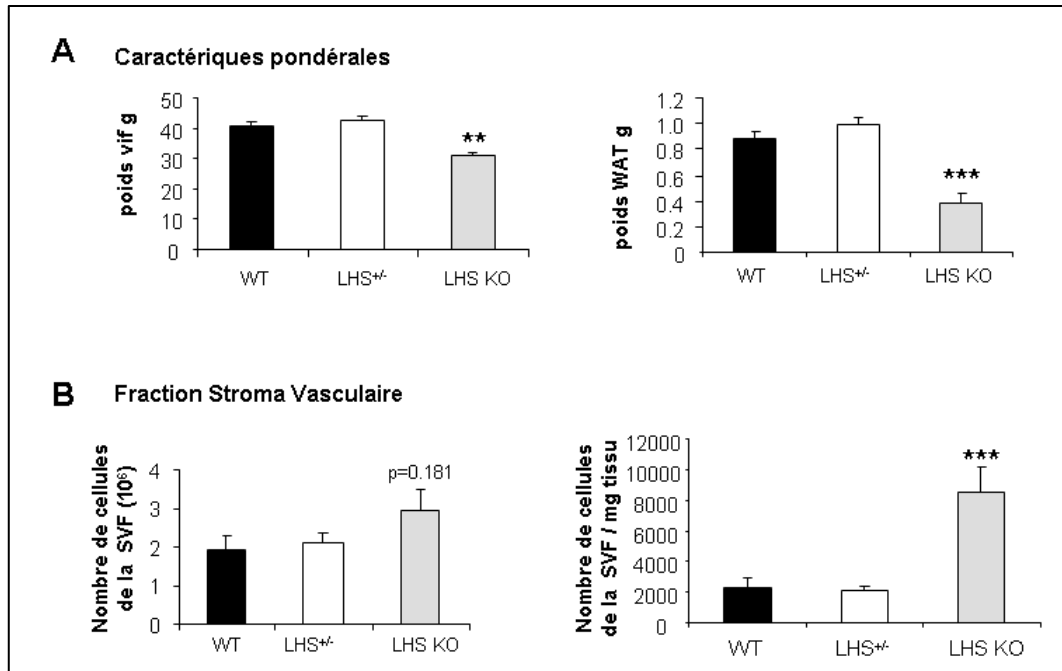
Nous avons réalisé les travaux de cytométrie en flux en collaboration avec l'équipe du Docteur Anne Bouloumié à Toulouse. L'expérience a inclus des animaux WT (n=7), LHS<sup>+/-</sup> (n=9) et Lhs KO (n=4). En effet ce type d'analyse n'avait jamais été réalisé sur des animaux Lhs KO. Ces derniers étant décrits dans la littérature comme un modèle marqué d'inflammation (Cinti et al., 2005), nous les avons considérés comme des « témoins positifs ». La SVF d'un pan entier de TA péri-gonadique a été isolée après digestion du TA à la collagénase, filtration et centrifugations successives. La cellularité de la SVF a été mesurée et une fraction de cette SVF a été marquée avec des fluorochromes spécifiques de marqueurs de surface des différentes populations cellulaires avant d'être quantifiée par cytométrie en flux. La figure 29 présente ces différents marqueurs ainsi que les populations cellulaires associées.



**Figure 29 : Les populations cellulaires de la fraction non adipocytaire (fraction stroma-vasculaire) du tissu adipeux.**

L'analyse des résultats qui a été effectuée grâce au logiciel FACS DIVA sont présentés sous trois formes : nombre total de cellules par dépôt adipeux ou par mg de tissu et pourcentage par rapport à la SVF totale. Chaque mode de présentation des résultats possède un intérêt particulier selon le message à mettre en valeur. Le premier mode d'expression s'affranchit du poids de l'animal et de la masse grasse ainsi que du volume des adipocytes. Le second mode d'expression tient compte du développement de la masse grasse, il permet de comparer des animaux aux caractères morphologiques différents. Le dernier mode d'expression renseigne sur les proportions de cellules par rapport aux autres types cellulaires de la SVF sans tenir compte du poids de TA. La figure 30A présente en premier lieu les caractéristiques pondérales des animaux montrant un poids total et un TA significativement inférieurs chez les animaux Lhs KO par rapport aux souris WT et LHS<sup>+/-</sup>. En revanche, le poids total et la

quantité de TA est identique entre les souris LHS<sup>+/-</sup> et WT. WT et LHS<sup>+/-</sup> présentent un nombre total de cellules de la SVF comparable, tandis que celui des souris Lhs KO tend à être supérieur (Figure 30B). Si l'on exprime ce résultat par rapport au dépôt adipeux entier le nombre total de cellules de la SVF devient très significativement supérieur chez les souris Lhs KO en raison de leur plus faible quantité de TA. De manière attendue, ce mode d'expression ne modifie pas le résultat pour les animaux LHS<sup>+/-</sup>.

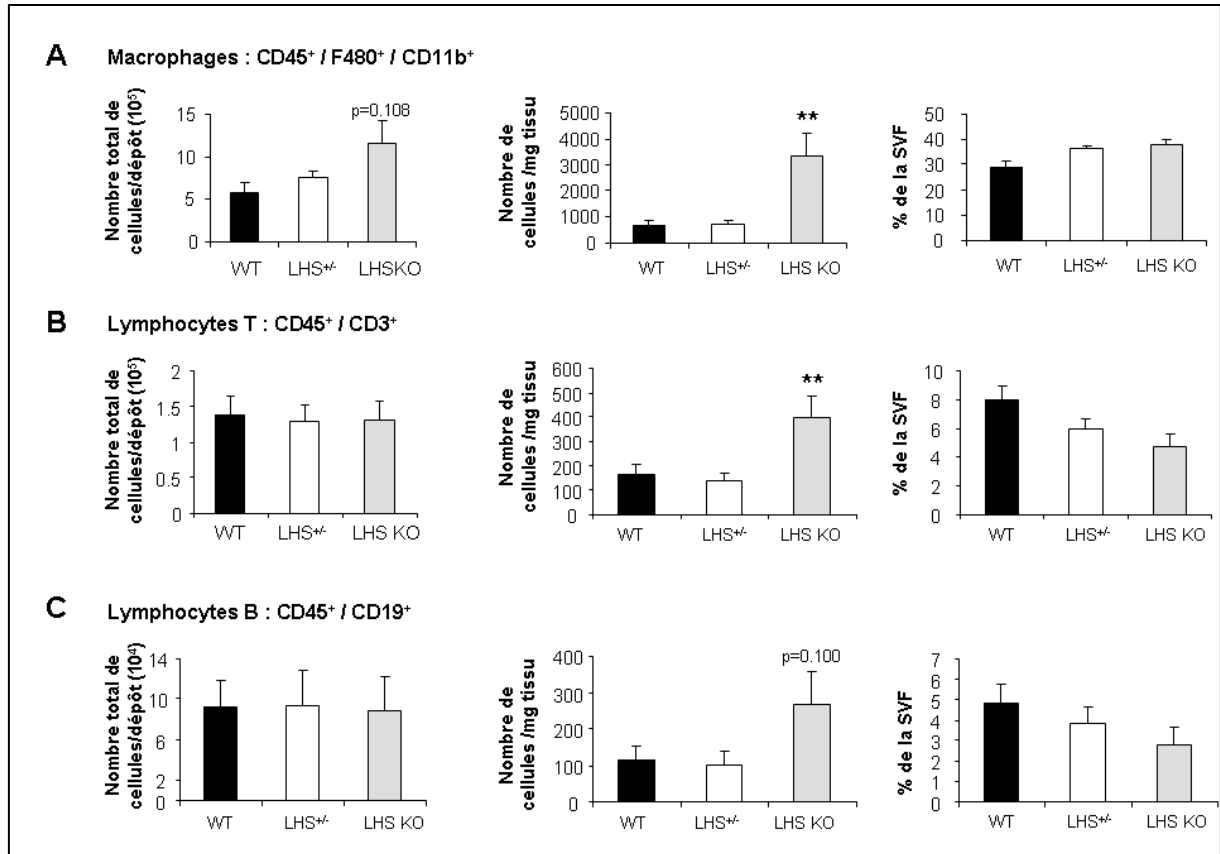


**Figure 30 : Caractéristiques pondérales des animaux et quantification de la fraction stroma vasculaire de leur tissu adipeux.**

**A**, poids vif et poids du tissu adipeux périgonadique analysé en FACS. **B**, quantification de la fraction non adipeuse, fraction stroma vasculaire présentée en nombre total de cellules et en nombre de cellule par milligramme de TA. WAT, white adipose tissue. \* p<0.05 Test t de Student.

Le nombre total de macrophages (CD45<sup>+</sup>/F480<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>) par dépôt adipeux est identique entre WT et LHS<sup>+/-</sup> mais tend à être augmenté chez les Lhs KO (Figure 31A). Cette tendance se confirme si les résultats sont exprimés par mg de tissu. Par rapport à la SVF totale, la population macrophagique tend à être plus représentée chez les animaux LHS<sup>+/-</sup> et Lhs KO. Le nombre total de lymphocytes T (CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>) et B (CD45<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>) par dépôt adipeux est comparable entre les trois génotypes, mais devient supérieur chez les Lhs KO par mg de tissu

(Figure 31B). Il est intéressant de noter que la proportion de lymphocytes dans la SVF diminue parallèlement avec la diminution de l'expression de la LHS.

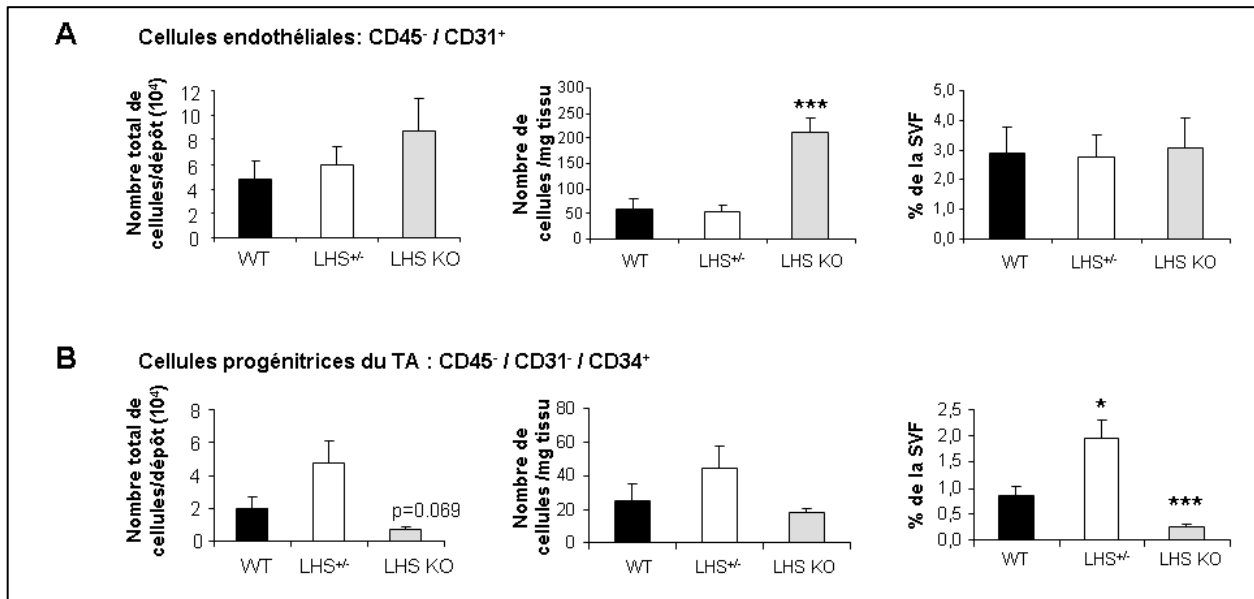


**Figure 31 : Cellules leucocytaires.**

**A**, Quantification de la population macrophagique. **B** et **C**, Quantification des populations lymphocytaires. Les résultats sont exprimés en nombre total de cellules par dépôt adipeux (à gauche), par nombre de cellule par milligramme de TA (au centre) et par pourcentage du nombre total de cellules de la fraction stroma vasculaire (à droite). \*\*  $p < 0.01$  Test *t* de Student.

La figure 32 présente ensuite la quantification des cellules non immunes de la SVF du TA. En nombre total de cellules par dépôt et par mg de tissu, le profil des cellules endothéliales (CD45<sup>-</sup>/CD31<sup>+</sup>) ressemble à celui des macrophages, à savoir un niveau identique entre WT et LHS<sup>+/-</sup>, et supérieur pour les Lhs KO (Fig 32A). Enfin, une estimation des cellules progénitrices du TA (CD45<sup>-</sup>/CD31<sup>-</sup>/CD34<sup>+</sup>) a été réalisée. Par rapport aux animaux WT et

selon n'importe quel mode d'expression, cette population cellulaire est augmentée chez les animaux LHS<sup>+/-</sup> et diminuée chez les animaux Lhs KO (Figure 32B).



**Figure 32 : Cellules non immunitaires de la fraction stroma vasculaire.**

**A**, Quantification des cellules endothéliales. **B**, Quantification des cellules progénitrices. Les résultats sont exprimés en nombre total de cellules par dépôt adipeux (à gauche), par nombre de cellule par milligramme de TA (au centre) et par pourcentage du nombre total de cellules de la fraction stroma vasculaire (à droite). \* p<0.05, \*\*\* p<0.001 Test de Student.

En conclusion de l'expérience menée par cytométrie en flux :

- 1) nous avons vérifié que les souris KO Lhs présentent une infiltration macrophagique prononcée au sein du TA comme décrit dans la littérature,
- 2) nous observons que les animaux LHS<sup>+/-</sup> présentent un infiltrat de cellules immunes quantitativement identique aux souris WT,
- 3) nous suspectons des différences de potentiel adipogénique du TA entre les trois génotypes au vue de l'estimation des cellules progénitrices.

Au vu de cette dernière observation nous avons réalisé un test d'adipogenèse *in vitro* à partir de SVF de TA péri-gonadique et sous-cutané chez des souris WT, LHS<sup>+/-</sup> et Lhs KO (Fig 33A). Les cellules de la SVF de TA ont été ensemencées et mises à proliférer dans un milieu de base ECBM 2% SVF pendant 3 jours. La différenciation a été menée pendant 8 jours en

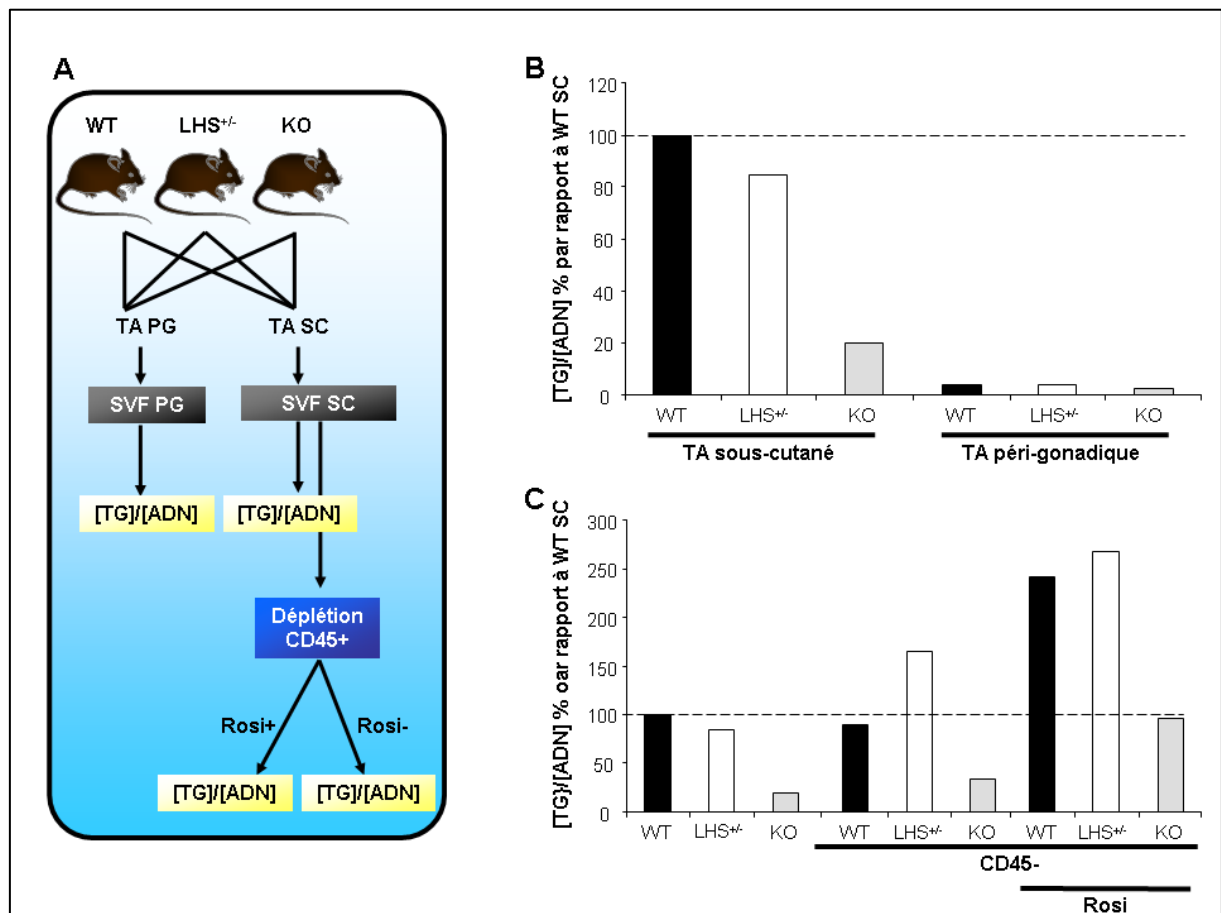


milieu de base ECBM 2% SVF complétement (insuline, T3, cortisol, transférine). Afin d'observer le potentiel anti-adipogénique des cellules immunes de la SVF, une partie de la SVF du TA sous-cutané a été préalablement déplétée des cellules CD45 positives grâce à des billes magnétiques couplées à l'anticorps anti CD45. La SVF CD45 négative a été différenciée en présence ou pas de rosiglitazone. La figure 33B permet d'observer que :

- le potentiel adipogénique des cellules du TA sous-cutané est supérieur à celui des cellules du TA péri-gonadique,
- les potentiels adipogéniques des SVF des génotypes WT et LHS<sup>+/-</sup> sont comparables et nettement supérieur à celui des animaux Lhs KO.

La figure 33C nous apprend ensuite que :

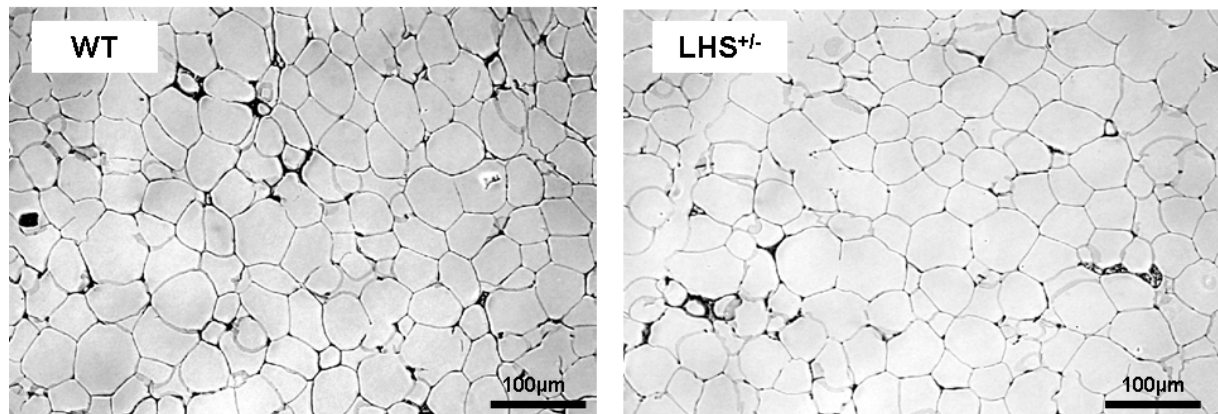
- les souris LHS<sup>+/-</sup> semblent plus sensibles que les deux autres groupes au pouvoir anti adipogénique de la fraction cellulaire CD45<sup>+</sup>,
- le défaut de différenciation observée chez les animaux Lhs KO est conservé même en présence d'un agoniste du récepteur PPAR $\gamma$ .



**Figure 33 : Challenge adipogénique *in vitro*.**

A, Protocole expérimental. B et C, évaluation de la différenciation adipocytaire par marquage au Red Oil, normalisé par le contenu en ADN. TA : tissu adipeux, PG :péri gonadique, SC : sous-cutané, SVF : fraction stroma-vasculaire, TG : triglycéride, ADN : acide désoxyribonucléique, Rosi : rosiglitazone.

Des coupes histologiques de TA péri-gonadique ont également été réalisées dans le but de mesurer la taille des adipocytes et de compléter les données sur l'infiltration macrophagique par immunomarquage au F4/80 chez les animaux LHS<sup>+/-</sup>. Les animaux LHS<sup>+/-</sup> ne présentent pas de modification de la taille adipocytaire par rapport aux souris contrôle (Fig 34). Les expériences de marquage de l'infiltrat macrophagique sont encore en cours.

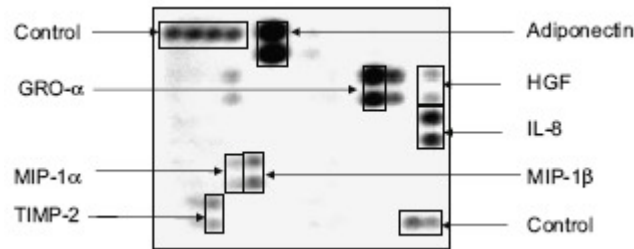


**Figure 34 : Coupe histologique de tissu adipeux.**

Notre deuxième objectif était d'évaluer le profil sécrétoire du TA des souris LHS<sup>+/-</sup> par rapport aux animaux WT. Notre première approche a consisté à établir qualitativement un profil « large et sans *a priori* » de sécrétion dans des milieux d'explants de TA grâce à la technique de «*cytokine array* ». Du TA péri-gonadique a été disséqué et immédiatement placé en condition stérile, puis émincé dans un milieu KRBHA (0,5% albumine). Trois changements de milieu ont été réalisés durant les premières 24h afin de s'affranchir de la sécrétion adipocytaire liée à la mise en culture (stress et mort cellulaire). Nous avons ensuite récolté les milieux d'explant 24h après (48h après la mise initiale en culture). Ces derniers ont été supplémentés d'un cocktail d'anti-protéases et stockés à -80°C. Les milieux d'explants ont ensuite été déposés sur les membranes à cytokines comme indiqué par le protocole. Cette technique est semblable à l'Elisa. Les membranes sont ensuite photographiées et l'image

(exemple dans la Figure 35) est traitée par un logiciel informatique. L'intensité de sécrétion d'une cytokine donnée est proportionnelle à l'intensité de pixel du spot sur la membrane.

Le Tableau 6 présente les résultats obtenus en intensité de pixel.



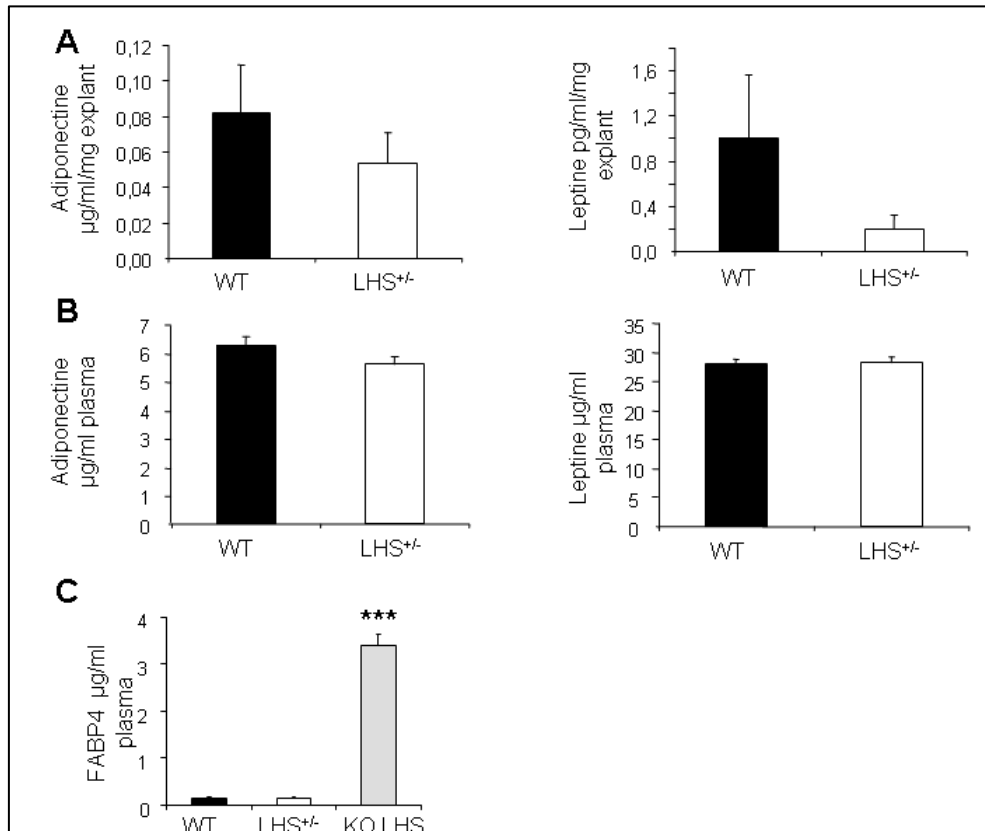
**Figure 35 : Exemple de membrane à cytokine « cytokine array ».**

**Tableau 6 : Membrane à cytokine**

		WT n=8	LHS <sup>+/-</sup> n=8	p=
<i>Chémokines</i>	6Ckine	83 ± 24	86 ± 17	ns
	CTACK	179 ± 44	141 ± 24	ns
	GM-CSF	140 ± 34	69 ± 25	ns
	Kc	1575 ± 549	477 ± 249	ns
	MCP-1	9209 ± 2976	3605 ± 1608	ns
	MCP-5	294 ± 53	299 ± 48	ns
	MIP-1α	327 ± 132	207 ± 34	ns
	MIP-2	2945 ± 703	2174 ± 440	ns
	MIP-3β	338 ± 57	322 ± 47	ns
	Eotaxine	172 ± 34	92 ± 16	0.067
<i>Facteurs de croissance</i>	GCSF	1501 ± 339	1201 ± 346	ns
	SCF	112 ± 21	81 ± 23	ns
	TIMP-1	492 ± 78	253 ± 52	*
	Thrombopoietine	383 ± 67	208 ± 61	0.077
	VEGF	300 ± 74	174 ± 42	ns
<i>Cytokines pro-inflammatoires</i>	IL2	96 ± 29	25 ± 10	0.052
	IL3	67 ± 24	2 ± 2	*
	IL5	41 ± 20	80 ± 20	ns
	IL6	3181 ± 1085	2028 ± 617	ns
	IL9	111 ± 28	102 ± 19	ns
	IL12p40p70	173 ± 28	167 ± 27	ns
	IL12p70	161 ± 33	169 ± 35	ns
	IL13	202 ± 34	135 ± 39	ns
	IL17	71 ± 8	33 ± 13	*
	IFNγ	129 ± 27	53 ± 22	*
	Rantes	147 ± 27	181 ± 29	ns
TNFα	245 ± 45	136 ± 42	ns	
<i>Cytokines anti-inflammatoires</i>	IL4	234 ± 71	85 ± 21	0.089
	IL10	61 ± 16	54 ± 13	ns

<i>Adipokine</i>	Leptine	142 ± 25	45 ± 12	**
<i>Autres</i>	sTNRFI	287 ± 46	208 ± 27	ns
	TARC	290 ± 38	224 ± 48	ns

Parmi les chémokines, nous avons observé seulement la diminution de l'Eotaxine dans les milieux d'explants des souris LHS<sup>+/-</sup>. Deux facteurs de croissance sont également diminués chez les animaux LHS<sup>+/-</sup>: TIMP-1 et la thrombopoïétine (tendance). Parmi les cytokines pro-inflammatoires l'IL2, IL3, IL17 et IFN $\gamma$  sont réduits chez les souris LHS<sup>+/-</sup>. La cytokine anti-inflammatoire IL4 suit le même profil de réduction ainsi que la leptine. Le fait qu'un grand nombre de protéines soit diminué dans les milieux d'explants des animaux LHS<sup>+/-</sup> nous a d'abord suggéré un problème technique de normalisation des données. Cependant, certaines protéines ne sont pas du tout modifiées (6Ckine, MCP-5, CTACK, IL9, IL12...) chez les animaux LHS<sup>+/-</sup> ce qui permet de valider l'expérience. L'ensemble de ces données suggérait un profil « moins inflammatoire » chez les animaux partiellement déficient pour la LHS. Ce « cytokine array » n'offrait pas la possibilité de doser l'adiponectine. Or, l'adiponectine est souvent associée aux modifications de sensibilité à l'insuline. Nous l'avons donc dosé à l'aide d'un kit commercial indépendant. Nous avons également redosé la leptine que nous avons trouvé largement diminuée dans les milieux d'explants des souris LHS<sup>+/-</sup>. Nous n'avons pas mis en évidence de modification des quantités d'adiponectine dans les milieux d'explants des animaux LHS<sup>+/-</sup> (Figure 36A, à gauche) et observé une diminution de la leptine comme précédemment (Figure 36A, à droite). En parallèle, la mesure de ces deux adipokines au niveau plasmatique n'a pas révélé de différence chez les animaux LHS<sup>+/-</sup> par rapport aux témoins WT (Fig 36B). L'établissement du profil des AG plasmatiques n'a pas révélé de modification chez les animaux LHS<sup>+/-</sup>, si ce n'est une légère diminution de la proportion d'acide arachidonique (WT : 6,3 ± 0,4% vs LHS<sup>+/-</sup> : 5,3 ± 0,4%, p=0,115).



**Figure 36 : Dosages d'adipokines dans les milieux d'explants et dans les plasmas.**

**A**, Dosage d'adipokines dans les milieux d'explants. **B** et **C**, Dosage d'adipokines dans le plasma. \*\*\*  $p < 0.001$  Test  $t$  de Student.

## Discussion

### Capacités lipolytiques

Dans ce travail nous avons tout d'abord caractérisé les conséquences fonctionnelles de l'haplodéficiencia du gène de la *Lhs* par des mesures d'activités d'hydrolyse d'ester de cholestérol. La diminution de l'expression de la LHS est accompagnée d'une diminution de cette activité enzymatique. De manière surprenante, l'activité TG hydrolase est également diminuée chez ces animaux (mesure effectuée sur différents groupes de souris indépendants). En effet, si l'on considère que l'ATGL est majoritairement responsable de l'hydrolyse de la première liaison ester du TG alors, une diminution de l'activité de la LHS ne devrait pas avoir de conséquences sur l'hydrolyse des TG. Une diminution de l'expression de l'ATGL, son co-activateur CGI-58 et de la périlipine, qui aurait pu expliquer cette observation, n'a pas été constatée. De plus, l'activité propre de l'ATGL mesurée *in vitro* en présence d'un inhibiteur

spécifique de la LHS, n'est pas modifiée chez les souris LHS<sup>+/-</sup>. On pourrait envisager que l'importance relative des deux enzymes dans l'hydrolyse de la première liaison se trouve modifiée par la quantité disponible de LHS.

### **Haplodéficiences pour la LHS et flux lipidiques**

En collaboration avec la société Physiogenex, une mesure des flux d'AG a été réalisée. Cette technique originale et très peu employée chez la souris a révélé une diminution de leur *turn-over* chez les animaux LHS<sup>+/-</sup>. Ces animaux présentent donc un métabolisme lipidique qui en « statique » ne diffère pas de celui des animaux WT (concentrations plasmatiques inchangées) mais qui est largement altéré sur le plan « dynamique ». La diminution des capacités lipolytiques est reliée à une diminution de l'estérification des AG chez les animaux LHS<sup>+/-</sup>. Le ralentissement global du métabolisme des AG permettrait d'expliquer pourquoi la masse de TA de ces souris n'est pas modifiée. Il serait donc improbable que le défaut de lipolyse stimulée observée dans le TA de sujets obèses puisse participer au développement excessif de la masse grasse. L'origine physiologique de la diminution de la LHS pendant l'obésité pourrait alors être perçue comme un mécanisme adaptatif et protecteur afin de limiter la production excessive d'AG susceptibles d'altérer l'insulino-sensibilité (Samuel et al., 2010). Bien que fort intéressante cette approche *in vivo* de fluxomique ne renseigne cependant pas sur le devenir des AG incorporés dans les autres pools de lipides neutres de la cellule, ni sur la part des AG qui est dirigée vers la  $\beta$ -oxydation mitochondriale dans chaque organe. L'estimation de l'oxydation fournie par cette technique n'est que globale. Enfin, l'estimation de la re-estérification des AG n'est pas accessible. Cette donnée aurait été très intéressante car des travaux du laboratoire ont montré qu'en jouant sur le niveau d'expression des lipases, on pouvait modifier la re-estérification des AG (Bezaire et al., 2009). Cette question pourrait être abordée *in vivo* grâce à l'utilisation de deux types d'AG, marqués par des isotopes différents.

### **Haplodéficiences pour la LHS et homéostasie glucidique**

Nous avons ensuite montré chez les animaux LHS<sup>+/-</sup> que la modification des flux d'AG était associée à une amélioration de la tolérance à l'insuline et au glucose. Le maintien de la glycémie résulte d'une balance fine entre la production hépatique de glucose et son utilisation par les tissus répondant ou non à l'action de l'insuline. Le foie et les muscles squelettiques sont donc des organes insulino-sensibles majeurs de l'homéostasie glucidique.

Afin de déterminer si l'amélioration de la sensibilité à l'insuline pouvait être attribuée aux muscles squelettiques, nous avons réalisé un clamp euglycémique hyperinsulinémique à « forte dose » d'insuline (stimulant à environ 90-100% l'utilisation de glucose par les muscles et inhibant totalement la production hépatique de glucose). A notre surprise, cette mesure n'a pas mis en évidence de différence d'insulino-sensibilité périphérique entre les animaux WT et LHS<sup>+/-</sup>. Nous en avons conclu que i) soit la dose d'insuline employée était trop forte pour mettre en évidence des différences fines entre les génotypes ; ii) soit le phénotype musculaire n'était pas impliqué dans l'amélioration de la sensibilité à l'insuline. En revanche, l'*uptake* de 2-désoxyglucose *in vivo* suite à une stimulation insulinique était augmentée dans deux types de muscles (*gastrocnemius* et *soleus*) chez les souris LHS<sup>+/-</sup> indiquant leur importance dans la régulation globale de la glycémie. Sur le modèle d'inactivation complète de la LHS, Park et al. avaient observé une augmentation de l'utilisation globale du glucose sans modification du GIR (Park et al., 2005). L'explication du phénotype des souris LHS<sup>+/-</sup> sur le plan de la sensibilité à l'insuline souffre des mêmes limites que les modèles d'inactivation totale de la lipase à savoir une non-spécificité d'organe. Ainsi, les animaux haplodéficients présentent une altération du niveau d'expression de la LHS dans plusieurs tissus intervenant dans le contrôle de l'homéostasie glucidique et il est alors compliqué de démêler les effets propres de la diminution de l'expression de la lipase dans le TA et dans ces autres organes. Différents travaux ont montré le rôle important des lipases dans la gestion des stocks musculaires de TG (Alsted et al., 2009; Kienesberger et al., 2009; Moro et al., 2009). Dans le muscle du sujet obèse l'expression de l'ATGL est augmentée et celle de la LHS diminuée ce qui entraîne une accumulation de DG suspectés d'altérer la voie de signalisation de l'insuline au niveau de diverses protéines kinases (résultats non publiés du laboratoire) et concourir à l'installation d'une insulino-résistance. L'expression des deux lipases dans le muscle n'est donc pas altérée de la même manière comme cela avait été décrit dans le TA. L'importance relative des deux lipases dans le processus lipolytique pourrait être tissu-dépendant. Le rôle de la LHS sur la sensibilité à l'insuline pourrait être opposé dans le TA et les muscles squelettiques. Dans notre modèle, l'effet adipocytaire de la LHS semble prédominant *in vivo* même si l'augmentation de l'oxydation du glucose et la diminution du contenu en TG suggèrent une potentielle amélioration de l'insulino-sensibilité musculaire. L'exploration de la fonctionnalité de la voie de l'insuline *ex vivo* permettrait de compléter le phénotype musculaire. L'implication du foie dans le phénotype des souris LHS<sup>+/-</sup> a été exploré par différentes manipulations mais les résultats sont contradictoires. Si les données de clamp euglycémique hyperinsulinémique à « faible dose » d'insuline, le challenge nutritionnel de « mise à jeun – re

alimentation », et les données d'oxydation de l'oléate ne mettent pas clairement en évidence d'amélioration de sensibilité hépatique à l'insuline, les mesures de lipogenèse hépatique et la diminution du contenu en TG du foie sont en faveur d'un rôle de ce dernier dans l'amélioration globale de l'insulino-sensibilité des animaux LHS<sup>+/-</sup>. En effet, l'amélioration de l'insulino-sensibilité hépatique pourrait expliquer les résultats obtenus en ITT. La charge exogène d'insuline bloquerait plus efficacement la production hépatique de glucose et expliquerait l'abaissement plus marqué de la glycémie chez les animaux LHS<sup>+/-</sup>. D'autre part, le défaut de néoglucogenèse observé en test de tolérance au pyruvate participerait à la diminution de la production hépatique de glucose chez les animaux LHS<sup>+/-</sup>. L'altération de la sensibilité à l'insuline peut avoir lieu à deux niveaux, celui des récepteurs (nombre de récepteurs recrutés) et celui de la voie de signalisation. D'autres expériences pourraient donc venir compléter l'étude du phénotype hépatique :

- la mesure des récepteurs à l'insuline par Western blot,
- la mesure de la phosphorylation de protéines de la voie de signalisation de l'insuline (IRS1, Akt...) suite à une injection d'insuline,
- la mesure de l'ARNm de TRB-3, inhibiteur d'Akt (Koo et al., 2004), mais aussi sur un plan plus physiologique, la mesure de la formation de glycogène hépatique suite à une stimulation insulinique (Knauf et al., 2005).

Il serait également nécessaire de refaire les expériences de « mise à jeun – re-alimentation » sur un plus grand nombre d'animaux, de doser le glucagon, le glycogène hépatique et de vérifier les données sur l'expression de la G-6-phosphate. Il est en effet très étonnant d'observer chez les animaux LHS<sup>+/-</sup> à jeun la diminution de cette enzyme clé de la néoglucogenèse et glycolyse sans voir de répercussion sur la concentration de glucose plasmatique à jeun. Cette diminution pourrait résulter de la baisse de l'expression de PGC1 $\alpha$ . Etant donné les contraintes logistiques d'élevage des lignées et la durée des protocoles de mises en régime, nous n'avons pas eu le temps de réaliser ces expériences et vérifier ces hypothèses avant la rédaction de ce mémoire.

Une limite de notre modèle réside dans la difficulté d'estimer l'impact de la diminution de l'expression de la LHS sur le pancréas. En effet, la LHS ainsi que l'ATGL sont exprimées dans le pancréas (Fex et al., 2009; Fex et al., 2004) et des travaux sur le modèle d'invalidation totale ont montré le rôle majeur des lipases dans le processus sécrétoire (Roduit et al., 2001). De plus, une invalidation spécifique de la LHS dans les cellules  $\beta$  pancréatiques altère profondément la sécrétion d'insuline. Ainsi, dans ces cellules, la lipolyse permettrait la



production de signaux lipidiques essentiels pour la sécrétion d'insuline (Fex et al., 2009). La mesure de l'insuline plasmatique réalisée dix minutes après la charge orale de glucose (oGTT) indique une augmentation cependant non significative chez les souris LHS<sup>+/-</sup>, cependant non significative. La quantification de l'expression des lipases dans le pancréas représenterait une donnée facilement accessible et pourrait nous renseigner. Cependant, pour caractériser plus précisément la fonctionnalité pancréatique, des expériences *ex vivo* sur îlots isolés seraient nécessaires. Nous ne disposons pas de cette technique au laboratoire.

Enfin, nous avons remarqué que le TA péri-gonadique des souris LHS<sup>+/-</sup> soumises à une stimulation insulinique captait d'avantage de glucose que celui des animaux WT. Cette observation trouve difficilement une place dans l'explication de l'amélioration de la sensibilité à l'insuline mais pourrait participer à l'amélioration de la tolérance au glucose observée en GTT. En revanche, dans le contexte du métabolisme adipocytaire cette observation revêt un intérêt particulier au vu des récents travaux présentant le lactate comme inhibiteur de la lipolyse. Ahmed et al. ont montré que le L-lactate, produit suite à l'entrée de glucose stimulée par l'insuline dans l'adipocyte, pouvait se lier sur le récepteur GPR81 et diminuer les taux intracellulaires d'AMPc (Ahmed et al., 2010). Nous pouvons donc imaginer qu'en situation post prandiale (situation non stimulée de la lipolyse), l'inhibition de la lipolyse soit plus efficace chez les animaux LHS<sup>+/-</sup>. Nous n'avons cependant pas remarqué de modification des basales (glycérol et AG) en lipolyse *in vivo*.

### **L'inflammation du tissu adipeux impliquée dans le phénotype d'haplodéficiences pour la LHS ?**

Nous avons donc établi que les flux d'AG représentaient un lien entre métabolisme lipidique et sensibilité à l'insuline chez les animaux LHS<sup>+/-</sup>. L'obésité, caractérisée par un dérèglement de ces flux d'AG et une exagération de leur libération par la masse adipeuse, est également associée à un état inflammatoire de bas niveau. Ces AG ont été impliqués dans l'activation des macrophages et leur recrutement au sein du TA. Des récepteurs de la famille des TLR, dont plus particulièrement TLR4 et TLR2, permettent de médier l'effet des AG dans les macrophages (Ehse et al., 2010; Suganami et al., 2007b). Ils initient l'activation de la voie du NFκB qui en aval régule l'expression de nombreuses molécules pro-inflammatoires. Tout comme les AG, ces cytokines pro-inflammatoires seraient en partie responsables de la dégradation de l'insulino-sensibilité chez les sujets obèses, par l'activation de protéines kinases inhibant la voie de signalisation de l'insuline (Maury and Brichard, 2010; Qatanani

and Lazar, 2007). Les cytokines pro-inflammatoires représenteraient donc le troisième pilier d'une interaction métabolique triangulaire entre métabolisme adipocytaire et insulino-sensibilité. Il nous a donc paru pertinent d'essayer de savoir si l'amélioration de la sensibilité à l'insuline associée à la diminution des flux d'AG chez les souris LHS<sup>+/-</sup> pouvait être reliée à une modification du degré de l'inflammation du TA. Nous imaginions que cette inflammation pouvait être réduite et concourrait à l'amélioration du profil insulinaire. D'autre part, les relations entre lipolyse, inflammation et insulino-résistance étaient encore peu décrites.

Notre investigation a débuté par le dosage de l'expression génique de marqueurs de surface macrophagiques et de cytokines sans pouvoir mettre en évidence de modification chez les animaux LHS<sup>+/-</sup> par rapport aux animaux WT, suggérant alors une infiltration macrophagique d'ampleur comparable. Cette observation a été corroborée par les mesures des différentes populations cellulaires de la fraction non adipocytaire du TA. En effet, les quantités de macrophages et lymphocytes étaient comparables chez animaux LHS<sup>+/-</sup> et WT quelque soit le mode de présentation des résultats : nombre total de cellules par dépôt adipeux, par mg de tissu ou % de la SVF. Pour le dénombrement des différents types de macrophages, la manipulation est cependant limitée par l'absence du marqueur CD11c, sensé différencier en association avec les marqueurs CD11b et F4/80 les macrophages recrutés des macrophages résidents. Les mesures de cytométrie en flux nous renseignent sur la quantité de cellules F480<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> qui englobent les cellules recrutées CD11c<sup>+</sup>. Cependant, quand bien même ce type de mesure permet d'estimer les quantités de cellules qui expriment ces marqueurs, elle ne permet pas de vérifier la physiologie et la fonction de la cellule *in situ*. D'autre part, les travaux récents du groupe d'Olefsky a remis en doute la pertinence du marqueur CD11c pour l'identification des macrophages de type M1. Des animaux rendus obèses et insulino-résistants par l'effet d'un régime enrichi en graisses ont ensuite été placés en régime standard ce qui a eu pour effet d'améliorer nettement leur sensibilité à l'insuline sans toutefois modifier la quantité initiale de macrophages CD11c<sup>+</sup> dans le TA (Li et al., 2010b). Cependant, si ces macrophages expriment toujours ce marqueur après l'amélioration des paramètres métaboliques, leur phénotype est largement modifié. Ces travaux mettent donc en évidence la plasticité de polarisation des macrophages M1 CD11c<sup>+</sup> et mettent surtout en lumière la dissociation possible entre insulino-sensibilité et inflammation du TA. Le meilleur moyen de vérifier le phénotype des macrophages présents dans le TA serait de les isoler et de regarder leur métabolisme et sécrétion *in vitro*.

Nous pouvons penser, suite à l'ensemble de ces observations, qu'une modification des flux d'AG sans changement de la quantité totale d'AG dans le tissu n'est pas suffisante pour

influencer le recrutement macrophagique. Dans l'idée qu'un effet qualitatif pouvait également être responsable de l'effet des AG sur les macrophages (Suganami et al., 2007b), nous avons également établi le profil d'AG du TA. Cependant, aucune différence dans les espèces d'AG dosées n'avait été mise en évidence entre les animaux WT et LHS<sup>+/-</sup>. La mort adipocytaire est un autre facteur pouvant favoriser l'infiltration macrophagique (Cinti et al., 2005; Strissel et al., 2007). L'étude des coupes histologiques de TA par immunomarquage au F4/80 pourra nous renseigner sur l'importance des événements de « *crown-like structure* » associées à la nécrose adipocytaire. Nous avons imaginé que FABP4 pourrait représenter un bon marqueur de nécrose adipocytaire. En effet, cette protéine, largement exprimée dans les adipocytes pourrait signaler, sur le même principe que la lactate déshydrogénase, une mort adipocytaire prononcée. Un autre membre de la famille des FABP, *heart-FABP*, est considéré comme un bio marqueur pertinent de la nécrose myocardique (Azzazy et al., 2006). Afin de tester notre hypothèse, nous avons mesuré cette protéine dans le plasma de nos animaux ainsi que dans celui de souris Lhs KO connues pour présenter une nécrose prononcée dans le TA (Cinti et al., 2005). Les taux plasmatiques de FABP4 chez les souris WT et LHS<sup>+/-</sup> sont comparables, ne suggérant pas l'augmentation de la nécrose adipocytaire chez ces derniers. En revanche, les concentrations relevées chez Lhs KO sont vingt fois supérieures à celles des souris WT et LHS<sup>+/-</sup> et semblent bien corrélées aux descriptions de la littérature. Afin de complètement valider FABP4 comme marqueur plasmatique de nécrose adipocytaire différentes expérimentations seraient nécessaires, comme par exemple établir des corrélations précises entre les taux plasmatiques de FABP4 et la perte du marquage immunohistochimique de la périlipine (intégrité de la GL).

La mise en culture d'explants de TA a ensuite été réalisée dans le but d'établir un profil de sécrétion du TA pour chacun des deux génotypes. Une approche exploratoire, par « *cytokine array* » semblait montrer un profil moins inflammatoire chez les animaux LHS<sup>+/-</sup>. Notamment, la sécrétion de leptine par les explants des animaux LHS<sup>+/-</sup> est diminuée. Différents travaux ont mis en évidence le potentiel de la leptine dans l'activation des monocytes/macrophages et la production de cytokines pro-inflammatoire par ces cellules (Gainsford et al., 1996; Loffreda et al., 1998; Santos-Alvarez et al., 1999). D'autre part, la fixation de la leptine sur les macrophages promeut le phénotype pro-athérogénique de ce dernier par l'augmentation de la sécrétion de LPL (Maingrette and Renier, 2003). La diminution de la production de leptine par le TA des animaux LHS<sup>+/-</sup> aurait pu favoriser une polarisation plutôt M2/anti-inflammatoire des macrophages. Sachant que l'expression et la sécrétion des adipokines est favorisée par l'hypertrophie adipocytaire (Skurk et al., 2007), la

diminution de la sécrétion de leptine chez les animaux LHS<sup>+/-</sup> aurait pu s'expliquer par une réduction de la taille adipocytaire. Or, les mesures réalisées à partir de coupes histologiques ne mettent pas en évidence de modification de la taille des adipocytes chez ces animaux.

En dernier lieu, devant l'évidence grandissante que le statut inflammatoire du TA ne devait certainement pas être impliqué dans l'amélioration de la sensibilité à l'insuline chez les animaux LHS<sup>+/-</sup>, nous nous sommes demandés si des changements dans le profil plasmatique des AG pouvait jouer ce rôle. En effet, les travaux d'Hotamisligil ont mis en évidence le rôle d'une lipokine, le palmitoléate (C16:1 $\omega$ 7) dans l'amélioration de la sensibilité à l'insuline (Cao et al., 2008). D'autre part, les AG représentent des modulateurs de l'inflammation, soit plutôt modérateurs (cas de l'acide  $\alpha$  linoléique (Chang et al., 2010) et des résolvines produites à partir de précurseurs  $\omega$ 3-poly-insaturés (Kohli and Levy, 2009) ou alors comme précurseurs d'activateurs (acide arachidonique) (Das, 2006). Les profils établis chez les animaux LHS<sup>+/-</sup> ne montrent pas de différence de concentration de palmitoléate, écartant l'intervention de cette lipokine dans l'amélioration de la sensibilité à l'insuline. Nous avons seulement observé une légère diminution (non significative de par la variabilité interindividuelle présente dans chaque groupe d'animaux) de la proportion d'acide arachidonique chez les souris LHS<sup>+/-</sup> difficilement associable au phénotype global de ces animaux.

Les expériences de cytométrie en flux nous ont quand même permis de valider le phénotype pro-inflammatoire du TA des animaux Lhs KO. Cinti et al avait mis en évidence l'accumulation macrophagique autour d'adipocytes « mourants » et avait ainsi décrit les « *crown-like structures* » par des techniques immunohistochimiques (Cinti et al., 2005). Une quantification par cytométrie n'avait jamais été effectuée auparavant sur ce modèle. Elle montre que la fraction non adipeuse du TA est considérablement augmentée chez les animaux Lhs KO. Par unité de masse grasse, ces souris présentent beaucoup plus de macrophages et de lymphocytes. En proportion de la SVF, les animaux Lhs KO présentent plus de macrophages et moins de lymphocytes par rapport aux animaux WT. L'observation des cellules CD45<sup>-</sup>/CD31<sup>+</sup> renseigne sur la quantité de cellules endothéliales, qui est augmentée chez les animaux Lhs KO par unité de tissu. L'augmentation du nombre de cellules endothéliales, directement corrélée à celle de la SVF par unité de masse grasse, pourrait être reliée à la description faite du TA de ces souris par Ström et al., comme un tissu ayant acquis certaines caractéristiques du TA brun (Strom et al., 2008). Or le TA brun est largement vascularisé ; on

pourrait penser que l'augmentation de la proportion des cellules endothéliales chez les animaux Lhs KO soit le reflet d'une augmentation de la vascularisation de ce tissu.

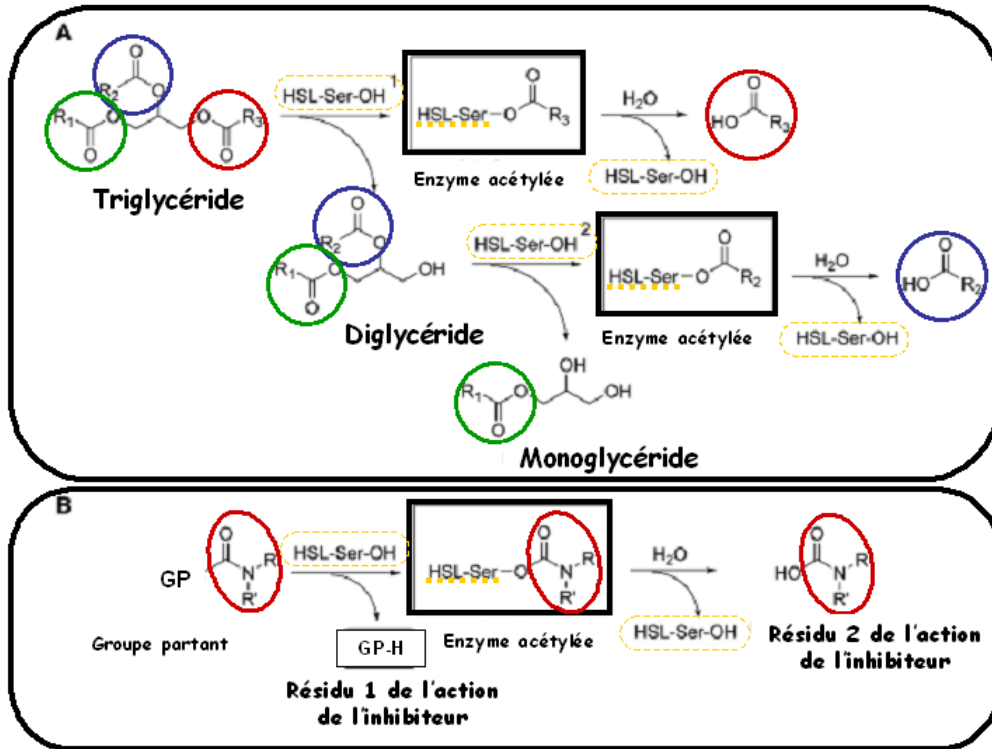
L'observation de l'évolution de la cellularité de la masse adipeuse avec le développement de l'obésité a conduit le groupe de Björntorp à l'hypothèse pionnière de la présence de cellules progénitrices dans le TA humain (Björntorp et al., 1971). Au cours de l'obésité, le TA croît selon deux modes successifs: hypertrophie adipocytaire suivie d'une hyperplasie adipocytaire or les adipocytes matures sont des cellules différenciées incapables de proliférer. L'expansion du TA au cours de l'obésité doit certainement se produire par recrutement de nouveaux progéniteurs pour assurer le développement de nouveaux adipocytes (Björntorp et al., 1971; Sjöström, 1972; Sjöström et al., 1972). Ces observations ont été le point de départ du champ de recherche sur les cellules progénitrices du TA. Différents travaux ont depuis démontré la présence au sein du TA de cellules capables de se différencier en adipocytes fonctionnels (Björntorp et al., 1978; Choi et al., 2006; Deslex et al., 1987; Hauner et al., 1989). On sait d'autre part que le taux de renouvellement annuel des adipocytes chez un sujet normo-pondéré est d'environ 10% (Spalding et al., 2008). Ce *turn-over* cellulaire nécessite le recrutement de nouveaux adipocytes dont l'origine dérive des cellules progénitrices. Les travaux de l'équipe d'A. Bouloumié a caractérisé ces cellules dans le TA humain, elles répondent au marquage spécifique CD34<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup> (Sengenès et al., 2005). Nous avons pu bénéficier de l'expertise de cette équipe pour l'étude de la fraction non adipocytaire du TA de nos animaux. Les mesures de cytométrie en flux ont montré respectivement une augmentation et une diminution de ces cellules chez les animaux LHS<sup>+/-</sup> et Lhs KO par rapport aux souris WT. Ce résultat est toutefois à prendre avec précaution sachant que le marqueur Sca-1 est plus spécifique de ces cellules chez la souris que le marqueur CD34 (Rodeheffer et al., 2008). Nous n'avons malheureusement pas eu la possibilité d'avoir accès à cet anticorps lors de notre expérience. Cependant nous savons qu'une partie seulement des cellules CD34<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup> est également positive pour le marqueur Sca-1. Les résultats présentés doivent certainement sous estimer la population de cellules progénitrices. Les tests d'adipogenèse réalisés suite à cette observation ont montré que la SVF des souris Lhs KO présentait un défaut de différenciation par rapport aux cellules des deux autres génotypes même en présence d'un agoniste du récepteur PPAR $\gamma$ . Ce résultat rejoint l'hypothèse initiée par Zimmermann (Zimmermann et al., 2003) et développée dans la revue de Kraemer qui propose que le défaut de développement de la masse adipeuse des souris Lhs KO puisse être consécutif à un défaut de différenciation adipocytaire (Kraemer and Shen, 2006). L'absence de LHS ne permettrait pas

la production d'AG spécifiques requis pour la synthèse de ligands préférentiellement utilisés par le récepteur PPAR $\gamma$ , affectant alors le processus de différenciation. Cependant nos résultats montrent que même en présence d'agonistes exogènes de PPAR $\gamma$ , la différenciation des adipocytes des souris Lhs KO reste affectée et inférieure à celle des animaux WT et LHS<sup>+/-</sup> suggérant d'autres mécanismes d'altération de la différenciation adipocytaire chez les souris Lhs KO (impliquant peut être le défaut de production d'acide rétinoïque). Ces résultats s'opposent à ceux d'Okazaki et al. qui ont montré une différenciation normale des *mouse embryonic fibroblasts* (MEF) chez les souris Lhs KO (Okazaki et al., 2002). Nos manipulations *in vitro* n'ont, en revanche, pas révélé de différence entre les capacités adipogéniques des animaux WT et LHS<sup>+/-</sup>, signifiant que les défauts de différenciation observés chez les KO Lhs peuvent être réversés par la présence partielle de la lipase. Enfin, nous avons observé une très grande différence territoriale dans les capacités adipogéniques des adipocytes. Les cellules provenant du TA SC présentent des capacités adipogéniques bien supérieures à celle des cellules du TA péri-gonadique. Si les travaux de Hauner chez la souris avaient montré un potentiel adipogénique supérieur dans les adipocytes de TA viscéral par rapport à ceux provenant de TA fémoral (Hauner and Entenmann, 1991), les travaux de Van Harmelen chez l'Homme ne semblent pas montrer de différence de différenciation entre adipocytes de TA viscéral vs sous-cutané ; cependant la prolifération des cellules provenant du TA sous-cutané se trouve augmentée par rapport à celle du TA viscéral (Van Harmelen et al., 2004). Chez le rongeur des différences entre TA péri-gonadique et périrénal avaient été décrites dès 1990 (Kirkland et al., 1990). Il semble donc exister des différences interspécifiques dans la régionalisation du TA associée au potentiel adipogénique des adipocytes.

## **ARTICLE IV : L'inhibition chronique de la lipase hormono-sensible : un modèle d'amélioration de l'insulino-sensibilité et de remodelage du tissu adipeux.**

### **Introduction**

Parallèlement au modèle de souris haplo-déficientes pour le gène de la Lhs, nous avons étudié les conséquences d'une inhibition prolongée de la LHS par un inhibiteur pharmacologique. L'inhibition pharmacologique de la lipolyse est une stratégie intéressante dont l'objectif est de limiter la production excessive d'AG potentiellement délétères pour les organes insulino-sensibles. Cette approche a été largement utilisée dans le traitement du syndrome métabolique associé à l'obésité. Ainsi l'acide nicotinique ou son dérivé Acipimox sont toujours actuellement proposés comme thérapeutique et, conjointement aux statines, sont des agents pharmacologiques capables d'améliorer le profil lipidique des sujets. En outre, l'acide nicotinique possède un avantage par rapport aux statines : elle représente à ce jour la seule famille de composés permettant d'augmenter le HDL cholestérol. Initialement, l'accès à cet inhibiteur de BAYER résultait de collaborations avec le groupe pharmaceutique GlaxoSmithKline (GSK) et le groupe suédois de Peter Arner (Langin et al., 2005), puis nous avons ensuite fait synthétiser (par Idealp Pharma, Villeurbanne, France) le produit en grande quantité pour des études *in vivo*. Le BAY (4-Isopropyl-3-méthyl-2-((S)-3-méthyl-pipéridine-1-carbonyl)-2H-isoxazol-5-one) est un inhibiteur sélectif, compétitif et non réversible de la LHS qui agit comme un pseudo-substrat sur le site catalytique de la lipase et forme avec lui une liaison covalente (Figure 37) (Wang and Fotsch, 2006).



**Figure 37 : Mode d'action du BAY, inhibiteur de la lipase hormono-sensible**

A, Mode d'action de la LHS dans l'hydrolyse des lipides neutres. B, Mode d'action du BAY.

Des traitements chroniques par voie orale à la dose de 70mg/kg/jour (prise unique) avaient été testés par GSK. Après discussion avec leur service de recherche et sur leurs conseils, nous avons décidé de garder les mêmes doses pour nos traitements prolongés. Premièrement, mon travail a consisté à vérifier l'action du BAY *in vivo* et *in vitro*. Nous avons effectué des lipolyses *in vitro* sur adipocytes isolés et des essais d'activité lipase en présence de la molécule. Nous avons également testé la possibilité d'utiliser le BAY de manière aiguë, à une concentration de 25mg/kg. Tous nos résultats ont montré une bonne efficacité du BAY en tant qu'inhibiteur de la lipolyse. Une phase de mise au point a ensuite suivi cette étape de validation. Nous avons d'abord étudié les animaux (groupes de mâles et de femelles) en régime standard, 24h après la dernière administration d'un traitement chronique de 7 jours. A ce temps, les résultats sur l'insulino-sensibilité souffraient d'un manque de reproductibilité et d'une grande variabilité interindividuelle. Les mesures de calorimétrie indirecte ont également été décevantes. Nous avons donc ensuite décidé d'effectuer nos investigations physiologiques sur des animaux, préalablement rendus obèses par 12 semaines de régime enrichi en graisse, deux heures après la dernière administration. Dans cet article nous montrons qu'une



administration prolongée de BAY permet de diminuer significativement les taux plasmatiques d'AG libres et de glycérol. Le traitement permet également d'améliorer la tolérance à l'insuline sans toutefois modifier la tolérance au glucose. Nous avons ensuite voulu connaître l'implication potentielle des organes périphériques insulino-sensibles dans l'amélioration de l'insulino-sensibilité. Des mesures de phosphorylation d'Akt suite à une stimulation insulinique ont montré une amélioration de la sensibilité à l'insuline dans le foie mais pas dans le muscle squelettique. Par la suite, sachant que 1) l'obésité est associée à une inflammation du TA et que les AG tiennent un rôle clé dans l'activation et le recrutement des cellules immunitaires au sein du TA et que 2) les cytokines produites par l'excès de masse grasse peuvent altérer le signal insulinique dans les organes insulino-sensibles, nous nous sommes questionnés quant à l'implication de l'inflammation du TA dans le phénotype de nos animaux traités au BAY. Une caractérisation de l'inflammation du TA a donc été réalisée et les mesures de cytométrie en flux ont montré une augmentation de différentes populations de macrophages suite à l'inhibition chronique de la LHS par le BAY. Cette observation, en parallèle de l'hétérogénéité de taille des adipocytes constatée chez les animaux traités au BAY, suggère un remodelage du TA.

Diminution génique ou pharmacologique de la lipase hormono-sensible

**Article**

# **L'inhibition chronique de la lipase hormono-sensible améliore la sensibilité à l'insuline et induit un remodelage du tissu adipeux**

**Amandine Girousse<sup>1,2</sup>, Aurélien Fioroni<sup>1,2</sup>, Geneviève Tavernier<sup>1,2</sup>, , Sylvie Caspar-Bauguil<sup>1,2,4</sup>, Laurent Monbrun<sup>1,2</sup>, Cédric Moro<sup>1,2</sup>, Balbine Roussel<sup>1,2</sup>, Jean Galitsky<sup>3</sup>, Anne Bouloumié<sup>3</sup> and Dominique Langin<sup>1,2,4</sup>.**

From <sup>1</sup> Inserm, U858, Obesity Research Laboratory, Team 4, Ranguel Institute of Molecular Medicine, BP 84225, F-31432 Toulouse Cedex 4, France

<sup>2</sup> University of Toulouse, IFR150, Paul Sabatier University, France

<sup>3</sup> Inserm, U858, Team 1, Ranguel Institute of Molecular Medicine, Toulouse, France

<sup>4</sup> Laboratory of clinical biochemistry, Toulouse University Hospitals, France

**Running head:** HSL inhibition influences insulin sensitivity and AT remodelling

Diminution génique ou pharmacologique de la lipase hormono-sensible

## CHRONIC INHIBITION OF HORMONE-SENSITIVE LIPASE IMPROVES INSULIN SENSITIVITY AND INDUCES ADIPOSE TISSUE REMODELLING.

Amandine Girousse<sup>1,2</sup>, Aurélien Fioroni<sup>1,2</sup>, Geneviève Tavernier<sup>1,2</sup>, Sylvie Caspar-Bauguil<sup>1,2,4</sup>, Laurent Monbrun<sup>1,2</sup>, Cédric Moro<sup>1,2</sup>, Balbine Roussel<sup>1,2</sup>, Jean Galitzky<sup>3</sup>, Anne Bouloumié<sup>3</sup>, and Dominique Langin<sup>1,2,4</sup>.

From <sup>1</sup> Inserm, U858, Obesity Research Laboratory, Team 4, Rangueil Institute of Molecular Medicine, BP 84225, F-31432 Toulouse Cedex 4, France

<sup>2</sup> University of Toulouse, IFR150, Paul Sabatier University, France

<sup>3</sup> Inserm, U858, Team 1, Rangueil Institute of Molecular Medicine, Toulouse,

<sup>4</sup> Laboratory of clinical biochemistry, Toulouse University Hospitals, France

Running head: HSL inhibition influences insulin sensitivity and adipose tissue remodelling

Address : Dominique Langin, Laboratoire de Recherche sur les Obésités, INSERM U858-

I2MR, Equipe 4 , 1 avenue du Prof. Jean Poulhès, BP 84225, 31432 Toulouse Cedex 4.

Phone: +33(0)5 61325628; Fax: +33(0)561325623; E-mail: [dominique.langin@inserm.fr](mailto:dominique.langin@inserm.fr)

### Abstract

**Introduction:** Plasma free fatty acids (FFA) and/or adipocytokines are thought to contribute to the development of obesity-associated insulin resistance. Inhibition of lipolysis is one of the strategies used to reduce plasma FFA levels. However, the effects of chronic inhibition of lipolysis on insulin-sensitivity and white adipose tissue (AT) inflammation have not been investigated.

**Methods:** After 12-16 weeks of high fat diet, mice were treated daily with BAY, a selective inhibitor of hormone sensitive lipase (HSL), or vehicle during seven days. Two hours post last dose, we investigated insulin sensitivity and AT inflammation.

**Results:** *In vivo* tests revealed an improvement of insulin sensitivity in BAY-treated mice *versus* control animals. That improvement cannot be related to a fat mass effect since both groups present the same weight and body composition at the end of the treatment. However, plasma FFA and glycerol concentrations are reduced after the treatment. Analysis of cell population in the stroma-vascular fraction (SVF) showed a rise in both M1- and M2-like macrophages in WAT of BAY-treated mice and adipocyte size heterogeneity.

**Conclusion:** Chronic pharmacological inhibition of lipolysis can improve periphery insulin sensitivity through modulation of plasma FFA levels. This decrease in FFA release is associated with a remodelling of AT involving distinct subtypes of macrophages.

**Keywords:** lipolysis, hormone-sensitive lipase, pharmacological inhibition, mouse, inflammation, macrophages

### Introduction

Fat cell lipolysis is the process by which fatty acids (FA) are released from adipocytes in which they are stored as triglycerides (TG) in the lipid droplet (LD). Complete TG breakdown involves successive enzyme reactions that lead to the formation of glycerol and FA. Adipose triglyceride lipase (ATGL) initiates TG hydrolysis and forms diglycerides (DG) that are in turn degraded by hormone-sensitive lipase (HSL). Monoglyceride lipase catalyzes the final step. Obesity is a metabolic storage disorder that is associated with lipase dysfunctions (1; 2). Clinical studies showed that obese subjects presented altered lipolytic capacities and reduction in expression and activity of HSL (3). However, even if lipolysis is impaired during obesity, the net FA efflux remains increased due to expanded fat mass. As a result, excessive plasma

FA causes several peripheral metabolic disorders such as insulin resistance. Indeed, besides ectopic storage, FA can alter insulin signalling pathways in liver and skeletal muscle *via* activation of different kinases (PKC, JNK, IKK $\beta$ ) (4). Obesity is also characterized by chronic low grade inflammation that is reflected by immune cells infiltration in adipose tissue (AT) and increased secretion of proinflammatory molecules. Alongside FA, cytokines are suspected to interfere with insulin signalling and deterioration of global insulin sensitivity (4). Adipocytes and macrophages can communicate together within a paracrine loop involving FA and adipocytokines as signalling molecules (5). FA can bind toll like receptors, especially TLR4 and TLR2, which result in activation of the NF $\kappa$ B pathway and in expression and secretion of proinflammatory cytokines by macrophages (6). These molecules can in turn influence adipocyte metabolism.

In this context, inhibition of lipolysis can represent an attractive approach to limit deleterious effects of excessive FA release. This strategy has already been used in the past and has proved an effective way to improve the metabolic profile in obese subjects. Indeed, nicotinic acid, one of the oldest normolipidemic drug, acts through inhibition lipolysis *via* the Gi-coupled receptor HM74A/GPR109A (7). The use of the drug has been impaired due to upper-body skin flushing. Moreover, data on insulin sensitivity are conflicting (8). As an alternative, several groups developed HSL inhibitors in the past decade (9-11). Although predominantly studied *in vitro*, some of them underwent *in vivo* tests. Lowe et al. described the inhibitory potential of a 5-(2H)-isoxazolonyl urea derivative named BAY (12). *In vivo*, BAY had an antilipolytic effect in rodents and in dogs (13). Acute BAY treatment in mouse treated with  $\beta_3$ -adrenergic agonist revealed a protective effect of lipolysis inhibition on expression of inflammatory markers (14; 15).

Here, we wanted to investigate the consequences of prolonged HSL inhibition on AT tissue metabolism and inflammation as well as on glucose homeostasis. Chronic BAY treatment of high fat diet-fed obese mice decreased lipolysis and improved insulin sensitivity. Moreover, it slightly increased AT infiltration of macrophages with inflammatory and remodelling phenotypes.

## Experimental procedures

### Animals

All animal experimental procedures were performed according to the INSERM and IFR150 animal core facility guidelines for the care and use of laboratory animals. Four to five-week-old B6D2/F1 male mice were fed a high fat diet for 12 weeks (45%kCal, D12451, Research Diets Inc.) and had free access to water. Four animals per cage were kept on an 07:00-19:00 h light cycle at a temperature of 21°C. During the feeding period, body weight was measured weekly. BAY was synthesized by Idealp Pharma (Villeurbanne, France). Mice were orally treated during 7 consecutive days at 08:00 AM. The BAY-treated group were given a single 70mg/kg dose in carboxymethylcellulose (CMC) 5%. Control animals received the vehicle 5% CMC. Food intake was measured daily in animal housed individually. Body mass composition was evaluated by quantitative nuclear magnetic resonance imaging at day 6 of the treatment before the final overnight fasting (EchoMRI-100TM, Echo Medical Systems). On day 7, after an overnight fast, mice were euthanized 2 hours post last dose. Blood was collected in EDTA-tubes and various tissues were removed, immediately weighed, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Epididymal fat samples were fixed in 1% Formalin (Sigma), embedded in paraffin and processed to hemalun eosin staining or prepared as cultured explants. Briefly, AT was cut in small pieces and plated in Krebs Ringer Buffer supplemented with 10 mM HEPES, 6 mM glucose and 0.5% BSA. The medium was changed 1, 24 and 28h after the initial plating. Media were collected after a 24h period starting after

the last wash. A protease inhibitor cocktail (Complete, Roche) was added before storage at -80°C. Cytokine measurements were normalized by explant weight. For adipocyte area determination, digital images of histological preparations were captured using light microscope and a camera. Morphometry was performed using Lucia IMAGE(version 4.81; Laboratory Imaging, Prague, Czech Republic). Adipocyte size was determined on histological preparation measuring area of at least 120 adipocytes.

### **Biochemical analyses**

Plasma insulin was determined by ELISA (Mercodia). Free fatty acid (FFA) concentrations were determined by an enzymatic colorimetric reaction (NEFA C, Wako). Glycerol concentrations were measured with the hydrazine buffer method or with a commercial kit (Sigma). Plasma TG and cholesterol concentrations were determined with COBA COBAS-MIRA + analyzer (ABX Diagnostics). Leptin and adiponectin were dosed with ELISA commercial kits (R&D Systems). IL6, IL10, MCP-1 and TNF $\alpha$  were measured with a Multiplex array (4-plex, Millipore). Plasma FA profile was established using gas chromatography.

### **Neutral lipid measurement in skeletal muscle**

A small piece of *Biceps femoris* was homogenized in 1ml 5mM EGTA water:Methanol (1:2) using Precellys tissue homogenizer. Lipids were extracted with a mixture Methanol/Chloroform/Water (2.5/2.5/1.7 volume) purified with SPE column dried and dissolved in ethyl acetate. The fraction was measured by gas chromatography.

### ***In vitro* lipase activity**

*In vitro* enzymatic activities were performed as described (16). Briefly, triolein or cholesterol oleate was emulsified with phospholipids by sonication. Fat-depleted BSA (Sigma) was used as a FA acceptor. Cytosolic fractions of AT homogenates were incubated for 30 min at 37°C with the different substrates. Hydrolysis was stopped, and radiolabelled oleic acid released was measured using a scintillation counter (Tri-Carb2100TR; Pakard).

### ***In vitro* lipolysis challenge**

AT was extracted, weighed and finely minced. Adipocytes were isolated by collagenase (0.5 mg/ml) digestion at 37°C for 10-20 min in a Krebs Ringer Buffer supplemented with 10 mM HEPES, 6 mM glucose and 3.5% BSA. Digested tissue was filtered through a nylon mesh and cells were collected. After filtration, adipocytes were rinsed, diluted and incubated with isoproterenol at a concentration from 10<sup>-7</sup> to 10<sup>-4</sup> M with or without 1mM BAY at 37°C under gentle shaking for 90 min. Lipolysis was stopped by cold for 30 min and then adipocyte infranatant was collected to measure FFA and glycerol concentration. Those concentrations were normalized by lipid quantitation measured gravimetrically after organic extraction.

### ***In vivo* lipolysis challenge**

6h-fasted mice received an oral charge of 25mg/kg BAY or vehicle 15 min before ip injection of isoproterenol (10mg/kg, Sigma) or NaCl. Fifteen minutes after the injection, the mice were anesthetized with isoflurane. Blood was sampled by retroorbital puncture and kept on ice until FFA and glycerol analysis.

### **Intraperitoneal insulin tolerance test**

An ip injection of 0.6U/kg insulin (Insuman Rapid, Sanofi Aventis) was given to 6h-fasted mice. Blood glucose levels were monitored from the tip of the tail with a glucose meter

(Accu-check, Actine, Roche) at -15, 0, 15, 30, 45, 60, 90 and 120 min after insulin injection. The area under the curve (AUC) was calculated for each mouse.

### **Oral glucose tolerance test**

An oral administration of 1.5mg/g  $\alpha$ -D Glucose (Serva Feinbiochemica) was given to overnight fasted mice. Blood glucose levels were monitored from the tip of the tail with a glucose meter (Accu-check, Actine, Roche) at -15, 0, 10, 20, 30, 40, 60 and 90 min after glucose administration. The area under the curve (AUC) was calculated for each mouse. Blood samples were taken ten minutes after oral charge of glucose and plasma insulin was measured with ultrasensitive Elisa kit (Merckodia)

### **Western blots**

Skeletal muscle and liver samples were lysed (Precellys 24, Ozyme, France) and loaded (30  $\mu$ g protein per lane) on a 4-12% SDS-PAGE gel (Biorad) and transferred to nitrocellulose membrane (ECM, GE healthcare, Bio-Science, Sweden). Membranes were blotted with anti-phospho-Ser473-Akt and anti-GAPDH (Ozyme). Membranes were then stripped and probed again with specific antibody for total Akt protein. Immunoreactive proteins were detected using the ECL plus (GE Healthcare, UK) and quantified by Image Quant TL software (GE healthcare, Bio-Science, Sweden).

### **Gene expression analysis**

AT was homogenized in Qiazol buffer (Qiagen) using Precellys tissue homogenizer. Total RNA was extracted using RNeasy kit (Qiagen). RNA concentration and purity were assessed spectrophotometrically with a NanoDrop (DigitalBio). After treatment with DNase I (Invitrogen) and reverse transcription of 1  $\mu$ g of total RNA with Superscript II (Invitrogen), real time quantitative PCR was performed with ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems). For each primer pair, a standard curve was obtained using serial dilutions of AT cDNA prior to mRNA quantitation. 18s rRNA and HPRT mRNA were used as controls to normalize gene expression.

### **Ex vivo oleate and glucose oxidation**

Pieces of *Soleus* muscle and liver were homogenized with a polytron homogenizer in a buffer containing 0.25M Sucrose, 1mM EDTA, 1 $\mu$ M Tris-HCl and 2mM ATP at pH7.4. 80  $\mu$ l of homogenized sample were incubated at 37°C for two hours with 0.2mM cold oleate, 1 $\mu$ Ci/ml  $^{14}$ C oleate, 0.5% BSA, 125mM Sucrose, 25mM Potassium phosphate monobasic, 200mM Potassium chloride, 2.5mM Magnesium chloride, 2.5mM L-Carnitine, 0.25mM Malic acid, 20mM Tris-HCl, 2.5mM DTT, 0.25mM NAD<sup>+</sup>, 4mM ATP and 0.125mM Coenzyme A. For glucose oxidation, oleate was replaced by 1  $\mu$ Ci/ml [U- $^{14}$ C]glucose and D-glucose. Following incubation, 40 $\mu$ l of 70% perchloric acid was added to trap CO<sub>2</sub> production for 1 additional hour at RT. 200 $\mu$ l of NaOH, containing trapped CO<sub>2</sub>, were counted using a scintillation counter (Tri-Carb2100TR; Pakard). An acidified portion was collected, placed at 4°C overnight, centrifuged at 15000g for 15 min at 4°C and the supernatant was counted. A sample of the incubation medium was used to quantify specific activity.

### **Isolation of the stoma-vascular fraction (SVF) from adipose tissue and flow cytometry analyses.**

The SVF cells were obtained by collagenase digestion as previously described (17). After digestion, the suspension was filtered with a 150 $\mu$ m filter and centrifuged (100g, 10 s) to collect the infranatant containing the SVF. The lower phase was centrifuged 400g, 10 min) and the pellet containing the SVF was incubated for 10 min in erythrocyte-lysis buffer



(155mM NH<sub>4</sub>Cl, 5.7mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 0.1mM EDTA), filtered through 40µm filters and centrifuged again (400g, 10 min). The pellet was then suspended in PBS containing 2mM EDTA and 0.5% bovine serum albumin. The total number of cells was counted using Trypan blue (Gibco, Courbevoie, France) and a Neubauer hemacytometer (Poly Labo, Paul Block & Cie, Strasbourg, France). The cell count was confirmed by DNA determination using fluorometric assay (Picogreen, Invitrogen, Cergy Pontoise, France). 100 000 cells of the SVF were incubated with FITC-conjugated antibodies (F4/80, CD4, Sca-1), PE-conjugated antibody (CD34, CD3), PerCP-conjugated antibody (CD45, NK1.1), PE-Cy7-conjugated antibody (CD11c, CD19), APC-conjugated antibody (CD31, CD8), APC-Cy7-conjugated antibody (CD11b, CD25) and respective isotype control. Analyses were performed using a FACSCanto flow cytometer and the BD FACS Diva software (BD Bioscience). The total number of each cell population present in the AT depot was calculated as a product of the percentage of each cell type determined by the flow cytometry analyses and the total number of SVF cells.

### Statistical analyses

Student's *t* test for non-paired values was used for group comparison. For adipocyte area analysis a repeated measurement ANOVA with a Greenhouse-Geisser correction was employed. Differences were considered significant for  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*), and  $p < 0.001$  (\*\*\*)).

### Results

#### *BAY inhibits HSL activity and decreases lipolysis.*

BAY is the 4-isopropyl-3-méthyl-2-((S)-3-méthyl-pipéridine-1-carbonyl)-2H-isoxazol-5-one. It is a potent, selective, non-reversible HSL inhibitor that has already been characterized *in vitro* by our group (3; 18). Total proteins of WT mouse AT were extracted and BAY inhibitory action was assessed *in vitro* during enzymatic assays. BAY completely abolished HSL hydrolase activity against cholesteryl esters (Fig.1A). It also decreased TG hydrolase activity by 60%, the remaining activity being attributable to ATGL (Fig. 1B). A range of 40-60% inhibition has been observed in other series of experiments (data not shown). When added to isolated adipocytes stimulated by isoproterenol, BAY reduced glycerol release by 50% (Fig. 1C). We also assessed BAY inhibitory potential *in vivo*. After an oral charge of 25mg/kg, animal received an intraperitoneal injection of saline or isoproterenol. BAY did not affect basal plasma levels of NEFA and glycerol. However upon  $\beta$ -adrenergic stimulation, BAY decreased NEFA (20%) and glycerol (50%) levels (Fig. 1D). Altogether, BAY inhibits HSL activity and shows antilipolytic effect at the cellular and organism level.

#### *Chronic inhibition of HSL improves insulin sensitivity*

Obese mice fed high fat diet for 12 weeks were treated orally with BAY or vehicle during 7 consecutive days. Food intake was not modified (Fig. 2A). Vehicle and BAY-treated mice presented similar body weight and body composition at the end of the treatment (Fig. 2B). Classical blood parameters were measured after an overnight fast (Table 1). BAY treatment significantly reduced plasma glucose (16%), insulin (64%), NEFA (24%) and glycerol (43%) levels. TG and cholesterol plasma levels were not affected by prolonged HSL inhibition.

Next, we investigated the consequences of HSL chronic inhibition on glucose homeostasis. Insulin tolerance test (ITT) revealed that BAY-treated mice were more insulin tolerant than control mice as attested the significantly decreased glycemic curve and AUC (Fig. 3A). BAY treatment did not affect glucose tolerance (Fig. 3B). In order to get further details on the origin of the improvement of insulin sensitivity in BAY-treated mice, we studied insulin-stimulated Akt phosphorylation in two major organs involved in glucose homeostasis, skeletal muscle and liver (Fig. 3C). We observed reduced insulin stimulated-phosphorylation of Akt in

*soleus* muscle of BAY-treated mice suggesting impaired insulin signalling in this organ consecutive to HSL prolonged inhibition. However, Akt phosphorylation was increased in liver of BAY-treated mice implying that liver is more insulin-sensitive in these mice. As skeletal muscle insulin resistance can be associated with neutral lipid, and particularly DG accumulation, we measured lipids in skeletal muscle. TG, DG and cholesterol levels were similar in both vehicle and BAY-treated groups (Fig. 4). Because insulin sensitivity is often reflected by improvement of oxidative capacity, we measured oleate and glucose oxidation in homogenates of *soleus* muscle and liver. Oxidation of oleate tends to be slightly increased in *soleus* muscle and unchanged in liver. Concerning glucose, oxidation rates were increased in both tissues but with significance nearly reached only in liver ( $14 \pm 2.6$  nmol/g tissue/h in BAY-treated mice vs  $8.7 \pm 1.3$  nmol/g tissue/h in control mice,  $p=0.073$ ). mRNA expression of genes involved in oxidative process were measured in both tissues and showed a decrease in PDK4 expression in *soleus* muscle whereas PPAR $\alpha$ , PGC1 $\alpha$  and CPT1b were unchanged in BAY-treated mice (Fig. 5). Liver of these mice presented a reduced expression of PDK4 and CPT1b.

#### *HSL chronic inhibition impacts WAT morphology and inflammation*

Besides FA, chronic low grade inflammation associated with obesity is another well established factor favouring deterioration of insulin sensitivity. We wanted to know if the improvement of insulin sensitivity observed in our BAY-treated mice could be associated with modulation of AT inflammation. We first observed morphology of AT and measured mean adipocyte areas on histological preparations. BAY treatment affected adipocyte size by significantly depleting standard hypertrophied adipocytes while increasing the frequency of smaller and very large adipocytes (Fig. 6). HSL prolonged inhibition lead to adipocyte heterogeneity suggesting AT remodelling. We next measured the mRNA expression of macrophage surface markers and cytokines in AT. BAY-treated animals presented an increase of all surface markers (F4/80, CD11b, CD11c, MAC-2 and CD68) as well as chemokines (MCP-1, MIP1 $\alpha$ ) and proinflammatory cytokine (IL6) (Fig. 7). Gene expression of the antiinflammatory cytokine, IL10, was also increased. TNF $\alpha$  mRNA level remained unchanged. The mRNA levels of leptin and adiponectin were reduced while. In order to quantify non-adipose cell populations in AT, we isolated the SVF and performed flow cytometry measurements. AT classically presents two populations of macrophages, the recruited M1 and the resident M2 macrophages. The number of CD45<sup>+</sup>/F480<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> recruited M1 macrophages tended to increase the difference becoming significant per gram of tissue (Fig. 8A). The total number of CD45<sup>+</sup>/F480<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>-</sup> resident M2 macrophages was significantly increased in BAY-treated mice. Figure 8B shows that the different populations of lymphocytes were not affected by the BAY treatment. The total number of endothelial cells (CD45<sup>-</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup>) and progenitors cells (CD45<sup>-</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup>/Sca1<sup>+</sup>) was not modified by HSL chronic inhibition (Fig. 8C).

#### *HSL chronic treatment influences AT secretions.*

In order to complete the phenotyping of AT, we measured adipokines and cytokines produced by AT explants in culture media. The levels of proinflammatory (IL6, TNF $\alpha$ ) and antiinflammatory (IL10) cytokines and adipokines (leptin and adiponectin) did not differ between vehicle and BAY-treated mice (Table 1). At the plasma level, BAY treated-mice presented a decrease of IL6 concentrations while other adipocytokines were not modified. As lipids can be modulators of inflammation, we determined the profile of plasma FA. The level of palmitoleate (C16:1n7), a recently proposed factor improving insulin sensitivity, was equivalent in both groups (Fig. 9). Palmitate (C16:0), stearate (C18:0), linolenate (C18:3n3)

and arachidonate (C20:4n6) were not affected by BAY treatment. However, BAY-treated mice presented decreased concentration of oleate (C18:1n9) and linoleate (C18:2n6) levels in comparison with control mice.

## Discussion

Inhibition of FA release, i.e. inhibition of lipolysis, is a strategy that has been employed since decade in humans (19; 20) and represents today effective hypolipidemic treatment (21). HSL inhibitors have been developed over the past decade and have shown to limit FA release in rodents and dog (13). If acute treatments with these molecules have been studied (14; 15), there is no report on the consequences of prolonged administration of HSL inhibitors *in vivo*. We decided to investigate the metabolic consequences consecutive to a long-term HSL inhibition with BAY in a mouse model of diet-induced obesity.

We first confirmed the inhibitory action BAY *in vitro* and showed a marked reduced HSL activity in AT and significant reduction of lipolysis on isolated adipocytes. *In vivo*, BAY inhibits glycerol and FA release after isoproterenol stimulation. Prolonged treatment with BAY did not affect food intake. Energy expenditure was not evaluated in the obese mice but it was not modified in BAY-treated mice fed a regular chow diet (data not shown). As a result, body weight or body composition did not differ between BAY-treated and control mice at the end of the treatment. Increased basal lipolysis has been associated with the decrease of fat mass and body weight in several animal models (deleted mice for the gene of hsl, perilipin or fat specific protein of 27kDa). Since BAY did not affect the basal release of FA and energy balance, the absence of change in body weight is not surprising.

We then showed that chronic BAY treatment significantly decreased plasma levels of FA and glycerol. Metabolic investigations first demonstrated that HSL chronic inhibition improved insulin tolerance measured by ITT. This has also been observed in another model of lipolysis inhibition studied in our group, the mice haploinsufficient for the HSL gene (manuscript in preparation). Since the measurement was realized 2 hours post last dose the chronic and acute effects of the treatment could overlap. However, ITT realized after acute BAY administration did not reveal differences in insulin sensitivity among the BAY-treated group compared to the control group (data not shown). On the other hand, HSL chronic inhibition did not reverse obesity induced-glucose intolerance. Both groups of mice presented identical rise of glycaemia after the oral charge of glucose suggesting that BAY did not affect pancreatic insulin secretion. We also observed a decrease of basal fasted glycaemia in some groups of BAY-treated mice that is in favour of insulin sensitivity improvement together with the decreased fasting insulinaemia. In order to get further details in the origin of insulin sensitivity improvement in BAY-treated mice, we investigated the insulin signalling pathway functionality. Western blots revealed respectively increased and reduced phosphorylation of Akt in liver and skeletal muscles consecutively to insulin stimulation. Furthermore, maximal oxidation capacities towards glucose tended to be increased in BAY-treated mice. The results suggested that global improvement of insulin sensitivity could be essentially triggered by a hepatic phenotype. The more pronounced decrease of glycaemia observed in BAY-treated mice during ITT can also be the consequence of a better inhibition of hepatic glucose production by insulin. Neutral lipids were dosed in skeletal muscle as another indicator of insulin resistance/sensitivity. We did not observe any modification in the concentrations of TG, DG or cholesterol in BAY-treated mice, suggesting that modulation of DG is not the main determinant of the decrease of insulin-stimulated Akt phosphorylation. However we do not have any data about ceramides levels in muscles. As BAY treatment also inhibits muscle HSL, these results inform us about the fact that HSL inhibition alone (without modification of ATGL activity) is not sufficient to provoke DG accumulation in skeletal muscle. Adiponectin

is a protective adipokine that has largely been associated with insulin sensitivity (22; 23). However, it is unlikely that plasma adiponectin could be implicated in the global improvement of insulin sensitivity in BAY-treated mice since plasma level of this adipokine is not modified compared to those of control mice.

We then asked whether AT inflammation could play part in the improvement of insulin sensitivity observed in BAY-treated mice. Indeed, it is now well described that excess fat mass developed during obesity is a source of adipocytokines that can alter the insulin pathway in peripheral organs (24; 25). Furthermore, FA released by adipocytes can activate immune cell within the AT through the TLR4 pathway (6; 26). A vicious cycle can take place between both cell types involving FA, cytokines (5) or other macrophage-derived molecules (27), that lead on the one hand to disturbance of adipocyte metabolism and increased lipolysis and on the other hand to macrophage activation. Facing this system, we hypothesized that reducing FA release through HSL prolonged inhibition could impact the adipose paracrine inflammatory loop and at a larger scale could influence insulin sensitivity. Flow cytometry measurements of the SVF of AT indicated surprisingly an increase of two populations of macrophages in AT of BAY-treated mice that can be classically recognized as “recruited M1 macrophages” (CD45<sup>+</sup>/F480<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup>) and “resident M2 macrophages” (CD45<sup>+</sup>/F480<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>-</sup>). The increase of M1 macrophages is associated with the rise of mRNA expression of surface markers such as F4/80, CD68, CD11c whereas the increase of IL10 mRNA expression and explant secretion fit with the rise in M2 macrophages. Mottillo et al. showed contradictory results in BAY acute treatment, since they did not observe any change in the expression of MCP-1, IL6 and PAI-1 in BAY treated animal without  $\beta$ -3 adrenergic stimulation (14; 15). This discrepancy between acute and chronic treatments could result from different adaptations due to the prolonged effect of BAY. The increase of CD45<sup>+</sup>/F480<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>-</sup> cells together with the heterogeneity in adipocyte size suggest that BAY treatment may cause adipose tissue remodelling. Cinti and colleagues described macrophages specifically positioned around dead adipocytes and forming structures called “crow-like structures” (28). Whether phenotypically different macrophages could localize depending on adipocyte size and viability as suggested by Wentworth et al. (29) is still questioned in our model. BAY treatment lead to a proportional increase in both populations of AT macrophages compared to control mice as attested by the identical M1/M2 ratio. Fujisaka et al. showed a correlation between the increase of the M1/M2 ratio and obesity-associated insulin resistance (30) however it should not be the case in our study since BAY-treated mice were more insulin sensitive despite identical M1/M2 ratio compared to control mice. The accepted M1/M2 dichotomy seems to be re-evaluated today. Indeed, recent works describes subpopulations inside the M2 macrophages on the basis of different markers such as CD206 (29; 30), macrophage galactose-typeC-type lectin 1 (MGL1) (31) or mannose receptor (MR) (32). It is likely that some M2 macrophages present intermediary phenotypes also linked to the insulinic status. It is also possible that recruited macrophages present some characteristics of the M2 phenotype (31; 32). These intermediary M2 macrophages could be implicated in AT remodelling (31). The immunomarking made in our experiment was not able to discriminate this new described population of macrophages. One could imagine that BAY-treated mice may present modification of “intermediary macrophages” that can be related to improvement of insulin sensitivity. Since the ablation of CD11c<sup>+</sup> cells can normalize insulin sensitivity in obese mice (33), these cells could be considered as major factors in insulin resistance. However it is unlikely that they could not play alone the same role in our model since the increase of CD11c<sup>+</sup> cells is observed in the same time with the improvement of insulin sensitivity in BAY-treated mice.

In a second step we performed explants of AT in order to evaluate if AT secretions could be modified by the treatment with BAY. We did not observe any change in IL6, MCP-1 or

TNF $\alpha$  secretion whereas the secretion of IL10 was slightly increased. AT secretion were not correlated with plasma measures as we observed a rise in IL6 concentration while non modification of IL10 levels. These observations suggest a role for subcutaneous AT in the contribution of plasma cytokine levels. Besides cytokines AT tissue through the adipose fraction delivers a panel of FA. We made a plasma profile of free FA; we were particularly interested in the variation of palmitoleate that has been described as an insulin-sensitizer FA (34). However we did not observe any change in the plasma level of palmitoleate in BAY-treated mice suggesting that this FA is not involved in the global improvement of insulin sensitivity. BAY treatment led to the decrease of plasma of two unsaturated FA, oleate and linoleate. Saturated FA can mediate inflammation and insulin resistance in AT (35) whereas unsaturated FA and particularly oleate can reverse the negative effects of inflammatory cytokines (36). Our observation is then unlikely related to the improvement of insulin sensitivity in BAY-treated mice. Together, these results showed that HSL prolonged inhibition lead to the increase in the same time of pro- and anti-inflammatory macrophages suggesting with adipocyte size heterogeneity a marked remodelling of AT. Our model finds its originality in the fact that the improvement of insulin sensitivity can be associated with a rise of M1 macrophages. Other physiological studies in mouse and human present such dissociation between insulin sensitivity and macrophage infiltration in AT (37-39).

Since murine macrophages are supposed to express HSL (40), BAY treatment theoretically have the ability to inhibit macrophage lipolysis. The consequences of such metabolic disturbance in the macrophage are still unknown. In human, CD11c<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup> macrophages present high expression of FA metabolism enzymes and decreased HSL expression (29) suggesting them prone to FA storage. It remains to be determined whether HSL inhibition leads to FA storage into the macrophages and modulate their phenotype. However, we can not speculate about the consequences of the inhibition of the other enzymatic activities of HSL in the macrophage. In the field of atherosclerosis, many works focused on the role of HSL as cholesteryl ester hydrolase. Several model of macrophage HSL-specific overexpression have been studied and showed amelioration of atherosclerosis depending on the effectiveness of associated cholesterol efflux mechanisms (41-45). However, none of these works studied the consequences of the depletion of the lipase in macrophages. Our interpretation of the global phenotype of AT inflammation may be then confounded by the direct effect of BAY on macrophages.

AT tissue inflammation associated with obesity also implicates other cells than macrophages. Indeed, lymphocytes received a particular attention during the past years. T-lymphocyte infiltration seems to be a primary event in the genesis of AT inflammation that precedes macrophages infiltration (46-48) for review see (49)). Flow cytometry analyses did not showed any differences in the populations of lymphocytes in AT of BAY-treated mice compared to control mice. One could imagine that lymphocytes infiltrated the AT before BAY treatment; the later being unable to modulate this population of cells at 12 weeks of HFD. Some type of lymphocytes (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>) appear later in the kinetic of AT inflammation and could be involved in the resolution of AT remodelling (50). However, HSL prolonged inhibition did not seem to impact CD8<sup>+</sup> lymphocytes despite AT remodelling suggested by M2 macrophages. Manipulations of MIP1 $\alpha$ -deleted mice showed that this cytokine is necessary for the recruitment lymphocytes (51). Nevertheless, the increase in MIP1 $\alpha$  mRNA expression did not seem to be correlated with lymphocyte recruitment in BAY-treated mice. Furthermore, the importance of lymphocytes in AT tissue remodelling could be served by the fact that regulatory lymphocytes (CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>) have the ability to polarize macrophages to the M2 phenotype through arginase, IL10 and TGF $\beta$  pathways (52). However, this observation has not been validated in our model *in vivo* since we observed an increase in M2 macrophages without modification in CD25<sup>+</sup> lymphocytes in BAY-treated mice.

AT SVF also includes endothelial and progenitors cells. BAY-treated mice did not present any changes in endothelial cells compared to control mice while they showed a tendency in more progenitors cells when results expressed per gram of tissue. Kim and Hematti demonstrated *in vitro* that human mesenchymal stem cells could alternatively activate macrophages (53). If such macrophage education could be triggered by murine progenitors cells is unknown.

To conclude, this work provides the evidence that the improvement of insulin sensitivity in BAY-treated mice is likely due to FA more than changes in AT inflammation status. The major role of FA *versus* AT inflammation has also been observed in another model of alteration of lipolytic capacity developed in our laboratory (manuscript in preparation). This FA-centred hypothesis (54) offers a strategic position for lipases and reinforces the interest in antilipolytic approaches to deal with obesity-associated insulin resistance.

### Acknowledgements

We especially thank Katie Louche for Western blots realization and Virginie Bourlier and Coralie Sengenés for helpful discussions. We are grateful for technical work of the Histomorphological platform, ANEXPLO and Animal facility core of IFR150.

### References

1. Large V, Reynisdottir S, Langin D, Fredby K, Klannemark M, Holm C, Arner P: Decreased expression and function of adipocyte hormone-sensitive lipase in subcutaneous fat cells of obese subjects. *J Lipid Res* 40:2059-2066, 1999
2. Jocken JW, Langin D, Smit E, Saris WH, Valle C, Hul GB, Holm C, Arner P, Blaak EE: Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase protein expression is decreased in the obese insulin-resistant state. *J Clin Endocrinol Metab* 92:2292-2299, 2007
3. Langin D, Dicker A, Tavernier G, Hoffstedt J, Mairal A, Ryden M, Arner E, Sicard A, Jenkins CM, Viguerie N, van Harmelen V, Gross RW, Holm C, Arner P: Adipocyte lipases and defect of lipolysis in human obesity. *Diabetes* 54:3190-3197, 2005
4. Qatanani M, Lazar MA: Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes Dev* 21:1443-1455, 2007
5. Suganami T, Nishida J, Ogawa Y: A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:2062-2068, 2005
6. Suganami T, Tanimoto-Koyama K, Nishida J, Itoh M, Yuan X, Mizuarai S, Kotani H, Yamaoka S, Miyake K, Aoe S, Kamei Y, Ogawa Y: Role of the Toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:84-91, 2007
7. Lafontan M, Langin D: Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog Lipid Res* 48:275-297, 2009
8. Karpe F, Frayn KN: The nicotinic acid receptor--a new mechanism for an old drug. *Lancet* 363:1892-1894, 2004
9. Wang M, Fotsch C: Small-molecule compounds that modulate lipolysis in adipose tissue: targeting strategies and molecular classes. *Chem Biol* 13:1019-1027, 2006
10. Ben Ali Y, Chahinian H, Petry S, Muller G, Lebrun R, Verger R, Carriere F, Mandrich L, Rossi M, Manco G, Sarda L, Abousalham A: Use of an inhibitor to identify members of the hormone-sensitive lipase family. *Biochemistry* 45:14183-14191, 2006
11. Ebdrup S, Refsgaard HH, Fledelius C, Jacobsen P: Synthesis and structure-activity relationship for a novel class of potent and selective carbamate-based inhibitors of hormone selective lipase with acute *in vivo* antilipolytic effects. *J Med Chem* 50:5449-5456, 2007

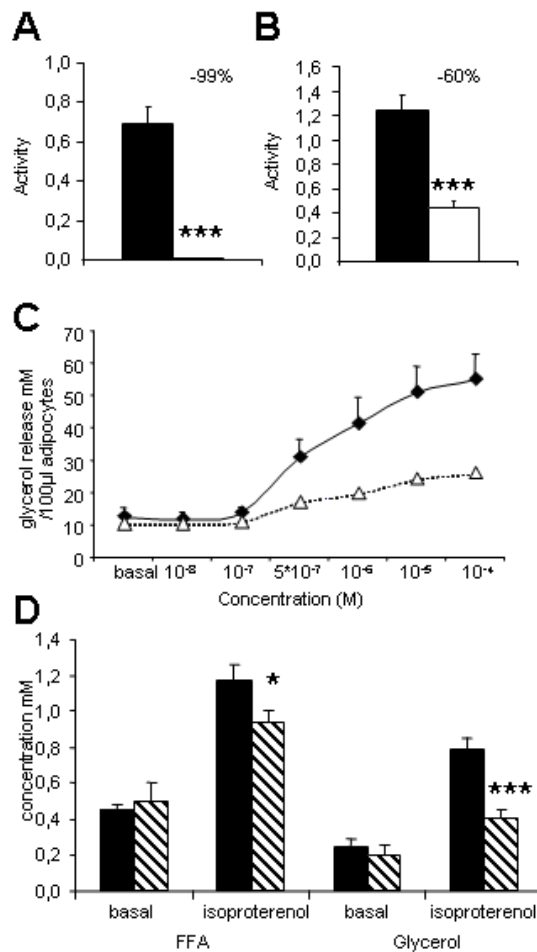
12. Lowe DB, Magnuson S, Qi N, Campbell AM, Cook J, Hong Z, Wang M, Rodriguez M, Achebe F, Kluender H, Wong WC, Bullock WH, Salhanick AI, Witman-Jones T, Bowling ME, Keiper C, Clairmont KB: In vitro SAR of (5-(2H)-isoxazolonyl) ureas, potent inhibitors of hormone-sensitive lipase. *Bioorg Med Chem Lett* 14:3155-3159, 2004
13. Claus TH, Lowe DB, Liang Y, Salhanick AI, Lubeski CK, Yang L, Lemoine L, Zhu J, Clairmont KB: Specific inhibition of hormone-sensitive lipase improves lipid profile while reducing plasma glucose. *J Pharmacol Exp Ther* 315:1396-1402, 2005
14. Mottillo EP, Shen XJ, Granneman JG: beta3-adrenergic receptor induction of adipocyte inflammation requires lipolytic activation of stress kinases p38 and JNK. *Biochim Biophys Acta* 1801:1048-1055, 2010
15. Mottillo EP, Shen XJ, Granneman JG: Role of hormone-sensitive lipase in beta-adrenergic remodeling of white adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293:E1188-1197, 2007
16. Bezaire V, Mairal A, Ribet C, Lefort C, Grousse A, Jocken J, Laurencikiene J, Anesia R, Rodriguez AM, Ryden M, Stenson BM, Dani C, Ailhaud G, Arner P, Langin D: Contribution of adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase to lipolysis in hMADS adipocytes. *J Biol Chem* 284:18282-18291, 2009
17. Curat CA, Miranville A, Sengenès C, Diehl M, Tonus C, Busse R, Bouloumie A: From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes* 53:1285-1292, 2004
18. Mairal A, Langin D, Arner P, Hoffstedt J: Human adipose triglyceride lipase (PNPLA2) is not regulated by obesity and exhibits low in vitro triglyceride hydrolase activity. *Diabetologia* 49:1629-1636, 2006
19. Musatti L, Maggi E, Moro E, Valzelli G, Tamassia V: Bioavailability and pharmacokinetics in man of acipimox, a new antilipolytic and hypolipemic agent. *J Int Med Res* 9:381-386, 1981
20. Sirtori CR, Gianfranceschi G, Sirtori M, Bernini F, Descovich G, Montaguti U, Fucella LM, Musatti L: Reduced triglyceridemia and increased high density lipoprotein cholesterol levels after treatment with acipimox, a new inhibitor of lipolysis. *Atherosclerosis* 38:267-271, 1981
21. Bays H, Stein EA: Pharmacotherapy for dyslipidaemia--current therapies and future agents. *Expert Opin Pharmacother* 4:1901-1938, 2003
22. Shetty S, Kusminski CM, Scherer PE: Adiponectin in health and disease: evaluation of adiponectin-targeted drug development strategies. *Trends Pharmacol Sci* 30:234-239, 2009
23. Ziemke F, Mantzoros CS: Adiponectin in insulin resistance: lessons from translational research. *Am J Clin Nutr* 91:258S-261S, 2010
24. Gutierrez DA, Puglisi MJ, Hasty AH: Impact of increased adipose tissue mass on inflammation, insulin resistance, and dyslipidemia. *Curr Diab Rep* 9:26-32, 2009
25. Shoelson SE, Herrero L, Naaz A: Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology* 132:2169-2180, 2007
26. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS: TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 116:3015-3025, 2006
27. Kurokawa J, Arai S, Nakashima K, Nagano H, Nishijima A, Miyata K, Ose R, Mori M, Kubota N, Kadowaki T, Oike Y, Koga H, Febbraio M, Iwanaga T, Miyazaki T: Macrophage-derived AIM is endocytosed into adipocytes and decreases lipid droplets via inhibition of fatty acid synthase activity. *Cell Metab* 11:479-492, 2010
28. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, Wang S, Fortier M, Greenberg AS, Obin MS: Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res* 46:2347-2355, 2005

29. Wentworth JM, Naselli G, Brown WA, Doyle L, Phipson B, Smyth GK, Wabitsch M, O'Brien PE, Harrison LC: Pro-inflammatory CD11c+CD206+ adipose tissue macrophages are associated with insulin resistance in human obesity. *Diabetes* 59:1648-1656, 2010
30. Fujisaka S, Usui I, Bukhari A, Ikutani M, Oya T, Kanatani Y, Tsuneyama K, Nagai Y, Takatsu K, Urakaze M, Kobayashi M, Tobe K: Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice. *Diabetes* 58:2574-2582, 2009
31. Shaul ME, Bennett G, Strissel KJ, Greenberg AS, Obin MS: Dynamic, M2-like remodeling phenotypes of CD11c+ adipose tissue macrophages during high-fat diet--induced obesity in mice. *Diabetes* 59:1171-1181, 2010
32. Zeyda M, Gollinger K, Kriehuber E, Kiefer FW, Neuhofer A, Stulnig TM: Newly identified adipose tissue macrophage populations in obesity with distinct chemokine and chemokine receptor expression. *Int J Obes (Lond)*, 2010
33. Patsouris D, Li PP, Thapar D, Chapman J, Olefsky JM, Neels JG: Ablation of CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin resistant animals. *Cell Metab* 8:301-309, 2008
34. Cao H, Gerhold K, Mayers JR, Wiest MM, Watkins SM, Hotamisligil GS: Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. *Cell* 134:933-944, 2008
35. Kennedy A, Martinez K, Chuang CC, LaPoint K, McIntosh M: Saturated fatty acid-mediated inflammation and insulin resistance in adipose tissue: mechanisms of action and implications. *J Nutr* 139:1-4, 2009
36. Vassiliou EK, Gonzalez A, Garcia C, Tadros JH, Chakraborty G, Toney JH: Oleic acid and peanut oil high in oleic acid reverse the inhibitory effect of insulin production of the inflammatory cytokine TNF-alpha both in vitro and in vivo systems. *Lipids Health Dis* 8:25, 2009
37. Riant E, Waget A, Cogo H, Arnal JF, Burcelin R, Gourdy P: Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice. *Endocrinology* 150:2109-2117, 2009
38. Tam CS, Viardot A, Clement K, Tordjman J, Tonks K, Greenfield JR, Campbell LV, Samocha-Bonet D, Heilbronn LK: Short-term overfeeding may induce peripheral insulin resistance without altering subcutaneous adipose tissue macrophages in humans. *Diabetes*, 2010
39. Viardot A, Lord RV, Samaras K: The effects of weight loss and gastric banding on the innate and adaptive immune system in type 2 diabetes and prediabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 95:2845-2850, 2010
40. Khoo JC, Reue K, Steinberg D, Schotz MC: Expression of hormone-sensitive lipase mRNA in macrophages. *J Lipid Res* 34:1969-1974, 1993
41. Escary JL, Choy HA, Reue K, Schotz MC: Hormone-sensitive lipase overexpression increases cholesteryl ester hydrolysis in macrophage foam cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:991-998, 1998
42. Escary JL, Choy HA, Reue K, Wang XP, Castellani LW, Glass CK, Lusis AJ, Schotz MC: Paradoxical effect on atherosclerosis of hormone-sensitive lipase overexpression in macrophages. *J Lipid Res* 40:397-404, 1999
43. Okazaki H, Osuga J, Tsukamoto K, Isoo N, Kitamine T, Tamura Y, Tomita S, Sekiya M, Yahagi N, Iizuka Y, Ohashi K, Harada K, Gotoda T, Shimano H, Kimura S, Nagai R, Yamada N, Ishibashi S: Elimination of cholesterol ester from macrophage foam cells by adenovirus-mediated gene transfer of hormone-sensitive lipase. *J Biol Chem* 277:31893-31899, 2002



44. Choy HA, Wang XP, Schotz MC: Reduced atherosclerosis in hormone-sensitive lipase transgenic mice overexpressing cholesterol acceptors. *Biochim Biophys Acta* 1634:76-85, 2003
45. Tazoe F, Yagyu H, Okazaki H, Igarashi M, Eto K, Nagashima S, Inaba T, Shimano H, Osuga J, Ishibashi S: Induction of ABCA1 by overexpression of hormone-sensitive lipase in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 376:111-115, 2008
46. Kintscher U, Hartge M, Hess K, Foryst-Ludwig A, Clemenz M, Wabitsch M, Fischer-Posovszky P, Barth TF, Dragun D, Skurk T, Hauner H, Bluher M, Unger T, Wolf AM, Knippschild U, Hombach V, Marx N: T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:1304-1310, 2008
47. Duffaut C, Zakaroff-Girard A, Bourlier V, Decaunes P, Maumus M, Chiotasso P, Sengenès C, Lafontan M, Galitzky J, Bouloumie A: Interplay between human adipocytes and T lymphocytes in obesity: CCL20 as an adipochemokine and T lymphocytes as lipogenic modulators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29:1608-1614, 2009
48. Strissel KJ, Stancheva Z, Miyoshi H, Perfield JW, 2nd, DeFuria J, Jick Z, Greenberg AS, Obin MS: Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes* 56:2910-2918, 2007
49. Sell H, Eckel J: Adipose tissue inflammation: novel insight into the role of macrophages and lymphocytes. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 13:366-370, 2010
50. Strissel KJ, Defuria J, Shaul ME, Bennett G, Greenberg AS, Obin MS: T-Cell Recruitment and Th1 Polarization in Adipose Tissue During Diet-Induced Obesity in C57BL/6 Mice. *Obesity (Silver Spring)*, 2010
51. Surmi BK, Webb CD, Ristau AC, Hasty AH: Absence of Macrophage Inflammatory Protein-1{alpha} Does Not Impact Macrophage Accumulation in Adipose Tissue of Diet Induced Obese Mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010
52. Liu G, Ma H, Qiu L, Li L, Cao Y, Ma J, Zhao Y: Phenotypic and functional switch of macrophages induced by regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in mice. *Immunol Cell Biol*, 2010
53. Kim J, Hematti P: Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages. *Exp Hematol* 37:1445-1453, 2009
54. Samuel VT, Petersen KF, Shulman GI: Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *Lancet* 375:2267-2277, 2010

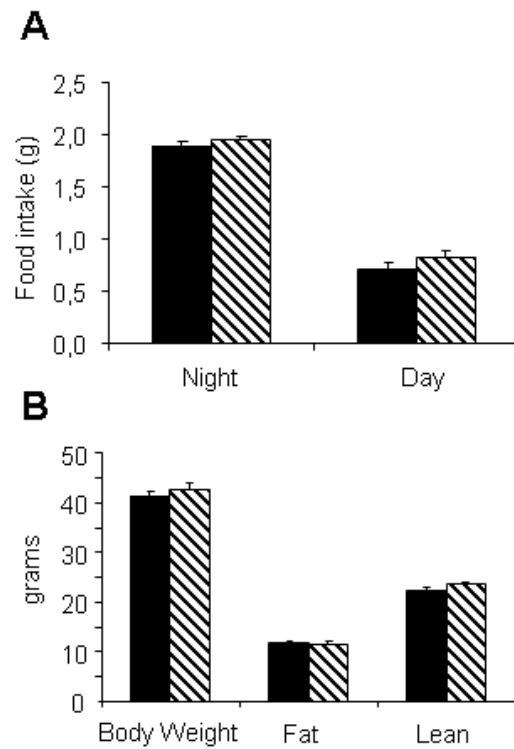
FIGURE 1



**Figure 1. BAY validation *in vitro* and *in vivo***

*In vitro* hydrolytic activities against a cholesterol ester (A) and a triglyceride (B) in the absence or the presence of 1 $\mu$ M BAY were determined in total proteins of adipose tissue homogenates. (C) *In vitro* lipolysis in adipocytes isolated from adipose tissue; glycerol release was measured from adipocytes either unstimulated or incubated with isoproterenol in the presence or absence of 1 $\mu$ M BAY. (D) *In vivo* lipolysis after 7 h fasting; animal received an oral dose of 25mg/kg BAY 15 min prior saline or isoproterenol (10mg/kg) ip injection. Plasma NEFA and glycerol levels were measured 15 min after saline and isoproterenol ip injection, as described in Materials and Methods. Values are means  $\pm$  SEM. Mice treated with vehicle (black bars) n= 4-8 and mice treated with BAY (hatched bars) n=4-8. \*p<0.05, \*\*\* p<0.001 for the indicated effects using Student's t test.

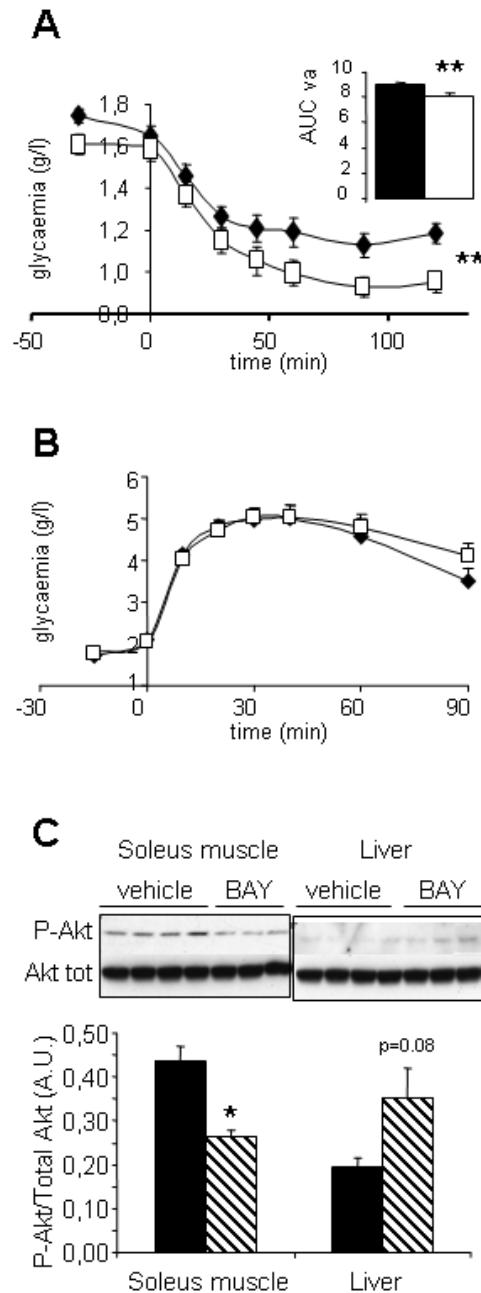
FIGURE 2



**Figure 2. Food intake and body composition**

(A) Food intake was assessed on individually housed mice. (B) Body weight at the end of BAY chronic treatment; fat and lean mass were measured by EcoMRI at D6 of the treatment before overnight fasting. (C) Values are means  $\pm$  SEM. Mice treated with vehicle (black bars) n= 10 and mice treated with BAY (hatched bars) n=10.

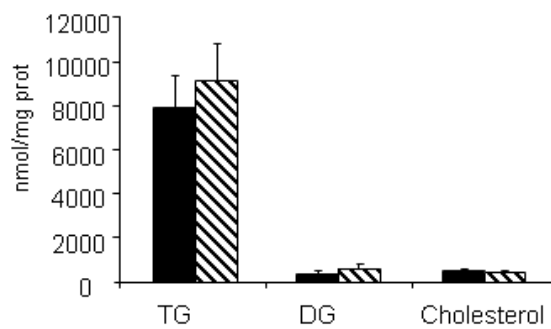
FIGURE 3



**Figure 3. Insulin and glucose tolerance in vehicle and BAY-treated mice.**

(A) Intraperitoneal insulin tolerance test (0.6U/kg) assessed in twelve week high fat fed and vehicle or BAY-treated mice fasted for 6 hours. Right side, area-under-curve analysis (arbitrary units). Mice treated with vehicle (black diamond) n= 20 and mice treated with BAY (white square) n=20. (B) Oral glucose tolerance test (1.5mg/g) assessed in twelve week high fat diet-fed and vehicle or BAY-treated mice fasted overnight. Mice treated with vehicle (black diamond) n= 6 and mice treated with BAY (white square) n=6. (C) Akt phosphorylation in homogenates of *soleus* muscle (left panel) and liver (right panel) of vehicle or BAY-treated mice injected with insulin (1U/kg). Mice treated with vehicle (black bars) n= 4 and mice treated with BAY (hatched bars) n=3. Values are means  $\pm$  SEM. \*p<0.05, \*\*p<0.01 for the indicated effects using Student's t test.

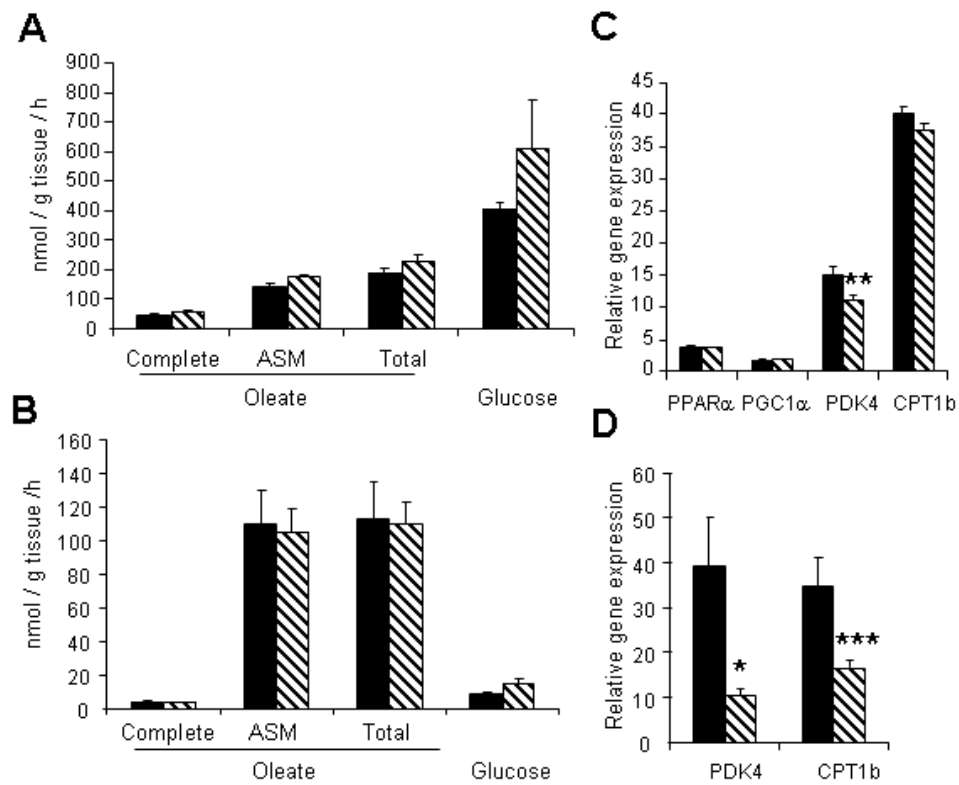
FIGURE 4



**Figure 4. Neutral lipids in skeletal muscle.**

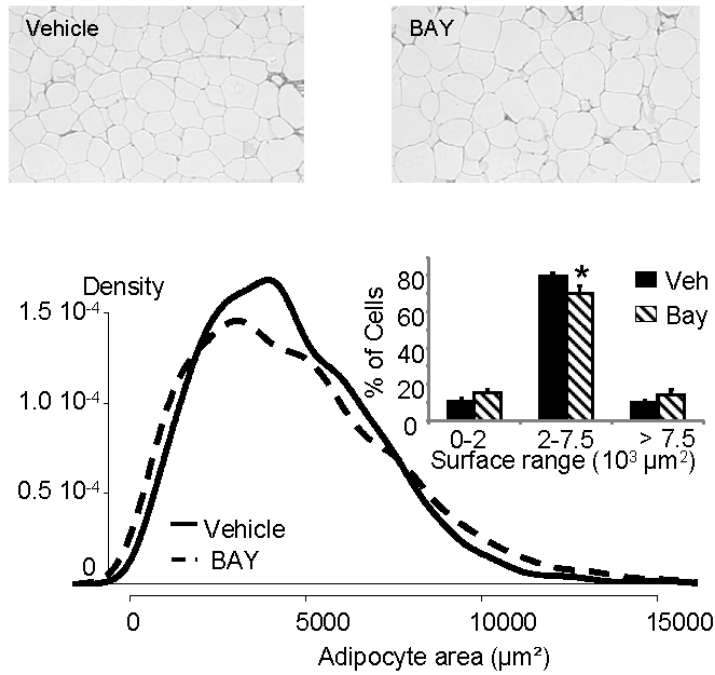
Neutral lipids were determined in *Biceps Femoris*. Values are means  $\pm$  SEM. Mice treated with vehicle (black bars) n= 10 and mice treated with BAY (hatched bars) n=10. TG, triglyceride; DG, diglyceride.

FIGURE 5



**Figure 5. Skeletal muscle and liver oxidative capacities.**

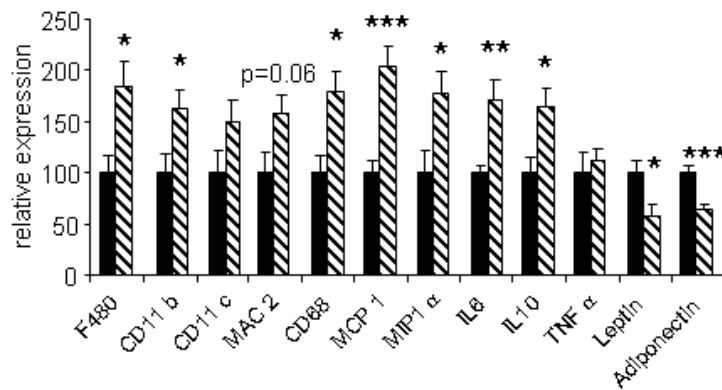
Oleate and glucose oxidation assessed on *soleus* muscle (A) and liver (B) homogenates. mRNA expression of oxidative genes in *soleus* muscle (C) and liver (D). Values are means  $\pm$  SEM. Mice treated with vehicle (black bars)  $n=7$  and mice treated with BAY (hatched bars)  $n=9$ . \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$  for the indicated effects using Student's *t* test.



**Figure 6. Adipocyte size and morphology.**

An average of 120 adipocytes was measured on histological preparations. Results are expressed as density of cell surface. Values are means  $\pm$  SEM. Mice treated with vehicle (filled curve, black bars) n=10 and mice treated with BAY (dotted curve, hatched bars) n=10. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\* p<0.001 for the indicated effects using Student's *t* test.

FIGURE 7

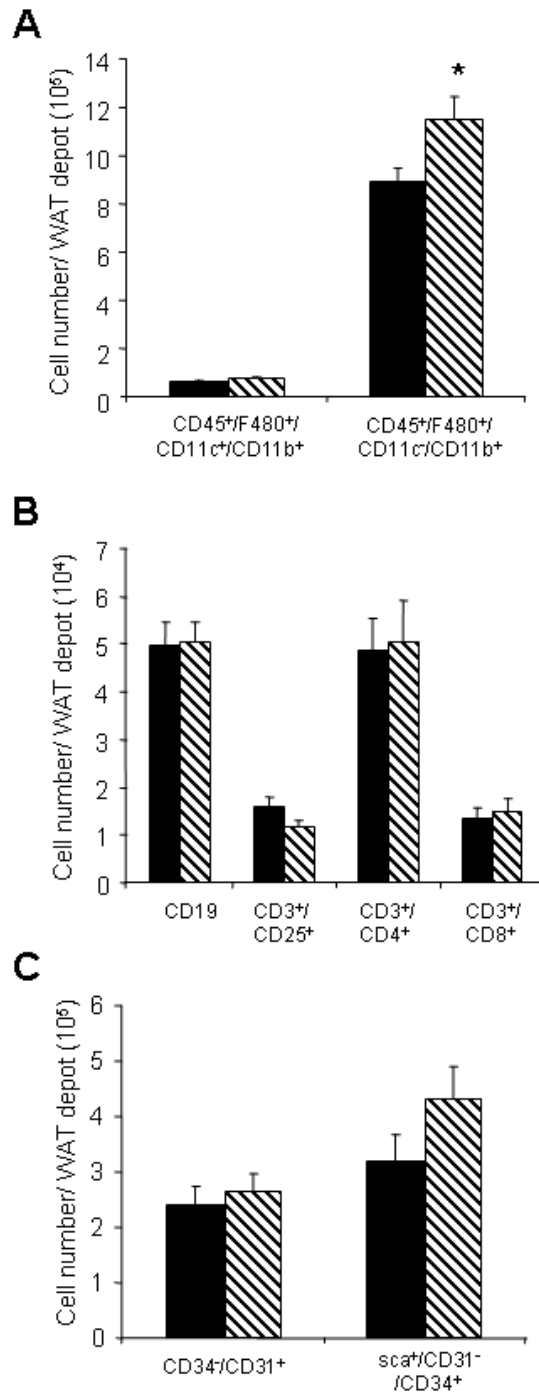


**Figure 7. mRNA expression of inflammatory markers in AT.**

Gene expression of inflammatory markers were evaluated by RT PCR. Data, normalized by 18s and HPRT, are presented as percentage of vehicle-treated mice values. Values are means  $\pm$  SEM. Mice treated with vehicle (black bars) n=10 and mice treated with BAY (hatched bars) n=10. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\* p<0.001 for the indicated effects using Student's *t* test.



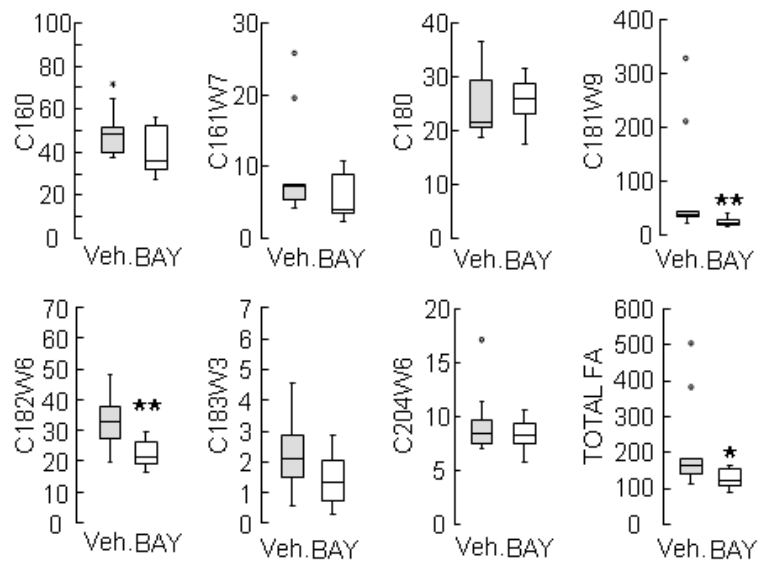
FIGURE 8



**Figure 8. Non adipose cells present in AT of vehicle and BAY treated mice.**

Multicolour flow cytometry analyses were performed on the stroma-vascular fraction (SVF) of high fat diet-fed vehicle or BAY-treated mice. Data are presented as total number of cells in WAT depot. Number of macrophages(A), lymphocytes (B) and endothelial and progenitor cells (C) Values are means  $\pm$  SEM. Mice treated with vehicle (black bars) n=10 and mice treated with BAY (hatched bars) n=10. \*p<0.05 for the indicated effects using Student's *t* test.

FIGURE 9



**Figure 9. Plasma fatty acid profiles in vehicle and BAY treated mice.**

GSMS was performed on extracted lipids from plasma of high fat diet-fed vehicle or BAY-treated mice. Results are presented as box plots. Mice treated with vehicle (grey boxes) n=8 and mice treated with BAY (white boxes) n=8. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\* p<0.001 for the indicated effects using Student's *t* test.

## Tables

	Véhicule (n=10)	BAY (n=10)	p=
<b>Glucose (g/l)</b>	1,17 ± 0,05	0,99 ± 0,04	0,024
<b>Insulin (µg/l)</b>	1,07 ± 0,16	0,39 ± 0,13	0,016
<b>NEFA (mM)</b>	0,63 ± 0,03	0,48 ± 0,03	0,001
<b>Glycerol (mM)</b>	0,60 ± 0,04	0,34 ± 0,07	0.012
<b>TG (mM)</b>	1,66 ± 0,10	1,53 ± 0,06	ns
<b>Cholesterol (mM)</b>	3,30 ± 0,08	3,46 ± 0,08	ns

**Table 1**

Fasting plasma parameters assessed on twelve week high fat diet-fed vehicle or BAY-treated mice. Values are means ± SEM. Indicated effects using Student's *t* test. NEFA, non esterified fatty acid; TG, triglyceride.

		<i>Plasma</i>			p value	<i>Explant culture media</i>			p value
		Vehicle	BAY			Vehicle	BAY		
IL6	<i>pg/ml</i>	36.74 ± 7.14	8.28 ± 2.1	0.014	<i>pg/ml/g tissue</i>	34257 ± 4551	38928 ± 2494	ns	
IL10	<i>pg/ml</i>	10.62 ± 2.14	10.62 ± 3.00	ns	<i>pg/ml/g tissue</i>	38.61 ± 5.72	67.35 ± 12.85	0.127	
MCP-1	<i>pg/ml</i>	16.60 ± 7.80	15.24 ± 4.44	ns	<i>pg/ml/g tissue</i>	13166 ± 3697	11433 ± 2816	ns	
TNFα	<i>pg/ml</i>	1.67 ± 0.37	4.20 ± 3.01	ns	<i>pg/ml/g tissue</i>	1084 ± 367	1236 ± 484	ns	
Leptine	<i>ng/ml</i>	36,04 ± 4,83	27,42 ± 6561	ns	<i>ng/ml/g tissue</i>	2,88 ± 0,80	2,23 ± 0,70	ns	
Adiponectine	<i>ng/ml</i>	6347 ± 466	5885 ± 624	ns	<i>ng/ml/g tissue</i>	128 ±30	88 ± 16	ns	

**Table 2**

Adipo-cytokines measured in plasma and media of adipose tissue explants of high fat diet-fed vehicle or BAY-treated mice. Values are means ± SEM. Indicated effects using Student's *t* test.



## Discussion

### Limites de l'utilisation du BAY

En vue du développement potentiel de la molécule en application thérapeutique, le BAY avait initialement été utilisé par voie orale. Cependant l'utilisation de cette molécule est assez contraignante du fait de sa non solubilité en milieu aqueux. Le BAY est suspendu dans du DMSO que nous diluons à 5% dans la carboxyméthyl cellulose (CMC) 0,5% et qui nous sert de véhicule. Or, la suspension n'est stable que très peu de temps et le gavage des animaux doit intervenir avant la cristallisation du produit dans son véhicule. D'autre part, le BAY présente de nombreuses limites pharmacodynamiques :

- sa bio-disponibilité est très faible, en raison d'une absorption intestinale supposée faible et d'un fort premier passage hépatique,
- sa demi-vie est courte, chez le Rat elle est inférieure à une heure. Cependant, le temps d'action effectif du BAY est plus long que sa demi-vie étant donné qu'il forme une liaison covalente avec la LHS. Le temps de demi-vie de la protéine LHS (environ 4-5 heures (Kraemer et al., 1993)) semblerait donc mieux approprié pour estimer celui du BAY. Claus et al. avait décrit un temps d'action du BAY (inhibition effective de la lipolyse) d'au moins 4 heures et pouvant s'étendre jusqu'à 8 heures après l'administration (Claus et al., 2005). D'autres molécules présentent des effets biologiques même après leur disparition du compartiment sanguin. Un exemple frappant, dont nous sommes familiers au sein de notre institut de recherche, est celui de l'apeline, petit peptide bioactif d'une demi-vie de quelques minutes et qui entraîne pourtant des effets biologiques marqués suite à un traitement chronique d'une administration par jour pendant 28 jours (Dray et al., 2008).

Ces limites pharmacodynamiques ainsi que la perte des effets du traitement chronique 24 heures après la dernière administration nous ont amenés à reconsidérer l'intervalle de temps entre la dernière administration de notre traitement et les investigations expérimentales. En se plaçant deux heures après la dernière administration nous avons observé des résultats robustes et reproductibles sur l'amélioration de l'insulino-sensibilité. A ce moment nous nous sommes demandé comment distinguer les effets chroniques de l'administration de BAY de ceux de l'effet aigu de la dernière administration. J'ai donc réalisé en parallèle les ITT et GTT après

une unique dose de 70mg/kg et n'ai pas observé d'amélioration de la tolérance à l'insuline ou au glucose ce qui signifiait que l'amélioration observée après le traitement prolongé provenait bien de la chronicité de l'inhibition de la LHS.

Etant donné les temps de demi-vie du BAY et de la LHS, nous nous sommes interrogés quant à la durée de l'inhibition de la lipolyse entre deux administrations. Les règles de pharmacocinétique permettent d'estimer la disparition quasi-complète d'une molécule du compartiment sanguin après sept demi-vies. Ainsi selon que l'on considère la demi-vie stricte du BAY ou la durée de son interaction avec la LHS, dépendante de la demi-vie de la lipase, le mode d'administration en une seule prise par jour doit certainement être insuffisant pour atteindre la dose efficace. Etant donné d'une part que nous n'avons pas eu la possibilité de doser le BAY au niveau plasmatique, et que l'éventualité de multiples gavages par jour était écartée en raison de la génération d'un stress trop élevé, nous sommes restés sur une administration quotidienne de 70 mg/kg de BAY. Néanmoins, il est probable que l'inhibition de la lipolyse ne couvre pas totalement l'intervalle de temps entre deux prises et que les concentrations plasmatiques d'AG libres subissent des variations et mêmes des rebonds. Afin de vérifier cela, nous avons essayé d'effectuer une cinétique de concentration des AG plasmatiques suite à une administration aiguë de BAY. Malheureusement, pour des raisons logistiques (groupe d'animaux trop restreint) et de prélèvements (prises de sang répétées à la veine caudale), les dosages d'AG ont été faussés suite à la fréquente hémolyse des plasmas. Le prélèvement sanguin par cathéter fémoral s'est ensuite révélé décevant car le cathéter se collait dans la veine et le prélèvement était alors impossible. Un prélèvement répété en rétro-orbitaire étant inenvisageable, une possibilité résiderait dans le prélèvement en région maxillaire.

Nous avons réfléchi quant à de nouveaux modes d'administration du BAY en chronique. Le système de pompe « alzet » paraissait très séduisant, néanmoins inapplicable à la délivrance de notre molécule en raison de sa trop faible solubilité en milieu aqueux. L'administration intra-péritonéale de BAY (repris dans du DMSO) reste une piste intéressante. Cependant l'administration de DMSO doit rester en dessous des limites toxiques. Pour ce type d'administration le problème réside dans le choix de la dose à administrer. Les seules données que nous possédons sont issues des traitements par voie orale et des tests préliminaires de pharmacocinétique réalisés par GSK. Des mises au point seraient nécessaires et pourraient être entreprises.

### **BAY et homéostasie glucidique**

Dans cet article nous avons montré une amélioration de la tolérance à l'insuline suite à l'administration prolongée de BAY. Les AG sont des facteurs reconnus pour perturber le signal insulinique au sein des organes insulino-sensibles (Samuel et al., 2010). Etant donné que le traitement au BAY permet de diminuer significativement les concentrations plasmatiques d'AG, il est légitime d'attribuer un rôle à ces derniers dans l'amélioration de la sensibilité à l'insuline des animaux traités au BAY. Dans le modèle d'haplo-déficiencia pour la LHS, nous avons déjà observé une amélioration de la sensibilité à l'insuline mais cette fois-là reliée à la modification des flux d'AG plus que par la diminution de leur concentration plasmatique. Grâce à ces deux modèles nous montrons que chez des animaux obèses, une diminution des flux d'AG du TA ainsi qu'une diminution nette de l'efflux d'AG permet d'améliorer la sensibilité à l'insuline. Pour des raisons pratiques, la mesure d'insulino-sensibilité par la technique de clamp euglycémique hyperinsulinémique n'a pas été entreprise dans ces protocoles. En effet, la période de gavage se superposerait avec la chirurgie de la pose du cathéter fémoral et l'effet du traitement pouvait s'en trouver influencé. La mesure de la dépense énergétique par calorimétrie indirecte a également été écartée en raison des faibles effets que nous avons observés sur le même protocole en régime standard.

Tout comme pour le modèle d'haplodéficiencia de la LHS, l'interprétation de l'amélioration de l'insulino-sensibilité chez les animaux traités au BAY pose la question des conséquences du BAY sur le TA par rapport à celles dans les autres organes impliqués dans l'homéostasie glucidique. Nous avons vu précédemment que la LHS (et l'ATGL) était exprimée dans les muscles squelettiques, le foie et le pancréas. Un effet du BAY dans ces tissus, pourrait alors contribuer au phénotype global.

### **Traitement au BAY et populations leucocytaires.**

Dans le cadre de l'étude de l'inflammation provoquée par un traitement avec un agoniste  $\beta$ 3-adrénergique, un traitement aigu au BAY avait été pratiqué par Mottillo et al. (Mottillo et al., 2007; Mottillo et al., 2010). Ces auteurs avaient observé que le BAY prévenait l'inflammation (estimée par l'augmentation de l'expression de MCP-1 dans le TA total et dans les adipocytes 3T3-L1 en culture) déclenchée par le traitement  $\beta$ 3-agoniste suggérant l'inhibition de la lipolyse comme effet protecteur. Ces observations révèlent l'importance de l'accumulation d'AG et/ou de dérivés lipidiques issus de la lipolyse dans l'activation de l'inflammation dans l'adipocyte. Ce travail, cependant, n'avait évalué l'inflammation que par le changement du

niveau d'expression de trois cytokines sans vérifier les conséquences fonctionnelles sur les sécrétions adipocytaires ou l'infiltration macrophagique. D'autre part, le BAY n'avait eu aucun effet dans les conditions de lipolyse basale, sans stimulation par l'agoniste  $\beta$ 3-adrénergique. Enfin, les auteurs n'ont pas expérimenté de traitement chronique au BAY dans leurs protocoles.

Dans notre travail, le traitement au BAY intervient sur une obésité avancée (12 semaines de régime gras) mais qui, si l'on en croit les résultats de Strissel et al., est encore extrêmement dynamique sur le plan inflammatoire (Strissel et al., 2007). Chez les animaux traités au BAY, nous avons observé une augmentation de deux populations macrophagiques que l'on pourrait apparenter aux macrophages « recrutés, de type M1 » et aux macrophages « résidents, de type M2 » signant de prime abord une augmentation du tonus pro- et anti-inflammatoire. Cependant, la littérature récente, semble remettre en question le dogme M1/M2. L'étude de différents marqueurs de surface tels que MGL1 (Shaul et al., 2010), MR (Zeyda et al., 2010) ou CD206 (Fujisaka et al., 2009; Wentworth et al., 2010) a permis de décrire des phénotypes intermédiaires au sein des classes M1 et M2. Ces récentes observations ne facilitent pas l'interprétation de nos résultats, et l'on voit ainsi que l'augmentation des cellules CD11c<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> chez les animaux traités au BAY ne doit pas seulement être considérée comme une infiltration de cellules pro-inflammatoires activées. De même, la population CD11c<sup>-</sup>/CD11b<sup>+</sup>, considérée jusque là comme représentant les macrophages résidents inclut peut être une fraction de macrophages recrutés de type M2. La classification des types de macrophages selon leurs marqueurs de surface est difficile tant il semble exister de multiples combinaisons.

Le traitement au BAY n'a pas modifié les quantités et les proportions des différents types de lymphocytes. Différents travaux s'accordent sur le fait que l'apparition des lymphocytes dans le TA en expansion précède celle des macrophages (Duffaut et al., 2009a; Kintscher et al., 2008), cependant un autre travail décrit un recrutement beaucoup plus tardif de lymphocytes dans le TA (20-22 semaines de régime enrichi en graisse) (Strissel et al., 2010). Dans les deux cas, notre traitement est intervenu dans une période où peu de changements concernant les populations lymphocytaires sont décrits. En ce sens, nos résultats ne sont donc peut être pas si étonnants.

### **Une action directe du BAY sur les macrophages et les lymphocytes ?**



Les macrophages possèdent toute la machinerie enzymatique nécessaire à l'absorption, la mise en réserve (sous forme de TG), la mobilisation et l'utilisation des AG et du cholestérol. En plus du glucose, les AG représentent une source énergétique majeure pour ce type cellulaire. L'activation des macrophages influence l'utilisation (balance stockage/oxydation) des substrats lipidiques (Hauton and Evans, 2002).

Dès 1984, Khoo et al. décrivaient l'activité d'une lipase neutre des TG dans les macrophages (Khoo et al., 1984). Aujourd'hui on sait que les macrophages expriment la LHS mais aussi l'ATGL (enzyme initiatrice de la dégradation des TG) (Chandak et al., 2010) et que l'expression de cette enzyme est dix à quinze fois supérieure à celle de la LHS. Les macrophages des souris invalidées pour l'atgl présentent de profondes modifications métaboliques (diminution de l'activité TG hydrolase, accumulation de GLs, augmentation du captage des AG, réduction des concentrations d'ATP) et fonctionnelle (défaut de phagocytose) soulignant l'importance de cette lipase au sein du macrophage (Chandak et al., 2010). Le rôle macrophagique de la LHS a quant à lui largement été étudié dans le cadre de l'athérosclérose. Les plaques d'athérome présentent des macrophages dits « spumeux », gorgés de lipides (cholestérol et TG). Les travaux qui ont consisté à étudier les conséquences d'une surexpression de la LHS dans ces macrophages, afin de favoriser la libération des lipides, ont essentiellement porté leur attention sur la fonction cholestérol estérase de la LHS. Dans ce cadre, le rôle protecteur d'une surexpression de la LHS est encore débattu (Escary et al., 1999). La fonction TG hydrolase de la LHS n'a pas reçu la même attention mais il semblerait, au vue des données sur les macrophages des souris ATGL<sup>-/-</sup>, que l'importance de la LHS dans cette activité enzymatique soit secondaire.

Chez les animaux traités au BAY nous avons observé une augmentation du nombre de deux différentes classes de macrophages associée à une augmentation de l'expression génique des marqueurs de ces macrophages ainsi que de cytokines. Dans les travaux de Mottillo et al. en condition basale (sans stimulation  $\beta$ -adrénergique), aucune modification de l'expression de MCP-1, IL6 ou PAI-1 n'avait été observée (Mottillo et al., 2010) suggérant l'influence de la chronicité de l'inhibition de la lipolyse différente sur l'inflammation du TA. Etant donné que les macrophages expriment la LHS, il est légitime de s'interroger sur l'impact direct du BAY et donc de l'inhibition de la lipolyse dans ce type leucocytaire. Si l'on considère, comme au sein du TA, que la LHS est plus importante pour l'hydrolyse des DG que des TG, quels pourraient être les effets d'une accumulation de DG dans les macrophages ? Les DG ont une double fonction biologique dans la cellule : précurseur de TG et molécule de signalisation

intracellulaire. Koliwad et al. ont mis en évidence la diminution de l'activation des macrophages par l'augmentation de DGAT-1 dépendante des capacités d'estérification des AG en TG (Koliwad et al., 2010). Une accumulation de DG peut alors être vue comme un pool prêt à être re-estérifié par le macrophage. Une augmentation de l'expression et de l'activité des DGAT pourraient étayer cette hypothèse. Si l'on considère à présent la fonction de messenger des DG, leur accumulation, pourrait venir perturber la signalisation intracellulaire et contribuer à l'établissement d'une insulino-résistance macrophagique. Ainsi tout comme dans les cellules musculaires, l'insulino-résistance macrophagique est caractérisée par une suppression de la phosphorylation d'Akt (Tabas et al., 2010) qui, en présence concomitante d'une élévation du stress du réticulum endoplasmique, peut engager le macrophage dans la voie apoptotique. Cependant, les effets de l'insulino-résistance seraient différents selon les types de macrophages (Tabas et al., 2010). L'accumulation de DG au sein du macrophage pourrait donc avoir des conséquences opposées et une balance entre ces potentiels effets anti- et pro-inflammatoires peut alors être imaginée.

Néanmoins, il ne faut pas oublier les fonctions de cholestérol et rétinyl ester hydrolase de la LHS qui se retrouveraient également perturbées par l'action du BAY. Si d'autres enzymes (comme KIAA1363 ou CEH) sont capables d'hydrolyser les esters de cholestérol, la LHS semble limitante chez les souris Lhs KO (Bucheberner et al., 2010). Différentes enzymes non dépendante des sels biliaires effectuent l'hydrolyse des esters de rétinol au sein du macrophage (Hagen et al., 1999), le rôle relatif de la LHS dans ce processus n'est pas documenté.

A ma connaissance, aucun travail de la littérature ne documente la présence et le rôle de la LHS et de l'ATGL dans les lymphocytes. En revanche, l'importance des lipases lysosomales acides dans le développement et l'activation des lymphocytes a été mise en évidence par Qu et al. (Qu et al., 2009). On pourrait alors imaginer qu'un défaut des lipases neutres puisse également modifier l'approvisionnement en médiateurs lipidiques essentiels au fonctionnement du lymphocyte.

En conclusion, pour vérifier les effets possibles du BAY directement sur les macrophages et les lymphocytes, nous pourrions appliquer cette molécule sur des macrophages péritonéaux ou des macrophages/lymphocytes isolés de la SVF et observer les changements d'expression génique et les sécrétions associées.

**Traitement chronique au BAY : remodelage du TA associé à une nécrose adipocytaire ?**

Cette hypothèse a été proposée par Aurélien Fioroni, étudiant en M2R, avec qui nous avons réalisé la caractérisation de l'inflammation du TA de ce protocole ; il me semble intéressant d'en reparler dans ce mémoire. Les travaux de Strissel et al. ont étudié la cinétique de la taille adipocytaire, de la nécrose et de l'infiltration macrophagique au cours d'un régime enrichi en graisse d'une durée de 20 semaines (Strissel et al., 2007). Ils ont mis en évidence une hypertrophie adipocytaire (à 12 semaines de régime) suivi d'une diminution de la taille moyenne des adipocytes associée à une hyperplasie adipocytaire (à 20 semaines de régime). La mort adipocytaire au sein du TA péri-gonadique augmentait en fonction du temps de régime pour culminer à 16 semaines avant de diminuer (à 20 semaines de régime). Enfin, l'intensité de l'infiltration macrophagique semblait positivement corrélée à la mort adipocytaire. De leur travaux, les auteurs ont proposé que le TA en expansion subissait un remodelage tissulaire important, autour de l'événement central de nécrose adipocytaire, et résultant en majorité de l'activité des macrophages. Ce remodelage du TA ferait intervenir de nouvelles cellules adipeuses en fin de processus. L'inhibition de la lipolyse provoquée par le BAY pourrait favoriser l'hyperplasie adipocytaire et accélérer l'engagement de la cellule en nécrose. L'hypothèse proposée par Strissel et al. pourraient alors s'appliquer. Les observations servant cette hypothèse sont :

- la répartition des tailles adipocytaires, suggérant la présence au sein du TA des animaux traités au BAY d'une population de très gros adipocytes, (action du BAY sur la rétention des TG) et d'une population de petits adipocytes pouvant refléter l'hyperplasie décrite par Strissel et al.,
- l'augmentation des macrophages de type M1 (CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup>) décrits dans la littérature comme pouvant être recrutés suite à la nécrose adipocytaire,
- l'inhibition « intermittante » de la lipolyse adipocytaire du au temps d'action limité du BAY pourrait entraîner un stress métabolique favorisant la mort adipocytaire,
- l'augmentation des macrophages de type M2 (CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>-</sup>) décrit dans la littérature comme pouvant être impliqués dans le remodelage tissulaire.

Cependant, certaines observations desservent cette hypothèse :

- les adipocytes passeraient par une phase hypertrophique impliquant à l'échelle tissulaire l'augmentation des TG, or, l'analyse des lipides neutres du TA n'a pas montré d'augmentation des TG chez les animaux traités au BAY,
- la rapidité de l'effet du BAY sur la mort adipocytaire, Strissel et al. avaient seulement effectué des mesures toutes les 4 semaines de régime.

- l'observation simultanée d'hypertrophie et d'hyperplasie adipocytaires alors que Strissel et al. semblaient montrer une dissociation temporelle entre ces événements,
- la concentration plasmatique de FABP4, que nous avons montré très augmentée chez les souris KO Lhs (modèle reconnu de nécrose adipocytaire), n'est pas modifiée chez les animaux traités au BAY,

Pour estimer la nécrose adipocytaire nous pourrions réaliser sur coupes histologiques des immuno-marquages de la périlipine, protéine garante de l'intégrité de la GL. Sur les mêmes préparations il serait intéressant de marquer les macrophages afin d'observer leur localisation en fonction de leur polarisation. Pour déterminer si la fraction de petits adipocytes observée chez les animaux traités au BAY inclut des préadipocytes nous pourrions doser l'expression génique de Pref-1, marqueur des préadipocytes (Smas and Sul, 1993).

### **Comment expliquer les différences concernant l'inflammation du TA entre le modèle d'haplodéficiencia de la LHS et le traitement chronique au BAY ?**

Si les deux modèles d'inhibition de l'activité de la LHS ont montré une amélioration de la sensibilité à l'insuline ils se distinguent pourtant nettement sur le statut inflammatoire du TA. Les souris LHS<sup>+/-</sup> n'ont pas présenté de modification du nombre de macrophages dans le TA alors que les souris traitées au BAY ont vu leur nombre augmenter. L'autre différence majeure entre ces deux modèles réside dans la modification ou non de la taille des adipocytes. La plasticité adipocytaire pourrait représenter un déterminant majeur de l'inflammation du TA. En effet, le TA des animaux traités au BAY a présenté une hétérogénéité de la taille des adipocytes, qui n'a pas été observée dans le TA des animaux LHS<sup>+/-</sup>. Nous pouvons imaginer que le traitement chronique au BAY a provoqué des changements soudains au sein d'un TA en expansion alors que le TA des animaux LHS<sup>+/-</sup> s'est potentiellement adapté précocement à la déplétion de LHS et l'inflammation qui lui est associée n'est donc pas différente de celle d'animaux contrôles.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES GÉNÉRALES

Ce travail de thèse se décomposait en deux parties indépendantes, la première sur la protéine découplante UCP3 présentant des aspects moléculaires et l'autre, sur l'étude de la LHS, développant des approches physiologiques. Dans les deux cas la majorité de mon travail de thèse a été effectué sur modèles animaux.

**Notre premier objectif a été de caractériser les séquences *cis* régulatrices impliquées dans l'expression muscle spécifique de la protéine découplante UCP3.** Par une approche de transgénèse additive nous avons pu mettre en évidence l'importance d'une petite région du premier intron pour l'expression musculaire de la forme humaine d'UCP3. Dans le même temps, une équipe avait mis en évidence l'importance de régions non promotrices dans la régulation de l'expression d'UCP3 durant l'exposition aux hormones thyroïdiennes (de Lange et al., 2007). Depuis, une autre équipe a montré l'importance de l'intron 1 pour l'expression spécifique dans le TAB (Fromme et al., 2009). Ainsi une mutation ponctuelle au sein de l'intron 1 entraîne la perte de l'expression d'UCP3 dans ce tissu. La régulation intronique de l'expression transcriptionnelle des gènes, bien que non majoritaire par rapport à celles faisant intervenir les régions du promoteur, n'est pas si exceptionnelle. Ainsi, plusieurs gènes exprimés dans les précurseurs musculaires (myofibroblastes) ou dans les myocytes en différenciation ont montré une régulation intronique ; c'est le cas notamment pour l'*α smooth muscle actine*, la nestine ou encore, l'acétylcholinestérase (Camp et al., 2008; Cohen and Randall, 2006; De Jaco et al., 2005; Tomasek et al., 2005; Zhong et al., 2008). On sait qu'UCP3 est préférentiellement exprimé dans les fibres musculaires à métabolisme glycolytique mais les éléments régulateurs à l'origine de cette répartition sub tissulaire n'ont jamais été décrits. Nous avons montré pour la première fois que des régions introniques (situées dans la partie 5' du premier intron) étaient importantes pour l'expression musculaire de hUCP3 selon le type de fibres. Ainsi les animaux exprimant le fragment I4 ont bien présenté une expression spécifiquement musculaire mais avec un profil d'expression selon le type de fibres très différent de celui des autres lignées, avec une expression majoritaire dans le *soleus*, muscle à métabolisme oxydatif et le diaphragme, muscle mixte.

Dans ce travail nous avons identifié des régions introniques d'intérêt, d'une centaine de paires de bases. L'analyse informatique que nous avons menée avait pour but de révéler au sein de ces séquences la présence de sites putatifs de liaison pour des facteurs de transcription afin de

préciser le mécanisme moléculaire de l'expression muscle spécifique. Malheureusement les sites identifiés, dont la fonctionnalité a été testée *in vitro* à l'aide de construction promoteur gène rapporteur, n'ont pas apporté de réponse concrète sur cette question. L'approche *in vitro* a peut être été limitante, quand on sait que l'environnement chromatinien influence la régulation de l'expression des gènes, pour révéler l'importance de ces sites régulateurs. Pour des raisons de stratégie scientifique ce projet n'a pas été poursuivi. Cependant nous aurions pu envisager certaines manipulations pour le finaliser :

- nouvelles constructions de transgène visant à redécouper le fragment I4 ou ayant subi une mutagenèse dirigée des sites potentiels de liaison de facteur de transcription identifiés par l'analyse informatique, notamment les *E-box*,
- tests *in vitro* des séquences par chromatine immunoprécipitation.

### **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. Néanmoins, une des stratégies actuellement à l'étude dans le cadre du développement de la masse grasse associée à l'obésité consiste à augmenter les capacités oxydatives du TA blanc. Différentes pistes sont envisagées, comme augmenter les cycles futiles de dépense énergétique au sein des mitochondries (Tan et al., 2003; Tiraby et al., 2003) ou orienter le TA blanc en TA brun (soit par trans différenciation des adipocytes blancs en adipocytes bruns (Barbatelli et al., 2010; Cinti, 2009; De Matteis et al., 2009), soit en « réveillant » les précurseurs bruns au sein du TA blanc (Petrovic et al., 2010)). Si l'activation ectopique d'UCP1 (dont les capacités découplantes sont garanties) dans l'adipocyte blanc serait certainement préférée à celle d'UCP3, cette dernière serait tout de même envisageable. D'autre part, l'étude du rôle d'UCP3 dans les précurseurs bruns pourrait se révéler intéressante mais serait cependant limitée par l'expression tardive de la protéine (Langin, 2010).

Si les applications de nos résultats dans le TA semblent lointaines, le promoteur et l'intron 1 du gène hUcp3 pourraient en revanche 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 ou bien dans le cadre plus large de l'étude du vieillissement musculaire. La sarcopénie associée au vieillissement est caractérisée par une réduction globale du nombre de fibres musculaires de types I et II et

d'une atrophie spécifique des fibres de type II menant à un déclin progressif de la masse et de la force musculaire (Larsson et al., 1978; Lexell et al., 1988; Verdijk et al., 2007). Elle est également définie par une accumulation d'ERO résultant de l'altération progressive des capacités fonctionnelles des mitochondries (Rossi et al., 2008). D'après les travaux de la littérature passés en revue dans la partie introductive de ce manuscrit, il serait tout à fait envisageable d'attribuer un rôle à UCP3 dans les mécanismes moléculaires du vieillissement musculaire et son étude se révélerait certainement très intéressante.

**Le deuxième projet développé dans cette thèse s'est porté sur l'étude des conséquences d'une diminution fonctionnelle de la LHS sur le métabolisme énergétique et l'inflammation du TA.** Nous avons exploité deux approches complémentaires sur modèles animaux : l'une génique, basée sur la création d'animaux haplodéficients pour le gène de la Lhs et l'autre pharmacologique, basée sur l'utilisation en chronique d'un inhibiteur spécifique de la LHS.

Les animaux de ces deux modèles ont présenté une diminution marquée des capacités lipolytiques *in vitro* et *in vivo*. Nous avons montré qu'en régime enrichi en graisse, l'haplodéficiencia ou l'inhibition chronique n'entraînaient pas de modification de la composition corporelle des animaux. L'exploration des paramètres plasmatiques a révélé un impact sur les concentrations d'AG suite au traitement pharmacologique mais pas chez les animaux LHS<sup>+/-</sup>, suggérant l'établissement chez ces derniers de mécanismes adaptatifs ou une modification au niveau dynamique. Nous avons en effet observé une diminution globale des flux d'AG chez les animaux LHS<sup>+/-</sup>. La diminution des concentrations circulantes ou des flux d'AG a ensuite été associée dans les deux modèles à une amélioration nette de la tolérance à l'insuline.

Plusieurs questions subsistent encore quant à l'origine tissulaire de l'amélioration de la sensibilité à l'insuline. Chez les animaux LHS<sup>+/-</sup> soumis à une stimulation par l'insuline, les muscles captent plus de glucose que chez les animaux contrôles. L'implication du foie dans ce modèle resterait à vérifier. En effet, les clamps euglycémiques hyperinsulinémiques n'ont pas montré d'amélioration de la sensibilité hépatique à l'insuline cependant d'autres évidences (oxydation du glucose augmentée, diminution de l'accumulation des TG, augmentation de la lipogénèse hépatique stimulée par l'insuline) tendent à impliquer cet organe dans

l'amélioration globale de la sensibilité à l'insuline. En perspective, nous pourrions envisager de réitérer les expériences de mise à jeun - réalimentation et de tester la fonctionnalité de la voie de signalisation de l'insuline dans les tissus insulino-sensibles afin de clarifier l'implication du foie et des muscles squelettiques dans ce phénotype. L'étude de l'impact de la diminution de l'activité de la LHS dans le pancréas serait tout à fait pertinente. Ces travaux sur l'homéostasie glucidique ont révélé une limite de ce modèle, à savoir la non spécificité tissulaire de la diminution de l'activité de la LHS. Ce problème est également présent dans les modèles d'invalidation totale de la LHS. Ainsi la discrimination des effets propres de la diminution de l'activité de la LHS dans le tissu où elle est majoritairement exprimée, le TA, sur l'insulino-sensibilité et de ceux dans les tissus insulino-sensibles est pratiquement impossible. En ce sens une perspective serait de créer un **modèle d'invalidation (totale ou partielle) de la LHS qui serait spécifique du TA**. Il est vraiment étonnant qu'un tel modèle n'ait jamais été construit. L'engouement pour l'étude de la LHS et ce type de projet qui aurait pu y être associé a peut être été éclipsé par la découverte de l'ATGL et la description de son rôle prépondérant dans la lipolyse basale et stimulée. L'outil « promoteur de l'adiponectine » récemment développé par l'équipe de PE Sherer (Wang et al., 2010) et assurant une meilleure spécificité tissulaire que le promoteur FABP4/aP2 pourrait être utilisé en collaboration pour créer un tel modèle.

Par le modèle d'haplodéficiencia de la LHS et l'utilisation d'un régime enrichi en graisse nous souhaitons mimer le défaut d'expression de la LHS associée au développement excessif de masse grasse du sujet obèse. Cependant l'extrapolation des résultats obtenus sur le métabolisme énergétique est conceptuellement limitée par le fait que nous n'intervenons que sur l'expression et l'activité d'une seule lipase alors qu'il est décrit chez le sujet obèse que l'ATGL est également affectée (Jocken et al., 2007). La caractérisation phénotypique d'animaux **doubles hétérozygotes LHS/ ATGL** pourrait se révéler extrêmement intéressante. C'est une perspective qui va être développée au laboratoire puisque nous avons obtenu au courant de l'année 2010 des souris  $AGTL^{+/-}$  par collaboration avec le groupe autrichien de R. Zechner. Ce projet devrait être débuté durant de dernier trimestre de cette année.

Connaissant l'implication potentielle des adipocytokines dans l'altération de la sensibilité à l'insuline et le rôle activateur des AG vis-à-vis des macrophages du TA, **nous avons voulu connaître le statut inflammatoire du TA dans nos deux modèles afin de déterminer s'il pouvait être impliqué dans l'amélioration de l'insulino-sensibilité**. Nous n'avons pas



observé de différence d'infiltration macrophagique chez les animaux LHS<sup>+/-</sup> tandis que deux populations de macrophages étaient augmentées chez les animaux traités au BAY. Nous pouvons alors supposer que :

- l'amélioration de la sensibilité à l'insuline n'est pas automatiquement liée à une «amélioration» du profil inflammatoire du TA,
- la modification des quantités circulantes d'AG a peut être plus d'impact que la modification des flux d'AG sur les populations leucocytaires du TA,
- la modification de la taille adipocytaire est un déterminant important de cette réponse inflammatoire,
- les mécanismes compensatoires sont différents dans les deux modèles, en effet le traitement pharmacologique intervient sur une obésité établie (et donc une inflammation du TA déjà initiée) tandis que le modèle d'haplodéficiencia masque peut être des adaptations à long terme (cf. effets sur la taille adipocytaire).

Néanmoins, pour parfaire la caractérisation du statut inflammatoire dans le modèle d'haplodéficiencia il serait nécessaire de réitérer les mesures de FACS avec le marqueur CD11c et de rapprocher ces résultats des marquages immunohistochimiques au F4/80 et à la périlipine (pour évaluer la nécrose). Il serait intéressant de vérifier si le BAY possède ou non un effet direct sur les populations leucocytaires. Plus globalement et dans nos deux modèles, nous pourrions évaluer en collaboration avec l'équipe d'A. Bouloumié la présence des macrophages de phénotype intermédiaire (Shaul et al., 2010; Wentworth et al., 2010; Zeyda et al., 2010) afin d'affiner notre description. En effet, le dogme « M1/M2 » semble aujourd'hui être révisé et la description de l'inflammation liée à l'expansion du TA moins catégorique chez la Souris. Le rôle même du macrophage au sein du TA pourrait être différent selon les stades de développement de celui-ci. On pourrait également imaginer que la nature des relations entre adipocytes et macrophages puisse elle aussi être conditionnée selon ces stades. Plusieurs interrogations me semblent intéressantes et pourraient constituer des perspectives pour ce travail:

- i) autour du macrophage premièrement : Qu'est ce qui détermine le rôle du macrophage dans ces différents stades ? Est-ce que le métabolisme même du macrophage intervient dans sa polarisation ? Est-ce qu'une modification des lipases et donc de l'accumulation d'intermédiaires lipidiques peut affecter ce métabolisme ?

- ii) autour de l'adipocyte deuxièmement : Quels seraient les facteurs adipocytaires pouvant modifier leur relation avec les macrophages durant les différents stades du développement de la masse grasse ? Qu'est-ce qui détermine la taille critique de l'adipocyte ? Est-ce qu'un phénotype « brun » pourrait moduler la relation macrophage / adipocyte ?

Concernant l'utilisation du BAY, ce manuscrit de thèse ne présente pas les nombreuses mises au point qui ont été nécessaires avant l'obtention des résultats soumis à publication. Même si nous avons entrevu les limites d'utilisation de cet agent pharmacologique, ce travail a permis de proposer un protocole de traitement chronique qui a par la suite été appliqué à un autre modèle développé par le laboratoire (souris mutées pour le TLR4). En perspective il serait tout de même utile de tester la voie d'administration intrapéritonéale et de tester également des conséquences biologiques de traitements d'une durée plus longue, 1 mois par exemple. Nous pourrions également imaginer comparer le modèle d'haplodéficience sur souris obèses avec un traitement chronique au BAY débuteant en même temps que le régime gras ou imaginer des traitements chroniques au BAY au moment de l'infiltration de certaines populations leucocytaires majeures selon les données de la littérature.

Nos travaux *in vivo* pourraient enfin être complétés par des approches *in vitro*. Nous disposons au laboratoire d'un modèle d'adipocyte humain (*human multipotent adipose derived stem*, hMADS) ainsi que de la lignée monocyttaire THP-1. Des approches moléculaires par ARN interférence ou pharmacologiques par le BAY permettraient d'inactiver la LHS. Des expériences en cours étudient l'effet de milieux conditionnés d'adipocytes, dont la lipolyse a été stimulée par différents agents pharmacologiques ou inhibée par les moyens cités précédemment, sur le phénotype des macrophages. L'effet prolongé d'un traitement au BAY pourrait également être étudié dans un système de co-culture adipocyte/macrophage.

## BIBLIOGRAPHIE

## A

- Acin, A., Rodriguez, M., Rique, H., Canet, E., Boutin, J. A., and 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.
- Adams, A. E., Carroll, A. M., Fallon, P. G., and Porter, R. K. (2008a). Mitochondrial uncoupling protein 1 expression in thymocytes. *Biochim Biophys Acta* 1777, 772-776.
- Adams, A. E., Hanrahan, O., Nolan, D. N., Voorheis, H. P., Fallon, P., and Porter, R. K. (2008b). Images of mitochondrial UCP 1 in mouse thymocytes using confocal microscopy. *Biochim Biophys Acta* 1777, 115-117.
- Ahmed, K., Tunaru, S., Langhans, C. D., Hanson, J., Michalski, C. W., Kolker, S., Jones, P. M., Okun, J. G., and Offermanns, S. (2009a). Deorphanization of GPR109B as a receptor for the beta-oxidation intermediate 3-OH-octanoic acid and its role in the regulation of lipolysis. *J Biol Chem* 284, 21928-21933.
- Ahmed, K., Tunaru, S., and Offermanns, S. (2009b). GPR109A, GPR109B and GPR81, a family of hydroxy-carboxylic acid receptors. *Trends Pharmacol Sci* 30, 557-562.
- Ahmed, K., Tunaru, S., Tang, C., Muller, M., Gille, A., Sassmann, A., Hanson, J., and Offermanns, S. (2010). An autocrine lactate loop mediates insulin-dependent inhibition of lipolysis through GPR81. *Cell Metab* 11, 311-319.
- Alkhoury, N., Gornicka, A., Berk, M. P., Thapaliya, S., Dixon, L. J., Kashyap, S., Schauer, P. R., and Feldstein, A. E. (2010). Adipocyte apoptosis, a link between obesity, insulin resistance, and hepatic steatosis. *J Biol Chem* 285, 3428-3438.
- Alonso, A., Marti, A., Corbalan, M. S., Martinez-Gonzalez, M. A., Forga, L., and Martinez, J. A. (2005). Association of UCP3 gene -55C>T polymorphism and obesity in a Spanish population. *Ann Nutr Metab* 49, 183-188.
- Alsted, T. J., Nybo, L., Schweiger, M., Fledelius, C., Jacobsen, P., Zimmermann, R., Zechner, R., and Kiens, B. (2009). Adipose triglyceride lipase in human skeletal muscle is upregulated by exercise training. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296, E445-453.
- Andrews, Z. B., Horvath, B., Barnstable, C. J., Elsworth, J., Yang, L., Beal, M. F., Roth, R. H., Matthews, R. T., and Horvath, T. L. (2005). Uncoupling protein-2 is critical for nigral dopamine cell survival in a mouse model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 25, 184-191.
- Arkan, M. C., Hevener, A. L., Greten, F. R., Maeda, S., Li, Z. W., Long, J. M., Wynshaw-Boris, A., Poli, G., Olefsky, J., and Karin, M. (2005). IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med* 11, 191-198.
- Arsenijevic, D., Onuma, H., Pecqueur, C., Raimbault, S., Manning, B. S., Miroux, B., Couplan, E., Alves-Guerra, M. C., Gubern, M., Surwit, R., *et al.* (2000). Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat Genet* 26, 435-439.
- Ayala, J. E., Bracy, D. P., McGuinness, O. P., and Wasserman, D. H. (2006). Considerations in the design of hyperinsulinemic-euglycemic clamps in the conscious mouse. *Diabetes* 55, 390-397.
- Azzazy, H. M., Pelsers, M. M., and Christenson, R. H. (2006). Unbound free fatty acids and heart-type fatty acid-binding protein: diagnostic assays and clinical applications. *Clin Chem* 52, 19-29.

## B

- Bao, S., Kennedy, A., Wojciechowski, B., Wallace, P., Ganaway, E., and Garvey, W. T. (1998). Expression of mRNAs encoding uncoupling proteins in human skeletal muscle: effects of obesity and diabetes. *Diabetes* 47, 1935-1940.
- Barbatelli, G., Murano, I., Madsen, L., Hao, Q., Jimenez, M., Kristiansen, K., Giacobino, J. P., De Matteis, R., and Cinti, S. (2010). The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298, E1244-1253.
- Barbe, P., Larrouy, D., Boulanger, C., Chevillotte, E., Viguerie, N., Thalamas, C., Oliva Trastoy, M., Roques, M., Vidal, H., and Langin, D. (2001). Triiodothyronine-mediated up-regulation of UCP2 and UCP3 mRNA expression in human skeletal muscle without coordinated induction of mitochondrial respiratory chain genes. *Faseb J* 15, 13-15.
- Bartke, N., and Hannun, Y. A. (2009). Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *J Lipid Res* 50 Suppl, S91-96.
- Beller, M., Sztalryd, C., Southall, N., Bell, M., Jackle, H., Auld, D. S., and Oliver, B. (2008). COPI complex is a regulator of lipid homeostasis. *PLoS Biol* 6, e292.
- Bezaire, V., Bruce, C. R., Heigenhauser, G. J., Tandon, N. N., Glatz, J. F., Luiken, J. J., Bonen, A., and Spriet, L. L. (2006). Identification of fatty acid translocase on human skeletal muscle mitochondrial membranes: essential role in fatty acid oxidation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290, E509-515.
- Bezaire, V., Hofmann, W., Kramer, J. K., Kozak, L. P., and Harper, M. E. (2001). Effects of fasting on muscle mitochondrial energetics and fatty acid metabolism in Ucp3(-/-) and wild-type mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281, E975-982.
- Bezaire, V., Mairal, A., Ribet, C., Lefort, C., Grousse, A., Jocken, J., Laurencikiene, J., Anesia, R., Rodriguez, A. M., Ryden, M., *et al.* (2009). Contribution of adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase to lipolysis in hMADS adipocytes. *J Biol Chem* 284, 18282-18291.
- Bezaire, V., Seifert, E. L., and Harper, M. E. (2007). Uncoupling protein-3: clues in an ongoing mitochondrial mystery. *Faseb J* 21, 312-324.
- Bezaire, V., Spriet, L. L., Campbell, S., Sabet, N., Gerrits, M., Bonen, A., and Harper, M. E. (2005). Constitutive UCP3 overexpression at physiological levels increases mouse skeletal muscle capacity for fatty acid transport and oxidation. *Faseb J* 19, 977-979.
- Bjorntorp, P., Gustafson, A., and Persson, B. (1971). Adipose tissue fat cell size and number in relation to metabolism in endogenous hypertriglyceridemia. *Acta Med Scand* 190, 363-367.
- Bjorntorp, P., Karlsson, M., Pertoft, H., Pettersson, P., Sjostrom, L., and Smith, U. (1978). Isolation and characterization of cells from rat adipose tissue developing into adipocytes. *J Lipid Res* 19, 316-324.
- Bloch-Damti, A., and Bashan, N. (2005). Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 7, 1553-1567.
- Boss, O., Samec, S., Kuhne, F., Bijlenga, P., Assimacopoulos-Jeannet, F., Seydoux, J., Giacobino, J. P., and Muzzin, P. (1998). Uncoupling protein-3 expression in rodent skeletal muscle is modulated by food intake but not by changes in environmental temperature. *J Biol Chem* 273, 5-8.
- Boss, O., Samec, S., Paoloni-Giacobino, A., Rossier, C., Dulloo, A., Seydoux, J., Muzzin, P., and Giacobino, J. P. (1997). Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett* 408, 39-42.
- Bouillaud, F. (2009). UCP2, not a physiologically relevant uncoupler but a glucose sparing switch impacting ROS production and glucose sensing. *Biochim Biophys Acta* 1787, 377-383.

- Bouillaud, F., Ricquier, D., Thibault, J., and Weissenbach, J. (1985). Molecular approach to thermogenesis in brown adipose tissue: cDNA cloning of the mitochondrial uncoupling protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 445-448.
- Bouloumie, A., Curat, C. A., Sengenès, C., Lolmede, K., Miranville, A., and Busse, R. (2005). Role of macrophage tissue infiltration in metabolic diseases. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 8, 347-354.
- Bourlier, V., and Bouloumie, A. (2009). Role of macrophage tissue infiltration in obesity and insulin resistance. *Diabetes Metab* 35, 251-260.
- Bourlier, V., Zakaroff-Girard, A., Miranville, A., De Barros, S., Maumus, M., Sengenès, C., Galitzky, J., Lafontan, M., Karpe, F., Frayn, K. N., and Bouloumie, A. (2008). Remodeling phenotype of human subcutaneous adipose tissue macrophages. *Circulation* 117, 806-815.
- Brand, M. D., Brindle, K. M., Buckingham, J. A., Harper, J. A., Rolfe, D. F., and Stuart, J. A. (1999). The significance and mechanism of mitochondrial proton conductance. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23 Suppl 6, S4-11.
- Brand, M. D., Chien, L. F., Ainscow, E. K., Rolfe, D. F., and Porter, R. K. (1994). The causes and functions of mitochondrial proton leak. *Biochim Biophys Acta* 1187, 132-139.
- Brand, M. D., Pamplona, R., Portero-Otin, M., Requena, J. R., Roebuck, S. J., Buckingham, J. A., Clapham, J. C., and Cadenas, S. (2002). Oxidative damage and phospholipid fatty acyl composition in skeletal muscle mitochondria from mice underexpressing or overexpressing uncoupling protein 3. *Biochem J* 368, 597-603.
- Brookes, P. S., Parker, N., Buckingham, J. A., Vidal-Puig, A., Halestrap, A. P., Gunter, T. E., Nicholls, D. G., Bernardi, P., Lemasters, J. J., and Brand, M. D. (2008). UCPs--unlikely calcium porters. *Nat Cell Biol* 10, 1235-1237; author reply 1237-1240.
- Brun, S., Carmona, M. C., Mampel, T., Vinas, O., Giralt, M., Iglesias, R., and Villarroya, F. (1999a). 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.
- Brun, S., Carmona, M. C., Mampel, T., Vinas, O., Giralt, M., Iglesias, R., and Villarroya, F. (1999b). Uncoupling protein-3 gene expression in skeletal muscle during development is regulated by nutritional factors that alter circulating non-esterified fatty acids. *FEBS Lett* 453, 205-209.
- Buchebner, M., Pfeifer, T., Rathke, N., Chandak, P. G., Lass, A., Schreiber, R., Kratzer, A., Zimmermann, R., Sattler, W., Koefeler, H., *et al.* (2010). Cholesteryl ester hydrolase activity is abolished in HSL $^{-/-}$  macrophages but unchanged in macrophages lacking KIAA1363. *J Lipid Res.*
- Bugge, A., Siersbaek, M., Madsen, M. S., Gondor, A., Rougier, C., and Mandrup, S. (2010). A novel intronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma enhancer in the uncoupling protein (UCP) 3 gene as a regulator of both UCP2 and -3 expression in adipocytes. *J Biol Chem* 285, 17310-17317.

## C

- Cabrero, A., Alegret, M., Sanchez, R., Adzet, T., Laguna, J. C., and Vazquez, M. (2001). Uncoupling protein-3 mRNA up-regulation in C2C12 myotubes after etomoxir treatment. *Biochim Biophys Acta* 1532, 195-202.
- Cadenas, S., Buckingham, J. A., Samec, S., Seydoux, J., Din, N., Dulloo, A. G., and Brand, M. D. (1999). UCP2 and UCP3 rise in starved rat skeletal muscle but mitochondrial proton conductance is unchanged. *FEBS Lett* 462, 257-260.

- Cadrin, M., Tolszczuk, M., Guy, J., Pelletier, G., Freeman, K. B., and Bukowiecki, L. J. (1985). Immunohistochemical identification of the uncoupling protein in rat brown adipose tissue. *J Histochem Cytochem* 33, 150-154.
- Camp, S., De Jaco, A., Zhang, L., Marquez, M., De la Torre, B., and Taylor, P. (2008). Acetylcholinesterase expression in muscle is specifically controlled by a promoter-selective enhancer in the first intron. *J Neurosci* 28, 2459-2470.
- Cao, H., Gerhold, K., Mayers, J. R., Wiest, M. M., Watkins, S. M., and Hotamisligil, G. S. (2008). Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. *Cell* 134, 933-944.
- Cao, J., Cheng, L., and Shi, Y. (2007). Catalytic properties of MGAT3, a putative triacylglycerol synthase. *J Lipid Res* 48, 583-591.
- Carroll, A. M., Haines, L. R., Pearson, T. W., Fallon, P. G., Walsh, C. M., Brennan, C. M., Breen, E. P., and Porter, R. K. (2005). Identification of a functioning mitochondrial uncoupling protein 1 in thymus. *J Biol Chem* 280, 15534-15543.
- Chan, C. B., De Leo, D., Joseph, J. W., McQuaid, T. S., Ha, X. F., Xu, F., Tsushima, R. G., Pennefather, P. S., Salapatek, A. M., and Wheeler, M. B. (2001). Increased uncoupling protein-2 levels in beta-cells are associated with impaired glucose-stimulated insulin secretion: mechanism of action. *Diabetes* 50, 1302-1310.
- Chan, R. Y., Boudreau-Lariviere, C., Angus, L. M., Mankal, F. A., and Jasmin, B. J. (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.
- Chandak, P. G., Radovic, B., Aflaki, E., Kolb, D., Buchebner, M., Frohlich, E., Magnes, C., Sinner, F., Haemmerle, G., Zechner, R., *et al.* (2010). Efficient phagocytosis requires triacylglycerol hydrolysis by adipose triglyceride lipase. *J Biol Chem* 285, 20192-20201.
- Chang, C. S., Sun, H. L., Lii, C. K., Chen, H. W., Chen, P. Y., and Liu, K. L. (2010). Gamma-linolenic acid inhibits inflammatory responses by regulating NF-kappaB and AP-1 activation in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. *Inflammation* 33, 46-57.
- Chavez, J. A., and Summers, S. A. (2010). Lipid oversupply, selective insulin resistance, and lipotoxicity: molecular mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1801, 252-265.
- Chen, A., Mumick, S., Zhang, C., Lamb, J., Dai, H., Weingarh, D., Mudgett, J., Chen, H., MacNeil, D. J., Reitman, M. L., and Qian, S. (2005). Diet induction of monocyte chemoattractant protein-1 and its impact on obesity. *Obes Res* 13, 1311-1320.
- Chevillotte, E., Rieusset, J., Roques, M., Desage, M., and 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.
- Choi, Y. S., Cha, S. M., Lee, Y. Y., Kwon, S. W., Park, C. J., and Kim, M. (2006). Adipogenic differentiation of adipose tissue derived adult stem cells in nude mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 345, 631-637.
- Cinti, S. (2009). Reversible physiological transdifferentiation in the adipose organ. *Proc Nutr Soc* 68, 340-349.
- Cinti, S., Mitchell, G., Barbatelli, G., Murano, I., Ceresi, E., Faloia, E., Wang, S., Fortier, M., Greenberg, A. S., and Obin, M. S. (2005). Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res* 46, 2347-2355.
- Cioffi, F., Senese, R., de Lange, P., Goglia, F., Lanni, A., and Lombardi, A. (2009). Uncoupling proteins: a complex journey to function discovery. *Biofactors* 35, 417-428.
- Claus, T. H., Lowe, D. B., Liang, Y., Salhanick, A. I., Lubeski, C. K., Yang, L., Lemoine, L., Zhu, J., and Clairmont, K. B. (2005). Specific inhibition of hormone-sensitive lipase improves lipid profile while reducing plasma glucose. *J Pharmacol Exp Ther* 315, 1396-1402.

- Clement, K., Viguerie, N., Diehn, M., Alizadeh, A., Barbe, P., Thalamas, C., Storey, J. D., Brown, P. O., Barsh, G. S., and Langin, D. (2002). In vivo regulation of human skeletal muscle gene expression by thyroid hormone. *Genome Res* 12, 281-291.
- Cohen, T. V., and Randall, W. R. (2006). The regulation of acetylcholinesterase by cis-elements within intron I in cultured contracting myotubes. *J Neurochem* 98, 723-734.
- Coleman, R., and Bell, R. M. (1976). Triacylglycerol synthesis in isolated fat cells. Studies on the microsomal diacylglycerol acyltransferase activity using ethanol-dispersed diacylglycerols. *J Biol Chem* 251, 4537-4543.
- Coleman, R. A., and Lee, D. P. (2004). Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog Lipid Res* 43, 134-176.
- Collins, S., Cao, W., and Robidoux, J. (2004). Learning new tricks from old dogs: beta-adrenergic receptors teach new lessons on firing up adipose tissue metabolism. *Mol Endocrinol* 18, 2123-2131.
- Comuzzie, A. G., Almasy, L., Cole, S. A., Boss, O., Giacobino, J. P., Muzzin, P., Stern, M. P., MacCluer, J. W., Blangero, J., and Hixson, J. E. (2000). 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* 24, 1065-1068.
- Cortright, R. N., Zheng, D., Jones, J. P., Fluckey, J. D., DiCarlo, S. E., Grujic, D., Lowell, B. B., and Dohm, G. L. (1999). Regulation of skeletal muscle UCP-2 and UCP-3 gene expression by exercise and denervation. *Am J Physiol* 276, E217-221.
- Costford, S. R., Chaudhry, S. N., Crawford, S. A., Salkhordeh, M., and Harper, M. E. (2008). Long-term high-fat feeding induces greater fat storage in mice lacking UCP3. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295, E1018-1024.
- Cusin, I., Zakrzewska, K. E., Boss, O., Muzzin, P., Giacobino, J. P., Ricquier, D., Jeanrenaud, B., and Rohner-Jeanrenaud, F. (1998). Chronic central leptin infusion enhances insulin-stimulated glucose metabolism and favors the expression of uncoupling proteins. *Diabetes* 47, 1014-1019.
- Cypess, A. M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A. B., Kuo, F. C., Palmer, E. L., Tseng, Y. H., Doria, A., *et al.* (2009). Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med* 360, 1509-1517.

## D

- Das, U. N. (2006). Essential Fatty acids - a review. *Curr Pharm Biotechnol* 7, 467-482.
- De Jaco, A., Camp, S., and Taylor, P. (2005). Influence of the 5' intron in the control of acetylcholinesterase gene expression during myogenesis. *Chem Biol Interact* 157-158, 372-373.
- de Lange, P., Feola, A., Ragni, M., Senese, R., Moreno, M., Lombardi, A., Silvestri, E., Amat, R., Villarroya, F., Goglia, F., and Lanni, A. (2007). Differential 3,5,3'-triiodothyronine-mediated regulation of uncoupling protein 3 transcription: role of Fatty acids. *Endocrinology* 148, 4064-4072.
- de Luca, C., and Olefsky, J. M. (2008). Inflammation and insulin resistance. *FEBS Lett* 582, 97-105.
- De Matteis, R., Zingaretti, M. C., Murano, I., Vitali, A., Frontini, A., Giannulis, I., Barbatelli, G., Marcucci, F., Bordicchia, M., Sarzani, R., *et al.* (2009). In vivo physiological transdifferentiation of adult adipose cells. *Stem Cells* 27, 2761-2768.
- Deng, Z. B., Poliakov, A., Hardy, R. W., Clements, R., Liu, C., Liu, Y., Wang, J., Xiang, X., Zhang, S., Zhuang, X., *et al.* (2009). Adipose tissue exosome-like vesicles mediate activation of macrophage-induced insulin resistance. *Diabetes* 58, 2498-2505.

- Denjean, F., Desplanches, D., Lachuer, J., Cohen-Adad, F., Mayet, M. H., and Duchamp, C. (1999). Muscle-specific up-regulation of rat UCP3 mRNA expression by long-term hindlimb unloading. *Biochem Biophys Res Commun* 266, 518-522.
- Deslex, S., Negrel, R., Vannier, C., Etienne, J., and Ailhaud, G. (1987). Differentiation of human adipocyte precursors in a chemically defined serum-free medium. *Int J Obes* 11, 19-27.
- Dietrich, M. O., and Horvath, T. L. (2010). The role of mitochondrial uncoupling proteins in lifespan. *Pflugers Arch* 459, 269-275.
- Dray, C., Knauf, C., Daviaud, D., Waget, A., Boucher, J., Buleon, M., Cani, P. D., Attane, C., Guigne, C., Carpenne, C., *et al.* (2008). Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Cell Metab* 8, 437-445.
- Ducharme, N. A., and Bickel, P. E. (2008). Lipid droplets in lipogenesis and lipolysis. *Endocrinology* 149, 942-949.
- Duffaut, C., Galitzky, J., Lafontan, M., and Bouloumie, A. (2009a). Unexpected trafficking of immune cells within the adipose tissue during the onset of obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 384, 482-485.
- Duffaut, C., Zakaroff-Girard, A., Bourlier, V., Decaunes, P., Maumus, M., Chiotasso, P., Sengenès, C., Lafontan, M., Galitzky, J., and Bouloumie, A. (2009b). Interplay between human adipocytes and T lymphocytes in obesity: CCL20 as an adipochemokine and T lymphocytes as lipogenic modulators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 1608-1614.

## E

- Echtay, K. S., Esteves, T. C., Pakay, J. L., Jekabsons, M. B., Lambert, A. J., Portero-Otin, M., Pamplona, R., Vidal-Puig, A. J., Wang, S., Roebuck, S. J., and Brand, M. D. (2003). A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling. *Embo J* 22, 4103-4110.
- Echtay, K. S., Roussel, D., St-Pierre, J., Jekabsons, M. B., Cadenas, S., Stuart, J. A., Harper, J. A., Roebuck, S. J., Morrison, A., Pickering, S., *et al.* (2002). Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* 415, 96-99.
- Ehehalt, R., Fullekrug, J., Pohl, J., Ring, A., Herrmann, T., and Stremmel, W. (2006). Translocation of long chain fatty acids across the plasma membrane--lipid rafts and fatty acid transport proteins. *Mol Cell Biochem* 284, 135-140.
- Ehses, J. A., Meier, D. T., Wueest, S., Rytka, J., Boller, S., Wielinga, P. Y., Schraenen, A., Lemaire, K., Debray, S., Van Lommel, L., *et al.* (2010). Toll-like receptor 2-deficient mice are protected from insulin resistance and beta cell dysfunction induced by a high-fat diet. *Diabetologia* 53, 1795-1806.
- Ellis, B. A., Poynten, A., Lowy, A. J., Furler, S. M., Chisholm, D. J., Kraegen, E. W., and Cooney, G. J. (2000). Long-chain acyl-CoA esters as indicators of lipid metabolism and insulin sensitivity in rat and human muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279, E554-560.
- Escary, J. L., Choy, H. A., Reue, K., Wang, X. P., Castellani, L. W., Glass, C. K., Lusic, A. J., and Schotz, M. C. (1999). Paradoxical effect on atherosclerosis of hormone-sensitive lipase overexpression in macrophages. *J Lipid Res* 40, 397-404.
- Esterbauer, H., Oberkofler, H., Dallinger, G., Breban, D., Hell, E., Krempler, F., and Patsch, W. (1999). Uncoupling protein-3 gene expression: reduced skeletal muscle mRNA in obese humans during pronounced weight loss. *Diabetologia* 42, 302-309.
- Esterbauer, H., Oberkofler, H., Krempler, F., Strosberg, A. D., and 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.



Evock-Clover, C. M., Poch, S. M., Richards, M. P., Ashwell, C. M., and McMurtry, J. P. (2002). Expression of an uncoupling protein gene homolog in chickens. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 133, 345-358.

## F

Farese, R. V., Jr., and Walther, T. C. (2009). Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T. *Cell* 139, 855-860.

Feuerer, M., Herrero, L., Cipolletta, D., Naaz, A., Wong, J., Nayer, A., Lee, J., Goldfine, A. B., Benoist, C., Shoelson, S., and Mathis, D. (2009). Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med* 15, 930-939.

Fex, M., Haemmerle, G., Wierup, N., Dekker-Nitert, M., Rehn, M., Ristow, M., Zechner, R., Sundler, F., Holm, C., Eliasson, L., and Mulder, H. (2009). A beta cell-specific knockout of hormone-sensitive lipase in mice results in hyperglycaemia and disruption of exocytosis. *Diabetologia* 52, 271-280.

Fex, M., Olofsson, C. S., Fransson, U., Bacos, K., Lindvall, H., Sorhede-Winzell, M., Rorsman, P., Holm, C., and Mulder, H. (2004). Hormone-sensitive lipase deficiency in mouse islets abolishes neutral cholesterol ester hydrolase activity but leaves lipolysis, acylglycerides, fat oxidation, and insulin secretion intact. *Endocrinology* 145, 3746-3753.

Finck, B. N., Gropler, M. C., Chen, Z., Leone, T. C., Croce, M. A., Harris, T. E., Lawrence, J. C., Jr., and Kelly, D. P. (2006). Lipin 1 is an inducible amplifier of the hepatic PGC-1alpha/PPARalpha regulatory pathway. *Cell Metab* 4, 199-210.

Flandin, P., Lehr, L., Asensio, C., Giacobino, J. P., Rohner-Jeanrenaud, F., Muzzin, P., and Jimenez, M. (2009). Uncoupling protein-3 as a molecular determinant of the action of 3,5,3'-triiodothyronine on energy metabolism. *Endocrine* 36, 246-254.

Fleury, C., Neverova, M., Collins, S., Raimbault, S., Champigny, O., Levi-Meyrueis, C., Bouillaud, F., Seldin, M. F., Surwit, R. S., Ricquier, D., and Warden, C. H. (1997). Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet* 15, 269-272.

Frith, M. C., Fu, Y., Yu, L., Chen, J. F., Hansen, U., and Weng, Z. (2004). Detection of functional DNA motifs via statistical over-representation. *Nucleic Acids Res* 32, 1372-1381.

Fromme, T., Hoffmann, C., Nau, K., Rozman, J., Reichwald, K., Utting, M., Platzer, M., and Klingenspor, M. (2009). An intronic single base exchange leads to a brown adipose tissue-specific loss of Ucp3 expression and an altered body mass trajectory. *Physiol Genomics* 38, 54-62.

Fujisaka, S., Usui, I., Bukhari, A., Icutani, M., Oya, T., Kanatani, Y., Tsuneyama, K., Nagai, Y., Takatsu, K., Urakaze, M., *et al.* (2009). Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice. *Diabetes* 58, 2574-2582.

## G

Gainsford, T., Willson, T. A., Metcalf, D., Handman, E., McFarlane, C., Ng, A., Nicola, N. A., Alexander, W. S., and Hilton, D. J. (1996). Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14564-14568.

Galic, S., Oakhill, J. S., and Steinberg, G. R. (2010). Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol* 316, 129-139.

Giacobino, J. P. (1999). Effects of dietary deprivation, obesity and exercise on UCP3 mRNA levels. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23 Suppl 6, S60-63.

Gimeno, R. E., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Shyjan, A. W., Gimeno, C. J., Iris, F., Ellis, S. J., Woolf, E. A., and Tartaglia, L. A. (1997). Cloning and characterization of an

- uncoupling protein homolog: a potential molecular mediator of human thermogenesis. *Diabetes* 46, 900-906.
- Goglia, F., and Skulachev, V. P. (2003). 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* 17, 1585-1591.
- Gomez-Ambrosi, J., Fruhbeck, G., and Martinez, J. A. (1999). Leptin, but not a beta 3-adrenergic agonist, upregulates muscle uncoupling protein-3 messenger RNA expression: short-term thermogenic interactions. *Cell Mol Life Sci* 55, 992-997.
- Gong, D. W., He, Y., Karas, M., and 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.
- Gong, D. W., He, Y., and Reitman, M. L. (1999). Genomic organization and regulation by dietary fat of the uncoupling protein 3 and 2 genes. *Biochem Biophys Res Commun* 256, 27-32.
- Gong, D. W., Monemdjou, S., Gavrilova, O., Leon, L. R., Marcus-Samuels, B., Chou, C. J., Everett, C., Kozak, L. P., Li, C., Deng, C., *et al.* (2000). Lack of obesity and normal response to fasting and thyroid hormone in mice lacking uncoupling protein-3. *J Biol Chem* 275, 16251-16257.
- Granneman, J. G., Moore, H. P., Krishnamoorthy, R., and Rathod, M. (2009). Perilipin controls lipolysis by regulating the interactions of AB-hydrolase containing 5 (Abhd5) and adipose triglyceride lipase (Atgl). *J Biol Chem* 284, 34538-34544.
- Gu, J. Q., Wang, D. F., Yan, X. G., Zhong, W. L., Zhang, J., Fan, B., and Ikuyama, S. (2010). A Toll-like receptor 9-mediated pathway stimulates perilipin 3 (TIP47) expression and induces lipid accumulation in macrophages. *Am J Physiol Endocrinol Metab*.

## H

- Haemmerle, G., Zimmermann, R., Hayn, M., Theussl, C., Waeg, G., Wagner, E., Sattler, W., Magin, T. M., Wagner, E. F., and Zechner, R. (2002). Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis. *J Biol Chem* 277, 4806-4815.
- Hagen, E., Myhre, A. M., Tjelle, T. E., Berg, T., and Norum, K. R. (1999). Retinyl esters are hydrolyzed in early endosomes of J774 macrophages. *J Lipid Res* 40, 309-317.
- Hanak, P., and Jezek, P. (2001). Mitochondrial uncoupling proteins and phylogenesis--UCP4 as the ancestral uncoupling protein. *FEBS Lett* 495, 137-141.
- Harada, K., Shen, W. J., Patel, S., Natu, V., Wang, J., Osuga, J., Ishibashi, S., and Kraemer, F. B. (2003). Resistance to high-fat diet-induced obesity and altered expression of adipose-specific genes in HSL-deficient mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285, E1182-1195.
- Hauner, H., and Entenmann, G. (1991). Regional variation of adipose differentiation in cultured stromal-vascular cells from the abdominal and femoral adipose tissue of obese women. *Int J Obes* 15, 121-126.
- Hauner, H., Entenmann, G., Wabitsch, M., Gaillard, D., Ailhaud, G., Negrel, R., and Pfeiffer, E. F. (1989). Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J Clin Invest* 84, 1663-1670.
- Hauton, D., and Evans, R. D. (2002). Utilisation of fatty acid and triacylglycerol by rat macrophages: the effect of endotoxin. *Cell Physiol Biochem* 12, 293-304.
- Heaton, G. M., Wagenvoort, R. J., Kemp, A., Jr., and Nicholls, D. G. (1978). Brown-adipose-tissue mitochondria: photoaffinity labelling of the regulatory site of energy dissipation. *Eur J Biochem* 82, 515-521.

- Hesselink, M. K., Keizer, H. A., Borghouts, L. B., Schaart, G., Kornips, C. F., Sliker, L. J., Sloop, K. W., Saris, W. H., and Schrauwen, P. (2001). Protein expression of UCP3 differs between human type 1, type 2a, and type 2b fibers. *Faseb J* 15, 1071-1073.
- Himms-Hagen, J. (1990). Brown adipose tissue thermogenesis: interdisciplinary studies. *Faseb J* 4, 2890-2898.
- Himms-Hagen, J., and Harper, M. E. (2001). Physiological role of UCP3 may be export of fatty acids from mitochondria when fatty acid oxidation predominates: an hypothesis. *Exp Biol Med (Maywood)* 226, 78-84.
- Ho, P. W., Chan, D. Y., Kwok, K. H., Chu, A. C., Ho, J. W., Kung, M. H., Ramsden, D. B., and Ho, S. L. (2005). Methyl-4-phenylpyridinium ion modulates expression of mitochondrial uncoupling proteins 2, 4, and 5 in catecholaminergic (SK-N-SH) cells. *J Neurosci Res* 81, 261-268.
- Ho, P. W., Chu, A. C., Kwok, K. H., Kung, M. H., Ramsden, D. B., and Ho, S. L. (2006). Knockdown of uncoupling protein-5 in neuronal SH-SY5Y cells: Effects on MPP<sup>+</sup>-induced mitochondrial membrane depolarization, ATP deficiency, and oxidative cytotoxicity. *J Neurosci Res* 84, 1358-1366.
- Hoeks, J., Hesselink, M. K., van Bilsen, M., Schaart, G., van der Vusse, G. J., Saris, W. H., and Schrauwen, P. (2003). Differential response of UCP3 to medium versus long chain triacylglycerols; manifestation of a functional adaptation. *FEBS Lett* 555, 631-637.
- Holland, W. L., and Summers, S. A. (2008). Sphingolipids, insulin resistance, and metabolic disease: new insights from in vivo manipulation of sphingolipid metabolism. *Endocr Rev* 29, 381-402.
- Hotamisligil, G. S. (2010). Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell* 140, 900-917.
- Hotamisligil, G. S., Peraldi, P., Budavari, A., Ellis, R., White, M. F., and Spiegelman, B. M. (1996). IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- $\alpha$ - and obesity-induced insulin resistance. *Science* 271, 665-668.
- Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S., and Spiegelman, B. M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259, 87-91.
- Hoy, A. J., Brandon, A. E., Turner, N., Watt, M. J., Bruce, C. R., Cooney, G. J., and Kraegen, E. W. (2009). Lipid and insulin infusion-induced skeletal muscle insulin resistance is likely due to metabolic feedback and not changes in IRS-1, Akt, or AS160 phosphorylation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297, E67-75.
- Hwang, C. S., and Lane, M. D. (1999). Up-regulation of uncoupling protein-3 by fatty acid in C2C12 myotubes. *Biochem Biophys Res Commun* 258, 464-469.
- Ilan, Y., Maron, R., Tukpah, A. M., Maioli, T. U., Murugaiyan, G., Yang, K., Wu, H. Y., and Weiner, H. L. (2010). Induction of regulatory T cells decreases adipose inflammation and alleviates insulin resistance in ob/ob mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 9765-9770.
- Inouye, K. E., Shi, H., Howard, J. K., Daly, C. H., Lord, G. M., Rollins, B. J., and Flier, J. S. (2007). Absence of CC chemokine ligand 2 does not limit obesity-associated infiltration of macrophages into adipose tissue. *Diabetes* 56, 2242-2250.
- Iossa, S., Lionetti, L., Mollica, M. P., Crescenzo, R., Botta, M., Samec, S., Dulloo, A. G., and Liverini, G. (2001). 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* 505, 53-56.
- Ito, A., Suganami, T., Yamauchi, A., Degawa-Yamauchi, M., Tanaka, M., Kouyama, R., Kobayashi, Y., Nitta, N., Yasuda, K., Hirata, Y., *et al.* (2008). Role of CC chemokine receptor

2 in bone marrow cells in the recruitment of macrophages into obese adipose tissue. *J Biol Chem* 283, 35715-35723.

## J

Jaburek, M., Miyamoto, S., Di Mascio, P., Garlid, K. D., and Jezek, P. (2004). Hydroperoxy fatty acid cycling mediated by mitochondrial uncoupling protein UCP2. *J Biol Chem* 279, 53097-53102.

Jacobsson, A., Stadler, U., Glotzer, M. A., and Kozak, L. P. (1985). Mitochondrial uncoupling protein from mouse brown fat. Molecular cloning, genetic mapping, and mRNA expression. *J Biol Chem* 260, 16250-16254.

Jakus, P. B., Sipos, K., Kispal, G., and Sandor, A. (2002). Opposite regulation of uncoupling protein 1 and uncoupling protein 3 in vivo in brown adipose tissue of cold-exposed rats. *FEBS Lett* 519, 210-214.

Jarmuszkiewicz, W., Milani, G., Fortes, F., Schreiber, A. Z., Sluse, F. E., and Vercesi, A. E. (2000). First evidence and characterization of an uncoupling protein in fungi kingdom: CpUCP of *Candida parapsilosis*. *FEBS Lett* 467, 145-149.

Jarmuszkiewicz, W., Sluse-Goffart, C. M., Hryniewiecka, L., and Sluse, F. E. (1999). Identification and characterization of a protozoan uncoupling protein in *Acanthamoeba castellanii*. *J Biol Chem* 274, 23198-23202.

Jaworski, K., Ahmadian, M., Duncan, R. E., Sarkadi-Nagy, E., Varady, K. A., Hellerstein, M. K., Lee, H. Y., Samuel, V. T., Shulman, G. I., Kim, K. H., *et al.* (2009). AdPLA ablation increases lipolysis and prevents obesity induced by high-fat feeding or leptin deficiency. *Nat Med* 15, 159-168.

Jenkins, C. M., Mancuso, D. J., Yan, W., Sims, H. F., Gibson, B., and Gross, R. W. (2004). Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. *J Biol Chem* 279, 48968-48975.

Jia, J. J., Zhang, X., Ge, C. R., and Jois, M. (2009). The polymorphisms of UCP2 and UCP3 genes associated with fat metabolism, obesity and diabetes. *Obes Rev* 10, 519-526.

Jimenez, M., Yvon, C., Lehr, L., Leger, B., Keller, P., Russell, A., Kuhne, F., Flandin, P., Giacobino, J. P., and Muzzin, P. (2002). Expression of uncoupling protein-3 in subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria of various mouse muscle types and its modulation by fasting. *Eur J Biochem* 269, 2878-2884.

Jocken, J. W., Langin, D., Smit, E., Saris, W. H., Valle, C., Hul, G. B., Holm, C., Arner, P., and Blaak, E. E. (2007). Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase protein expression is decreased in the obese insulin-resistant state. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 2292-2299.

Jucker, B. M., Dufour, S., Ren, J., Cao, X., Previs, S. F., Underhill, B., Cadman, K. S., and Shulman, G. I. (2000). Assessment of mitochondrial energy coupling in vivo by <sup>13</sup>C/<sup>31</sup>P NMR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6880-6884.

## K

Kamei, N., Tobe, K., Suzuki, R., Ohsugi, M., Watanabe, T., Kubota, N., Ohtsuka-Kowatari, N., Kumagai, K., Sakamoto, K., Kobayashi, M., *et al.* (2006). Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J Biol Chem* 281, 26602-26614.

Kanda, H., Tateya, S., Tamori, Y., Kotani, K., Hiasa, K., Kitazawa, R., Kitazawa, S., Miyachi, H., Maeda, S., Egashira, K., and Kasuga, M. (2006). MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* 116, 1494-1505.

- Kang, K., Reilly, S. M., Karabacak, V., Gangl, M. R., Fitzgerald, K., Hatano, B., and Lee, C. H. (2008). Adipocyte-derived Th2 cytokines and myeloid PPARdelta regulate macrophage polarization and insulin sensitivity. *Cell Metab* 7, 485-495.
- Keophiphath, M., Achard, V., Henegar, C., Rouault, C., Clement, K., and Lacasa, D. (2009). Macrophage-secreted factors promote a profibrotic phenotype in human preadipocytes. *Mol Endocrinol* 23, 11-24.
- Keophiphath, M., Rouault, C., Divoux, A., Clement, K., and Lacasa, D. (2010). CCL5 promotes macrophage recruitment and survival in human adipose tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30, 39-45.
- Kersten, S., Seydoux, J., Peters, J. M., Gonzalez, F. J., Desvergne, B., and Wahli, W. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest* 103, 1489-1498.
- Khalfallah, Y., Fages, S., Laville, M., Langin, D., and 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.
- Khoo, J. C., Vance, J. E., Mahoney, E. M., Jensen, D., Wancewicz, E., and Steinberg, D. (1984). Neutral triglyceride lipase in macrophages. *Arteriosclerosis* 4, 34-40.
- Kiefer, F. W., Zeyda, M., Gollinger, K., Pfau, B., Neuhofer, A., Weichhart, T., Saemann, M. D., Geyeregger, R., Schleder, M., Kenner, L., and Stulnig, T. M. (2010). Neutralization of osteopontin inhibits obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Diabetes* 59, 935-946.
- Kiefer, F. W., Zeyda, M., Todoric, J., Huber, J., Geyeregger, R., Weichhart, T., Aszmann, O., Ludvik, B., Silberhumer, G. R., Prager, G., and Stulnig, T. M. (2008). Osteopontin expression in human and murine obesity: extensive local up-regulation in adipose tissue but minimal systemic alterations. *Endocrinology* 149, 1350-1357.
- Kienesberger, P. C., Lee, D., Pulinkunnil, T., Brenner, D. S., Cai, L., Magnes, C., Koefeler, H. C., Streith, I. E., Rechberger, G. N., Haemmerle, G., *et al.* (2009). Adipose triglyceride lipase deficiency causes tissue-specific changes in insulin signaling. *J Biol Chem* 284, 30218-30229.
- Kiens, B. (2006). Skeletal muscle lipid metabolism in exercise and insulin resistance. *Physiol Rev* 86, 205-243.
- Kim-Han, J. S., Reichert, S. A., Quick, K. L., and Dugan, L. L. (2001). BMCP1: a mitochondrial uncoupling protein in neurons which regulates mitochondrial function and oxidant production. *J Neurochem* 79, 658-668.
- Kim, D. J., Oh, B., and Kim, Y. Y. (2009). Splicing factor ASF/SF2 and transcription factor PPAR-gamma cooperate to directly regulate transcription of uncoupling protein-3. *Biochem Biophys Res Commun* 378, 877-882.
- Kim, F., Pham, M., Luttrell, I., Bannerman, D. D., Tupper, J., Thaler, J., Hawn, T. R., Raines, E. W., and Schwartz, M. W. (2007). Toll-like receptor-4 mediates vascular inflammation and insulin resistance in diet-induced obesity. *Circ Res* 100, 1589-1596.
- Kim, J., and Hematti, P. (2009). Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages. *Exp Hematol* 37, 1445-1453.
- Kintscher, U., Hartge, M., Hess, K., Foryst-Ludwig, A., Clemenz, M., Wabitsch, M., Fischer-Posovszky, P., Barth, T. F., Dragun, D., Skurk, T., *et al.* (2008). T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 1304-1310.
- Kirk, E. A., Sagawa, Z. K., McDonald, T. O., O'Brien, K. D., and Heinecke, J. W. (2008). Monocyte chemoattractant protein deficiency fails to restrain macrophage infiltration into adipose tissue [corrected]. *Diabetes* 57, 1254-1261.

- Kirkland, J. L., Hollenberg, C. H., and Gillon, W. S. (1990). Age, anatomic site, and the replication and differentiation of adipocyte precursors. *Am J Physiol* 258, C206-210.
- Kishida, K., Kuriyama, H., Funahashi, T., Shimomura, I., Kihara, S., Ouchi, N., Nishida, M., Nishizawa, H., Matsuda, M., Takahashi, M., *et al.* (2000). Aquaporin adipose, a putative glycerol channel in adipocytes. *J Biol Chem* 275, 20896-20902.
- Kishida, K., Shimomura, I., Kondo, H., Kuriyama, H., Makino, Y., Nishizawa, H., Maeda, N., Matsuda, M., Ouchi, N., Kihara, S., *et al.* (2001). Genomic structure and insulin-mediated repression of the aquaporin adipose (AQPap), adipose-specific glycerol channel. *J Biol Chem* 276, 36251-36260.
- Klaus, S., Munzberg, H., Truloff, C., and Heldmaier, G. (1998). Physiology of transgenic mice with brown fat ablation: obesity is due to lowered body temperature. *Am J Physiol* 274, R287-293.
- Knauf, C., Cani, P. D., Perrin, C., Iglesias, M. A., Maury, J. F., Bernard, E., Benhamed, F., Gremeaux, T., Drucker, D. J., Kahn, C. R., *et al.* (2005). Brain glucagon-like peptide-1 increases insulin secretion and muscle insulin resistance to favor hepatic glycogen storage. *J Clin Invest* 115, 3554-3563.
- Kohli, P., and Levy, B. D. (2009). Resolvins and protectins: mediating solutions to inflammation. *Br J Pharmacol* 158, 960-971.
- Kolb, H., and Mandrup-Poulsen, T. (2005). An immune origin of type 2 diabetes? *Diabetologia* 48, 1038-1050.
- Koliwad, S. K., Streeper, R. S., Monetti, M., Cornelissen, I., Chan, L., Terayama, K., Naylor, S., Rao, M., Hubbard, B., and Farese, R. V., Jr. (2010). DGAT1-dependent triacylglycerol storage by macrophages protects mice from diet-induced insulin resistance and inflammation. *J Clin Invest* 120, 756-767.
- Koo, S. H., Satoh, H., Herzig, S., Lee, C. H., Hedrick, S., Kulkarni, R., Evans, R. M., Olefsky, J., and Montminy, M. (2004). PGC-1 promotes insulin resistance in liver through PPAR-alpha-dependent induction of TRB-3. *Nat Med* 10, 530-534.
- Korshunov, S. S., Skulachev, V. P., and Starkov, A. A. (1997). High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett* 416, 15-18.
- Koves, T. R., Li, P., An, J., Akimoto, T., Slentz, D., Ilkayeva, O., Dohm, G. L., Yan, Z., Newgard, C. B., and Muoio, D. M. (2005). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1alpha-mediated metabolic remodeling of skeletal myocytes mimics exercise training and reverses lipid-induced mitochondrial inefficiency. *J Biol Chem* 280, 33588-33598.
- Koves, T. R., Ussher, J. R., Noland, R. C., Slentz, D., Mosedale, M., Ilkayeva, O., Bain, J., Stevens, R., Dyck, J. R., Newgard, C. B., *et al.* (2008). Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. *Cell Metab* 7, 45-56.
- Kraemer, F. B., Patel, S., Saedi, M. S., and Sztalryd, C. (1993). Detection of hormone-sensitive lipase in various tissues. I. Expression of an HSL/bacterial fusion protein and generation of anti-HSL antibodies. *J Lipid Res* 34, 663-671.
- Kraemer, F. B., and Shen, W. J. (2006). Hormone-sensitive lipase knockouts. *Nutr Metab (Lond)* 3, 12.
- Krauss, S., Zhang, C. Y., Scorrano, L., Dalgaard, L. T., St-Pierre, J., Grey, S. T., and Lowell, B. B. (2003). Superoxide-mediated activation of uncoupling protein 2 causes pancreatic beta cell dysfunction. *J Clin Invest* 112, 1831-1842.
- Krook, A., Digby, J., O'Rahilly, S., Zierath, J. R., and Wallberg-Henriksson, H. (1998). Uncoupling protein 3 is reduced in skeletal muscle of NIDDM patients. *Diabetes* 47, 1528-1531.

Kurokawa, J., Arai, S., Nakashima, K., Nagano, H., Nishijima, A., Miyata, K., Ose, R., Mori, M., Kubota, N., Kadowaki, T., *et al.* (2010). Macrophage-derived AIM is endocytosed into adipocytes and decreases lipid droplets via inhibition of fatty acid synthase activity. *Cell Metab* 11, 479-492.

## L

Lacasa, D., Taleb, S., Keophiphath, M., Miranville, A., and Clement, K. (2007). Macrophage-secreted factors impair human adipogenesis: involvement of proinflammatory state in preadipocytes. *Endocrinology* 148, 868-877.

Lafontan, M. (2008). Advances in adipose tissue metabolism. *Int J Obes (Lond)* 32 *Suppl* 7, S39-51.

Lafontan, M., and Berlan, M. (1993). Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *J Lipid Res* 34, 1057-1091.

Laloi, M., Klein, M., Riesmeier, J. W., Muller-Rober, B., Fleury, C., Bouillaud, F., and Ricquier, D. (1997). A plant cold-induced uncoupling protein. *Nature* 389, 135-136.

Langin, D. (2006). Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome. *Pharmacol Res* 53, 482-491.

Langin, D. (2010). Recruitment of brown fat and conversion of white into brown adipocytes: strategies to fight the metabolic complications of obesity? *Biochim Biophys Acta* 1801, 372-376.

Langin, D., Dicker, A., Tavernier, G., Hoffstedt, J., Mairal, A., Ryden, M., Arner, E., Sicard, A., Jenkins, C. M., Viguerie, N., *et al.* (2005). Adipocyte lipases and defect of lipolysis in human obesity. *Diabetes* 54, 3190-3197.

Langin, D., Larrouy, D., Barbe, P., Millet, L., Viguerie-Bascands, N., Andreelli, F., Laville, M., and Vidal, H. (1999). Uncoupling protein-2 (UCP2) and uncoupling protein-3 (UCP3) expression in adipose tissue and skeletal muscle in humans. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23 *Suppl* 6, S64-67.

Lanouette, C. M., Giacobino, J. P., Perusse, L., Lacaille, M., Yvon, C., Chagnon, M., Kuhne, F., Bouchard, C., Muzzin, P., and Chagnon, Y. C. (2001). Association between uncoupling protein 3 gene and obesity-related phenotypes in the Quebec Family Study. *Mol Med* 7, 433-441.

Large, V., Peroni, O., Letexier, D., Ray, H., and Beylot, M. (2004). Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes Metab* 30, 294-309.

Large, V., Reynisdottir, S., Langin, D., Fredby, K., Klannemark, M., Holm, C., and Arner, P. (1999). Decreased expression and function of adipocyte hormone-sensitive lipase in subcutaneous fat cells of obese subjects. *J Lipid Res* 40, 2059-2066.

Larkin, S., Mull, E., Miao, W., Pittner, R., Albrandt, K., Moore, C., Young, A., Denaro, M., and Beaumont, K. (1997). Regulation of the third member of the uncoupling protein family, UCP3, by cold and thyroid hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 240, 222-227.

Larsson, L., Sjodin, B., and Karlsson, J. (1978). Histochemical and biochemical changes in human skeletal muscle with age in sedentary males, age 22--65 years. *Acta Physiol Scand* 103, 31-39.

Lass, A., Zimmermann, R., Haemmerle, G., Riederer, M., Schoiswohl, G., Schweiger, M., Kienesberger, P., Strauss, J. G., Gorkiewicz, G., and Zechner, R. (2006). Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell Metab* 3, 309-319.

Lengacher, S., Magistretti, P. J., and Pellerin, L. (2004). Quantitative rt-PCR analysis of uncoupling protein isoforms in mouse brain cortex: methodological optimization and comparison of expression with brown adipose tissue and skeletal muscle. *J Cereb Blood Flow Metab* 24, 780-788.

- Leuwer, M., Welters, I., Marx, G., Rushton, A., Bao, H., Hunter, L., and Trayhurn, P. (2009). Endotoxaemia leads to major increases in inflammatory adipokine gene expression in white adipose tissue of mice. *Pflugers Arch* 457, 731-741.
- Lexell, J., Taylor, C. C., and Sjoström, M. (1988). What is the cause of the ageing atrophy? Total number, size and proportion of different fiber types studied in whole vastus lateralis muscle from 15- to 83-year-old men. *J Neurol Sci* 84, 275-294.
- Li, L. O., Klett, E. L., and Coleman, R. A. (2010a). Acyl-CoA synthesis, lipid metabolism and lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 1801, 246-251.
- Li, P., and Hotamisligil, G. S. (2010). Metabolism: Host and microbes in a pickle. *Nature* 464, 1287-1288.
- Li, P., Lu, M., Nguyen, M. T., Bae, E. J., Chapman, J., Feng, D., Hawkins, M., Pessin, J. E., Sears, D. D., Nguyen, A. K., *et al.* (2010b). Functional heterogeneity of CD11c-positive adipose tissue macrophages in diet-induced obese mice. *J Biol Chem* 285, 15333-15345.
- Lin, B., Coughlin, S., and Pilch, P. F. (1998). Bidirectional regulation of uncoupling protein-3 and GLUT-4 mRNA in skeletal muscle by cold. *Am J Physiol* 275, E386-391.
- Liu, G., Ma, H., Qiu, L., Li, L., Cao, Y., Ma, J., and Zhao, Y. (2010). Phenotypic and functional switch of macrophages induced by regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in mice. *Immunol Cell Biol*.
- Liu, Y. J., Liu, P. Y., Long, J., Lu, Y., Elze, L., Recker, R. R., and Deng, H. W. (2005). Linkage and association analyses of the UCP3 gene with obesity phenotypes in Caucasian families. *Physiol Genomics* 22, 197-203.
- Loffreda, S., Yang, S. Q., Lin, H. Z., Karp, C. L., Brengman, M. L., Wang, D. J., Klein, A. S., Bulkley, G. B., Bao, C., Noble, P. W., *et al.* (1998). Leptin regulates proinflammatory immune responses. *Faseb J* 12, 57-65.
- Lombardi, A., Busiello, R. A., Napolitano, L., Cioffi, F., Moreno, M., de Lange, P., Silvestri, E., Lanni, A., and Goglia, F. (2010). UCP3 translocates lipid hydroperoxide and mediates lipid hydroperoxide-dependent mitochondrial uncoupling. *J Biol Chem* 285, 16599-16605.
- Lovren, F., Pan, Y., Quan, A., Szmítko, P. E., Singh, K. K., Shukla, P. C., Gupta, M., Chan, L., Al-Omran, M., Teoh, H., and Verma, S. (2010). Adiponectin Primes Human Monocytes into Alternative Anti-inflammatory M2 Macrophages. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*.
- Lumeng, C. N., Bodzin, J. L., and Saltiel, A. R. (2007a). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 117, 175-184.
- Lumeng, C. N., Deyoung, S. M., Bodzin, J. L., and Saltiel, A. R. (2007b). Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes* 56, 16-23.

## M

- Maingrette, F., and Renier, G. (2003). Leptin increases lipoprotein lipase secretion by macrophages: involvement of oxidative stress and protein kinase C. *Diabetes* 52, 2121-2128.
- Mairal, A., Langin, D., Arner, P., and Hoffstedt, J. (2006). Human adipose triglyceride lipase (PNPLA2) is not regulated by obesity and exhibits low in vitro triglyceride hydrolase activity. *Diabetologia* 49, 1629-1636.
- Malhi, H., and Gores, G. J. (2008). Molecular mechanisms of lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis* 28, 360-369.
- Mao, W., Yu, X. X., Zhong, A., Li, W., Brush, J., Sherwood, S. W., Adams, S. H., and Pan, G. (1999). UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells. *FEBS Lett* 443, 326-330.
- Marshall, P., Chartrand, N., De Repentigny, Y., Kothary, R., Pelletier, L., Mueller, R., and Worton, R. G. (2002). Mouse dystrophin enhancer preferentially targets lacZ expression in skeletal and cardiac muscle. *Dev Dyn* 224, 30-38.



- Masaki, T., Yoshimatsu, H., Chiba, S., and Sakata, T. (2000a). Impaired response of UCP family to cold exposure in diabetic (db/db) mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279, R1305-1309.
- Masaki, T., Yoshimatsu, H., and Sakata, T. (2000b). Expression of rat uncoupling protein family mRNA levels by chronic treatment with thyroid hormone. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24 Suppl 2, S162-164.
- Matthias, A., Jacobsson, A., Cannon, B., and Nedergaard, J. (1999). The bioenergetics of brown fat mitochondria from UCP1-ablated mice. Ucp1 is not involved in fatty acid-induced de-energization ("uncoupling"). *J Biol Chem* 274, 28150-28160.
- Maury, E., and Brichard, S. M. (2010). Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol* 314, 1-16.
- Millet, L., Vidal, H., Andreelli, F., Larrouy, D., Riou, J. P., Ricquier, D., Laville, M., and Langin, D. (1997). Increased uncoupling protein-2 and -3 mRNA expression during fasting in obese and lean humans. *J Clin Invest* 100, 2665-2670.
- Millet, L., Vidal, H., Larrouy, D., Andreelli, F., Laville, M., and Langin, D. (1998). mRNA expression of the long and short forms of uncoupling protein-3 in obese and lean humans. *Diabetologia* 41, 829-832.
- Mills, E. M., Banks, M. L., Sprague, J. E., and Finkel, T. (2003). Pharmacology: uncoupling the agony from ecstasy. *Nature* 426, 403-404.
- Miyoshi, H., Souza, S. C., Zhang, H. H., Strissel, K. J., Christoffolete, M. A., Kovsan, J., Rudich, A., Kraemer, F. B., Bianco, A. C., Obin, M. S., and Greenberg, A. S. (2006). Perilipin promotes hormone-sensitive lipase-mediated adipocyte lipolysis via phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem* 281, 15837-15844.
- Moore, G. B., Himms-Hagen, J., Harper, M. E., and Clapham, J. C. (2001). Overexpression of UCP-3 in skeletal muscle of mice results in increased expression of mitochondrial thioesterase mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 283, 785-790.
- Moreno, M., Lombardi, A., De Lange, P., Silvestri, E., Ragni, M., Lanni, A., and Goglia, F. (2003). Fasting, lipid metabolism, and triiodothyronine in rat gastrocnemius muscle: interrelated roles of uncoupling protein 3, mitochondrial thioesterase, and coenzyme Q. *Faseb J* 17, 1112-1114.
- Moro, C., Galgani, J. E., Luu, L., Pasarica, M., Mairal, A., Bajpeyi, S., Schmitz, G., Langin, D., Liebisch, G., and Smith, S. R. (2009). Influence of gender, obesity, and muscle lipase activity on intramyocellular lipids in sedentary individuals. *J Clin Endocrinol Metab* 94, 3440-3447.
- Mosser, D. M., and Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8, 958-969.
- Mottillo, E. P., Shen, X. J., and Granneman, J. G. (2007). Role of hormone-sensitive lipase in beta-adrenergic remodeling of white adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293, E1188-1197.
- Mottillo, E. P., Shen, X. J., and Granneman, J. G. (2010). beta3-adrenergic receptor induction of adipocyte inflammation requires lipolytic activation of stress kinases p38 and JNK. *Biochim Biophys Acta* 1801, 1048-1055.
- Mozo, J., Ferry, G., Studeny, A., Pecqueur, C., Rodriguez, M., Boutin, J. A., and Bouillaud, F. (2006). Expression of UCP3 in CHO cells does not cause uncoupling, but controls mitochondrial activity in the presence of glucose. *Biochem J* 393, 431-439.
- Muoio, D. M. (2010). Intramuscular triacylglycerol and insulin resistance: guilty as charged or wrongly accused? *Biochim Biophys Acta* 1801, 281-288.
- Muoio, D. M., MacLean, P. S., Lang, D. B., Li, S., Houmard, J. A., Way, J. M., Winegar, D. A., Corton, J. C., Dohm, G. L., and Kraus, W. E. (2002). 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* 277, 26089-26097.

Murano, I., Barbatelli, G., Parisani, V., Latini, C., Muzzonigro, G., Castellucci, M., and Cinti, S. (2008). Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice. *J Lipid Res* 49, 1562-1568.

## N

Nagase, I., Yoshida, S., Canas, X., Irie, Y., Kimura, K., Yoshida, T., and Saito, M. (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.

Nedergaard, J., Bengtsson, T., and Cannon, B. (2007). Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293, E444-452.

Nguyen, M. T., Favelyukis, S., Nguyen, A. K., Reichart, D., Scott, P. A., Jenn, A., Liu-Bryan, R., Glass, C. K., Neels, J. G., and Olefsky, J. M. (2007). A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J Biol Chem* 282, 35279-35292.

Nicholls, D. G., Snelling, R., and Rial, E. (1984). Proton and calcium circuits across the mitochondrial inner membrane. *Biochem Soc Trans* 12, 388-390.

Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Eto, K., Yamashita, H., Ohsugi, M., Otsu, M., Hara, K., Ueki, K., Sugiura, S., *et al.* (2009). CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med* 15, 914-920.

Nishino, N., Tamori, Y., Tateya, S., Kawaguchi, T., Shibakusa, T., Mizunoya, W., Inoue, K., Kitazawa, R., Kitazawa, S., Matsuki, Y., *et al.* (2008). FSP27 contributes to efficient energy storage in murine white adipocytes by promoting the formation of unilocular lipid droplets. *J Clin Invest* 118, 2808-2821.

Noland, R. C., Koves, T. R., Seiler, S. E., Lum, H., Lust, R. M., Ilkayeva, O., Stevens, R. D., Hegardt, F. G., and Muoio, D. M. (2009). Carnitine insufficiency caused by aging and overnutrition compromises mitochondrial performance and metabolic control. *J Biol Chem* 284, 22840-22852.

Nomiyama, T., Perez-Tilve, D., Ogawa, D., Gizard, F., Zhao, Y., Heywood, E. B., Jones, K. L., Kawamori, R., Cassis, L. A., Tschop, M. H., and Bruemmer, D. (2007). Osteopontin mediates obesity-induced adipose tissue macrophage infiltration and insulin resistance in mice. *J Clin Invest* 117, 2877-2888.

Nordfors, L., Hoffstedt, J., Nyberg, B., Thorne, A., Arner, P., Schalling, M., and Lonnqvist, F. (1998). Reduced gene expression of UCP2 but not UCP3 in skeletal muscle of human obese subjects. *Diabetologia* 41, 935-939.

## O

Odegaard, J. I., Ricardo-Gonzalez, R. R., Red Eagle, A., Vats, D., Morel, C. R., Goforth, M. H., Subramanian, V., Mukundan, L., Ferrante, A. W., and Chawla, A. (2008). Alternative M2 activation of Kupffer cells by PPARdelta ameliorates obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab* 7, 496-507.

Ohashi, K., Parker, J. L., Ouchi, N., Higuchi, A., Vita, J. A., Gokce, N., Pedersen, A. A., Kalthoff, C., Tullin, S., Sams, A., *et al.* (2010). Adiponectin promotes macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype. *J Biol Chem* 285, 6153-6160.

Okazaki, H., Osuga, J., Tamura, Y., Yahagi, N., Tomita, S., Shionoiri, F., Iizuka, Y., Ohashi, K., Harada, K., Kimura, S., *et al.* (2002). Lipolysis in the absence of hormone-sensitive lipase: evidence for a common mechanism regulating distinct lipases. *Diabetes* 51, 3368-3375.

- Olefsky, J. M., and Glass, C. K. (2010). Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol* 72, 219-246.
- Olefsky, J. M., and Saltiel, A. R. (2000). PPAR gamma and the treatment of insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab* 11, 362-368.
- Osuga, J., Ishibashi, S., Oka, T., Yagyu, H., Tozawa, R., Fujimoto, A., Shionoiri, F., Yahagi, N., Kraemer, F. B., Tsutsumi, O., and Yamada, N. (2000). Targeted disruption of hormone-sensitive lipase results in male sterility and adipocyte hypertrophy, but not in obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 787-792.

## P

- Park, S. Y., Kim, H. J., Wang, S., Higashimori, T., Dong, J., Kim, Y. J., Cline, G., Li, H., Prentki, M., Shulman, G. I., *et al.* (2005). Hormone-sensitive lipase knockout mice have increased hepatic insulin sensitivity and are protected from short-term diet-induced insulin resistance in skeletal muscle and heart. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289, E30-39.
- Patsouris, D., Li, P. P., Thapar, D., Chapman, J., Olefsky, J. M., and Neels, J. G. (2008). Ablation of CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin resistant animals. *Cell Metab* 8, 301-309.
- Pecqueur, C., Alves-Guerra, M. C., Gelly, C., Levi-Meyrueis, C., Couplan, E., Collins, S., Ricquier, D., Bouillaud, F., and Miroux, B. (2001). Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation. *J Biol Chem* 276, 8705-8712.
- Pecqueur, C., Cassard-Doulier, A. M., Raimbault, S., Miroux, B., Fleury, C., Gelly, C., Bouillaud, F., and Ricquier, D. (1999). Functional organization of the human uncoupling protein-2 gene, and juxtaposition to the uncoupling protein-3 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 255, 40-46.
- Pedraza, N., Solanes, G., Iglesias, R., Vazquez, M., Giralt, M., and Villarroya, F. (2001). Differential regulation of expression of genes encoding uncoupling proteins 2 and 3 in brown adipose tissue during lactation in mice. *Biochem J* 355, 105-111.
- Petrovic, N., Walden, T. B., Shabalina, I. G., Timmons, J. A., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2010). Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem* 285, 7153-7164.
- Pickup, J. C., and Crook, M. A. (1998). Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia* 41, 1241-1248.
- Pilegaard, H., Ordway, G. A., Saltin, B., and Neufer, P. D. (2000). Transcriptional regulation of gene expression in human skeletal muscle during recovery from exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279, E806-814.
- Poggi, M., Bastelica, D., Gual, P., Iglesias, M. A., Gremeaux, T., Knauf, C., Peiretti, F., Verdier, M., Juhan-Vague, I., Tanti, J. F., *et al.* (2007). C3H/HeJ mice carrying a toll-like receptor 4 mutation are protected against the development of insulin resistance in white adipose tissue in response to a high-fat diet. *Diabetologia* 50, 1267-1276.
- Poggi, M., Jager, J., Paulmyer-Lacroix, O., Peiretti, F., Gremeaux, T., Verdier, M., Grino, M., Stepanian, A., Msika, S., Burcelin, R., *et al.* (2009). The inflammatory receptor CD40 is expressed on human adipocytes: contribution to crosstalk between lymphocytes and adipocytes. *Diabetologia* 52, 1152-1163.
- Poulain-Godefroy, O., and Froguel, P. (2007). Preadipocyte response and impairment of differentiation in an inflammatory environment. *Biochem Biophys Res Commun* 356, 662-667.

Puri, V., and Czech, M. P. (2008). Lipid droplets: FSP27 knockout enhances their sizzle. *J Clin Invest* 118, 2693-2696.

## Q

Qatanani, M., and Lazar, M. A. (2007). Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes Dev* 21, 1443-1455.

Qu, P., Du, H., Wilkes, D. S., and Yan, C. (2009). Critical roles of lysosomal acid lipase in T cell development and function. *Am J Pathol* 174, 944-956.

## R

Raimbault, S., Dridi, S., Denjean, F., Lachuer, J., Couplan, E., Bouillaud, F., Bordas, A., Duchamp, C., Taouis, M., and Ricquier, D. (2001). An uncoupling protein homologue putatively involved in facultative muscle thermogenesis in birds. *Biochem J* 353, 441-444.

Randle, P. J., Garland, P. B., Hales, C. N., and Newsholme, E. A. (1963). The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1, 785-789.

Reshef, L., Olswang, Y., Cassuto, H., Blum, B., Croniger, C. M., Kalhan, S. C., Tilghman, S. M., and Hanson, R. W. (2003). Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle. *J Biol Chem* 278, 30413-30416.

Reue, K., and Brindley, D. N. (2008). Thematic Review Series: Glycerolipids. Multiple roles for lipins/phosphatidate phosphatase enzymes in lipid metabolism. *J Lipid Res* 49, 2493-2503.

Ricquier, D., and Bouillaud, F. (2000). The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem J* 345 Pt 2, 161-179.

Ricquier, D., and Kader, J. C. (1976). Mitochondrial protein alteration in active brown fat: a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study. *Biochem Biophys Res Commun* 73, 577-583.

Riquet, F. B., Rodriguez, M., Guigal, N., Dromaint, S., Naime, I., Boutin, J. A., and Galizzi, J. P. (2003). In vivo characterisation of the human UCP3 gene minimal promoter in mice tibialis anterior muscles. *Biochem Biophys Res Commun* 311, 583-591.

Rodeheffer, M. S., Birsoy, K., and Friedman, J. M. (2008). Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo. *Cell* 135, 240-249.

Roduit, R., Masiello, P., Wang, S. P., Li, H., Mitchell, G. A., and Prentki, M. (2001). A role for hormone-sensitive lipase in glucose-stimulated insulin secretion: a study in hormone-sensitive lipase-deficient mice. *Diabetes* 50, 1970-1975.

Rolfe, D. F., and Brand, M. D. (1996). Contribution of mitochondrial proton leak to skeletal muscle respiration and to standard metabolic rate. *Am J Physiol* 271, C1380-1389.

Roncon-Albuquerque, R., Jr., Moreira-Rodrigues, M., Faria, B., Ferreira, A. P., Cerqueira, C., Lourenco, A. P., Pestana, M., von Hafe, P., and Leite-Moreira, A. F. (2008). Attenuation of the cardiovascular and metabolic complications of obesity in CD14 knockout mice. *Life Sci* 83, 502-510.

Rossi, P., Marzani, B., Giardina, S., Negro, M., and Marzatico, F. (2008). Human skeletal muscle aging and the oxidative system: cellular events. *Curr Aging Sci* 1, 182-191.

Rothwell, N. J., and Stock, M. J. (1979). A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Nature* 281, 31-35.

Russell, A. P., Wadley, G., Hesselink, M. K., Schaart, G., Lo, S., Leger, B., Garnham, A., Kornips, E., Cameron-Smith, D., Giacobino, J. P., *et al.* (2003). UCP3 protein expression is lower in type I, IIa and IIx muscle fiber types of endurance-trained compared to untrained subjects. *Pflugers Arch* 445, 563-569.

Ryden, M., Jocken, J., van Harmelen, V., Dicker, A., Hoffstedt, J., Wiren, M., Blomqvist, L., Mairal, A., Langin, D., Blaak, E., and Arner, P. (2007). Comparative studies of the role of

hormone-sensitive lipase and adipose triglyceride lipase in human fat cell lipolysis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292, E1847-1855.

## S

Saberi, M., Woods, N. B., de Luca, C., Schenk, S., Lu, J. C., Bandyopadhyay, G., Verma, I. M., and Olefsky, J. M. (2009). Hematopoietic cell-specific deletion of toll-like receptor 4 ameliorates hepatic and adipose tissue insulin resistance in high-fat-fed mice. *Cell Metab* 10, 419-429.

Sale, M. M., Hsu, F. C., Palmer, N. D., Gordon, C. J., Keene, K. L., Borgerink, H. M., Sharma, A. J., Bergman, R. N., Taylor, K. D., Saad, M. F., and Norris, J. M. (2007). 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 Endocr Disord* 7, 1.

Samec, S., Seydoux, J., and Dulloo, A. G. (1998). Interorgan signaling between adipose tissue metabolism and skeletal muscle uncoupling protein homologs: is there a role for circulating free fatty acids? *Diabetes* 47, 1693-1698.

Samec, S., Seydoux, J., and Dulloo, A. G. (1999). 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* 48, 436-441.

Samuel, V. T., Liu, Z. X., Wang, A., Beddow, S. A., Geisler, J. G., Kahn, M., Zhang, X. M., Monia, B. P., Bhanot, S., and Shulman, G. I. (2007). Inhibition of protein kinase Cepsilon prevents hepatic insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 117, 739-745.

Samuel, V. T., Petersen, K. F., and Shulman, G. I. (2010). Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *Lancet* 375, 2267-2277.

Sanchis, D., Fleury, C., Chomiki, N., Gubern, M., Huang, Q., Neverova, M., Gregoire, F., Easlick, J., Raimbault, S., Levi-Meyrueis, C., *et al.* (1998). 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* 273, 34611-34615.

Sandelin, A., Alkema, W., Engstrom, P., Wasserman, W. W., and Lenhard, B. (2004). JASPAR: an open-access database for eukaryotic transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res* 32, D91-94.

Santos-Alvarez, J., Goberna, R., and Sanchez-Margalet, V. (1999). Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes. *Cell Immunol* 194, 6-11.

Sbraccia, P., D'Adamo, M., Leonetti, F., Buongiorno, A., Silecchia, G., Basso, M. S., Tamburrano, G., Lauro, D., Federici, M., Di Daniele, N., and Lauro, R. (2002). 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)* 57, 199-207.

Schrauwen, P., and Hesselink, M. K. (2004a). Oxidative capacity, lipotoxicity, and mitochondrial damage in type 2 diabetes. *Diabetes* 53, 1412-1417.

Schrauwen, P., and Hesselink, M. K. (2004b). The role of uncoupling protein 3 in fatty acid metabolism: protection against lipotoxicity? *Proc Nutr Soc* 63, 287-292.

Schrauwen, P., Hesselink, M. K., Blaak, E. E., Borghouts, L. B., Schaart, G., Saris, W. H., and Keizer, H. A. (2001a). Uncoupling protein 3 content is decreased in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 50, 2870-2873.

Schrauwen, P., Hoeks, J., and Hesselink, M. K. (2006a). Putative function and physiological relevance of the mitochondrial uncoupling protein-3: involvement in fatty acid metabolism? *Prog Lipid Res* 45, 17-41.

- Schrauwen, P., Hoeks, J., Schaart, G., Kornips, E., Binas, B., Van De Vusse, G. J., Van Bilsen, M., Luiken, J. J., Coort, S. L., Glatz, J. F., *et al.* (2003). Uncoupling protein 3 as a mitochondrial fatty acid anion exporter. *Faseb J* 17, 2272-2274.
- Schrauwen, P., Hoppeler, H., Billeter, R., Bakker, A. H., and Pendergast, D. R. (2001b). Fiber type dependent upregulation of human skeletal muscle UCP2 and UCP3 mRNA expression by high-fat diet. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25, 449-456.
- Schrauwen, P., Mensink, M., Schaart, G., Moonen-Kornips, E., Sels, J. P., Blaak, E. E., Russell, A. P., and Hesselink, M. K. (2006b). 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.
- Schrauwen, P., Russell, A. P., Moonen-Kornips, E., Boon, N., and Hesselink, M. K. (2005). Effect of 2 weeks of endurance training on uncoupling protein 3 content in untrained human subjects. *Acta Physiol Scand* 183, 273-280.
- Schrauwen, P., Troost, F. J., Xia, J., Ravussin, E., and Saris, W. H. (1999a). Skeletal muscle UCP2 and UCP3 expression in trained and untrained male subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23, 966-972.
- Schrauwen, P., Westerterp-Plantenga, M. S., Kornips, E., Schaart, G., and van Marken Lichtenbelt, W. D. (2002). The effect of mild cold exposure on UCP3 mRNA expression and UCP3 protein content in humans. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26, 450-457.
- Schrauwen, P., Xia, J., Walder, K., Snitker, S., and Ravussin, E. (1999b). 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* 23, 1242-1245.
- Sengenès, C., Berlan, M., De Glisezinski, I., Lafontan, M., and Galitzky, J. (2000). Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes. *Faseb J* 14, 1345-1351.
- Sengenès, C., Bouloumie, A., Hauner, H., Berlan, M., Busse, R., Lafontan, M., and Galitzky, J. (2003). Involvement of a cGMP-dependent pathway in the natriuretic peptide-mediated hormone-sensitive lipase phosphorylation in human adipocytes. *J Biol Chem* 278, 48617-48626.
- Sengenès, C., Lolmede, K., Zakaroff-Girard, A., Busse, R., and Bouloumie, A. (2005). Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display distinct features from the adult mesenchymal and hematopoietic stem cells. *J Cell Physiol* 205, 114-122.
- Sengenès, C., Zakaroff-Girard, A., Moulin, A., Berlan, M., Bouloumie, A., Lafontan, M., and Galitzky, J. (2002). Natriuretic peptide-dependent lipolysis in fat cells is a primate specificity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283, R257-265.
- Shaul, M. E., Bennett, G., Strissel, K. J., Greenberg, A. S., and Obin, M. S. (2010). Dynamic, M2-like remodeling phenotypes of CD11c+ adipose tissue macrophages during high-fat diet--induced obesity in mice. *Diabetes* 59, 1171-1181.
- Shen, W. J., Patel, S., Miyoshi, H., Greenberg, A. S., and Kraemer, F. B. (2009). Functional interaction of hormone-sensitive lipase and perilipin in lipolysis. *J Lipid Res* 50, 2306-2313.
- Shi, H., Kokoeva, M. V., Inouye, K., Tzameli, I., Yin, H., and Flier, J. S. (2006). TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 116, 3015-3025.
- Shimano, H. (2009). SREBPs: physiology and pathophysiology of the SREBP family. *Febs J* 276, 616-621.
- Shoelson, S. E., Lee, J., and Goldfine, A. B. (2006). Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 116, 1793-1801.
- Shulman, G. I. (2004). Unraveling the cellular mechanism of insulin resistance in humans: new insights from magnetic resonance spectroscopy. *Physiology (Bethesda)* 19, 183-190.

- Sivitz, W. I., Fink, B. D., and Donohoue, P. A. (1999). Fasting and leptin modulate adipose and muscle uncoupling protein: divergent effects between messenger ribonucleic acid and protein expression. *Endocrinology* 140, 1511-1519.
- Sjostrom, L. (1972). Adult human adipose tissue cellularity and metabolism with special reference to obesity and fatty acid synthesis de novo. *Acta Med Scand Suppl* 544, 1-52.
- Sjostrom, L., Smith, U., Krotkiewski, M., and Bjorntorp, P. (1972). Cellularity in different regions of adipose tissue in young men and women. *Metabolism* 21, 1143-1153.
- Skulachev, V. P. (1996). Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants. *Q Rev Biophys* 29, 169-202.
- Skulachev, V. P. (1998). Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim Biophys Acta* 1363, 100-124.
- Skurk, T., Alberti-Huber, C., Herder, C., and Hauner, H. (2007). Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 1023-1033.
- Smas, C. M., and Sul, H. S. (1993). Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation. *Cell* 73, 725-734.
- Sokolova, I. M., and Sokolov, E. P. (2005). Evolution of mitochondrial uncoupling proteins: novel invertebrate UCP homologues suggest early evolutionary divergence of the UCP family. *FEBS Lett* 579, 313-317.
- Solanes, G., Pedraza, N., Calvo, V., Vidal-Puig, A., Lowell, B. B., and 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.
- Solanes, G., Pedraza, N., Iglesias, R., Giralt, M., and 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.
- Solanes, G., Vidal-Puig, A., Grujic, D., Flier, J. S., and Lowell, B. B. (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.
- Solinas, G., Vilcu, C., Neels, J. G., Bandyopadhyay, G. K., Luo, J. L., Naugler, W., Grivennikov, S., Wynshaw-Boris, A., Scadeng, M., Olefsky, J. M., and Karin, M. (2007). JNK1 in hematopoietically derived cells contributes to diet-induced inflammation and insulin resistance without affecting obesity. *Cell Metab* 6, 386-397.
- Son, C., Hosoda, K., Matsuda, J., Fujikura, J., Yonemitsu, S., Iwakura, H., Masuzaki, H., Ogawa, Y., Hayashi, T., Itoh, H., *et al.* (2001). Up-regulation of uncoupling protein 3 gene expression by fatty acids and agonists for PPARs in L6 myotubes. *Endocrinology* 142, 4189-4194.
- Spalding, K. L., Arner, E., Westermark, P. O., Bernard, S., Buchholz, B. A., Bergmann, O., Blomqvist, L., Hoffstedt, J., Naslund, E., Britton, T., *et al.* (2008). Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 453, 783-787.
- Stahl, A. (2004). A current review of fatty acid transport proteins (SLC27). *Pflugers Arch* 447, 722-727.
- Stephens, J. M., Lee, J., and Pilch, P. F. (1997). Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction. *J Biol Chem* 272, 971-976.
- Stienstra, R., Duval, C., Keshtkar, S., van der Laak, J., Kersten, S., and Muller, M. (2008). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation promotes infiltration of alternatively activated macrophages into adipose tissue. *J Biol Chem* 283, 22620-22627.

- Stone, S. J., Myers, H. M., Watkins, S. M., Brown, B. E., Feingold, K. R., Elias, P. M., and Farese, R. V., Jr. (2004). Lipopenia and skin barrier abnormalities in DGAT2-deficient mice. *J Biol Chem* 279, 11767-11776.
- Strissel, K. J., Defuria, J., Shaul, M. E., Bennett, G., Greenberg, A. S., and Obin, M. S. (2010). T-Cell Recruitment and Th1 Polarization in Adipose Tissue During Diet-Induced Obesity in C57BL/6 Mice. *Obesity (Silver Spring)*.
- Strissel, K. J., Stancheva, Z., Miyoshi, H., Perfield, J. W., 2nd, DeFuria, J., Jick, Z., Greenberg, A. S., and Obin, M. S. (2007). Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes* 56, 2910-2918.
- Strom, K., Hansson, O., Lucas, S., Nevsten, P., Fernandez, C., Klint, C., Moverare-Skrtic, S., Sundler, F., Ohlsson, C., and Holm, C. (2008). Attainment of brown adipocyte features in white adipocytes of hormone-sensitive lipase null mice. *PLoS One* 3, e1793.
- Stryer, L., ed. (1992). *La biochimie de Lubert Stryer* (Paris, Flammarion).
- Stuart, J. A., Harper, J. A., Brindle, K. M., and Brand, M. D. (1999). Uncoupling protein 2 from carp and zebrafish, ectothermic vertebrates. *Biochim Biophys Acta* 1413, 50-54.
- Subramanian, V., Rothenberg, A., Gomez, C., Cohen, A. W., Garcia, A., Bhattacharyya, S., Shapiro, L., Dolios, G., Wang, R., Lisanti, M. P., and Brasaemle, D. L. (2004). Perilipin A mediates the reversible binding of CGI-58 to lipid droplets in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 279, 42062-42071.
- Suganami, T., Mieda, T., Itoh, M., Shimoda, Y., Kamei, Y., and Ogawa, Y. (2007a). Attenuation of obesity-induced adipose tissue inflammation in C3H/HeJ mice carrying a Toll-like receptor 4 mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 354, 45-49.
- Suganami, T., Nishida, J., and Ogawa, Y. (2005). A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 2062-2068.
- Suganami, T., Tanimoto-Koyama, K., Nishida, J., Itoh, M., Yuan, X., Mizuarai, S., Kotani, H., Yamaoka, S., Miyake, K., Aoe, S., *et al.* (2007b). Role of the Toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 84-91.
- Surmi, B. K., Webb, C. D., Ristau, A. C., and Hasty, A. H. (2010). Absence of Macrophage Inflammatory Protein-1{alpha} Does Not Impact Macrophage Accumulation in Adipose Tissue of Diet Induced Obese Mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*.

## T

- Tabas, I., Tall, A., and Accili, D. (2010). The impact of macrophage insulin resistance on advanced atherosclerotic plaque progression. *Circ Res* 106, 58-67.
- Talbot, D. A., and Brand, M. D. (2005). Uncoupling protein 3 protects aconitase against inactivation in isolated skeletal muscle mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1709, 150-156.
- Tan, G. D., Debard, C., Tiraby, C., Humphreys, S. M., Frayn, K. N., Langin, D., Vidal, H., and Karpe, F. (2003). A "futile cycle" induced by thiazolidinediones in human adipose tissue? *Nat Med* 9, 811-812; author reply 812.
- Thompson, B. R., Lobo, S., and Bernlohr, D. A. (2010). Fatty acid flux in adipocytes: the in's and out's of fat cell lipid trafficking. *Mol Cell Endocrinol* 318, 24-33.
- Tilg, H., and Moschen, A. R. (2008). Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. *Mol Med* 14, 222-231.
- Tiraby, C., Tavernier, G., Capel, F., Mairal, A., Crampes, F., Rami, J., Pujol, C., Boutin, J. A., and Langin, D. (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.



- Tiraby, C., Tavernier, G., Lefort, C., Larrouy, D., Bouillaud, F., Ricquier, D., and Langin, D. (2003). Acquisition of brown fat cell features by human white adipocytes. *J Biol Chem* 278, 33370-33376.
- Toh, S. Y., Gong, J., Du, G., Li, J. Z., Yang, S., Ye, J., Yao, H., Zhang, Y., Xue, B., Li, Q., *et al.* (2008). Up-regulation of mitochondrial activity and acquisition of brown adipose tissue-like property in the white adipose tissue of *fsp27* deficient mice. *PLoS One* 3, e2890.
- Toime, L. J., and Brand, M. D. (2010). Uncoupling protein-3 lowers reactive oxygen species production in isolated mitochondria. *Free Radic Biol Med* 49, 606-611.
- Tomasek, J. J., McRae, J., Owens, G. K., and Haaksma, C. J. (2005). Regulation of alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts is dependent on the intronic CARG element and the transforming growth factor-beta1 control element. *Am J Pathol* 166, 1343-1351.
- Toyomizu, M., Ueda, M., Sato, S., Seki, Y., Sato, K., and Akiba, Y. (2002). Cold-induced mitochondrial uncoupling and expression of chicken UCP and ANT mRNA in chicken skeletal muscle. *FEBS Lett* 529, 313-318.
- Trenker, M., Malli, R., Fertschai, I., Levak-Frank, S., and Graier, W. F. (2007). Uncoupling proteins 2 and 3 are fundamental for mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uniport. *Nat Cell Biol* 9, 445-452.
- Tsukumo, D. M., Carvalho-Filho, M. A., Carvalheira, J. B., Prada, P. O., Hirabara, S. M., Schenka, A. A., Araujo, E. P., Vassallo, J., Curi, R., Velloso, L. A., and Saad, M. J. (2007). Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56, 1986-1998.
- Tu, N., Chen, H., Winnikes, U., Reinert, I., Marmann, G., Pirke, K. M., and Lentjes, K. U. (1999). Structural organization and mutational analysis of the human uncoupling protein-2 (hUCP2) gene. *Life Sci* 64, PL41-50.
- Tu, N., Chen, H., Winnikes, U., Reinert, I., Pirke, K. M., and Lentjes, K. U. (2000). Functional characterization of the 5'-flanking and the promoter region of the human UCP3 (hUCP3) gene. *Life Sci* 67, 2267-2279.
- Tunstall, R. J., Mehan, K. A., Hargreaves, M., Spriet, L. L., and Cameron-Smith, D. (2002). Fasting activates the gene expression of UCP3 independent of genes necessary for lipid transport and oxidation in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 294, 301-308.

## U

- Uyemura, S. A., Luo, S., Moreno, S. N., and Docampo, R. (2000). Oxidative phosphorylation, Ca<sup>2+</sup> transport, and fatty acid-induced uncoupling in malaria parasites mitochondria. *J Biol Chem* 275, 9709-9715.

## V

- Van Harmelen, V., Rohrig, K., and Hauner, H. (2004). Comparison of proliferation and differentiation capacity of human adipocyte precursor cells from the omental and subcutaneous adipose tissue depot of obese subjects. *Metabolism* 53, 632-637.
- van Marken Lichtenbelt, W. D., Vanhommel, J. W., Smulders, N. M., Drossaerts, J. M., Kemerink, G. J., Bouvy, N. D., Schrauwen, P., and Teule, G. J. (2009). Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med* 360, 1500-1508.
- Verdijk, L. B., Koopman, R., Schaart, G., Meijer, K., Savelberg, H. H., and van Loon, L. J. (2007). Satellite cell content is specifically reduced in type II skeletal muscle fibers in the elderly. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292, E151-157.
- Vianna, C. R., Hagen, T., Zhang, C. Y., Bachman, E., Boss, O., Gereben, B., Moriscot, A. S., Lowell, B. B., Bicudo, J. E., and Bianco, A. C. (2001). Cloning and functional characterization of an uncoupling protein homolog in hummingbirds. *Physiol Genomics* 5, 137-145.

- Vidal-Puig, A., Solanes, G., Grujic, D., Flier, J. S., and Lowell, B. B. (1997). UCP3: an uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 235, 79-82.
- Vidal-Puig, A. J., Grujic, D., Zhang, C. Y., Hagen, T., Boss, O., Ido, Y., Szczepanik, A., Wade, J., Mootha, V., Cortright, R., *et al.* (2000). Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. *J Biol Chem* 275, 16258-16266.
- Vidal, H., Langin, D., Andreelli, F., Millet, L., Larrouy, D., and 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, E830-837.
- Villaret, A., Galitzky, J., Decaunes, P., Esteve, D., Marques, M. A., Sengenès, C., Chiotasso, P., Tchkonina, T., Lafontan, M., Kirkland, J. L., and Bouloumie, A. (2010). Adipose Tissue Endothelial Cells from Obese Human Subjects: Differences Among Depots in Angiogenic, Metabolic, and Inflammatory Gene Expression and Cellular Senescence. *Diabetes*.
- Villena, J. A., Roy, S., Sarkadi-Nagy, E., Kim, K. H., and Sul, H. S. (2004). Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem* 279, 47066-47075.
- Virtanen, K. A., Lidell, M. E., Orava, J., Heglind, M., Westergren, R., Niemi, T., Taittonen, M., Laine, J., Savisto, N. J., Enerback, S., and Nuutila, P. (2009). Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med* 360, 1518-1525.

## W

- Wakelam, M. J. (1998). Diacylglycerol--when is it an intracellular messenger? *Biochim Biophys Acta* 1436, 117-126.
- Walder, K., Norman, R. A., Hanson, R. L., Schrauwen, P., Neverova, M., Jenkinson, C. P., Easlick, J., Warden, C. H., Pecqueur, C., Raimbault, S., *et al.* (1998). Association between uncoupling protein polymorphisms (UCP2-UCP3) and energy metabolism/obesity in Pima indians. *Hum Mol Genet* 7, 1431-1435.
- Wang, B., Wood, I. S., and Trayhurn, P. (2007). Dysregulation of the expression and secretion of inflammation-related adipokines by hypoxia in human adipocytes. *Pflugers Arch* 455, 479-492.
- Wang, H., Hu, L., Dalen, K., Dorward, H., Marcinkiewicz, A., Russell, D., Gong, D., Londos, C., Yamaguchi, T., Holm, C., *et al.* (2009). Activation of hormone-sensitive lipase requires two steps, protein phosphorylation and binding to the PAT-1 domain of lipid droplet coat proteins. *J Biol Chem* 284, 32116-32125.
- Wang, M., and Fotsch, C. (2006). Small-molecule compounds that modulate lipolysis in adipose tissue: targeting strategies and molecular classes. *Chem Biol* 13, 1019-1027.
- Wang, S. P., Laurin, N., Himms-Hagen, J., Rudnicki, M. A., Levy, E., Robert, M. F., Pan, L., Oligny, L., and Mitchell, G. A. (2001). The adipose tissue phenotype of hormone-sensitive lipase deficiency in mice. *Obes Res* 9, 119-128.
- Wang, Z., Kontani, Y., Sato, Y., Mizuno, T., Mori, N., and Yamashita, H. (2003). Muscle type difference in the regulation of UCP3 under cold conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 305, 244-249.
- Wang, Z. V., Deng, Y., Wang, Q. A., Sun, K., and Scherer, P. E. (2010). Identification and characterization of a promoter cassette conferring adipocyte-specific gene expression. *Endocrinology* 151, 2933-2939.
- Weigle, D. S., Selfridge, L. E., Schwartz, M. W., Seeley, R. J., Cummings, D. E., Havel, P. J., Kuijper, J. L., and BeltrandelRio, H. (1998). Elevated free fatty acids induce uncoupling protein 3 expression in muscle: a potential explanation for the effect of fasting. *Diabetes* 47, 298-302.

Weisberg, S. P., Hunter, D., Huber, R., Lemieux, J., Slaymaker, S., Vaddi, K., Charo, I., Leibel, R. L., and Ferrante, A. W., Jr. (2006). CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest* *116*, 115-124.

Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., and Ferrante, A. W., Jr. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* *112*, 1796-1808.

Wentworth, J. M., Naselli, G., Brown, W. A., Doyle, L., Phipson, B., Smyth, G. K., Wabitsch, M., O'Brien, P. E., and Harrison, L. C. (2010). Pro-inflammatory CD11c+CD206+ adipose tissue macrophages are associated with insulin resistance in human obesity. *Diabetes* *59*, 1648-1656.

Winer, S., Chan, Y., Paltser, G., Truong, D., Tsui, H., Bahrami, J., Dorfman, R., Wang, Y., Zielenski, J., Mastronardi, F., *et al.* (2009). Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat Med* *15*, 921-929.

Wood, I. S., de Heredia, F. P., Wang, B., and Trayhurn, P. (2009). Cellular hypoxia and adipose tissue dysfunction in obesity. *Proc Nutr Soc* *68*, 370-377.

## X

Xiao, X. Q., Grove, K. L., Grayson, B. E., and Smith, M. S. (2004). Inhibition of uncoupling protein expression during lactation: role of leptin. *Endocrinology* *145*, 830-838.

Xu, H., Barnes, G. T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C. J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J. S., Tartaglia, L. A., and Chen, H. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* *112*, 1821-1830.

## Y

Yamaguchi, T., Omatsu, N., Matsushita, S., and Osumi, T. (2004). CGI-58 interacts with perilipin and is localized to lipid droplets. Possible involvement of CGI-58 mislocalization in Chanarin-Dorfman syndrome. *J Biol Chem* *279*, 30490-30497.

Yamashita, H., Sato, Y., and Mori, N. (1999). Difference in induction of uncoupling protein genes in adipose tissues between young and old rats during cold exposure. *FEBS Lett* *458*, 157-161.

Yang, X., Lu, X., Lombes, M., Rha, G. B., Chi, Y. I., Guerin, T. M., Smart, E. J., and Liu, J. (2010). The G(0)/G(1) switch gene 2 regulates adipose lipolysis through association with adipose triglyceride lipase. *Cell Metab* *11*, 194-205.

Yen, C. L., Stone, S. J., Koliwad, S., Harris, C., and Farese, R. V., Jr. (2008). Thematic review series: glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *J Lipid Res* *49*, 2283-2301.

Yoshitomi, H., Yamazaki, K., and Tanaka, I. (1998). Cloning of mouse uncoupling protein 3 cDNA and 5'-flanking region, and its genetic map. *Gene* *215*, 77-84.

Yu, C., Chen, Y., Cline, G. W., Zhang, D., Zong, H., Wang, Y., Bergeron, R., Kim, J. K., Cushman, S. W., Cooney, G. J., *et al.* (2002). Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem* *277*, 50230-50236.

Yu, X. X., Mao, W., Zhong, A., Schow, P., Brush, J., Sherwood, S. W., Adams, S. H., and Pan, G. (2000). Characterization of novel UCP5/BMCP1 isoforms and differential regulation of UCP4 and UCP5 expression through dietary or temperature manipulation. *Faseb J* *14*, 1611-1618.

Yuan, W., and Varga, J. (2001). Transforming growth factor-beta repression of matrix metalloproteinase-1 in dermal fibroblasts involves Smad3. *J Biol Chem* *276*, 38502-38510.

**Z**

- Zechner, R., Kienesberger, P. C., Haemmerle, G., Zimmermann, R., and Lass, A. (2009). Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. *J Lipid Res* 50, 3-21.
- Zeyda, M., Farmer, D., Todoric, J., Aszmann, O., Speiser, M., Gyori, G., Zlabinger, G. J., and Stulnig, T. M. (2007). Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production. *Int J Obes (Lond)* 31, 1420-1428.
- Zeyda, M., Gollinger, K., Kriehuber, E., Kiefer, F. W., Neuhofer, A., and Stulnig, T. M. (2010). Newly identified adipose tissue macrophage populations in obesity with distinct chemokine and chemokine receptor expression. *Int J Obes (Lond)*.
- Zhang, C. Y., Baffy, G., Perret, P., Krauss, S., Peroni, O., Grujic, D., Hagen, T., Vidal-Puig, A. J., Boss, O., Kim, Y. B., *et al.* (2001). Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes. *Cell* 105, 745-755.
- Zhang, M., Wang, B., Ni, Y. H., Liu, F., Fei, L., Pan, X. Q., Guo, M., Chen, R. H., and Guo, X. R. (2006). Overexpression of uncoupling protein 4 promotes proliferation and inhibits apoptosis and differentiation of preadipocytes. *Life Sci* 79, 1428-1435.
- Zhong, H., Jin, Z., Chen, Y., Zhang, T., Bian, W., Cui, X., and Jing, N. (2008). First intron of nestin gene regulates its expression during C2C12 myoblast differentiation. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 40, 526-532.
- Zhou, M., Lin, B. Z., Coughlin, S., Vallega, G., and Pilch, P. F. (2000). UCP-3 expression in skeletal muscle: effects of exercise, hypoxia, and AMP-activated protein kinase. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279, E622-629.
- Zhou, Q. G., Peng, X., Hu, L. L., Xie, D., Zhou, M., and Hou, F. F. (2010). Advanced oxidation protein products inhibit differentiation and activate inflammation in 3T3-L1 preadipocytes. *J Cell Physiol* 225, 42-51.
- Zimmermann, R., Haemmerle, G., Wagner, E. M., Strauss, J. G., Kratky, D., and Zechner, R. (2003). Decreased fatty acid esterification compensates for the reduced lipolytic activity in hormone-sensitive lipase-deficient white adipose tissue. *J Lipid Res* 44, 2089-2099.
- Zimmermann, R., Lass, A., Haemmerle, G., and Zechner, R. (2009). Fate of fat: the role of adipose triglyceride lipase in lipolysis. *Biochim Biophys Acta* 1791, 494-500.
- Zimmermann, R., Strauss, J. G., Haemmerle, G., Schoiswohl, G., Birner-Gruenberger, R., Riederer, M., Lass, A., Neuberger, G., Eisenhaber, F., Hermetter, A., and Zechner, R. (2004). Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* 306, 1383-1386.

## ANNEXES

### **Article 5 : Contribution of adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase to lipolysis in hMADS adipocytes.**

Bézaire V, Mairal A, Ribet C, Lefort C, Grousse A, Jocken J, Laurencikiene J, Anesia R, Rodriguez AM, Ryden M, Stenson BM, Dani C, Ailhaud G, Arner P and Langin D

J Biol Chem. 2009 Jul 3;284(27):18282-91

### **Article 6: Adipose tissue lipolysis Symposium. Congress report**

Grousse A and Langin D

Obésité 2008; 3:104-108

# Contribution of Adipose Triglyceride Lipase and Hormone-sensitive Lipase to Lipolysis in hMADS Adipocytes<sup>\*S</sup>

Received for publication, January 13, 2009, and in revised form, April 17, 2009 Published, JBC Papers in Press, May 11, 2009, DOI 10.1074/jbc.M109.008631

Véronic Bezaire<sup>‡S</sup>, Aline Mairal<sup>‡S</sup>, Carole Ribet<sup>‡S</sup>, Corinne Lefort<sup>‡S</sup>, Amandine Girousse<sup>‡S</sup>, Johan Jocken<sup>¶</sup>, Jurga Laucinkiene<sup>¶</sup>, Rodica Anesia<sup>‡S</sup>, Anne-Marie Rodriguez<sup>||</sup>, Mikael Ryden<sup>¶</sup>, Britta M. Stenson<sup>¶</sup>, Christian Dani<sup>\*\*</sup>, Gérard Ailhaud<sup>\*\*</sup>, Peter Arner<sup>¶</sup>, and Dominique Langin<sup>‡S¶†</sup>

From <sup>‡</sup>INSERM U858, Laboratoire de Recherches sur les Obésités, F-31432 Toulouse, France, the <sup>S</sup>Université de Toulouse, UPS, Institut de Médecine Moléculaire de Rangueil, IFR150, F-31432 Toulouse, France, the <sup>¶</sup>Department of Medicine, Karolinska Institute, Karolinska University Hospital, Huddinge, S-14186 Stockholm, Sweden, <sup>||</sup>INSERM U955, Avenir Team 22, Faculté de Médecine, 8 rue du Général Sarrail, 94010 Créteil, France, the <sup>\*\*</sup>Institut de Signalisation, Biologie du Développement et Cancer, Université de Nice Sophia-Antipolis, CNRS, 28 avenue Valrose, 06100 Nice, France, and the <sup>††</sup>CHU de Toulouse, Laboratoire de Biochimie, Institut Fédératif de Biologie de Purpan, F-31059 Toulouse, France

Lipolysis is the catabolic pathway by which triglycerides are hydrolyzed into fatty acids. Adipose triglyceride lipase (ATGL) and hormone-sensitive lipase (HSL) have the capacity to hydrolyze *in vitro* the first ester bond of triglycerides, but their respective contributions to whole cell lipolysis in human adipocytes is unclear. Here, we have investigated the roles of HSL, ATGL, and its coactivator CGI-58 in basal and forskolin-stimulated lipolysis in a human white adipocyte model, the hMADS cells. The hMADS adipocytes express the various components of fatty acid metabolism and show lipolytic capacity similar to primary cultured adipocytes. We show that lipolysis and fatty acid esterification are tightly coupled except in conditions of stimulated lipolysis. Immunocytochemistry experiments revealed that acute forskolin treatment promotes HSL translocation from the cytosol to small lipid droplets and redistribution of ATGL from the cytosol and large lipid droplets to small lipid droplets, resulting in enriched colocalization of the two lipases. HSL or ATGL overexpression resulted in increased triglyceride-specific hydrolase capacity, but only ATGL overexpression increased whole cell lipolysis. HSL silencing had no effect on basal lipolysis and only partially reduced forskolin-stimulated lipolysis. Conversely, silencing of ATGL or CGI-58 significantly reduced basal lipolysis and essentially abolished forskolin-stimulated lipolysis. Altogether, these results suggest that ATGL/CGI-58 acts independently of HSL and precedes its action in the sequential hydrolysis of triglycerides in human hMADS adipocytes.

Adipose tissue fat stores in humans are mainly dependent upon fatty acid (FA)<sup>2</sup> supply, FA esterification to triglycerides (TG), and TG breakdown, or lipolysis. Adipose tissue lipolysis is governed by three lipases. Adipose triglyceride lipase (ATGL) and hormone-sensitive lipase (HSL) both have the capacity to initiate TG degradation by cleaving the first ester bond, but HSL is unique in its capacity to break down the second ester bond, converting diglycerides (DG) to monoglycerides (1–3). The non-rate-limiting monoglyceride lipase completes lipolysis by cleaving the last ester bond from a monoglyceride molecule, leading to glycerol release (4). Adipose tissue lipolysis has received much attention over the past 10 years because of its altered regulation in obesity (5).

HSL resides freely in the cytosol and can associate with lipid droplets (LD). It is regulated by hormones such as catecholamines, insulin, and natriuretic peptides. Catecholamines bind to  $\beta$ -adrenoceptors on adipocyte cell membranes and activate cyclic AMP-dependent protein kinase. Similarly, natriuretic peptides bind to type A receptors and activate cyclic GMP-dependent protein kinase (6). The protein kinase action in stimulated lipolysis is 2-fold: 1) phosphorylation of HSL, leading to its translocation from the cytosol to LD (7, 8), and 2) phosphorylation of perilipin A (6, 9, 10), the predominant perilipin isoform in adipocytes, enhancing interaction between HSL and LD. The importance of HSL activity in stimulating complete lipolysis is indisputable, particularly given its unique capacity to hydrolyze DG. However, lipolysis is not exclusively dependent upon HSL because *HSL* null mice revealed residual TG lipase activity in adipose tissue (2, 11). Another adipose tissue lipase was identified (3, 12, 13). ATGL, also known as desnutrin or patatin-like phospholipase domain-containing protein 2, shows affinity toward TG only (3, 14). ATGL is activated by CGI-58, an esterase/thioesterase/lipase subfamily protein devoid of TG hydrolase enzymatic activity (15, 16). The

\* This work was supported by INSERM, YSL BEAUTE/BRI, the Swedish Research Council, and the Commission of the European Communities Integrated Project HEPADIP Contract LSHM-CT-2005-018734 and Collaborative Project ADAPT Contract HEALTH-F2-2008-2011 00. This work was also supported by funds from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (to V. B.) and The Netherlands Organization for Scientific Research Grant NWO Rubicon 820.07.025 (to J. J.).

<sup>S</sup> The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Figs. S1 and S2.

<sup>†</sup> To whom correspondence should be addressed: Laboratoire de Recherches sur les Obésités, Inserm U858-I2MR, Equipe 4, 1 avenue Jean Poulhès, BP 84225, 31432 Toulouse Cedex 4, France. Tel.: 33561325628; Fax: 33561325623; E-mail: dominique.langin@inserm.fr.

<sup>2</sup> The abbreviations used are: FA, fatty acid; ATGL, adipose triglyceride lipase; Bay, 4-isopropyl-3-methyl-2-[1-(3-(S)-methyl-piperidin-1-yl)-methanoyl]-2H-isoxazol-5-one; DG, diglyceride(s); FK, forskolin; GFP, green fluorescent protein; hMADS cells, human adipose tissue-derived multipotent stem cells; HSL, hormone-sensitive lipase; LD, lipid droplet; NEFA, nonesterified fatty acid(s); TG, triglyceride(s); DM, differentiation medium; BSA, bovine serum albumin; OA, oleic acid; ANOVA, analysis of variance; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; m.o.i., multiplicity of infection.

role of HSL and ATGL has been investigated in murine fat cell lipolysis, but the relative importance of these lipases in basal and protein kinase A-stimulated human fat cell lipolysis has remained elusive.

Increased fat mass is associated with defects in adipose tissue metabolism. In obesity, resistance to catecholamine-induced lipolysis is observed (17–19). This inhibition of lipolysis may be naturally occurring as an adaptive protective mechanism to minimize FA release and its deleterious consequences on metabolism. Indeed, decreased expression of HSL and ATGL has been observed in isolated adipocytes and differentiated preadipocytes of obese subjects and adipose tissue of insulin-resistant subjects, respectively (20–23). However, by virtue of its mass, adipose tissue basal lipolysis elevates circulating levels of FAs in obese subjects, thereby increasing the risk of insulin resistance. Therefore, the use of pharmacological lipid-lowering agents that act through inhibition of lipolysis has been a promising research avenue leading to the development of several series of HSL inhibitors (24).

Herein, we sought to examine the respective contributions of HSL and ATGL to lipolysis and re-esterification in fat cells derived from human adipose tissue derived-multipotent stem cells (termed hMADS cells). These cells, which exhibit at a clonal level normal karyotype, self-renewal ability, and no tumorigenicity, are able to differentiate into functional adipocytes (25, 26). We investigated the localization of HSL and ATGL in basal and stimulated lipolytic conditions and studied lipase activities and whole cell lipolysis in adipocytes with altered expression levels of HSL, ATGL, and its coactivator CGI-58. Our results provide novel insights into ATGL localization and its critical role with coactivator CGI-58 in DG provision to HSL during basal and stimulated lipolysis.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Cell Culture**—hMADS cells were maintained in proliferation medium (Dulbecco's modified Eagle's medium low glucose, 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 10 mM Hepes buffer, 50 units/ml of penicillin, 50  $\mu$ g/ml of streptomycin, supplemented with 2.5 ng/ml of human fibroblast growth factor 2). The cells were inoculated in 6-well plates at a density of 44,000 cells/ml and kept at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. Six days post-seeding, fibroblast growth factor 2 was removed from proliferation medium. On the next day (day 0), the cells were incubated in differentiation medium (DM; serum-free proliferation medium/Ham's F-12 medium containing 10  $\mu$ g/ml of transferrin, 5  $\mu$ g/ml of insulin, 0.2 nM triiodothyronine, 100  $\mu$ M 3-isobutyl-1-methylxanthine, 1  $\mu$ M dexamethasone, and 100 nM rosiglitazone). At day 3, dexamethasone and 3-isobutyl-1-methylxanthine were omitted from DM, and at day 9 rosiglitazone was also omitted. The experiments were carried out between days 12 and 15. Pharmacological treatment of cells was performed during functional measurements (3 h) with the adenylate cyclase activator forskolin (FK) and/or specific HSL inhibitor Bay (22, 27). Primary culture of differentiated preadipocytes was performed as previously described (28).

**Determination of mRNA Levels**—Total RNA was extracted using the RNeasy total RNA mini kit (Qiagen). RNA concentration and purity were assessed spectrophotometrically with a

NanoDrop (Digitalbio). After treatment with DNase I (Invitrogen) and reverse transcription of 1  $\mu$ g of total RNA with SuperScript II (Invitrogen), real time quantitative PCR was performed with ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems). For each primer pair, a standard curve was obtained using serial dilutions of hMADS cDNA prior to mRNA quantitation. 18 S rRNA was used as a control to normalize gene expression.

**Adenoviral Transduction**—Adenoviruses were produced at the Gene Therapy Laboratory of Nantes. They contained, in tandem, the green fluorescent protein (GFP) gene and the full-length human ATGL or HSL cDNA downstream of separate cytomegalovirus promoters (29). An adenovirus only containing the GFP gene was used as control. On day 12 of differentiation, the cells were infected for 6 h at a multiplicity of infection (m.o.i.) of 400 unless stated otherwise. Gene expression, flux measurements, and maximal activities were determined 72 h post-transduction.

**RNA Interference**—RNA interference was achieved by small interfering RNA. Briefly, on day 7 of differentiation, hMADS cells were detached from culture dishes with 0.25% trypsin/EDTA (Invitrogen) and counted. Control (siGFP; Ambion) or gene-specific small interfering RNAs for HSL (Ambion), ATGL (Ambion), and CGI-58 (Qiagen) were delivered into adipocytes at 100 pmol/2 million cells (1100 volts, 20 ms) with a microporator (Digitalbio). The adipocytes were then mixed with DM and reseeded onto Biocoat collagen multiwell plates (BD Biosciences). Gene expression, flux measurements, and enzymatic activities were assessed 6 days post-microporation. For each gene, two separate small interfering RNAs were tested. The targeted sequences, flanked with dTdT overhangs, for data presented are: GFP, 5'-GCA GCA CGA CUU CUU CAA G; HSL, 5'-AGG ACA ACA UAG CCU UCU U; ATGL, 5'-AGU UCA UUG AGG UAU CUA A; and CGI-58, 5'-GGC CUG AUU UCA AAC GAA A.

**Lipolytic Flux Measurement**—Whole cell lipolysis was investigated using two approaches: glycerol and nonesterified fatty acids (NEFAs) release in culture media, and radioactive lipolytic flux after inhibition of fatty acid re-esterification. For the former, lipolysis was assessed in DM lacking differentiation agents but supplemented with 2% BSA. The medium was changed, and following 3 h of treatment, glycerol and NEFAs released in the medium were measured using commercially available kits (free glycerol reagent from Sigma and NEFA-C from Wako Chemicals). To circumvent complications in cultured cells caused by important re-esterification flux of FAs, we performed whole cell lipolysis measurements in the presence of Triacsin C (Sigma), an inhibitor of acyl-CoA synthase. Because acyl-CoA synthase is a core component of NEFA determination kits, we combined the use of Triacsin C to a radioactive lipolytic flux approach. Briefly, lipolysis was carried out following an overnight loading period of hMADS cells with DM lacking differentiation agents but supplemented with 2% BSA and [<sup>3</sup>H-9,10]oleic acid (OA) (final concentration, 50  $\mu$ M, 8  $\mu$ Ci/ml; Amersham Biosciences). On the next morning, loading medium was discarded, and the cells were washed twice with phosphate-buffered saline with 1% BSA (Sigma) to remove residual loading medium and nonincorporated [<sup>3</sup>H-9,10]OA. Fresh DM supplemented with 2% BSA and Triacsin C (10  $\mu$ M)



## HSL and ATGL Control of Human Fat Cell Lipolysis

was added to initiate lipolysis. The medium (50  $\mu$ l) was sampled at time 0 to determine baseline levels of [ $^3$ H-9,10]OA. Following 3 h of drug treatment, the medium was sampled for counting of released [ $^3$ H-9,10]OA. The cells were washed twice with phosphate-buffered saline and scraped with extraction buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol) for protein normalization of lipolysis. Protein concentrations were determined with Bio-Rad protein assay using BSA as standard.

**Lipase Activity**—*In vitro* enzymatic activities were performed as described (30). Briefly, triolein or cholesterol oleate was emulsified with phospholipids by sonication. Fat-depleted BSA (Sigma) was used as a FA acceptor. Cytosolic fractions of hMADS adipocytes were incubated for 30 min at 37 °C with the different substrates. Hydrolysis was stopped, and radiolabeled oleic acid released was measured using a scintillation counter (Tri-Carb 2100TR; Packard). To determine HSL-independent TG lipase activity, the selective HSL inhibitor Bay was added during assays.

**Immunoblotting**—Western blots were performed on cytosolic and fat cake fractions of hMADS cells. The fractions of interest were separated with four series of differential centrifugation at 21,000  $\times$  g (4 °C). After the initial centrifugation step (40 min), which served to pellet organelles, the cytosol was aspirated with a syringe, leaving the fat cake behind. Each fraction was spun again and the cytosol was aspirated from the fat cake to yield clean respective fractions. Each fraction was transferred to a clean tube, and the fat cake was resuspended in a small volume of extraction buffer. Unless noted otherwise, equivalent amounts of protein present in samples were resolved in 8% SDS-PAGE. The separated proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (Hybond ECL; GE Healthcare). The blots were incubated and immunoblotted with polyclonal anti-hHSL (1:12,000; gift from Dr. Cecilia Holm, Lund University, Lund, Sweden), anti-hATGL (1:1000; Cell Signaling), and anti-hCGI-58 (1:1000; Tebu-Bio). Normalization of cytosolic and fat cake fractions was performed with anti- $\beta$ -actin (1:1000; Cell Signaling), and anti-vimentin (1:1000; Euromedex), respectively. Bound immunoglobulins were detected with a horseradish peroxidase-labeled goat anti-rabbit or anti-mouse IgG conjugate. Revelation was performed using enhanced chemiluminescence (ECL Plus; GE Healthcare) and densitometry analysis of bands with ImageQuant TL V2005 (GE Healthcare).

**Immunocytochemistry**—To examine localization of HSL and ATGL in the same cell, we developed a sequential double immunohistochemical staining procedure. Briefly, the cells were fixed and permeabilized as previously described (31). Then slides were incubated with the primary antibody against the first antigen (chicken anti-HSL, 1:500) overnight at 4 °C in incubation buffer (permeabilization buffer with 5% fetal calf serum). The slides were washed three times with permeabilization buffer over a 15-min period and then incubated for 1 h with Alexa Fluor 488 goat anti-chicken (A11039) in incubation buffer at room temperature. The slides were washed as before and then incubated overnight at 4 °C with the primary antibody against the second antigen (rabbit anti-ATGL at 1:300) in incubation buffer. The slides were again washed and incubated for 1 h with Alexa Fluor 568 donkey anti-rabbit (A10042) at 1:1500

and Hoechst 33258 at 1:2000 in incubation buffer. For each primary antibody, control experiments were performed, and antibodies were tested using Western blot methodology. All of the primary antibodies were detecting one single band corresponding to the predicted molecular mass of the protein. Specificity of secondary antibodies was tested in the control experiments. Alexa Fluor 568 donkey anti-rabbit antibody was not staining cells incubated with chicken anti-HSL and Alexa Fluor 488 Goat anti-Chicken antibodies. Similarly, Alexa Fluor 488 goat anti-chicken antibody gave no signal in cells incubated with rabbit anti-ATGL and 568 donkey anti-rabbit antibodies. The chicken anti-HSL antibody was a kind gift from Dr. Cecilia Holm. The rabbit anti-ATGL antibody was from Cell Signaling. Alexa fluorophore-conjugated secondary antibodies were all from Invitrogen Molecular Probes.

**Microscopy and Image Analysis**—Immunofluorescence images were made with an Axio Observer.Z1 inverted microscope (Carl Zeiss MicroImaging) using a 63 $\times$ /1.40 oil Plan-Apochromat lens and an Axiocam MRm camera. The following filters were used for indicated fluorophores: Alexa 488, filter 489038; and Alexa 568, filter 489043. No cross-bleeding was observed between red and green channels. Optical sections were taken at the calculated optimal z axis interval (Nyquist theory) beginning at the surface of the cell. At least 50 sections were made of each cell. Image stacks were deconvolved with the constrained iterative maximum likelihood algorithm, giving results with confocal-like properties. Automatic correction for Z-stacks was included in the deconvolution algorithm. This function corrected for bleaching and lamp flicker. At least 10 cells were analyzed for each condition. The intensity distribution within the colocalization region (extent of colocalization) was evaluated by Pearson's correlation coefficient ( $r^2$ ) for each optical section (after deconvolution), and a mean of Pearson's coefficient was calculated. Statistical analysis was done using unpaired *t* test. A straight line was drawn across the cell image, and distribution of signal in each channel along the line was evaluated in different optical sections. Matching profiles of green and red channels were regarded as colocalization.

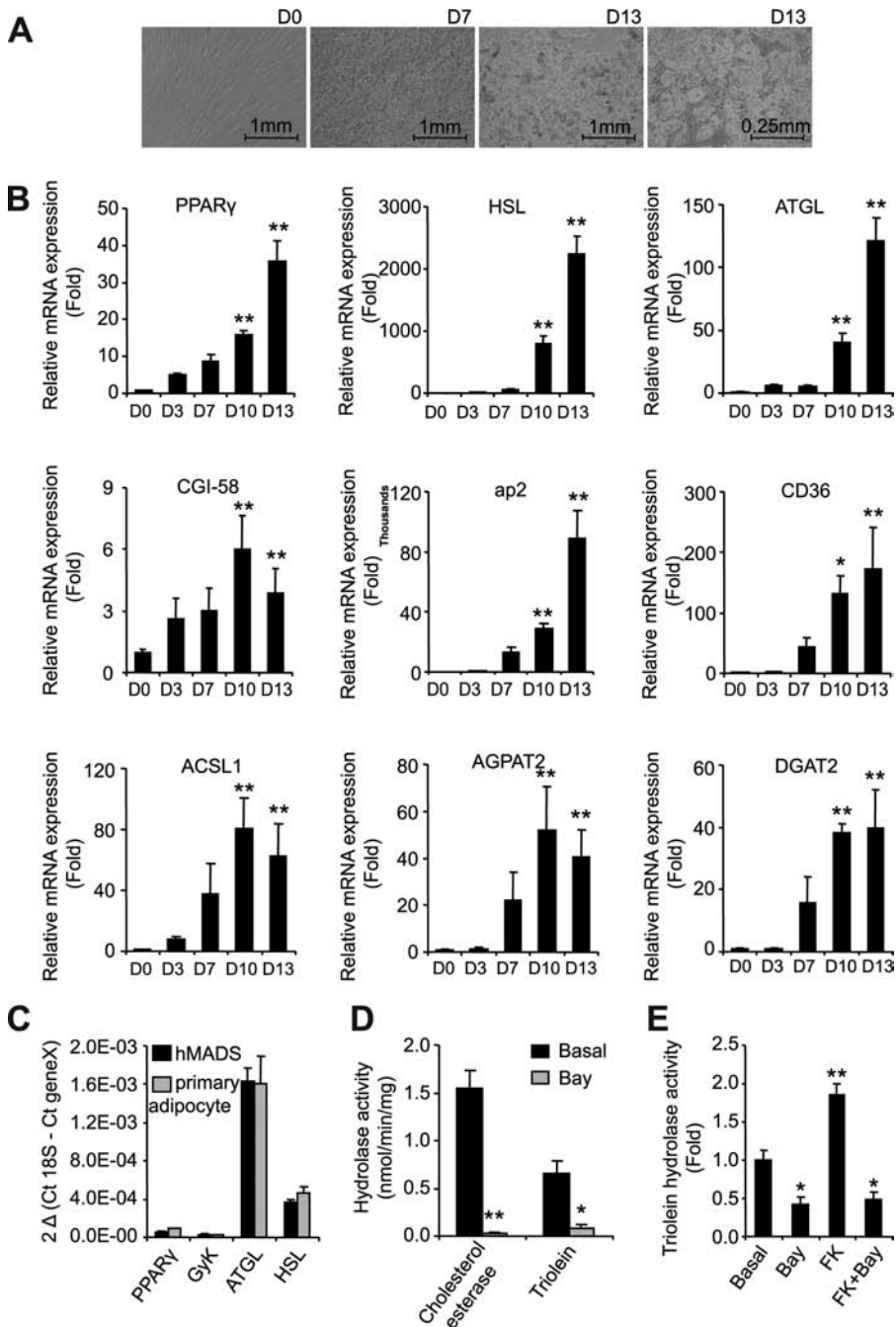
**Statistical Analysis**—Statistical significance was determined by one-way ANOVA (Dunnett's post hoc test), two-way ANOVA (Bonferroni correction), or Pearson's correlation coefficient. Group differences were considered significant for  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*), and  $p < 0.001$  (\*\*\*)

## RESULTS

**The hMADS Cell Line, an Appropriate Model to Study Human Fat Cell Metabolism**—To study human adipocyte metabolism, we chose to use the hMADS cell line (25, 26). It offers the advantages of being of human white adipose tissue origin, while being less variable than primary culture of preadipocytes. During differentiation, visual examination of the cells clearly demonstrated a phenotypical progression from fibroblast-type cells at day 0 to round-shaped cells by day 7 (Fig. 1A). Significant lipid accumulation occurred between days 7 and 15. Day 13 was established as the optimal day for handling cells, after which they became overly fragile. Differentiation yield was estimated at 80–85%. We followed differentiation kinetics with real time reverse transcription PCR to validate the use of this



## HSL and ATGL Control of Human Fat Cell Lipolysis



**FIGURE 1. hMADS cells as a model to study human adipocyte metabolism.** *A*, representative micrographs of hMADS cells at days 0, 7, and 13 of differentiation. *B*, gene expression of fatty acid metabolism genes throughout hMADS differentiation, expressed as fold induction from day 0. *C*, gene expression of differentiation markers in hMADS and primary adipocytes at day 13 of differentiation, expressed as  $2\Delta C_t$ . *GyK*, glycerol kinase. *D*, cholesterol esterase and triolein hydrolyase activity of hMADS cells in the presence and absence of Bay ( $10 \mu\text{M}$ ) during the assay. *E*, triolein hydrolyase activity of hMADS cells pretreated with Bay ( $10 \mu\text{M}$ ) and/or FK ( $1 \mu\text{M}$ ). The data are presented as the means  $\pm$  S.D. ( $n = 4$ ). For one-way ANOVA, \*,  $p < 0.05$ , significantly different from day 0 or basal condition.

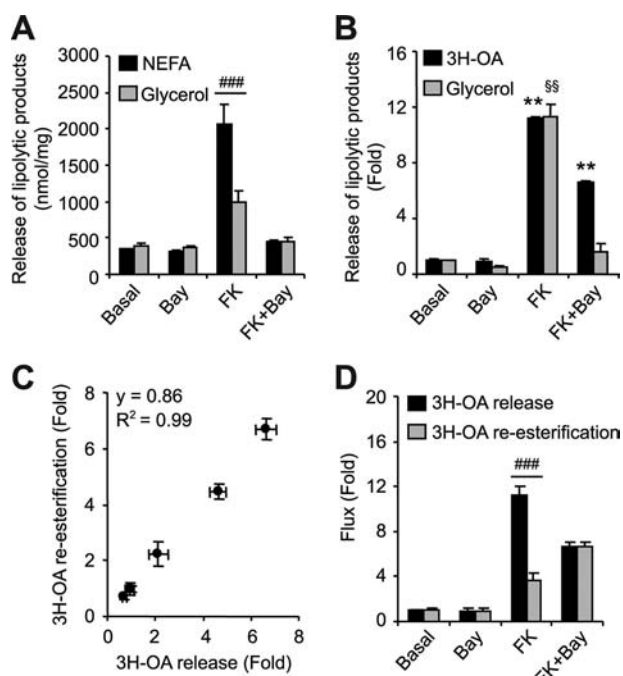
model for investigation of fat cell metabolism (Fig. 1*B*). Expression levels of PPAR $\gamma$ , lipases, FA transporters, and esterification enzymes increased throughout differentiation, indicating a concerted up-regulation of FA metabolism genes in hMADS adipocytes. We then assessed gene expression in both hMADS adipocytes and primary culture of differentiated preadipocytes at day 13 of differentiation to further validate these cells as an acceptable model of human adipocytes (Fig. 1*C*).

Expression levels of PPAR $\gamma$ , HSL, and ATGL were comparable between the two models. Glycerol kinase expression was also examined given the importance of lipid turnover in cell culture models. Low levels of expression were observed in both cases (32). Next, we measured lipid hydrolase activity of HSL and ATGL in hMADS adipocytes. In white adipose tissue, cholesterol esterase hydrolase activity is entirely attributed to HSL (11). In hMADS adipocytes, the Bay compound totally inhibited this activity, showing that it is a highly potent HSL inhibitor (Fig. 1*D*). Using triolein as a substrate in the presence and absence of Bay demonstrates that HSL accounts for 85% of total TG hydrolase activity, whereas the remaining 15% is attributed to ATGL, the predominant non-HSL lipase represented in the cytosolic fraction (Fig. 1*D*). The respective contributions of HSL and ATGL to TG hydrolase activity in hMADS cells are comparable with what was previously observed in other human models such as primary culture of preadipocytes and adipose tissue (22). *In vitro* activation of triolein hydrolase activity by protein kinase A is attributed to HSL (33). Treatment of cells with the adenylate cyclase activator FK, alone or in combination with the HSL inhibitor Bay, illustrates that this was also the case for hMADS adipocytes (Fig. 1*E*). These data support the use of hMADS cells for studies of human fat cell metabolism.

**Whole Cell Lipolysis and Re-esterification**—To further evaluate TG breakdown in adipocytes, we next measured basal and FK-stimulated lipolysis in hMADS adipocytes. The robust release of NEFA and glycerol by FK treatment was totally abrogated by the addition of

Bay, suggesting a strict HSL dependence of the process (Fig. 2*A*). However, the NEFA to glycerol ratio under basal conditions was close to 1, indicating an important re-esterification of FA during lipolysis. In an attempt to circumvent re-esterification, we measured lipolysis in the presence of acyl-CoA synthase inhibitor, Triacsin C. It involved an overnight loading period of cells with [ $^3\text{H}$ -9,10]OA bound to BSA, followed 16 h later by a washing period to eliminate nonincorporated

## HSL and ATGL Control of Human Fat Cell Lipolysis



**FIGURE 2. Lipolysis and re-esterification fluxes in hMADS adipocytes.** *A*, release of lipolytic products NEFA and glycerol with/without Bay (10  $\mu$ M) and/or FK (1  $\mu$ M). *B*, [ $^3$ H-9,10]OA and glycerol release in the presence of Triacsin C (10  $\mu$ M) with/without Bay (10  $\mu$ M) and/or FK (1  $\mu$ M). *C*, correlation of [ $^3$ H-9,10]OA release and re-esterification fluxes. Re-esterification was calculated as follows: [( $^3$ H-9,10]OA release with Triacsin C - [ $^3$ H-9,10]OA release without Triacsin C)/( $^3$ H-9,10]OA release with Triacsin C). *D*, [ $^3$ H-9,10]OA release and re-esterification fluxes of hMADS with/without Bay (10  $\mu$ M) and/or FK (1  $\mu$ M). All of the lipolytic and re-esterification fluxes were measured over 3 h. The data are presented as the means  $\pm$  S.E. ( $n = 4-5$ ). For one-way ANOVA, \* or  $\$, p < 0.05$ , significantly different from own basal; for two-way ANOVA, #,  $p < 0.05$ , significantly different from basal condition.

[ $^3$ H-9,10]OA. Lipolysis was initiated with fresh medium in the presence of Triacsin C and drugs as indicated. Because [ $^3$ H-9,10]OA and glycerol release are not directly comparable, the results were expressed as fold induction over untreated cells (Fig. 2*B*). The similar stimulation observed for [ $^3$ H-9,10]OA and glycerol release during basal and FK-stimulated lipolysis shows that the re-esterification process was fully abolished. Subsequent experiments were therefore performed by measuring [ $^3$ H-9,10]OA release in the presence of Triacsin C to evaluate complete FA release without esterification as a confounding variable. This approach revealed an HSL-independent FK-stimulated lipolysis that was previously masked by FA re-esterification (Fig. 2, *A* versus *B*). This lipolytic event was likely the result of ATGL activation. Clearly, important re-esterification fluxes take place in hMADS adipocytes, a phenomenon also observed in primary cultures of adipocytes. The re-esterification to lipolysis ratio was  $0.86 \pm 0.02$  and was tightly coupled over a wide range of lipolytic fluxes (Fig. 2*C*). FK treatment successfully uncoupled re-esterification from lipolytic flux, whereas Bay addition restored coupling (Fig. 2*D*). Altogether, these data suggest a more important re-esterification of DG than monoglycerides in hMADS adipocytes.

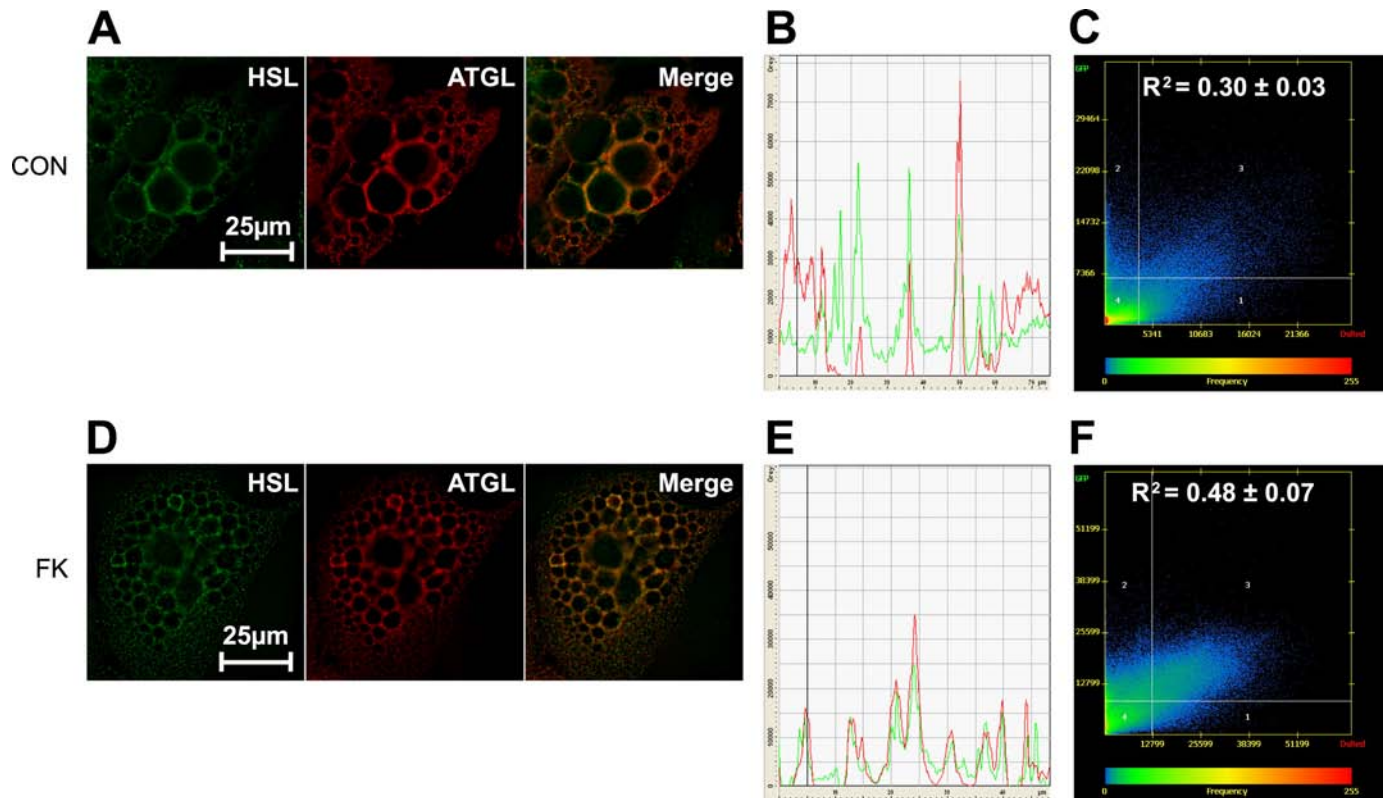
**HSL and ATGL Colocalization following FK Stimulation—**We investigated intracellular localization of HSL and ATGL in adipocytes in basal and FK-stimulated states. In the basal state, HSL was mainly localized to the cytosol, whereas ATGL was

localized both in the cytoplasm and around big central LD (Fig. 3, *A* and *B*). Some colocalization of HSL and ATGL was observed in the basal state (Fig. 3*C*). After stimulation with FK, fragmentation of LD was observed. HSL and ATGL were translocated to small peripheral LD (Fig. 3, *D* and *E*). Although staining profiles for HSL and ATGL differed to some extent prior to FK stimulation, they matched each other closely after stimulation. Consequently, the colocalization coefficient increased by 60% (Fig. 3*F*). The staining pattern of ATGL following FK stimulation suggests a translocation to LD and concomitant colocalization with HSL and therefore a potential implication of ATGL in stimulated lipolysis of hMADS adipocytes.

**Increased ATGL Content Modulates Basal Rates of Lipolysis in Fat Cells—**We altered HSL and ATGL balance in hMADS adipocytes to gain insight into their respective contributions to basal TG hydrolase activity and whole cell lipolysis. We first increased HSL and ATGL expression and content independently by adenoviral transductions using increasing m.o.i. (Fig. 4*A*). Triolein hydrolysis rates were determined in the absence or presence of Bay. From these data, we calculated the capacity of each lipase to hydrolyze a single ester bond. These computations revealed that the first ester bond TG hydrolase activity increased in proportion to the content of HSL or ATGL (Fig. 4*B*). Because a greater fraction of ATGL was found on LD than HSL ( $17 \pm 2\%$  versus  $9 \pm 1\%$ ,  $p < 0.05$ ) under the control and adenoviral transduction conditions (supplemental Fig. S1), ATGL activity was corrected to account for this difference. However, changes in TG hydrolase activity did not translate into alteration of whole cell lipolysis, because basal lipolysis was accentuated with ATGL overexpression, but not HSL (Fig. 4*C*). These results suggest that ATGL and HSL action in whole cell lipolysis is sequential despite the high *in vitro* capacity of HSL to initiate TG degradation. We next compared single (HSL or ATGL) with dual lipase (HSL and ATGL) overexpression at a given m.o.i. HSL and ATGL protein content were equally increased in single and dual lipase overexpression (Fig. 4*D*). As expected, HSL overexpression increased cytosolic Bay-inhibited TG hydrolase activity (Fig. 4*E*). ATGL overexpression enhanced cytosolic ATGL hydrolase activity but also potentiated HSL hydrolase activity when compared with AdGFP, independently of HSL content. These results support the notion that ATGL content is limiting HSL action. Single ATGL and dual lipase overexpression showed that basal fat cell lipolysis is dependent upon ATGL but not HSL content (Fig. 4*F*).

**Gene Silencing of Lipases Reveals an Important Role for ATGL in Stimulated Lipolysis—**We next reduced lipase expression using gene silencing. HSL and ATGL gene expression were reduced by 80–90% (Fig. 5*A*). Silencing of the lipases did not affect differentiation, as assessed by PPAR $\gamma$  gene expression (data not shown). Western blot analysis clearly shows reduced HSL and ATGL protein content following their respective targeted silencing. Gene silencing led to two interesting observations. First, ATGL protein content increased slightly but significantly (22%,  $p < 0.05$ ) with HSL silencing (Fig. 5, *B* and *C*). Second, CGI-58 protein content increased by over 100% ( $p < 0.01$ ) with ATGL silencing (Fig. 5, *B* and *C*). These adaptations were observed in both the cytosolic and fat cake fractions and did not involve cellular redistribution (supplemental Fig. S2).





**FIGURE 3. Intracellular localization of HSL and ATGL before and after FK stimulation.** Control (CON) and FK-treated cells were stained for ATGL and HSL and microscopy images were analyzed as described under "Experimental Procedures." *A* and *D*, immunofluorescence images of one representative optical section after deconvolution in control and FK-treated cells. *B* and *E*, distribution of the staining across the cell for one representative optical section in control and FK-treated cells. *C* and *F*, colocalization scatterplots evaluated by Pearson colocalization coefficients as means from at least 150 optical sections from five different cells in control ( $0.30 \pm 0.03$ ) and FK-treated ( $0.48 \pm 0.07$ ) cells. Colocalization coefficients for control and treated cells differed significantly ( $p < 0.0001$ ).

HSL TG hydrolase activity was reduced by 60%, whereas ATGL TG hydrolase activity was reduced by 50% (data not shown). The efficient silencing of the lipases prompted us to analyze lipolysis. Basal lipolysis was reduced in cells with decreased ATGL expression (Fig. 5*D*). Surprisingly, dual silencing of HSL and ATGL did not significantly alter basal lipolysis. FK-stimulated lipolysis was, however, severely reduced. Diminution of HSL expression resulted in a 53% decrease, whereas that of ATGL was more drastic and resulted in a 92% decrease in FK-stimulated lipolysis (Fig. 5*E*). These findings emphasize the rate-limiting nature of ATGL action not only in basal but also in FK-stimulated fat cell lipolysis.

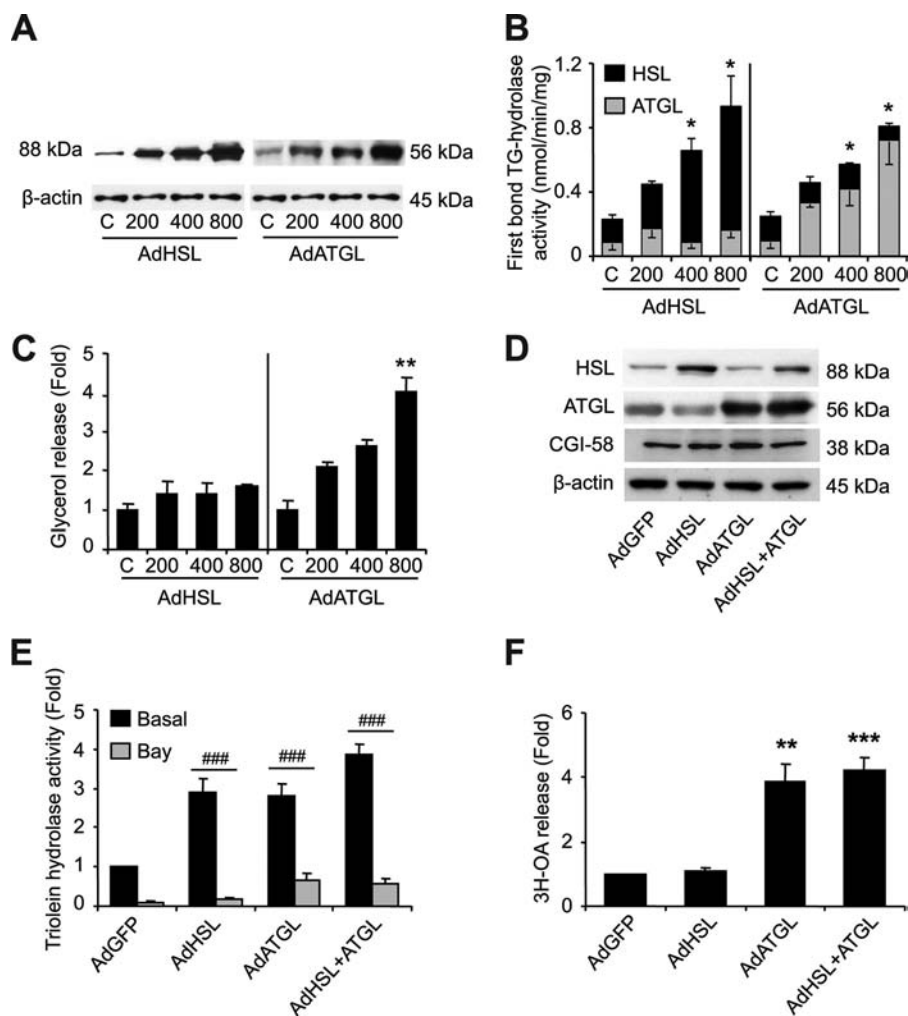
**Importance of CGI-58 in the Regulation of ATGL for Basal and FK-stimulated Lipolysis**—To further elucidate the role and regulation of ATGL in basal and FK-stimulated lipolysis, we reduced the expression of its coactivator CGI-58. Gene silencing of CGI-58 alone or with ATGL was equally efficient in reducing CGI-58 expression (Fig. 6*A*) and did not influence HSL or PPAR $\gamma$  expression (data not shown). Western blot analyses demonstrate a clear reduction of ATGL or CGI-58 protein levels following their respective gene silencing (Fig. 6*B*). As previously noted in Fig. 5*B*, ATGL silencing more than doubled CGI-58 protein content in the cytosolic (Fig. 6, *B* and *C*) and fat cake fraction (supplemental Fig. S2) of hMADS adipocytes. Similarly, ATGL protein content increased by almost 50% with silencing of CGI-58 (Fig. 6, *B* and *C*, and supplemental Fig. S2). TG hydrolase activity was unchanged by the absence of CGI-58

(data not shown). However, basal and FK-stimulated lipolysis were reduced by 40 and 82%, respectively (Fig. 6, *D* and *E*), revealing the importance of CGI-58 in the control of lipolysis. Dual silencing of ATGL and CGI-58 did not further reduce lipolysis.

## DISCUSSION

Obesity is characterized by an expanded fat mass and significant FA release in the bloodstream. A defect in human adipose tissue lipolysis, which may be primary, has been shown in obesity (22, 23, 34). Moreover, the link between circulating FA and insulin resistance is well documented (35); therefore pharmacological tools targeting adipose tissue lipases in the treatment of insulin resistance are of interest (24). To gain insight into the molecular mechanisms governing adipose tissue lipolysis and the pathological and physiological implications of the lipases, we investigated the respective contributions of HSL, ATGL, and cofactor CGI-58 in basal and FK-stimulated human fat cell lipolysis. We used hMADS adipocytes, which originate from human white adipose tissue and have essential fat cell characteristics (25, 26). We further validated the use of this model by showing a concerted up-regulation of genes involved in FA metabolism throughout differentiation as well as similarities to differentiated preadipocytes (22). The hMADS adipocyte cell line is a valuable tool for studying human fat cell lipolysis, particularly in light of differences between human and

## HSL and ATGL Control of Human Fat Cell Lipolysis



**FIGURE 4. Assessment of HSL and ATGL overexpression in hMADS adipocytes.** hMADS cells infected with adenoviruses containing the GFP gene alone or in tandem with human HSL and/or ATGL cDNA. m.o.i.s of HSL or ATGL ranged from 200 to 800 but were supplemented with GFP alone for a total m.o.i. of 800 in all conditions. *A*, Western blots of HSL and ATGL normalized to  $\beta$ -actin. *B*, theoretical HSL and ATGL first bond TG hydrolase activity of hMADS cells. Assuming that all three ester bonds of TG substrate (triolein) are cleaved during the *in vitro* assay (50), the activity of HSL was calculated as follows: [(TG hydrolase activity without Bay – TG hydrolase activity with Bay)/3]. The activity of ATGL is calculated from TG hydrolase activity in the presence of Bay. *C*, glycerol release. *D*, Western blots of HSL, ATGL, and CGI-58 in cytosolic fractions of hMADS adipocytes normalized to  $\beta$ -actin for single and dual adenoviral transductions of lipases at 400 m.o.i. *E*, cytosolic triolein hydrolase activity in the presence and absence of Bay (10  $\mu$ M) during assays following single and double adenoviral transductions of lipases at 400 m.o.i. *F*, basal [ $^3$ H-9,10]OA release with Triacsin C (10  $\mu$ M) following single and dual adenoviral transductions of lipases at 400 m.o.i. The data are presented as the means  $\pm$  S.E. The experiments were performed in duplicate. For one-way ANOVA ( $n = 3$ ), \*,  $p < 0.05$ , significantly different from own control or AdGFP; for two-way ANOVA ( $n = 6$ ), #,  $p < 0.05$ , significantly different from AdGFP condition.

rodent adipose tissue lipolysis (5). It complements recent developments in lipolysis that largely originate from rodent models or cell types other than fat cells (10, 16, 36–39).

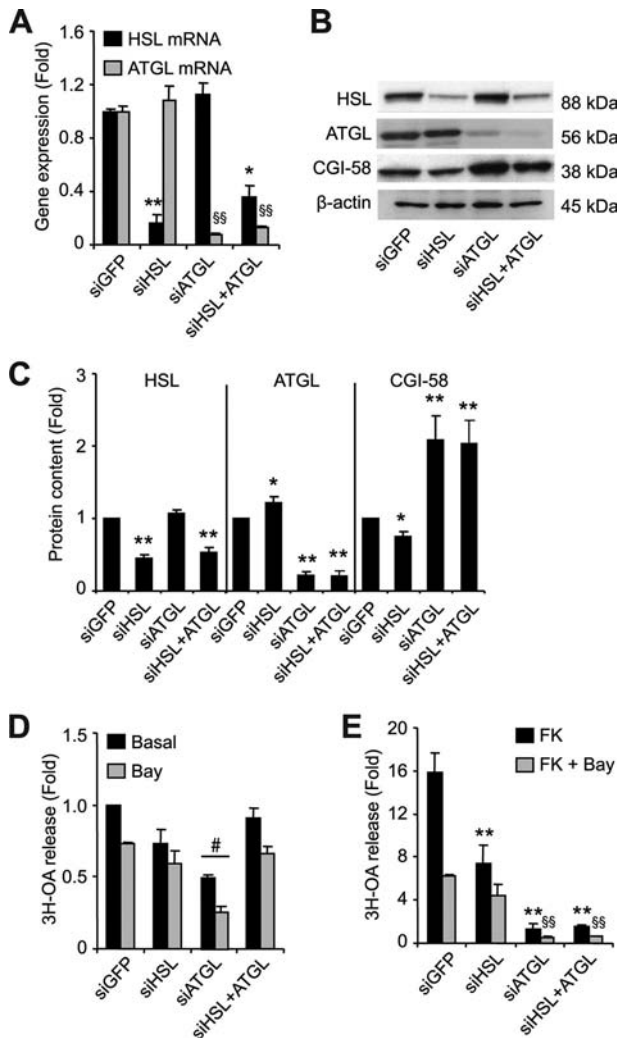
Re-esterification of FA, estimated from the ratio of released NEFA and glycerol (40), is often overlooked in adipose tissue metabolism. This is a critical issue because the balance between lipolysis and re-esterification determines the net efflux of FA from the fat cells. In mature adipocytes, two of every three FAs are re-esterified under basal conditions (41, 42), but the implication of lipolytic flux or lipase content in this process is poorly examined. Re-esterification and lipolysis were tightly coupled in hMADS adipocytes and remained unperturbed by changes in lipases content. A transient reduction in DAG stores did, however, challenge re-esterification. In support of this hypothesis, it

has been shown that newly synthesized DG are preferentially hydrolyzed during stimulated lipolysis (43). Conversely, it would be of interest to determine whether re-esterification is facilitated by a larger adipose tissue DG pool, which may temporarily be present in obesity as a result of impaired FK-stimulated lipolysis and HSL expression (22, 23).

The recent discovery of ATGL has led to a reassessment of the roles of lipases in fat cell lipolysis. Both HSL and ATGL have the *in vitro* capacity to cleave the first FA bond of a TG molecule, which raises questions about their respective roles in basal and FK-stimulated lipolysis in a whole adipocyte context. Our results demonstrate an HSL TG hydrolase capacity exceeding that of ATGL, as previously reported for human adipose tissue (14). However, whole cell basal lipolysis measurements clearly demonstrate the governing nature of ATGL. First, increased lipolysis in response to adenoviral transduction of ATGL indicates that, unlike HSL, ATGL regulates basal lipolysis independently of the perilipin barrier on LDs. A model detailing this interaction in murine adipocytes has previously been proposed (44, 45). Second, alteration of basal lipolysis with overexpression and silencing of ATGL, but not HSL, demonstrate the sequential action of these lipases. This is in line with decreased glycerol and FA release with ATGL knockdown in 3T3 L1 (46) and the lack of accentuated lipolysis in human HSL transgenic mice (47).

We previously advocated a prominent role for ATGL in basal lipolysis and for HSL in stimulated conditions (22). The combination of approaches and findings reported here indicate that ATGL is also governing FK-stimulated lipolysis. First, our immunocytochemistry results demonstrate the translocation of ATGL from the cytosol to smaller LD following FK stimulation. This increased its colocalization with HSL under stimulated conditions. These findings are in slight contrast with those from Granneman *et al.* (31), who showed ATGL translocation to LD in murine adipocytes but without alteration of HSL and ATGL colocalization. Thus, there may be some species differences in the intracellular trafficking of lipases during fat cell lipolysis. Second, although TG hydrolase

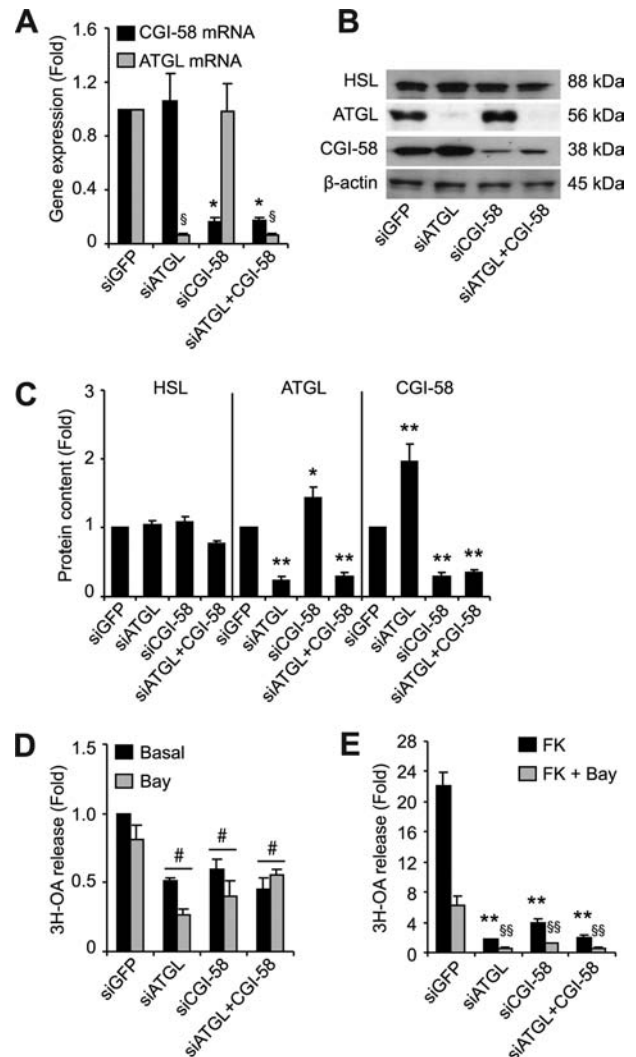
## HSL and ATGL Control of Human Fat Cell Lipolysis



**FIGURE 5. Assessment of HSL and ATGL gene silencing in hMADS adipocytes.** Control (*siGFP*) or gene-specific small interfering RNAs for HSL and/or ATGL were delivered into suspended adipocytes with a microporator and reseeded in DM. *A*, gene expression of HSL and ATGL expressed as fold induction over *siGFP*. *B*, Western blots of HSL, ATGL, and CGI-58 in cytosolic fractions of hMADS cells. *C*, densitometry analysis of Western blots normalized to  $\beta$ -actin in cytosolic fractions ( $n = 10$ ). *D*, basal [ $^3$ H-9,10]OA release with Triacsin C ( $10 \mu\text{M}$ ) in the presence and absence of Bay ( $10 \mu\text{M}$ ). *E*, FK-stimulated [ $^3$ H-9,10]OA release with Triacsin C ( $10 \mu\text{M}$ ) in the presence and absence of Bay ( $10 \mu\text{M}$ ) expressed as fold induction over basal levels. The data are presented as the means  $\pm$  S.E. The experiments were performed in duplicate. Unless stated otherwise, for one-way ANOVA ( $n = 3$ ), \* or  $\S$ ,  $p < 0.05$ , significantly different from corresponding basal; for two-way ANOVA ( $n = 6$ ), #,  $p < 0.05$ , significantly different from *siGFP* condition.

activity in FK-stimulated conditions is clearly dependent upon HSL, measuring lipolysis in the absence of re-esterification revealed an important HSL-independent contribution to stimulated lipolysis. Lastly, abrogation of FK-stimulated lipolysis with ATGL or CGI-58 gene silencing confirmed ATGL as the rate-limiting enzyme in FK-stimulated lipolysis. Together, our results illustrate the importance of ATGL in DG provision to HSL in basal and FK-stimulated adipocyte lipolysis despite the capacity of HSL to cleave the first TG ester bond.

CGI-58 has recently been shown to exert lysophosphatidic acid acyltransferase activity (48). This characteristic may appear to conflict with its role as an activator of ATGL. How-



**FIGURE 6. Assessment of CGI-58 gene silencing in hMADS adipocytes.** Control (*siGFP*) or gene-specific small interfering RNAs for ATGL and/or CGI-58 were delivered into suspended adipocytes with a microporator and reseeded in DM. Gene expression and functional measurements were assessed on day 13, 6 days post-microporation. *A*, gene expression of ATGL and CGI-58 expressed as fold induction over *siGFP*. *B*, Western blot analyses in cytosolic fractions of hMADS cells. *C*, densitometry analysis of Western blots normalized to  $\beta$ -actin in cytosolic fractions ( $n = 10$ ). *D*, basal [ $^3$ H-9,10]OA release with Triacsin C ( $10 \mu\text{M}$ ) in the presence and absence of Bay ( $10 \mu\text{M}$ ). *E*, FK-stimulated [ $^3$ H-9,10]OA release with Triacsin C ( $10 \mu\text{M}$ ) in the presence and absence of Bay ( $10 \mu\text{M}$ ) expressed as fold induction over basal levels. The data are presented as the means  $\pm$  S.E. The experiments were performed in duplicate. Unless stated otherwise, for one-way ANOVA ( $n = 3$ ), \* or  $\S$ ,  $p < 0.05$ , significantly different from corresponding *siGFP*; for two-way ANOVA ( $n = 6$ ), #,  $p < 0.05$ , significantly different from *siGFP* condition.

ever, both functions appear to be independent of each other because CGI-58 overexpression increases total phospholipids yet reduces TG levels. Nonetheless, gene silencing of CGI-58 evidenced the great dependence of ATGL on CGI-58 in basal and FK-stimulated human adipocyte lipolysis, despite the more modest activation of ATGL activity by CGI-58 in human compared with the mouse (Ref. 38 and data not shown). The importance of ATGL and CGI-58 in both basal and FK-stimulated lipolysis contrasts with two current models detailing the interaction between ATGL and its coactivator (44, 45). One model postulates that ATGL is not associated with CGI-58 under basal conditions but rather requires FK-dependent phosphorylation



## HSL and ATGL Control of Human Fat Cell Lipolysis

of perilipin for release and association of CGI-58 with ATGL. In another model, CGI-58 binds and activates ATGL on LD via interaction with perilipin A in the basal state but not following FK-dependent phosphorylation of perilipin. Our results in human adipocytes highlight species differences in whole cell dynamics of the lipolytic machinery. Other factors may be important for the control of lipolysis and lipase activity such as ADRP (adipose differentiation-related protein) and other members of the lipid-binding PAT (perilipin, adipophilin, Tip47 (tail-interacting protein 47)) protein family (39, 44, 49). The need for addressing their role in human fat cells is warranted.

Increased CGI-58 content with ATGL silencing is intriguing. Western blot analysis of CGI-58 in the fat cake fraction of adipocytes demonstrates that CGI-58 is not redistributed from LD to the cytosol following ATGL silencing. Stability of CGI-58 may be improved when interaction between CGI-58 and ATGL is reduced, as would be the case during ATGL gene silencing. Increased ATGL protein content as a result of CGI-58 silencing further supports this hypothesis.

In conclusion, despite the strong TG hydrolase activity of HSL toward TG *in vitro*, ATGL governs basal and FK-stimulated lipolysis in human fat cells. ATGL action is critical in providing DG to HSL, such that the latter can perform its unique action in DG degradation. ATGL acts independently of perilipin and requires CGI-58 for both basal and FK-stimulated lipolysis in human hMADS adipocytes. Our data therefore suggest that adipose tissue ATGL could be targeted, in addition to HSL, to reduce FA release as a strategy to combat the metabolic syndrome.

*Acknowledgments*—We are indebted to Elisabeth Vatan, Carine Valle, and Balbine Roussel (INSERM U858) for technical expertise. We are grateful to Jean José Maoret (Institut Fédératif de Recherche Biomédical de Toulouse, IFR150). We thank the Vector Core of the University Hospital of Nantes, supported by the Association Française contre les Myopathies for the production of adenovirus vectors.

### REFERENCES

- Belfrage, P., Jergil, B., Strålfors, P., and Tornqvist, H. (1978) *Adv. Exp. Med. Biol.* **101**, 113–126
- Haemmerle, G., Zimmermann, R., Hayn, M., Theussl, C., Waeg, G., Wagner, E., Sattler, W., Magin, T. M., Wagner, E. F., and Zechner, R. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 4806–4815
- Zimmermann, R., Strauss, J. G., Haemmerle, G., Schoiswohl, G., Birner-Gruenberger, R., Riederer, M., Lass, A., Neuberger, G., Eisenhaber, F., Hermetter, A., and Zechner, R. (2004) *Science* **306**, 1383–1386
- Fredrikson, G., Tornqvist, H., and Belfrage, P. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* **876**, 288–293
- Langin, D., and Arner, P. (2006) *Trends Endocrinol. Metab.* **17**, 314–320
- Sengenès, C., Bouloumie, A., Hauner, H., Berlan, M., Busse, R., Lafontan, M., and Galitzky, J. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 48617–48626
- Egan, J. J., Greenberg, A. S., Chang, M. K., Wek, S. A., Moos, M. C., Jr., and Londos, C. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 8537–8541
- Strålfors, P., and Belfrage, P. (1985) *FEBS Lett.* **180**, 280–284
- Miyoshi, H., Perfield, J. W., 2nd, Souza, S. C., Shen, W. J., Zhang, H. H., Stancheva, Z. S., Kraemer, F. B., Obin, M. S., and Greenberg, A. S. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 996–1002
- Miyoshi, H., Souza, S. C., Zhang, H. H., Strissel, K. J., Christoffolete, M. A., Kovan, J., Rudich, A., Kraemer, F. B., Bianco, A. C., Obin, M. S., and Greenberg, A. S. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 15837–15844

- Osuga, J., Ishibashi, S., Oka, T., Yagyu, H., Tozawa, R., Fujimoto, A., Shionoiri, F., Yahagi, N., Kraemer, F. B., Tsutsumi, O., and Yamada, N. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 787–792
- Jenkins, C. M., Mancuso, D. J., Yan, W., Sims, H. F., Gibson, B., and Gross, R. W. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 48968–48975
- Villena, J. A., Roy, S., Sarkadi-Nagy, E., Kim, K. H., and Sul, H. S. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 47066–47075
- Mairal, A., Langin, D., Arner, P., and Hoffstedt, J. (2006) *Diabetologia* **49**, 1629–1636
- Lass, A., Zimmermann, R., Haemmerle, G., Riederer, M., Schoiswohl, G., Schweiger, M., Kienesberger, P., Strauss, J. G., Gorkiewicz, G., and Zechner, R. (2006) *Cell Metab.* **3**, 309–319
- Schweiger, M., Schreiber, R., Haemmerle, G., Lass, A., Fledelius, C., Jacobsen, P., Tornqvist, H., Zechner, R., and Zimmermann, R. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 40236–40241
- Bougnères, P., Stunff, C. L., Pecqueur, C., Pinglier, E., Adnot, P., and Ricquier, D. (1997) *J. Clin. Invest.* **99**, 2568–2573
- Jensen, M. D., Haymond, M. W., Rizza, R. A., Cryer, P. E., and Miles, J. M. (1989) *J. Clin. Invest.* **83**, 1168–1173
- Jocken, J. W., Goossens, G. H., van Hees, A. M., Frayn, K. N., van Baak, M., Stegen, J., Pakbiers, M. T., Saris, W. H., and Blaak, E. E. (2008) *Diabetologia* **51**, 320–327
- Berndt, J., Klösch, S., Klötting, N., Ruschke, K., Kern, M., Fasshauer, M., Schön, M. R., Stumvoll, M., and Blüher, M. (2008) *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **116**, 203–210
- Jocken, J. W., Langin, D., Smit, E., Saris, W. H., Valle, C., Hul, G. B., Holm, C., Arner, P., and Blaak, E. E. (2007) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **92**, 2292–2299
- Langin, D., Dicker, A., Tavernier, G., Hoffstedt, J., Mairal, A., Rydén, M., Arner, E., Sicard, A., Jenkins, C. M., Viguier, N., van Harmelen, V., Gross, R. W., Holm, C., and Arner, P. (2005) *Diabetes* **54**, 3190–3197
- Large, V., Reynisdottir, S., Langin, D., Fredby, K., Klannemark, M., Holm, C., and Arner, P. (1999) *J. Lipid Res.* **40**, 2059–2066
- Wang, M., and Fotsch, C. (2006) *Chem. Biol.* **13**, 1019–1027
- Rodriguez, A. M., Elabd, C., Delteil, F., Astier, J., Vernochet, C., Saint-Marc, P., Guesnet, J., Guezennec, A., Amri, E. Z., Dani, C., and Ailhaud, G. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **315**, 255–263
- Rodriguez, A. M., Pisani, D., Dechesne, C. A., Turc-Carel, C., Kurzenne, J. Y., Wdziekonski, B., Villageois, A., Bagnis, C., Breittmayer, J. P., Groux, H., Ailhaud, G., and Dani, C. (2005) *J. Exp. Med.* **201**, 1397–1405
- Lowe, D. B., Magnuson, S., Qi, N., Campbell, A. M., Cook, J., Hong, Z., Wang, M., Rodriguez, M., Acebe, F., Klunder, H., Wong, W. C., Bullock, W. H., Salhanick, A. I., Witman-Jones, T., Bowling, M. E., Keiper, C., and Clairmont, K. B. (2004) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 3155–3159
- Tiraby, C., Tavernier, G., Lefort, C., Larrouy, D., Bouillaud, F., Ricquier, D., and Langin, D. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 33370–33376
- He, T. C., Zhou, S., da Costa, L. T., Yu, J., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 2509–2514
- Holm, C., Olivecrona, G., and Ottosson, M. (2001) *Assays of Lipolytic Enzymes in Methods in Molecular Biology* (Ailhaud, G., ed) pp. 97–119, Humana, Totowa, NJ
- Granneman, J. G., Moore, H. P., Granneman, R. L., Greenberg, A. S., Obin, M. S., and Zhu, Z. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 5726–5735
- Mazzucotelli, A., Viguier, N., Tiraby, C., Annicotte, J. S., Mairal, A., Klimcakova, E., Lepin, E., Delmar, P., Dejean, S., Tavernier, G., Lefort, C., Hidalgo, J., Pineau, T., Fajas, L., Clément, K., and Langin, D. (2007) *Diabetes* **56**, 2467–2475
- Khoo, J. C., Aquino, A. A., and Steinberg, D. (1974) *J. Clin. Invest.* **53**, 1124–1131
- Hellström, L., Langin, D., Reynisdottir, S., Dauzats, M., and Arner, P. (1996) *Diabetologia* **39**, 921–928
- Boden, G. (1997) *Diabetes* **46**, 3–10
- Brasaemle, D. L., Levin, D. M., Adler-Wailes, D. C., and Londos, C. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* **1483**, 251–262
- Miyoshi, H., Perfield, J. W., 2nd, Obin, M. S., and Greenberg, A. S. (2008) *J. Cell. Biochem.* **105**, 1430–1436
- Schweiger, M., Schoiswohl, G., Lass, A., Radner, F. P., Haemmerle, G., Malli, R., Graier, W., Cornaciu, I., Oberer, M., Salvayre, R., Fischer, J.,

## HSL and ATGL Control of Human Fat Cell Lipolysis

- Zechner, R., and Zimmermann, R. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 17211–17220
39. Yamaguchi, T., Omatsu, N., Morimoto, E., Nakashima, H., Ueno, K., Tanaka, T., Satouchi, K., Hirose, F., and Osumi, T. (2007) *J. Lipid Res.* **48**, 1078–1089
40. Vaughan, M. (1962) *J. Biol. Chem.* **237**, 3354–3358
41. Reshef, L., Olswang, Y., Cassuto, H., Blum, B., Croniger, C. M., Kalhan, S. C., Tilghman, S. M., and Hanson, R. W. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 30413–30416
42. Wang, T., Zang, Y., Ling, W., Corkey, B. E., and Guo, W. (2003) *Obes. Res.* **11**, 880–887
43. Edens, N. K., Leibel, R. L., and Hirsch, J. (1990) *J. Lipid Res.* **31**, 1351–1359
44. Brasaemle, D. L. (2007) *J. Lipid Res.* **48**, 2547–2559
45. Granneman, J. G., and Moore, H. P. (2008) *Trends Endocrinol. Metab.* **19**, 3–9
46. Kershaw, E. E., Hamm, J. K., Verhagen, L. A., Peroni, O., Katic, M., and Flier, J. S. (2006) *Diabetes* **55**, 148–157
47. Lucas, S., Tavernier, G., Tiraby, C., Mairal, A., and Langin, D. (2003) *J. Lipid Res.* **44**, 154–163
48. Ghosh, A. K., Ramakrishnan, G., Chandramohan, C., and Rajasekharan, R. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 24525–24533
49. Listenberger, L. L., Ostermeyer-Fay, A. G., Goldberg, E. B., Brown, W. J., and Brown, D. A. (2007) *J. Lipid Res.* **48**, 2751–2761
50. Raclot, T., Holm, C., and Langin, D. (2001) *Biochim. Biophys. Acta* **1532**, 88–96

## Lipolyse du tissu adipeux : compte rendu du Symposium international de Toulouse (2008)

### *International symposium on adipose tissue lipolysis*

A. Girousse

Laboratoire de recherches sur les obésités, Inserm U858, institut de médecine moléculaire de Rangueil, institut Louis-Bugnard, 1, avenue du Professeur-Jean-Poulhès, BP 84225, F-31432 Toulouse cedex 04, France

#### Introduction

Le 28 janvier 2008, un Symposium international sur la lipolyse du tissu adipeux (TA), organisé par Dominique Langin et Max Lafontan (Inserm U858 et université Paul-Sabatier, Toulouse, France), s'est tenu dans le nouveau bâtiment de l'institut de médecine moléculaire de Rangueil à Toulouse. L'objectif de la journée était de faire le point sur les dernières découvertes et leurs conséquences sur la compréhension des mécanismes physiologiques de l'obésité et sur la mise au point de nouvelles stratégies thérapeutiques. L'audience était constituée de 80 chercheurs de laboratoires académiques et industriels.

Le rôle physiologique majeur du TA blanc est de réguler l'homéostasie énergétique en stockant les lipides en période postprandiale et en restituant ces substrats lipidiques aux autres organes en période de déficit énergétique. La lipolyse, processus catabolique hautement régulé, permet l'hydrolyse des triglycérides (TG), stockés dans la gouttelette lipidique en acides gras (AG) et glycérol, qui sont alors libérés dans le plasma. Les mécanismes de contrôle de la lipolyse impliquent, chez l'homme, les catécholamines et les peptides natriurétiques et convergent sur deux enzymes clés hydrolysant les TG de la gouttelette lipidique, la lipase hormonosensible (LHS) et l'*adipose triglyceride lipase* (ATGL) (Fig. 1).

L'excès de masse grasse caractérisant l'obésité est majoritairement représenté par le TA sous-cutané. Cette masse adipeuse délivre, dans la circulation générale, de grandes quantités d'AG allant altérer les fonctions de divers organes. Le foie augmente alors sa production de glucose, les muscles en diminuent leur utilisation, la sécrétion pancréatique d'insuline est augmentée ; le cœur et les vaisseaux sont également influencés par ces fortes concentrations d'AG. Le TA viscéral, dont la masse croît

également, délivre des AG dans le système porte, affectant directement le métabolisme hépatique. Ce flux d'AG est accompagné d'une amplification de la synthèse de VLDL riches en TG. Le sujet obèse présente alors une hyperlipidémie, une intolérance au glucose, une insulino-résistance et une hyperinsulinémie à la source des complications liées à l'obésité (diabète de type 2, maladies cardiovasculaires...).

#### Voies lipolytiques et antilipolytiques

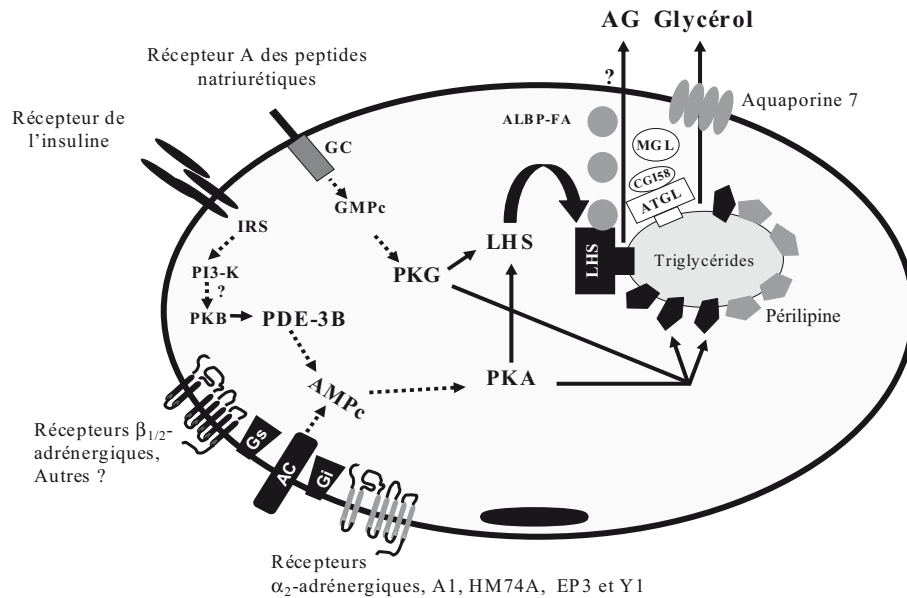
Max Lafontan

Le symposium a été ouvert par un exposé de Max Lafontan (I2MR, Inserm U858, Toulouse, France) proposant une vue d'ensemble de la lipolyse et présentant les particularités chez l'homme et les rongeurs. Après avoir rappelé les précautions nécessaires à l'étude de la lipolyse dans les modèles cellulaires d'adipocyte isolé, il a sensibilisé l'auditoire à l'importance des voies antilipolytiques souvent négligées dans l'étude de la lipolyse.

Les acteurs antilipolytiques (adénosine, acide nicotinique, prostaglandines, peptides NPY/PYY, adrénaline) exercent une régulation tonique de la lipolyse sur les récepteurs couplés à Gi (protéine G inhibitrice, Fig. 1) ou sur des récepteurs propres. Les récepteurs de ces différentes molécules (respectivement A<sub>1</sub>, HM74A, EP3, Y<sub>1</sub> et  $\alpha_2$ -adrénergiques) représentent de bons candidats pharmacologiques pour diminuer les taux plasmatiques d'AG dans le contexte de lutte contre le syndrome métabolique.

En matière de lipolyse, la physiologie comparée nous enseigne les particularités propres aux rongeurs. Outre la présence du TA brun, il existe des différences dans la réponse lipolytique. Par exemple, la voie des peptides natriurétiques n'existe pas chez les rongeurs [1]. On oublie souvent l'effet lipolytique du glucagon et des





**Fig. 1.** Contrôle de la lipolyse dans l'adipocyte blanc humain

Récepteurs A<sub>1</sub>, HM74A, EP3 et Y1, respectivement, récepteurs de l'adénosine, de l'acide nicotinique, des prostaglandines et des neuropeptides NPY/PYY. AC : adénylate cyclase ; GC : guanylyl cyclase ; Gi : protéine G inhibitrice ; Gs : protéine G activatrice ; IRS : substrat du récepteur de l'insuline ; PI3-K : phosphatidylinositol-3-phosphate kinase ; PDE-3B : phosphodiesterase 3B ; PKA : protéine kinase A ; PKB : protéine kinase B ; PKG : protéine kinase G ; AMPK : protéine kinase activée par l'AMP ; LHS : lipase hormonosensible ; ATGL : *adipose triglyceride lipase* ; MGL : lipase des monoglycérides ; ALBP : *adipocyte lipid binding protein* ; AG : acide gras.

hormones pituitaires chez ces animaux. Concernant la réponse antilipolytique, l'effet de l'adénosine, de l'acide nicotinique et de la PGE<sub>2</sub> est identique à l'effet observé chez l'homme, mais celui du NPY varie selon les espèces. En revanche, la réponse antilipolytique impliquant les récepteurs α<sub>2</sub>-adrénergiques est beaucoup moins efficace chez les rongeurs. Il faut, par ailleurs, garder à l'esprit que les différences de capacité lipolytique propre à la localisation du TA ne sont pas similaires chez l'homme et les rongeurs [2]. Ces contraintes ont conduit à la production d'un modèle transgénique de souris « humanisées », sous-exprimant les récepteurs β<sub>3</sub>-adrénergiques lipolytiques (exprimés en très faible quantité dans le TA humain) et surexprimant les récepteurs α<sub>2</sub>-adrénergiques antilipolytiques [3].

## Masse grasse et AG plasmatiques

Keith N. Frayn

Les descriptions classiques font état, pendant l'obésité, d'une augmentation des taux plasmatiques d'AG à l'origine de l'altération de la sensibilité à l'insuline. Keith N. Frayn (Oxford Center for Diabetes, Endocrinology and Metabolism, University of Oxford, Grande-Bretagne) a proposé aux congressistes une réflexion originale sur les relations entre TA, AG et insulino-résistance.

Il n'existe pas de relation directe entre les concentrations plasmatiques d'AG et l'indice de masse corporelle. L'état d'obésité entraîne une augmentation de la masse grasse proportionnellement bien plus importante

que l'augmentation des taux plasmatiques d'AG, laissant envisager un mécanisme adaptatif du TA réduisant la production plasmatique d'AG [4].

En accord avec cette observation, l'expression des lipases du TA (LHS et ATGL) est diminuée chez les sujets obèses et insulino-résistants [5]. De plus, l'excès de TA est accompagné d'une augmentation de la sécrétion d'insuline n'évitant tout de même pas l'établissement d'une insulino-résistance.

K.N. Frayn analyse la théorie d'expansion du TA (mécanisme compensatoire de la diminution de la lipolyse) comme une contrainte pour le TA pouvant être la source d'un stress cellulaire à l'origine d'une modification du statut inflammatoire du TA. Ce phénomène adaptatif est peut-être associé à une perte de la flexibilité métabolique du TA dans la réponse à l'insuline.

## ATGL

### Présentation de l'ATGL

Rudolf Zechner

L'exposé suivant, réalisé par Rudolf Zechner (institut de biosciences moléculaires, université de Graz, Autriche), a présenté la position de l'ATGL dans la régulation de la lipolyse. L'ATGL concourt avec la LHS à l'hydrolyse des TG de la gouttelette lipidique. Elle est co-activée par la protéine *comparative gene identification* (CGI-58).

L'ATGL est exprimée dans le TA mais aussi dans des tissus non adipeux comme le cœur, le foie, les muscles

squelettiques... Les animaux invalidés pour le gène de l'ATGL présentent une accumulation des TG très importante dans les tissus non adipeux et notamment dans le cœur [6]. Dans ce tissu, l'activation des *peroxysome proliferator-activated receptors* (PPAR) est déficiente, ce qui entraîne un défaut de biogenèse et de la fonction mitochondriale contribuant alors au défaut d'utilisation des AG. Chez ces animaux, l'expression spécifique de l'ATGL dans le cœur restaure complètement le phénotype cardiaque et augmente l'expression de gènes régulés par PPAR $\alpha$  (*MCAD*, *AOX*, *CPT1*...). De la même façon, l'ATGL semble contrôler la production de ligands de PPAR $\alpha$  dans le foie et l'expression du FGF21 qui a été récemment impliqué dans la réponse au jeûne.

### Rôle de la partie C-terminale de l'ATGL

Martina Schweiger

Martina Schweiger, du même institut, a ensuite exposé ses travaux de thèse sur l'étude de la partie C-terminale de l'ATGL et son implication dans l'activation de l'enzyme et sa liaison à la gouttelette lipidique.

Différentes mutations réalisées dans les domaines fonctionnels de l'ATGL ont permis de mettre en évidence l'importance de la partie C-terminale dans la régulation de l'activité enzymatique de l'ATGL, tandis que des études d'interactions protéiques ont révélé, à leur tour, l'importance de cette région dans l'interaction avec le co-activateur de l'ATGL, CGI-58 [7]. La partie C-terminale de l'enzyme réduit son activité enzymatique. Chez la souris, cette séquence est différente, elle est moins efficace pour diminuer l'activité enzymatique de l'ATGL, ce qui pourrait expliquer les différences spécifiques entre espèces observées dans la régulation de l'enzyme.

### Rôle de CGI-58 dans la peau

Franz P.W. Radner

Quelques résultats préliminaires concernant les souris invalidées pour le gène *CGI-58* ont été présentés par Franz P.W. Radner, un autre doctorant de l'équipe de R. Zechner. Il est connu chez l'homme que seule la déficience en CGI-58 provoque un ichthyosis [8]. En effet, les sujets présentant des mutations du gène de l'ATGL ne présentent pas de signes cliniques cutanés.

Un modèle murin d'inactivation de CGI-58 a été créé au sein de ce laboratoire autrichien. Ces animaux présentent, à la naissance, un défaut dans la composition lipidique de l'épiderme, ce dernier ne jouant pas son rôle de barrière. Les nouveau-nés sont plus maigres, ne s'alimentent pas et meurent en quelques heures. Ces premières données semblent mettre en avant un rôle majeur de CGI-58, indépendamment de l'ATGL, dans la peau. Une des questions intéressantes est la nature du rôle de la lipase partenaire de CGI-58 dans la peau.

### Lipases du TA humain

Dominique Langin

Dominique Langin (Inserm U858 et université Paul-Sabatier, Toulouse, France) a fait le point sur les lipases du TA humain.

Des travaux *in vitro* sur le modèle d'adipocyte humain hMADS combiné à différentes approches, dont l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de la LHS, le BAY, permettent d'appréhender la part relative de la LHS et de l'ATGL dans l'hydrolyse des TG. La contribution des deux enzymes dans l'hydrolyse de la première liaison ester des TG dépend de leur niveau d'expression. La surexpression de chacune des lipases a permis de mettre en évidence l'importance du rôle de l'ATGL dans la lipolyse stimulée. D'autres tests ont montré que CGI-58, le co-activateur de l'ATGL, n'est pas un facteur limitant pour l'hydrolyse des TG dépendante de l'ATGL dans le TA.

L'accent a ensuite été mis sur les régulations de ces lipases au cours de l'obésité. Des travaux de l'équipe ont montré une diminution de l'expression de la LHS et de la lipolyse chez le sujet obèse, ainsi que dans des cultures primaires de préadipocytes différenciés laissant entrevoir le caractère primaire de ce défaut [9]. Des données plus récentes indiquent que la diminution d'expression de la LHS et de l'ATGL, chez l'obèse insulino-résistant, est indépendante de la masse grasse [10].

Le concept de réestérification a été abordé par la présentation d'expériences d'incorporation de glucose radiomarqué dans le glycérol des lipides. Ces travaux objectivent le lien étroit entre lipolyse et réestérification et soulignent l'importance de la prise en compte de la réestérification dans le bilan des AG libérés par le TA.

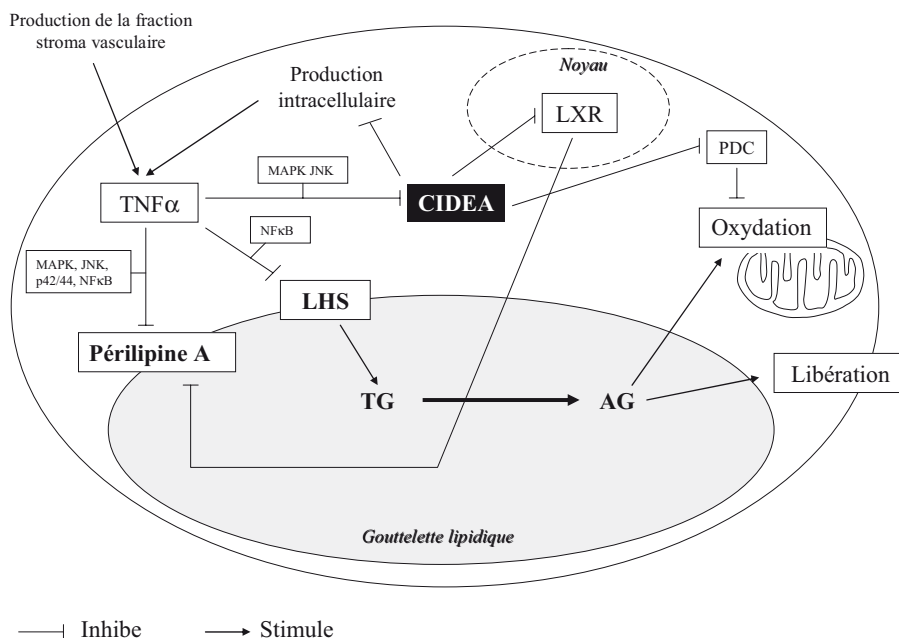
L'intervention s'est poursuivie par la présentation des travaux de modulation du métabolisme des AG dans l'adipocyte blanc humain par la surexpression de PGC1 $\alpha$  plus ou moins associée à des activations pharmacologiques de PPAR $\alpha$ .

Pour finir, l'auteur a ouvert les perspectives en matière de stratégies thérapeutiques de lutte contre le syndrome métabolique en rappelant les deux niveaux d'action que sont la mobilisation des AG et leur utilisation. En effet, les stratégies antilipolytiques par action sur le récepteur de l'acide nicotinique ou l'emploi d'inhibiteurs des lipases permettraient de diminuer les taux plasmatiques d'AG. De plus, l'utilisation d'inducteurs de PGC1 $\alpha$  associés à des agonistes PPAR $\alpha$  pourrait représenter un moyen d'augmenter l'oxydation des lipides au sein du TA blanc.

### Tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF $\alpha$ ), cell death-inducing DEFA (DNA fragmentation factor- $\alpha$ )-like effector A (CIDEA) et cachexie

Peter Arner

L'intervention de Peter Arner (département de médecine, Karolinska Institute, Stockholm, Suède) a débuté par un



**Fig. 2.** Action de CIDEA dans l'adipocyte blanc humain

LHS : lipase hormonosensible ; TG : triglycérides ; AG : acides gras ; TNF $\alpha$  : tumor necrosis factor  $\alpha$  ; NF $\kappa$ B : nuclear-factor kappa B ; MAPK : mitogen-activated protein kinase ; JNK : Jun N-terminal kinase ; LXR : liver X receptor ; PDC : complexe pyruvate déshydrogénase.

rappel du rôle du TNF $\alpha$  dans la lipolyse. Il existe une corrélation positive entre la lipolyse basale et la sécrétion de TNF $\alpha$  par l'adipocyte. Le TNF $\alpha$  agit par l'intermédiaire de différentes MAPK (JNK, p44/42) et du NF $\kappa$ B pour modifier l'état de phosphorylation de périlipines et de la LHS [11]. Il est connu que la production de TNF $\alpha$  est augmentée pendant l'obésité.

La suite de son exposé a concerné CIDEA, présenté comme un nouvel acteur dans la lipolyse adipocytaire et l'oxydation des AG chez l'homme. CIDEA fait partie d'une famille de gènes régulant l'apoptose. Bien que l'expression de CIDEA ait été étudiée chez les rongeurs, et que les souris invalidées pour ce gène soient résistantes à l'obésité induite par un régime gras [12], les fonctions de ce gène sont encore à l'étude.

Les travaux de l'équipe de P. Arner ont démontré que CIDEA est exprimé dans le TA blanc, et plus précisément dans l'adipocyte chez l'homme [13]. A contrario, chez la souris, CIDEA est exprimé dans le TA brun et très faiblement dans le TA blanc. Une étude de l'expression de CIDEA chez des sujets obèses a permis de mettre en évidence une diminution de ses ARNm dans cette population, corrélée avec des marqueurs du syndrome métabolique [14]. Une augmentation des transcrits est observée après un régime et une perte de poids.

Des travaux *in vitro* ont montré que l'expression de CIDEA est diminuée par le TNF $\alpha$ , via JNK, ce qui a pour conséquence d'augmenter la lipolyse de base. De plus, une *down regulation* de CIDEA par technique d'interférence ARN entraîne une augmentation de la lipolyse ainsi que de la production adipocytaire de TNF $\alpha$  [15].

L'ensemble de ces travaux suggère que la lipolyse de base dans le préadipocyte blanc humain est soumise à une inhibition tonique par CIDEA et que la diminution de son expression augmente la lipolyse (Fig. 2).

De façon inattendue, il existe une colocalisation de CIDEA avec le récepteur nucléaire LXR dans l'adipocyte. La liaison de CIDEA à LXR est stimulée par l'activation du récepteur nucléaire. LXR stimule la lipolyse adipocytaire, et son activité transcriptionnelle est inhibée par CIDEA. Les agonistes de LXR augmentent la lipolyse en diminuant l'expression des périlipines. CIDEA présente donc un unique rôle antilipolytique.

Enfin, P. Arner a replacé le rôle de CIDEA dans les cachexies associées au cancer. L'état cachectique est caractérisé par une augmentation de la lipolyse [16]. La LHS est surexprimée, mais pas l'ATGL. L'hypothèse de sécrétions tumorales agissant sur le TA est envisagée pour expliquer cet état pathologique. La dépense énergétique est augmentée, tandis que le quotient respiratoire est diminué, signifiant que les lipides sont préférentiellement oxydés. L'augmentation de l'expression de CIDEA est très fortement corrélée à celle de PDK4 et PDK1, enzymes impliquées dans l'oxydation des AG. Ces observations laissent supposer un rôle de CIDEA dans la régulation de l'oxydation des AG.

## Régulation de la lipolyse pendant l'exercice physique

Vladimir Stich

Le symposium s'est clôturé avec l'intervention de V. Stich (département de médecine du sport, 3<sup>rd</sup> Faculty

of Medicine, Charles University, Prague, République tchèque) concernant la régulation de la lipolyse pendant l'exercice physique. La lipolyse est évaluée à différents niveaux : celui de l'organisme entier par l'intermédiaire de dosages plasmatiques, celui d'une région précise grâce à la méthode de microdialyse in situ ou bien au niveau cellulaire à travers les dosages de lipolyse in vitro sur adipocytes isolés.

Après avoir montré le rôle important des voies dépendantes des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques dans la régulation de la lipolyse pendant l'exercice, l'effet antilipolytique de l'insuline a été abordé. Il existe un effet antilipolytique de l'insuline pendant l'exercice. Des résultats concernant l'étude de l'effet de l'hyperinsulinémie sur la lipolyse induite par l'exercice chez le sujet normopondéral ont été présentés. L'octréotide, un analogue de la somatostatine a été utilisé pour observer ses effets sur les hormones et la lipolyse. Sous octréotide, la lipolyse est exacerbée pendant l'exercice. Cette molécule entraîne un effondrement des concentrations plasmatiques d'insuline, d'hormone de croissance et d'adrénaline pendant l'effort physique tandis que les concentrations d'ANP et de noradrénaline ne sont pas modifiées. Les résultats de microdialyse suggèrent que l'octréotide lève les freins exercés par l'adénosine et l'insuline pendant l'exercice, augmentant ainsi la lipolyse. Pendant l'exercice, la mobilisation des lipides dépend de deux types de contrôle :

- l'effet lipolytique majeur de l'adrénaline mais aussi de l'ANP ;
- l'effet antilipolytique majeur de l'insuline mais aussi de l'adénosine.

## Conclusion

Ce symposium a constitué une bonne synthèse des données actuelles sur la lipolyse du TA en présentant aussi l'implication de nouveaux acteurs protéiques. L'auditoire a certainement pu tirer un grand intérêt des confrontations d'idées et de points de vue dégagés au cours des différentes présentations.

## Remerciements

Le Symposium international sur la lipolyse a été organisé à l'I2MR, unité mixte de recherche Inserm et université Paul-Sabatier ; l'événement a été possible grâce au soutien de Clarins, institut de recherches Servier, GlaxoSmithKline, LVMH, Sanofi-Aventis, Pierre Fabre et LPG systems.

## Références

1. Sengenès C, Zakaroff-Girard A, Moulin A, et al. (2002) Natriuretic peptide-dependent lipolysis in fat cells is a primate specificity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283: 257-65
2. Tavernier G, Galitzky J, Valet P, et al. (1995) Molecular mechanisms underlying regional variations of catecholamine-induced lipolysis in rat adipocytes. *Am J Physiol* 268: 1135-42
3. Valet P, Grujic D, Wade J, et al (2000) Expression of human alpha 2-adrenergic receptors in adipose tissue of beta 3-adrenergic receptor-deficient mice promotes diet-induced obesity. *J Biol Chem* 275: 34797-802
4. Jocken JW, Goossens GH, van Hees AM, et al. (2008) Effect of beta-adrenergic stimulation on whole-body and abdominal subcutaneous adipose tissue lipolysis in lean and obese men. *Diabetologia* 51: 320-7
5. Jocken JW, Langin D, Smit E, et al. (2007) Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase protein expression is decreased in the obese insulin-resistant state. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 2292-9
6. Haemmerle G, Lass A, Zimmermann R, et al. (2006) Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. *Science* 312: 734-7
7. Schweiger M, Schoiswohl G, Lass A, et al. (2008) The C-terminal region of human adipose triglyceride lipase affects enzyme activity and lipid droplet binding. *J Biol Chem* 283: 17211-20
8. Fischer J, Negre-Salvayre A, Salvayre R (2007) Neutral lipid storage diseases and ATGL (adipose triglyceride lipase) and CGI-58/ABHD5 (alpha-beta hydrolase domain-containing 5) deficiency: myopathy, ichthyosis, but no obesity. *Med Sci (Paris)* 23: 575-8
9. Langin D, Dicker A, Tavernier G, et al. (2005) Adipocyte lipases and defect of lipolysis in human obesity. *Diabetes* 54: 3190-7
10. Jocken JW, Langin D, Smit E, et al. (2007) Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase protein expression is decreased in the obese insulin-resistant state. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 2292-9
11. Rydén M, Arner P (2007) Tumour necrosis factor-alpha in human adipose tissue: from signalling mechanisms to clinical implications. *J Intern Med* 262: 431-8
12. Zhou Z, Yon Toh S, Chen Z, et al. (2003) CIDEA-deficient mice have lean phenotype and are resistant to obesity. *Nat Genet* 35: 49-56
13. Gummesson A, Jernås M, Svensson PA, et al. (2007) Relations of adipose tissue CIDEA gene expression to basal metabolic rate, energy restriction and obesity: population-based and dietary intervention studies. *J Clin Endocrinol Metab* 12: 4759-65
14. Dahlman I, Linder K, Arvidsson Nordström E, et al. (2005) Changes in adipose tissue gene expression with energy-restricted diets in obese women. *Am J Clin Nutr* 81: 1275-85
15. Nordström EA, Rydén M, Backlund EC, et al. (2005) A human-specific role of cell death-inducing DFFA (DNA fragmentation factor-alpha)-like effector A (CIDEA) in adipocyte lipolysis and obesity. *Diabetes* 54: 1726-34
16. Agustsson T, Rydén M, Hoffstedt J, et al. (2007) Mechanism of increased lipolysis in cancer cachexia. *Cancer Res* 67: 5531-7

**Author:** Amandine GIROUSSE

**Title:** Regulation of the expression of uncoupling protein 3 (UCP3) and genetic or pharmacological inhibition of hormone-sensitive lipase.

**Supervisor(s) :** Pr Dominique LANGIN, Dr Geneviève TAVERNIER

**Place and date of thesis defense :** Toulouse, le 5 Novembre 2010

**Abstract:**

In a first part, this study focuses on the regulation of the expression of the uncoupling protein-3 (UCP3). UCP3 is an inner mitochondrial protein almost exclusively expressed in skeletal muscle in human which could be implicated in fatty acid metabolism. A transgenesis approach has been used to create animal bearing all or part of the UCP3 gene in order to delineate the sequences responsible for the muscle specific expression. A 600 bp sequence of the human UCP3 intron 1 gene has been identified which confers the muscular expression *in vivo*.

The second part of this study is dedicated to the functional consequences of the alteration of lipolytic capacities in mouse adipose tissue. Adipocyte lipolysis is partly achieved by the hormone sensitive-lipase (HSL). HSL expression and activity is altered in adipose tissue of obese and/or insulin resistant subjects. We developed mouse models of genetic and pharmacological inhibition of HSL. Reduction of lipolytic capacity was associated with an improvement of insulin sensitivity and fatty acid metabolism in both animal models. Adipose tissue inflammation, that is a well known modulator of insulin sensitivity, did not seem to be involved in this phenotype.

**Key words:** animal models, uncoupling protein, skeletal muscle, adipose tissue, hormone-sensitive lipase, lipolysis.

**Auteur :** Amandine GIROUSSE

**Titre :** Régulation de l'expression de la protéine découplante UCP3 et inhibition génique ou pharmacologique de la lipase hormono-sensible.

**Directeur(s) de thèse :** Pr Dominique LANGIN, Dr Geneviève TAVERNIER

**Lieu et date de soutenance :** Toulouse, le 5 Novembre 2010

**Résumé :**

Ce manuscrit est premièrement axé sur la régulation de l'expression de la protéine découplante 3 (UCP3). 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. Des souris portant le gène UCP3 humain entier ou en partie ont été créés par transgénèse additive dans le but de délimiter les séquences responsables de la spécificité musculaire d'expression. Nous avons identifié une séquence intronique de 600 pb qui confère l'expression musculaire *in vivo*.

Dans une deuxième partie, une étude des conséquences fonctionnelles d'une altération des capacités lipolytiques du tissu adipeux a été réalisée chez la souris. La lipolyse adipocytaire est en partie assurée par la lipase hormono-sensible (LHS). L'expression et l'activité de la LHS sont diminuées dans le tissu adipeux du sujet obèse et/ou insulino-résistant. Nous avons développé des modèles animaux d'inhibition génique et pharmacologique de la LHS chez lesquels nous avons caractérisé le métabolisme énergétique, l'insulino-sensibilité et l'inflammation du tissu adipeux. La diminution des capacités lipolytiques est accompagnée d'une amélioration de la sensibilité à l'insuline et d'une modification du métabolisme des acides gras dans ces deux modèles. L'inflammation du tissu adipeux, reconnue comme facteur modulateur de l'insulino-sensibilité, ne semble pas être impliquée dans ce phénotype.

**Mots clés :** modèles animaux, protéine découplante, muscle squelettique, tissu adipeux, lipase hormono-sensible, lipolyse.

**Discipline :** Physiopathologie

**Intitulé et adresse du laboratoire :** Equipe 4 – Laboratoire de recherche sur les obésités. INSERM U858/ Institut de Médecine Moléculaire de Rangueil, Bât L4, 1 avenue du Prof. J. Poulhès, BP 84225, 31432 Toulouse Cedex 4