



UNIVERSITÉ  
DE NAMUR

University of Namur

# Institutional Repository - Research Portal

## Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche

[researchportal.unamur.be](http://researchportal.unamur.be)

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Recherche des kinases impliquées dans l'accumulation de triacylglycérols dans des cellules 3T3-L1 soumises à une inhibition mitochondriale

Defoiche, Julien

Award date:  
2002

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



---

**FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX**

*Faculté des Sciences*

**Recherche des kinases impliquées dans l'accumulation  
de triacylglycérols dans des cellules 3T3-L1 soumises  
à une inhibition mitochondriale**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
licencié en Sciences biologiques**

julien DEFOICHE

Juin 2002

**Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix**  
**FACULTE DES SCIENCES**

Secrétariat du département de Biologie

Rue de Bruxelles 61 – 5000 Namur

Téléphone ☐ + 32(0)81.72.44 – Téléfax= + 32(0)81.72.4420

E-mail ☐ [joelle.jonet@fundp.ac.be](mailto:joelle.jonet@fundp.ac.be)

<http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

**Recherche des kinases impliquées dans l'accumulation de triacylgcérol  
dans des cellules 3T3-L1 soumises à une inhibition mitochondriale**

DEFOICHE Julien

***Résumé***

L'obésité est un phénomène qui touche une proportion de plus en plus importante de la population. Au niveau cellulaire, elle est caractérisée par une hypertrophie et une hyperplasie de cellules pré-adipocytaires qui accumulent des triacylgcérols (TAG). Cependant, les mécanismes impliqués dans le programme de différenciation de cellules en adipocytes (adipogenèse) sont multiples et mettent en jeu l'activation de plusieurs kinases dans les voies de signalisation conduisant à l'accumulation de triacylgcérols dans les cellules. Au laboratoire, nous nous intéressons à la contribution mitochondriale à ce phénomène et plus particulièrement aux effets d'un dysfonctionnement mitochondrial sur la réponse de pré-adipocytes 3T3-L1.

Premièrement, nous avons montré que la stigmatelline, un inhibiteur du complexe III de la chaîne respiratoire induit l'accumulation de petites vésicules de TAG dans des cellules 3T3-L1. Cependant, ce phénotype « adipocyte-like » se distingue de l'état différencié obtenu en présence d'un cocktail inducteur de référence contenant de l'insuline, du dibutyryl-cAMP et de la dexaméthasone. Afin de rechercher la ou les kinases qui participent à l'accumulation de TAG, nous avons ensuite comparé les profils d'expression ou d'activation de six kinases (les p42/p44 MAPK, la p38 MAPK, la JNK, la GSK3, l'Akt et l'AMPK) potentiellement impliquées dans la différenciation adipocytaire. La caractérisation de ces kinases a été réalisée au cours du temps dans les modèles cellulaires de différenciation et de stress métabolique.

Dans une deuxième étape et afin de tenter de mettre en évidence le rôle de ces kinases dans l'apparition des phénotypes adipocytaires et « adipocyte-like », l'effet d'inhibiteurs des différentes voies de signalisation

impliquant ces kinases a été testé sur l'accumulation de vésicules de TAG dans les cellules par un test à l'Oil Red O.

En conclusion, nous montrons que l'inhibition mitochondriale par la stigmatelline conduit à l'accumulation de TAG dans des 3T3-L1. Ce phénotype pourrait impliquer une voie de la PI3-kinase en raison du fait que seuls la wortmannine, un inhibiteur de cette enzyme et le lithium, un inhibiteur de la GSK3 en aval de la PI3-kinase sont capables d'inhiber partiellement l'accumulation de TAG dans ces conditions. Enfin, cette étude supporte et renforce l'idée que les mécanismes responsables de l'accumulation de TAG en situation de stress métaboliques sont différents de ceux engagés dans le programme de différenciation de pré-adipocytes en adipocytes mature.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 2002

**Promoteur** □ T. Arnould

**Co-promoteur** □ P. Renard

*Ce mémoire couronne quelques années d'études. C'est au terme de celui-ci que je tiens à exprimer ma reconnaissance à toutes les personnes qui m'ont soutenu dans ce cheminement.*

*J'adresse mes premiers remerciements à Madame Raes de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.*

*Je remercie Thierry et Patsy qui ont corrigé mon mémoire car c'est un travail long et minutieux (et je m'excuse pour tous les maux de tête que mes phrases ont occasionnées) et encore merci pour tout.*

*Un autre grand merci à Sébastien pour sa patience ainsi que sa très grande disponibilité. Encore un tout grand merci pour tous ceux qui, durant des mois, ont dû répondre à mes questions stupides.*

*Un grand merci à ma famille et surtout à mes parents pour m'avoir donné la chance de faire ces études et pour m'avoir soutenu tout au long de celles-ci.*

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>ACC</b>	Acétyl-CoA carboxylase	<b>JNK</b>	c-Jun N-terminal kinase
<b>ACS</b>	Acyl-CoA synthase	<b>LAP</b>	Liver activator protein
<b>ACT</b>	Acyl-carnitine transférase	<b>LDL</b>	Low density lipoprotein
<b>ADD1</b>	Adipocyte determination and differentiation factor 1	<b>LIP</b>	Liver inhibitory protein
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique	<b>LPL</b>	Lipoprotein lipase
<b>ADP</b>	Adénosine diphosphate	<b>MAPK</b>	Mitogen-activated protein kinase
<b>AICAR</b>	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside	<b>MEC</b>	Matrice extracellulaire
<b>AIF</b>	Apoptosis-inducing factor	<b>MEK</b>	MAPK ERK kinase
<b>AMP</b>	Adénosine monophosphate	<b>MEKK</b>	MAPK ERK kinase kinase
<b>AMPc</b>	Adénosine monophosphate cyclique	<b>MKK</b>	MAPK kinase
<b>AMPK</b>	AMP-dependent kinase	<b>MKKK</b>	MAPK kinase kinase
<b>AMPKK</b>	AMP-dependent kinase kinase	<b>MKP</b>	MAPK phosphatase
<b>ANT</b>	Adénine nucléotide translocase	<b>MME</b>	Membrane mitochondriale externe
<b>AP-1</b>	Activating protein-1	<b>MMI</b>	Membrane mitochondriale interne
<b>ARNm</b>	Acide ribonucléique messenger	<b>Mn-SOD</b>	Superoxyde dismutase à manganèse
<b>ARNr</b>	Acide ribonucléique ribosomal	<b>mTOR</b>	Mammalian target of rapamycin
<b>ARNt</b>	Acide ribonucléique de transfert	<b>NADH</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide
<b>ATF</b>	Activating transcription factor	<b>PAK</b>	p21-activated kinase
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate	<b>PDGF</b>	Platelet-derived growth factor
<b>BMI</b>	Body Mass Index	<b>PDK</b>	Phosphoinositides-dependent kinase
<b>CDK</b>	Cyclin-dependent kinase	<b>PEP</b>	Phosphoénolpyruvate
<b>C/EBP</b>	CCAAT/Enhancer-binding protein	<b>PEPCK</b>	Phosphoénolpyruvate carboxykinase
<b>CHOP</b>	C/EBP homologous protein	<b>PGI2</b>	Prostaglandine I2
<b>CoA</b>	Coenzyme A	<b>PI3K</b>	Phosphatidylinositol-3-kinase
<b>CPT</b>	Carnitine palmitoyl-transferase	<b>PIP2</b>	Phosphatidylinositol-4,5-phosphate
<b>CRE</b>	cAMP-responsive element	<b>PIP3</b>	Phosphatidylinositol-3,4,5-phosphate
<b>CREB</b>	cAMP-responsive element-binding protein	<b>PKA</b>	Protéine kinase A
<b>CUP</b>	C/EBP undifferentiated protein	<b>PKB</b>	Protéine kinase B

<b>dbAMPc</b>	dibutyryl-AMPc	<b>PKC</b>	Protéine kinase C
<b>DHAP</b>	Dihydroxyacétone-phosphate	<b>PP2C</b>	Protéine phosphatase 2C
<b>DR-1</b>	Direct repeat-1	<b>PPAR</b>	Peroxisome proliferator-activated receptor
<b>ERK</b>	Extracellular-regulated kinase	<b>PPRE</b>	Peroxisome proliferator-responsive element
<b>FAAR</b>	Fatty acid-activated receptor	<b>Pref-1</b>	Pré-adipocyte factor-1
<b>Fabp</b>	Fatty acid-binding protein	<b>PTP</b>	Permeability transition pore
<b>FAD</b>	Flavine adénine dinucléotide	<b>RAR</b>	Retinoic acid receptor
<b>FAS</b>	Fatty acid synthase	<b>ROS</b>	Reactive oxygen species
<b>FATP</b>	Fatty acid transport protein	<b>RXR</b>	Retinoids-X-receptor
<b>FCCP</b>	Fluorocarbonyl-cyano-phénylhydrazone	<b>SAPK</b>	Stress-activated protein kinase
<b>FGF</b>	Fibroblast growth factor	<b>SCD</b>	Stearoyl-CoA desaturase
<b>GDP</b>	Guanosine diphosphate	<b>SH2/3</b>	Src homology domain 2/3
<b>GLUT-4</b>	Glucose transporter-4	<b>SREBP1</b>	Sterol-responsive element-binding protein 1
<b>GPAT</b>	Glycérol-3-phosphate acyl transférase	<b>SRF</b>	Serum responsive factor
<b>GPD</b>	Glycérol-3-phosphate déshydrogénase	<b>TAK</b>	TGF $\beta$ activated kinase
<b>GS</b>	Glycogène synthase	<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Tumor necrosis factor $\alpha$
<b>GSK3</b>	Glycogène synthase kinase 3	<b>TZD</b>	Thiazolidinediones
<b>HSF-1</b>	Heat shock factor-1	<b>UCP</b>	Uncoupling protein
<b>IBMX</b>	Isobutyl-méthyl-xanthine	<b>VEGF</b>	Vascular-endothelial growth factor
<b>IGF-1</b>	Insulin-like growth factor-1	<b>VLDL</b>	Very low density lipoprotein
<b>IRS</b>	Insulin receptor substrate		

## TABLE DES MATIERES

<b>1 INTRODUCTION.....</b>	<b>10</b>
1.1 <i>L'OBESITE: Généralités</i> .....	10
1.2 <i>STRUCTURE ET FONCTIONS DE LA MITOCHONDRIE</i> .....	11
1.2.1 Structure mitochondriale.....	11
1.2.2 Fonctions mitochondriales .....	13
1.2.2.1 <i>Les phosphorylations oxydatives</i> .....	13
1.2.2.2 <i>Agents découplants et UCP (Uncoupling Proteins)</i> .....	14
1.2.2.3 <i>La <math>\beta</math>-oxydation des acides gras</i> .....	15
1.3 <i>Différenciation des adipocytes</i> .....	16

1.3.1 Les gènes adipocytaires .....	17
1.3.1.2 Les gènes réprimés durant l'adipogenèse.....	18
1.3.1.3 Les gènes surexprimés durant l'adipogenèse .....	18
1.3.2 Les facteurs de transcription impliqués dans l'adipogenèse .....	20
1.3.2.1 Les CCAAT/Enhancer-Binding Proteins (C/EBPs).....	20
1.3.2.2 Les Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) .....	21
1.3.2.3 Cyclic AMP-Response Element-Binding Protein (CREB).....	23
1.3.2.4 Sterol-Response Element-Binding Protein-1 (SREBP-1)/Adipocyte Determination and Differentiation Factor-1 (ADD-1) .....	24
1.4 Voies de transduction du signal .....	24
1.4.1 La PI3K et la GSK3 .....	25
1.4.2 Les MAPKs .....	27
1.4.2.1 La voie des p38.....	27
1.4.2.2 La voie des ERKs (Extracellular-regulated kinases) .....	28
1.4.2.3 La voie des JNKs (c-Jun N-terminal kinases) .....	29
1.4.3 L'AMPK (adenosine-5'-monophosphate-dependent kinase) .....	30
<b>2 MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>35</b>
2.1 CULTURE, SOUS-CULTURES .....	35
2.1.1 Méthode de culture .....	35
2.1.2 Méthode de sous-culture .....	35
2.2 MODELE DE DIFFERENCIATION DES PREADIPOCYTES 3T3-L1 .....	35
2.3 CONDITIONS D'INCUBATION DES CELLULES 3T3-L1 AVEC LES INHIBITEURS MITOCHONDRIAUX.....	36
2.4 CONDITIONS D'INCUBATION AVEC LES INHIBITEURS OU ACTIVATEURS SPECIFIQUES DE KINASES.....	36
2.5 COLORATION DES TRIACYLGLYCÉROLS A L'OIL RED O .....	37
2.6 WESTERN BLOTTING .....	37
2.6.1 Préparation des lysats cellulaires.....	37
2.6.2. Préparation des échantillons.....	38
2.6.3 Préparation des gels et migration .....	38
2.6.4 Transfert des protéines sur une membrane de PVDF .....	39
2.6.5 Traitement de la membrane et révélation.....	39
2.6.5.1 Détection de motifs phosphorylés.....	39

2.6.5. 2 Détection de motifs non phosphorylés.....	40
2.7 DOSAGE DES PROTEINES :TEST BCA (acide bicinchoninique).....	40
2.8 TEST D'ACTIVITE DE L' AMPK.....	41
2.8.1 Sous cultures et incubations .....	41
2.8.2 Méthodes .....	41
2.9 ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS.....	42
<b>3. RESULTATS ET DISCUSSIONS.....</b>	<b>43</b>
3.1. Caractérisation du modèle de différenciation.....	43
3.1.1. Mesure de l'accumulation de triacylglycérols dans les cellules 3T3-L1 par le test Oil Red O .....	43
3.1.2. Comparaison entre le modèle classique et le modèle <i>adipocyte-like</i> .....	43
3.1.3 Détection du marqueur de différenciation adipocytaire Fabp/aP2 dans le modèle classique et le modèle <i>adipocyte-like</i> .....	44
3.2. Implication de la voie de la GSK3 dans le processus de différenciation ou d'acquisition du phénotype <i>adipocyte-like</i> .....	46
3.2.1 Expression et phosphorylation de la GSK3 $\beta$ .....	46
3.2.2. Effet du LiCl, inhibiteur de la GSK3 sur l'accumulation des triacylglycérols. ....	48
3.2.3 Expression et phosphorylation d'Akt .....	49
3.2.4 Effet de l'inhibiteur de la PI3K, la wortmannine, sur l'accumulation des triacylglycérols.....	50
3.3 Implication de la voie des MAP kinases dans le processus de différenciation ou <i>adipocyte-like</i> .....	51
3.3.1 Expression et phosphorylation de p38 MAPK.....	51
3.3.2 Effet du SB203580, un inhibiteur de la p38 MAPK sur l'accumulation des triacylglycérols.....	53
3.3.3 Expression et phosphorylation des p44/42 MAPKs .....	54
3.3.4 Effet de l'inhibiteur de p44/42 MAPK, PD98059, sur l'accumulation des triacylglycérols.....	56
3.3.5 Expression et phosphorylation des JNKs.....	57
3.3.6 Effet du SP600125 sur l'accumulation des triacylglycérols .....	58
3.4 Recherche de l'implication éventuelle de l'AMPK dans le processus de différenciation et dans le phénotype <i>adipocyte-like</i> . ....	59
3.5 Effet de l'AICAR, activateur de l'AMPK sur l'accumulation des triacylglycérols.....	61

<b>4 Conclusions et perspectives.....</b>	<b>63</b>
<b>5 BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>67</b>

# 1 INTRODUCTION

## 1.1 L'OBESITE: Généralités

L'obésité est définie comme l'état d'une personne dont le BMI est égal ou supérieur à 30 (*Body Mass Index* : poids divisé par la taille au carré, exprimé en  $\text{kg/m}^2$ ) (OMS *Organisation mondiale de la santé*, 1997). Elle résulte souvent d'un déséquilibre chronique entre l'apport et les dépenses énergétiques et constitue un phénomène alarmant, dont l'ampleur ne cesse de croître dans le monde, surtout en Europe et aux Etats-Unis (Kuczmarski et al., 1994). En effet, l'obésité touche plus de 18 % de la population mondiale dont plus de 20 % de la population américaine (Friedman, 2000). Considérée par certains comme une pathologie, elle est souvent associée à d'autres affections comme le diabète de type II, l'hypertension et des maladies cardiovasculaires dont l'athérosclérose (Pi-Sunyer, 1993). L'obésité est un problème de santé publique dont l'origine est multifactorielle. En effet, si de nombreux facteurs génétiques responsables de la prédisposition ou de la résistance à l'obésité ont été découverts, de nombreux facteurs environnementaux, culturels et psychologiques influencent les variations de la masse grasse, tels que la disponibilité en nourriture ou le manque d'exercice physique.

L'obésité peut également résulter de mutations touchant certains gènes et donc constituer un trait héréditaire. Parmi les gènes responsables des formes monogéniques de l'obésité, on peut citer ceux codant pour la leptine (*ob*) ou son récepteur (*db*), la carboxypeptidase E, l'*Agouti-related protein* et les protéines *tubby*. Toutes ces protéines sont impliquées directement ou indirectement dans la régulation de l'appétit par la production de neuropeptides au niveau de l'hypothalamus et sont revues par Spiegelman *et al.* (Spiegelman and Flier, 1996) (voir figure 1.1). Cependant, bien que ces mutations soient fréquentes dans les modèles animaux et que les souris *knock-out* pour ces gènes présentent un phénotype obèse, elles s'avèrent très rares dans la population humaine atteinte d'obésité.

L'obésité se caractérise par une augmentation importante du tissu adipeux blanc. Ce tissu constitue un lieu de stockage de l'énergie sous forme de triacylglycérols (ou triacylglycérols) et possède donc une grande activité lipogénique. Par opposition, le tissu adipeux brun a une activité lipolytique: il oxyde les triacylglycérols et libère l'énergie sous

forme de chaleur (thermogenèse). Abondant chez les nouveaux-nés et les mammifères hibernants, le tissu adipeux brun ne joue pas de rôle dans le phénomène d'obésité.

Au niveau cellulaire, l'obésité se caractérise par une hyperplasie et/ou une hypertrophie des adipocytes blancs (Bosello et al., 1978) (Kather et al., 1978) (Marques et al., 1998). La prolifération et la différenciation de ces cellules (adipogenèse) sont donc des phénomènes importants dans l'apparition de ce phénotype. C'est sur la différenciation et plus particulièrement sur la contribution de la mitochondrie à l'adipogenèse que portent nos études. En effet, la mitochondrie intervient dans le métabolisme des lipides puisque c'est dans la matrice mitochondriale que se déroule la  $\beta$ -oxydation des acides gras. De plus, il est bien établi qu'une diminution de l'oxydation des acides gras par la mitochondrie peut conduire à l'accumulation de triacylglycérols dans le cytosol et qu'inversement, une augmentation de l'oxydation des acides gras s'accompagne d'une diminution des stocks de triacylglycérols dans la cellule (Caserta et al., 2001). Ceci suggère que cet organite peut jouer un rôle dans le processus d'adipogenèse. Cependant, les mécanismes mis en jeu et les effets d'un dysfonctionnement de l'activité mitochondriale sur le programme de différenciation adipocytaire sont encore peu étudiés.

Dans une première partie de cette introduction, nous allons rappeler quelques généralités sur la mitochondrie.

## ***1.2 STRUCTURE ET FONCTIONS DE LA MITOCHONDRIE.***

La mitochondrie est limitée par une double membrane qui partage l'intérieur en deux compartiments : la matrice entourée par la membrane mitochondriale interne (MMI) et l'espace intermembranaire compris entre la membrane mitochondriale externe (MME) et la membrane mitochondriale interne (MMI) (Green and Perdue, 1966) (Lenaz, 1970). Cette structure permet à la mitochondrie d'assurer différentes fonctions au sein de la cellule (voir figure 1.2).

### **1.2.1 Structure mitochondriale**

La membrane mitochondriale externe contient de 30 à 40 % de lipides (dont une concentration relativement élevée de phosphatidylinositol) et de 60 à 70 % de protéines. Ces protéines jouent des rôles divers. La CPT1 (*carnitine palmytoyl-transferase-1*) catalyse l'étape limitante de l'entrée des acides gras dans la mitochondrie et, donc, régule l'entrée de

précurseurs de la  $\beta$ -oxydation. Les porines (comme le VDAC: *voltage-dependent activated channel*) permettent le passage de molécules < 10 kDa et participent également à l'élaboration du *Permeability Transition Pore* (PTP) lors de l'apoptose. L'ouverture de ce pore s'accompagne de la libération de protéines mitochondriales (cytochrome c, AIF: *apoptosis inducing factor*) et, souvent, de la chute du potentiel de membrane mitochondrial, deux événements déclencheurs de la mort cellulaire par apoptose. Les protéines Bcl2 et Bax, associées à ou ancrées dans la MME, participent également à la régulation du phénomène d'apoptose cellulaire (Vander Heiden and Thompson, 1999).

La membrane mitochondriale interne est constituée de nombreux replis appelés crêtes qui augmentent l'interface entre la matrice et l'espace intermembranaire. La membrane interne contient beaucoup de protéines (près de 80 %) et est riche en acides gras insaturés, en diphosphatidylglycérol (cardiolipine) et en phosphatidylglycérol. Cette composition la rend relativement rigide et facilite l'assemblage des différentes sous unités constituant la chaîne respiratoire. Du fait de son imperméabilité, seuls des ions ou des solutés de taille inférieure à 1500 Da transitent de manière contrôlée au travers de canaux. Les protéines de la MMI interviennent dans la chaîne de transport des électrons allant du NADH/FADH<sub>2</sub> à l'oxygène, dans la phosphorylation de l'ADP en ATP par la F<sub>0</sub>-F<sub>1</sub> ATP synthase et dans la régulation des flux ioniques et des métabolites par l'ANT (*Adenine Nucleotide Translocase*).

L'espace intermembranaire contient quelques protéines, notamment le cytochrome c qui transporte un électron entre les complexes III et IV de la membrane interne. Au niveau de l'espace intermembranaire s'accumulent des protons provenant de la chaîne de transporteurs d'électrons. Ceci entraîne une augmentation de pH dans la matrice et une différence de potentiel électrochimique de part et d'autre de la membrane interne, appelée potentiel de membrane mitochondrial, qui varie entre 180 et 220 mV.

La matrice mitochondriale renferme plusieurs (de 2 à 10) molécules d'ADN mitochondrial (Cavelier et al., 2000). Chez l'homme, cet ADN circulaire (16,6 kb) code pour 13 protéines mitochondriales qui entrent dans la composition de la chaîne de transporteurs d'électrons et de la F<sub>0</sub>-F<sub>1</sub> ATP synthase, 22 ARN de transfert (ARNt) et 2 ARN ribosomiques (ARNr 12S et 16S). Ce compartiment renferme aussi la machinerie nécessaire pour assurer l'expression de l'ADN mitochondrial (ARN polymérase, ribosomes) et sa répllication (ADN polymérase  $\beta$ ) (Enriquez et al., 1998) (Taanman, 1999). De plus, elle est le siège de nombreuses réactions métaboliques car elle contient les enzymes impliquées dans la  $\beta$ -oxydation des acides gras, la transformation du pyruvate en acétyl-coenzyme A et le cycle de Krebs.

## 1.2.2 Fonctions mitochondriales

### 1.2.2.1 Les phosphorylations oxydatives

Le NADH et le FADH<sub>2</sub> produits par la glycolyse, le cycle Krebs et l'oxydation des acides gras sont oxydés par la chaîne de transporteurs d'électrons. Ces transporteurs d'électrons sont intégrés dans la membrane interne de la mitochondrie sous forme de 4 complexes, appelés complexe I, II, III et IV (figure 1.3). Ces électrons sont transmis *via* ces complexes depuis le NADH (nicotinamide adénine dinucléotide) dont le pouvoir oxydant est faible ( $E_0' = -320$  mV) vers l'oxygène moléculaire, dont le pouvoir oxydant est très élevé ( $E_0' = 820$  mV). Ce transport d'électrons s'accompagne de l'expulsion de protons matriciels vers l'espace intermembranaire (pour une revue des phosphorylations oxydatives: lire (Saraste, 1999)).

Le complexe I (appelé *NADH-ubiquinone oxydoréductase*) catalyse la réduction de l'ubiquinone en ubiquinol, en lui transférant les deux électrons énergétiques du NADH. Le complexe I peut être inhibé par des molécules telles que la roténone et l'amytal, molécules à caractère hydrophobe qui interagissent avec le site de fixation de l'ubiquinone et peuvent entrer en compétition avec celle-ci.

Le complexe II (*succinate – ubiquinone oxydoréductase*) prend deux électrons au succinate, un intermédiaire du cycle de Krebs, pour les céder directement à la FAD (Flavine Adénine Dinucléotide). Après passage par des centres à Fe-S, ces électrons sont repris par l'ubiquinone et transmis au complexe III. Le complexe II est inhibé par le malonate qui est un inhibiteur compétitif de la succinate déshydrogénase.

Au niveau du complexe III (*ubiquinol cytochrome c oxydoréductase*), l'ubiquinol donne un premier électron au centre de Rieske qui le cède au cytochrome c1 puis au cytochrome c (dans l'espace intermembranaire). Le cytochrome c migre ensuite le long de la surface de la membrane et transporte l'électron vers la cytochrome c oxydase. Parmi les inhibiteurs du complexe III, on peut citer la stigmatelline et l'antimycine A. Ces deux inhibiteurs et leurs mécanismes d'action sont représentés à la figure 1.4. L'antimycine A inhibe le transfert d'électrons du cytochrome b à l'ubiquinone, en se liant au cytochrome b près de son noyau hémique. La stigmatelline bloque l'oxydation de l'ubiquinol (QH<sub>2</sub>) issu du complexe I ou II (Raha et al., 2000). Remarquons que l'antimycine A est connue pour augmenter la production de ROS (*reactive oxygen species*) par la mitochondrie, alors que les radicaux libres ne sont pas détectables quand le complexe III est inhibé par la stigmatelline.

Ces ROS sont des espèces radicalaires qui contiennent un électron non apparié très réactionnel, occasionnant un stress oxydatif au niveau cellulaire et principalement au niveau de la mitochondrie (Lenaz, 1998). Ceux-ci sont détoxifiés par différentes enzymes anti-oxydantes, dont la superoxyde dismutase à manganèse (Mn-SOD) présente dans la matrice mitochondriale.

Le complexe IV (*cytochrome c oxydase*) constitue l'étape finale du transport des électrons où le cytochrome c, oxydé sur la face externe de la MMI, libère un électron issu du complexe III. L'inhibition du complexe IV peut se produire au niveau du cytochrome a<sub>3</sub> dernier accepteur d'électron avant l'O<sub>2</sub> par le cyanure (CN<sup>-</sup>), l'azoture (N<sub>3</sub><sup>-</sup>) et le monoxyde de carbone (CO). Le cyanure et l'azoture se lient fortement à la forme ferrique du cytochrome a<sub>3</sub> tandis que le monoxyde de carbone ne se lie qu'à la forme ferreuse.

Les protons expulsés dans l'espace intermembranaire par les complexes respiratoires (sauf le complexe II) retournent vers la matrice grâce au potentiel électrochimique *via* la F<sub>0</sub>-F<sub>1</sub> ATP synthase (ou complexe V, voir figure 1.5). L'énergie libérée par les protons est récupérée par cette enzyme pour former de l'ATP à partir d'ADP. L'ATP synthase est constituée de 2 sous-unités: la partie catalytique F<sub>1</sub> qui est dans la matrice et la partie F<sub>0</sub> (sensible à l'oligomycine), intégrée dans la membrane mitochondriale interne. Le passage des protons (H<sup>+</sup>) s'accompagne d'une rotation de la partie F<sub>0</sub> qui transmet l'énergie de rotation à la partie F<sub>1</sub> (rotor) de l'ATP synthase. Cette sous-unité contient le site où l'ADP est fixé et phosphorylé. Ensuite, l'ATP formé est libéré dans la matrice mitochondriale, puis exporté dans le cytoplasme par un échangeur ATP/ADP présent en membrane interne: l'adénine nucléotide translocase (ANT). (Saraste, 1999)

#### 1.2.2.2 Agents découplants et UCP (*Uncoupling Proteins*)

Une autre classe d'inhibiteurs affecte la synthèse d'ATP par un autre mécanisme que l'inhibition des complexes. Ces inhibiteurs sont appelés agents découplants car ils interrompent le couplage entre le transport des électrons et la F<sub>0</sub>-F<sub>1</sub> ATP synthase. Parmi ces agents découplants, on retrouve des protonophores tels que le FCCP (Fluorocarbonyl-cyano-phénylhydrazone) qui perméabilise la membrane mitochondriale interne aux protons. Il existe par ailleurs des protéines qui découplent naturellement les mitochondries et qui jouent un rôle important dans la thermorégulation : les UCPs (*Uncoupling Proteins*).

Ces protéines permettent le retour des protons dans la matrice mitochondriale et la dissipation d'énergie sous forme de chaleur puisqu'elles ne synthétisent pas d'ATP. Les UCPs

existent sous trois isoformes: l'UCP 1, qui est spécifique du tissu adipeux brun des mammifères, l'UCP2 qui est ubiquiste et l'UCP 3, exprimée principalement dans les muscles squelettiques. Ces protéines découplantes sont particulièrement intéressantes dans le contexte de la recherche sur l'obésité étant donné qu'un découplage accru entraîne une certaine résistance à l'accumulation des graisses dans le tissu adipeux (Surwit et al., 1998). Des études ont un effet déjà montré que des souris transgéniques surexprimant l'UCP-3 humaine dans le muscle squelettique sont hyperphagiques mais ne grossissent pas (Clapham et al., 2000). Cependant, il est connu que l'isoforme UCP-2 est surexprimée dans les hépatocytes d'individus obèses (Chavin et al., 1999). De plus, nous avons montré au laboratoire que l'UCP-2 est également surexprimée dans les adipocytes en différenciation terminale (S. Vankoningsloo). L'UCP-2 est donc probablement une protéine impliquée dans l'adipogenèse, mais son rôle dans ce processus est encore inconnu, d'autant plus que le découplage mitochondrial s'oppose à la synthèse et au stockage des lipides qui caractérisent la différenciation des adipocytes. Ces constatations semblent contradictoires, mais il faut tenir compte du fait que l'activité de l'UCP-2 est régulable, notamment par les rétinoïdes et les acides gras (qui activent le flux de protons *via* UCP-2) (Rial et al., 1999) (Bouillaud et al., 1994), ainsi que par la GDP (qui l'inhibe) (Bouillaud et al., 1994). La surexpression de l'UCP-2 ne s'accompagne donc pas nécessairement d'une augmentation du découplage. De plus, l'activité « découplante » de l'UCP2 n'a été déduite que par son homologie de séquence avec l'isoforme UCP-1, dont le rôle dans la thermogenèse est bien connu (Nedergaard et al., 1999) (Nedergaard et al., 2001). Il est donc possible que l'UCP2 joue d'autres rôles encore à découvrir.

### 1.2.2.3 La $\beta$ -oxydation des acides gras

Les adipocytes jouent un rôle important dans le stockage d'énergie chez les vertébrés. Ainsi, lorsque l'apport calorique dans l'alimentation est supérieur aux dépenses énergétiques de l'individu, le surplus énergétique est stocké sous forme de triacylglycérols qui sont accumulés dans l'adipocyte. Inversement, lorsque la dépense calorique est supérieure à l'apport, cette réserve d'énergie est mobilisée pour combler le manque et fournir des acides gras oxydables.

Avant l'entrée de l'acide gras dans la mitochondrie, celui-ci est activé par liaison au coenzyme A pour donner l'acyl-CoA, qui sera transporté dans la matrice mitochondriale par le système de la carnitine palmitoyltransférase (CPT). La CPT-1 est une protéine insérée dans

la membrane mitochondriale externe (MME) qui catalyse la transestérification de l'acyl-CoA à la carnitine et permet son passage dans l'espace intermembranaire. Le complexe formé passe alors de l'espace intermembranaire à travers la MMI grâce à l'acylcarnitine translocase (ACT). L'acylcarnitine est ensuite clivé par la CPT-2 (associée à la MMI) pour régénérer l'acyl-CoA dans la matrice mitochondriale.

Le cycle de la  $\beta$ -oxydation consiste en quatre réactions successives (figure 1.6). (1) L'acyl-CoA est oxydé par l'acyl-CoA déshydrogénase pour former le trans- $\beta^2$ -énoyl-CoA. Cette réaction s'accompagne de la réduction d'une molécule de FAD en FADH<sub>2</sub>. (2) L'hydratation du trans- $\beta^2$ -énoyl-CoA au niveau de sa double liaison par l'énoyl-CoA hydratase donne le L- $\beta$ -hydroxacyl-CoA. (3) Celui-ci est oxydé par l'hydroxacyl-CoA déshydrogénase pour former le  $\beta$ -cétoacyl-CoA, tandis que le NAD<sup>+</sup> est réduit en NADH. (4) Enfin, la thiolase clive le  $\beta$ -cétoacyl-CoA pour donner une molécule d'acétyl-CoA et un nouvel acyl-CoA possédant deux atomes de carbones en moins que celui de départ, et le cycle recommence.

### ***1.3 Différenciation des adipocytes.***

L'adipogenèse est le processus complexe de différenciation qui conduit une cellule multipotente d'origine mésodermique à adopter la morphologie (augmentation de taille, arrondissement) et les caractéristiques biochimiques des adipocytes (lipogenèse, stockage des lipides, activité mitochondriale faible), sous-tendues par une modification de l'expression de nombreux gènes. (Pour une revue de l'adipogenèse, lire (MacDougald and Lane, 1995) (Ntambi and Young-Cheul, 2000)).

Dans un premier temps, la cellule multipotente s'engage dans la lignée adipocytaire pour devenir un pré-adipocyte (voir figure 1.7). Le pré-adipocyte peut initier son programme de différenciation suite à une stimulation adéquate. L'adipocyte blanc mature est caractérisé *in vivo* par une morphologie arrondie due à l'accumulation de triacylglycérols dans une vésicule unique qui exclut le noyau près de la membrane plasmique. L'initiation et le maintien de l'état différencié sont le résultat de l'expression ou de la répression de gènes spécifiques, contrôlés par un ensemble de facteurs de transcription. Cette activation transcriptionnelle résulte de l'interconnection de voies de transduction médiées par des régulateurs hormonaux.

De nombreuses recherches visant à comprendre les mécanismes de la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes sont réalisées *in vitro* sur des modèles cellulaires tels que les 3T3-L1, les NIH-3T3 ou les 3T3-F442A. *In vitro*, la différenciation des adipocytes est induite

par l'insuline, l'IGF-1 (Rubin et al., 1978) (Smith et al., 1988), les glucocorticoïdes et les composés qui augmentent la concentration cytosolique en AMP cyclique (AMPc) comme le dibutyryl-AMPc (dbAMPc) ou l'isobutylméthylxanthine (IBMX) (Rubin et al., 1978).

L'insuline est une hormone sécrétée par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans dans le pancréas endocrine, en réponse à une élévation de la glycémie (concentration sanguine en glucose). Elle est constituée de deux chaînes peptidiques reliées par deux ponts disulfures. L'insuline stimule l'entrée du glucose dans la cellule ainsi que la synthèse du glycogène (surtout dans le foie et le muscle squelettique), mais possède également de nombreuses autres fonctions. Par exemple, elle induit la synthèse des acides gras dans les adipocytes (Valverde et al., 1997). L'insuline est une molécule nécessaire à l'adipogenèse dans les modèles *in vitro*. En effet, nous avons montré au laboratoire que le taux de différenciation diminue de 50 % quand le programme adipogénique est réalisé sans insuline.

Le dibutyryl-AMPc est constitué d'une molécule d'AMPc à laquelle sont liées deux chaînes hydrocarbonées (butyryl), qui facilitent son passage à travers la membrane plasmique. Dans la cellule, ces deux chaînes sont clivées et l'AMPc va se fixer à un site allostérique d'une sous-unité de régulation d'une protéine kinase AMPc-dépendante (PKA). Une fois activée, la PKA est transloquée dans le noyau où elle catalyse, entre autres, la phosphorylation d'un facteur de transcription appelé CREB (*cAMP-responsive element-binding protein*) sur la Ser133. Nous verrons au point 1.3.2.3 que ce facteur de transcription est impliqué dans la différenciation des adipocytes.

La dexaméthasone est un glucocorticoïde synthétique qui, en se liant au récepteur intracellulaire aux glucocorticoïdes, induit l'expression de certains gènes. Ceci aboutit notamment à la sécrétion de la prostaglandine PGI<sub>2</sub> *via* l'activation de la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) et la libération de l'acide arachidonique à partir de lipides membranaires. La PGI<sub>2</sub> provoque une augmentation intracellulaire d'AMPc par l'activation d'un récepteur couplé aux protéines G et de l'adénylate cyclase (AC) (Vassaux et al., 1992) (Gaillard et al., 1989) (Gaillard et al., 1991).

Ces inducteurs de la différenciation conduisent tous, *via* différentes voies de transduction, à l'activation de facteurs de transcription impliqués dans l'expression de gènes adipocytaires (voir point 1.3.2).

### 1.3.1 Les gènes adipocytaires

Quand elle se différencie, une cellule ré-oriente ses voies métaboliques, synthétise de nouvelles molécules et change de morphologie. Ces changements biochimiques et morphologiques sont le résultat de l'expression ou de la répression de gènes liés au programme de différenciation. Dans l'adipogenèse, les gènes dont l'expression est modifiée sont nombreux et peuvent être regroupés en plusieurs catégories.

#### 1.3.1.2 Les gènes réprimés durant l'adipogenèse

Un certain nombre de gènes sont exprimés dans les lignées pré-adipocytaires et empêchent leur différenciation. Par exemple, Pref-1 (*Pre-adipocyte factor-1*) est une protéine transmembranaire de la membrane plasmique qui possède des domaines répétés EGF-like (*Epidermal Growth Factor*) extracellulaires. Ces domaines peuvent être clivés et libérés dans la matrice extracellulaire (MEC) pour exercer un effet anti-adipogénique auto- ou paracrine (Smas et al., 1997). En effet, ces domaines *EGF-like* répétés inhibent l'expression de C/EBP $\alpha$  et PPAR $\alpha$  deux facteurs de transcription impliqués dans l'adipogenèse (voir point 1.3.2). De plus, une des actions de la dexaméthasone (un inducteur de l'adipogenèse) serait de diminuer la transcription et donc l'expression du gène codant Pref-1 (Smas et al., 1999).

D'autres protéines ne jouant pas de rôle direct dans la régulation de l'adipogenèse sont également fortement réprimées, comme c'est le cas de l'actine et de la tubuline.

#### 1.3.1.3 Les gènes surexprimés durant l'adipogenèse

Plusieurs facteurs de transcription (voir point 1.3.2), dont l'expression est induite au cours des différentes étapes de l'adipogenèse, contrôlent l'expression des gènes impliqués dans ce processus. Beaucoup de ces gènes surexprimés au cours de l'adipogenèse ont été identifiés par des techniques de *differential display* et de *cDNA micro-array* (Guo and Liao, 2000).

Parmi ces gènes, mentionnons ceux qui codent pour des protéines impliquées dans la mobilisation et le transport des acides gras : la LPL (*Lipoprotein lipase*) est sécrétée dans le sang et dégrade les triacylglycérols présents dans les lipoprotéines (LDL, VLDL) en glycérol et en acides gras ; des protéines assurent l'incorporation des acides gras à travers la membrane plasmique (FATP : *fatty acid transport protein*) et leur transport dans le cytoplasme (Fabp2/aP2 : *fatty acid-binding protein*). Outre son rôle de transporteur, la Fabp2/aP2 régule également le métabolisme des acides gras en stimulant ou en inhibant certaines réactions

(Glatz and van der Vusse, 1996). D'autres enzymes catalysent les réactions de la synthèse des triacylglycérols, comme l'ACS (*Acyl-CoA synthase*), qui thioestérifie les acides gras avec le coenzyme A (CoA), et la PEPCK (*Phosphoenolpyruvate carboxykinase*), qui décarboxyle et phosphoryle l'oxaloacétate en PEP (*Phosphoenolpyruvate*) dans la voie de la gluconéogenèse hépatique. Dans le cas particulier des adipocytes, la PEPCK est impliquée dans la glycéronéogenèse (synthèse du glycérol). Citons encore la GPD (*Glycerol-3-phosphate dehydrogenase*), qui convertit la DHAP (*Dihydroxyacetone-phosphate*) en glycérol-3-phosphate et la GPAT (*Glycerol-3-phosphate acyl transferase*) qui lie les acides gras au glycérol...

Les enzymes impliquées dans la synthèse des acides gras sont également fortement exprimées en cours de différenciation : l'ACC (*Acetyl-CoA carboxylase*) catalyse la première réaction en transformant l'acétyl-CoA en malonyl-CoA, qui sert de substrat à la FAS (*Fatty acid synthase*), complexe multi-enzymatique assurant l'élongation des acides gras. La formation d'acides gras mono-insaturés est assurée par la SCD (*Stearoyl-CoA desaturase*), autre enzyme exprimée durant le processus d'adipogenèse et participant au métabolisme des acides gras. Les étapes principales de la synthèse des acides gras sont présentées à la figure 1.8.

Des protéines sécrétées dans la MEC participent au changement de la morphologie des adipocytes en différenciation (hypertrophie, arrondissement), comme le collagène VI $\square$ 2, dont l'expression est induite précocement et reste soutenue durant tout le programme adipocytaire.

Les adipocytes expriment et sécrètent également un grand nombre de cytokines (ou adipokines), qui permettent de coordonner le métabolisme du tissu adipeux avec celui d'autres tissus. Par exemple, la leptine agit au niveau de l'hypothalamus comme facteur de satiété et assure donc la régulation de l'appétit. Des hormones impliquées dans la régulation de la glycémie sont aussi produites par le tissu adipeux, comme l'adiponectine et la résistine: la première augmente et la deuxième inhibe l'effet hypoglycémiant de l'insuline.

D'autres cytokines sécrétées par les adipocytes jouent des rôles divers : citons l'angiotensinogène, précurseur de l'angiotensine, un puissant vaso-constricteur, le VEGF (*Vascular-endothelial growth factor*), qui joue un rôle dans l'angiogenèse en stimulant la mitose des cellules endothéliales et le TNF $\square$  (*Tumor necrosis factor  $\square$* ), une cytokine pro-inflammatoire.

L'adipogenèse s'accompagne aussi de l'expression de GLUT-4 (*Glucose transporter-4*), qui permet l'entrée du glucose dans la cellule par diffusion facilitée, d'UCP-2 (*Uncoupling protein-2*), protéine découplante de la membrane mitochondriale interne, d'inhibiteurs de

CDK (*Cyclin-dependent kinases*) comme p18 et p21, qui interviennent dans la régulation du cycle cellulaire...

### 1.3.2 Les facteurs de transcription impliqués dans l'adipogenèse

De nombreux facteurs de transcription interviennent dans l'adipogenèse en régulant l'expression de gènes nécessaires au passage du pré-adipocyte à l'adipocyte différencié. L'expression et l'activation de ces facteurs de transcription sont contrôlées dans le temps, ce qui permet à l'adipocyte d'exprimer successivement des gènes impliqués dans l'initiation de la différenciation et dans le maintien de l'état différencié (voir figures 1.9 et 1.10).

#### 1.3.2.1 Les CCAAT/Enhancer-Binding Proteins (C/EBPs)

Ces facteurs de transcription jouent un rôle dans la différenciation de plusieurs types cellulaires. Ils appartiennent à la famille des *basic-leucine zipper (bZIP)* et comportent un domaine de liaison à l'ADN (*basic region*), un domaine de dimérisation (*leucine zipper*) et un domaine de transactivation. C'est sous forme d'homo- ou d'hétérodimères que les C/EBPs peuvent lier des sites contenant la séquence consensus 5'-CCAAT-3'. La régulation de l'activité transcriptionnelle de ces facteurs passe par des modifications post-traductionnelles (phosphorylation activatrice au niveau du domaine de transactivation, phosphorylation inhibitrice au niveau du domaine de liaison à l'ADN) ou par la dimérisation avec des facteurs empêchant l'expression dépendante des C/EBPs, comme par exemple CUP (*C/EBP Undifferentiated Protein*) et CHOP (*C/EBP Homologous Protein*).

Les C/EBPs existent sous plusieurs isoformes codées par des gènes différents. Nous nous intéresserons particulièrement aux isoformes  $\beta$ ,  $\delta$  et  $\epsilon$  pour leurs rôles joués dans le processus d'adipogenèse. Signalons que l'expression de C/EBP $\beta$  et  $\delta$  est induite précocement et transitoirement durant le programme d'adipogenèse (Cao et al., 1991) (Darlington et al., 1998) (Yeh et al., 1995), alors que l'expression de C/EBP $\epsilon$  est plus tardive et précède l'expression de gènes liés au maintien de la différenciation terminale (Christy et al., 1989) (Kaestner et al., 1990).

C/EBP $\beta$  est le premier membre de la famille des C/EBPs à avoir été purifié et cloné. Différentes approches ont montré le rôle joué par C/EBP $\beta$  dans l'adipogenèse. En effet, la

surexpression de C/EBP $\alpha$  dans les pré-adipocytes 3T3-L1 suffit à induire leur différenciation (Lin and Lane, 1994) (Freytag et al., 1994), tandis que l'expression d'ARN antisens pour C/EBP $\alpha$  empêche ce processus (Lin and Lane, 1992). En plus de contrôler l'expression de certains gènes (Fabp2/aP2, SCD-1, GLUT-4...) ainsi que sa propre expression, C/EBP $\alpha$  exerce une activité anti-mitotique dans les adipocytes matures. Remarquons d'ailleurs que l'expression de C/EBP $\alpha$  commence quand la phase d'expansion mitotique clonale des pré-adipocytes se termine (Christy et al., 1991). L'ARNm de C/EBP $\alpha$  peut donner lieu à deux produits alternatifs de traduction : p42-C/EBP $\alpha$  (*full-length*) et p30-C/EBP $\alpha$  (si la traduction commence au troisième codon AUG *in-frame*), mais seul p42-C/EBP $\alpha$  possède une activité adipogénique et anti-mitotique (Lin et al., 1993).

C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  sont deux autres membres de la famille des C/EBPs impliqués dans l'adipogenèse. En effet, la surexpression de C/EBP $\beta$  dans les cellules 3T3-L1 entraîne leur différenciation sans ajouter d'inducteurs hormonaux. Des expériences comparables réalisées avec C/EBP $\delta$  montrent que les agents inducteurs sont encore nécessaires, mais que l'adipogenèse est accélérée (Yeh et al., 1995). Suite à l'induction du programme de différenciation, l'expression de C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  est fortement induite et ce, dans les premières 24 h, avant de diminuer. Ces deux facteurs jouent donc un rôle transitoire dans les stades précoces de l'adipogenèse, notamment en contrôlant l'expression d'autres facteurs de transcription comme C/EBP $\alpha$  et PPAR $\alpha$ . C/EBP $\delta$  présente, comme C/EBP $\alpha$ , deux produits alternatifs de traduction. p18-C/EBP $\delta$  (LIP : *liver inhibitory protein* (Descombes and Schibler, 1991)) ne possède pas le domaine de transactivation situé dans la région N-terminale de p41-C/EBP $\delta$  (LAP : *liver activator protein* (Descombes et al., 1990)), mais peut dimériser avec p41-C/EBP $\delta$  ainsi qu'avec les autres membres de la famille des C/EBPs. LIP agirait donc comme un dominant négatif de la transcription induite par les C/EBPs.

### 1.3.2.2 Les Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs)

Les PPARs appartiennent à la famille des récepteurs nucléaires aux hormones et sont donc des facteurs de transcription activés par la liaison d'un ligand (voir figure 1.11). Ils comportent trois domaines majeurs : un domaine N-terminal de transactivation ligand-indépendante, un domaine de liaison à l'ADN et un domaine C-terminal qui permet la liaison du ligand, la transactivation ligand-dépendante et la dimérisation. Les PPARs hétérodimérisent essentiellement avec les récepteurs X aux rétinoïdes (RXRs), autres

membres de la famille des récepteurs nucléaires, de structure comparable aux PPARs (Kliwer et al., 1992) (Gearing et al., 1993). Les dimères PPAR/RXR lient l'ADN au niveau de la séquence consensus 5'-AACTAGGTCAAAGGTCA-3'. Les bases soulignées constituent une répétition directe de deux hexanucléotides séparés par un nucléotide. Ce motif, appelé DR-1 (*direct repeat-1*), est commun à tous les PPRE (*Peroxisome Proliferator-Response Element*).

Différentes isoformes de PPARs existent ; elles résultent de l'expression de gènes homologues. Au cours de la différenciation des adipocytes, PPAR $\alpha$  et PPAR $\delta$  (aussi appelé PPAR $\beta$  ou FAAR pour *Fatty Acid-Activated Receptor*) contribuent à l'expression de gènes adipocytaires.

PPAR $\delta$  présente deux produits alternatifs générés par *splicing* alternatif : PPAR $\delta$  a 30 acides aminés de moins que PPAR $\beta$  à l'extrémité N-terminale de la protéine (Fajas et al., 1997) (Zhu et al., 1995). PPAR $\delta$  est exprimé dans beaucoup de tissus, alors que PPAR $\beta$  est spécifique au tissu adipeux chez la souris (Tontonoz et al., 1994) comme chez l'homme (Vidal-Puig et al., 1997) (Fajas et al., 1997). Les différences fonctionnelles entre PPAR $\delta$  et PPAR $\beta$  ne sont pas encore bien connues. On a montré récemment que les PPAR $\delta$  possèdent une certaine activité transcriptionnelle en l'absence de ligand, et que cette activité transcriptionnelle ligand-indépendante est dix fois plus élevée pour PPAR $\beta$  que pour PPAR $\delta$  (Werman et al., 1997). Au cours de l'adipogenèse, l'expression de ces deux facteurs est augmentée, mais PPAR $\beta$  apparaît plus tôt (dans les 24 h) que PPAR $\delta$  (un jour plus tard) (Saladin et al., 1999).

PPAR $\beta$  joue un rôle prédominant dans la différenciation des adipocytes car il contrôle la transcription d'un grand nombre de gènes liés à ce programme (Fabp2/aP2, LPL, ACS, FATP, PEPCCK, C/EBP $\alpha$ ...). Son activité transcriptionnelle est maximale quand les ligands des deux partenaires de l'hétérodimère PPAR $\beta$ /RXR $\alpha$  sont présents (Schulman et al., 1998). Le ligand naturel de PPAR $\beta$  est la 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandine J2 mais, dans les modèles d'étude *in vitro*, on utilise plus souvent des ligands synthétiques tels que les thiazolidinediones (TZD). Ces molécules sont utilisées comme agents anti-diabétiques. Les RXRs peuvent lier l'acide 9-cis rétinolique ainsi que des composés synthétiques tels que le LG100268. (Pour une revue des PPAR $\beta$  lire (Lemberger et al., 1996).)

PPAR $\gamma$  (PPAR $\delta$ , FAAR) est un autre facteur de la famille des PPAR. Il est exprimé dans les tissus qui métabolisent les acides gras, à l'exception du foie : le tissu adipeux, l'intestin grêle, le cœur et le muscle squelettique. Etant donné qu'il est activé par la liaison

des acides gras à longue chaîne, PPAR $\alpha$  joue un rôle important dans l'expression de gènes dépendante des lipides. Cependant, le rôle de PPAR $\alpha$  dans l'adipogenèse est encore à déterminer. En effet, certaines études montrent qu'un agoniste sélectif pour PPAR $\alpha$  n'induit pas la différenciation des 3T3-L1 (Berger et al., 1999).

#### 1.3.2.3 Cyclic AMP-Response Element-Binding Protein (CREB)

CREB est une protéine de 43 kDa impliquée dans des processus tels que la prolifération et la différenciation de différents types cellulaires. Il a été découvert à l'origine comme un facteur de transcription phosphorylé par la PKA (*Protein Kinase A*). Cette kinase étant régulée positivement par la concentration cytoplasmique en AMPc (adénosine monophosphate cyclique), CREB est donc un médiateur de la transcription dépendante de l'AMPc. Cependant, il apparaît aujourd'hui que CREB se situe également en aval d'autres voies de transduction, telles que les kinases dépendantes de la calmoduline (*Calmodulin-dependent kinases* ou *CaMK*), les p44/p42 MAPK et les p38 MAPK, et que CREB répond donc à différents signaux (De Cesare et al., 1999).

CREB appartient aux facteurs de transcription de type *basic-leucine zippers* (*bZIP*). Il est composé d'un domaine de transactivation N-terminal, qui contient notamment le résidu très conservé de la Ser133 (cible de plusieurs kinases), et d'un domaine C-terminal qui assure la liaison à l'ADN (*basic region*) ainsi que la dimérisation (*leucine zipper*). CREB s'assemble en homodimère, mais peut également hétérodimériser avec les autres membres de sa famille (CREM, ATF1...). Il lie l'ADN au niveau des *cAMP-response elements* (*CRE* : 5'-TGACGTCA-3').

Le rôle de CREB dans l'adipogenèse des 3T3-L1 a été démontré récemment. En effet, la surexpression d'une forme constitutivement active de CREB (VP16-CREB) suffit à induire la différenciation des 3T3-L1. D'autre part, la surexpression d'un dominant négatif (K-CREB Arg287Leu), qui dimérise avec CREB endogène et empêche sa liaison à l'ADN, bloque la différenciation en présence des inducteurs adipogéniques (Reusch et al., 2000). De plus, ces auteurs montrent que CREB subit une activation biphasique durant l'adipogenèse, puisqu'il est phosphorylé aux jours 2 et 6 du programme (Reusch et al., 2000). Par ailleurs, des sites CRE ont été découverts dans les promoteurs de C/EBP $\alpha$  et C/EBP $\beta$  ; le facteur CREB contribue donc probablement à leur expression (Belmonte et al., 2001).

#### *1.3.2.4 Sterol-Response Element-Binding Protein-1 (SREBP-1)/Adipocyte Determination and Differentiation Factor-1 (ADD-1)*

Ce facteur de transcription (famille des *bHLH* : *basic domain-helix-loop-helix*) a été cloné en tant que composant adipocytaire pouvant lier les motifs *E-box* dans les promoteurs des gènes liés au métabolisme des lipides (Tontonoz et al., 1993), ainsi que comme composant hépatocytaire capable de lier les *sterol-response elements (SRE)* dans les promoteurs de gènes liés au métabolisme du cholestérol (Brown and Goldstein, 1997). Dans les hépatocytes, la protéine SREBP-1/ADD-1 est une molécule inactive associée à la membrane du réticulum endoplasmique. Une diminution des stocks intracellulaires en stérols peut conduire à un clivage de SREBP-1/ADD-1 et à sa translocation nucléaire, nécessaire à son activité transcriptionnelle. Cependant, le mécanisme d'activation de SREBP-1/ADD-1 dans les adipocytes doit encore être élucidé.

Certaines études réalisées sur SREBP-1/ADD1 laissent penser que ce facteur joue un rôle dans le processus de différenciation adipocytaire. L'expression de SREBP-1/ADD-1 est induite durant l'adipogenèse (Kim and Spiegelman, 1996), et sa surexpression dans les pré-adipocytes suffit à induire ce processus (Fajas et al., 1999). SREBP-1/ADD-1 peut de plus réguler la transcription de plusieurs gènes liés à la synthèse des acides gras (ACC, FAS) et des triacylglycérols (GPAT-1 et -2), ainsi que la transcription du facteur de transcription PPAR $\alpha$  (Fajas et al., 1999). Il a par ailleurs été montré que l'expression des gènes lipogéniques médiée par SREBP-1c/ADD-1 est induite par le glucose et l'insuline (Foretz et al., 1999).

### **1.4 Voies de transduction du signal**

L'expression des gènes adipocytaires est contrôlée par plusieurs facteurs de transcription, dont l'expression et l'activité sont régulées par des signaux extracellulaires *via* différentes voies de transduction cytoplasmiques impliquant des kinases et/ou des phosphatases. Nous nous intéresserons particulièrement aux voies de transduction impliquant la PI3K (*Phosphatidylinositol-3-phosphate kinase*), la GSK3 (*Glycogen synthase kinase 3*), les MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*) et l'AMPK (*AMP-activated kinase*).

Le choix de ces kinases a été établi sur base de leur rôle dans la différenciation des adipocytes. Comme dans ce travail nous nous intéresserons à rechercher l'activation et l'implication éventuelle de ces kinases dans l'accumulation de triacylglycérols par des pré-adipocytes 3T3-L1 subissant un stress énergétique, nous terminerons cette introduction en décrivant brièvement ces kinases et ce qui est connu de leur rôle dans la différenciation induite selon un protocole standard.

#### 1.4.1 La PI3K et la GSK3

La PI3K et la GSK3 sont deux kinases appartenant à l'une des voies de transduction du signal activées par l'insuline (voir figure 1.12). La liaison de l'insuline à son récepteur sur les sous-unités  $\alpha$  induit la transphosphorylation des deux sous-unités  $\beta$  sur des résidus tyrosines et le recrutement de l'*Insulin Receptor Substrate (IRS)*. Cette "*docking*" protéine, une fois liée au récepteur activé, est également phosphorylée sur plusieurs résidus tyrosines et recrute à son tour diverses enzymes en amont de différentes voies de transduction. Ces enzymes se lient à l'IRS par un domaine SH<sub>2</sub> (*src homology domain 2*) et sont activées par phosphorylation. Elles possèdent en outre un ou plusieurs domaines SH<sub>3</sub>, permettant l'interaction de l'enzyme avec son substrat par la liaison à une séquence riche en prolines (Pawson, 1995). Des exemples de protéines à domaine SH<sub>2</sub> impliquées dans le *signaling* de l'insuline sont Grb2 (qui initie la voie des MAPK *via* Ras et Raf), Syp (une tyrosine phosphatase qui intervient dans la régulation négative de la réponse en déphosphorylant le récepteur à l'insuline, l'IRS et les protéines activées par cette voie) et la PI3K.

La PI3K est constituée d'une sous-unité régulatrice p85 (notamment impliquée dans la reconnaissance de l'IRS grâce à deux domaines SH<sub>2</sub>) et d'une sous-unité catalytique p110 (Carpenter et al., 1990), qui phosphoryle les phosphoinositides et catalyse la formation de PIP3 (*phosphatidylinositol-3,4,5-phosphate*) à partir de PIP2 (*phosphatidylinositol-4,5-phosphate*).

Dans les pré-adipocytes 3T3-L1, la PI3K est effectivement activée en réponse à l'insuline (Hill et al., 2000) et son inhibition, réalisée avec des molécules comme la wortmannine ou le LY294002, bloque l'adipogenèse (Xia and Serrero, 1999).

Le PIP3 produit par la PI3K active les PDK (*Phosphoinositides-dependent kinases*), qui activent par phosphorylation la Ser/Thr kinase Akt (aussi appelée PKB : *protein kinase B*) sur les résidus Thr308 et Ser473. Dans les pré-adipocytes 3T3-L1, Akt2 (PKB $\beta$ ) est la forme

prédominante, tandis que l'expression d'Akt1 (PBK $\alpha$ ) diminue en présence d'insuline (Hill et al., 1999). Cette enzyme joue un rôle important dans l'adipogenèse, puisque la surexpression d'une forme constitutivement active (c-Akt) dans les cellules 3T3-L1 suffit à induire le stockage de triacylglycérols et l'expression de gènes marqueurs de la différenciation adipocytaire, comme la LPL, la Fabp2/aP2 (Magun et al., 1996) et la leptine (Barthel et al., 1997).

Parmi les substrats d'Akt, la GSK3 est une Ser/Thr kinase constitutivement active dont l'activité est inhibée par la phosphorylation de la Ser9 par Akt et donc par la présence d'insuline (dont l'effet est cependant transitoire). Les deux isoformes de la GSK3 ( $\alpha$  et  $\beta$ ) sont exprimées dans les adipocytes mais sont surtout abondantes dans les hépatocytes et les myocytes. Dans ces deux derniers types cellulaires, la GSK3 participe à la régulation de la synthèse du glycogène en réponse à l'insuline (voir figure 1.13). En effet, en absence d'insuline, la GSK3 inhibe la *Glycogen synthase (GS)* par phosphorylation. Par contre, en présence d'insuline, la GSK3 est inactivée par la voie PI3K-PDK-Akt et la GS est activée par déphosphorylation (Orena et al., 2000). Les adipocytes ne sont pas spécialisés dans le stockage du glycogène, mais la GSK3 y joue d'autres rôles. Elle peut notamment phosphoryler le facteur de transcription C/EBP $\alpha$  sur les Thr222 et Thr226. Ceci a été montré par des mesures d'activité kinase *in vitro* avec, comme substrat pour la GSK3, un peptide mimant la région de C/EBP $\alpha$  qui contient ces deux thréonines (Ross et al., 1999). Ces résultats ont été confirmés par le fait que la wortmannine, un inhibiteur de la PI3K, augmente la phosphorylation de C/EBP $\alpha$ , tandis que le lithium, un inhibiteur de la GSK3, induit sa déphosphorylation. Cependant, la phosphorylation de C/EBP $\alpha$  par la GSK3 sur les Thr222 et Thr226 n'induit pas de modifications de son activité transcriptionnelle (Ross et al., 1999). La GSK3 a également été impliquée dans la phosphorylation atypique de l'IRS sur des résidus Ser307, Ser636, Ser639 et Thr612 (Eldar-Finkelman and Krebs, 1997). Ce mécanisme est proposé par de nombreux auteurs pour rendre compte du phénomène de résistance à l'insuline des adipocytes 3T3-L1 en différenciation. En effet, la phosphorylation de l'IRS sur des résidus Ser et Thr empêche une phosphorylation activatrice subséquente sur des résidus Tyr. La GSK3 n'est cependant pas la seule kinase participant à cette régulation. En effet, mTOR, JNK et PKC $\delta$  ont également été impliquées (Ozes et al., 2001) (Aguirre et al., 2000) (Vollenweider et al., 2002).

## 1.4.2 Les MAPKs

Les MAPKs (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) sont activées en réponse à différents stimuli et consistent en cascades de kinases s'activant successivement (voir figure 1.14). Les MAPKs sont activées par la phosphorylation de deux résidus (Thr et Tyr) par des MAPK kinases (MKKs/MEKs) qui sont des kinases à activité duale (Ser/Thr kinase *et* Tyr kinase). Les MKKs/MEKs sont elles-mêmes phosphorylées et activées par des MKK kinases (MKKKs/MEKKs) (Seger and Krebs, 1995) (Kyriakis and Avruch, 1996). L'inactivation de la voie est contrôlée notamment par les MAPK phosphatases (MKPs). Les différentes isoformes (MKP1, 2, 3, 4, 5) présentent une forte homologie de séquence et sont très spécifiques pour les MAPKs. Elles diffèrent cependant dans la spécificité de leur substrat et dans leur localisation tissulaire (Camps et al., 2000) (Keyse, 2000).

Trois voies de MAPKs sont bien caractérisées à ce jour : les p38, les ERK (*Extracellular-regulated kinases*) et les JNK (*c-Jun N-terminal kinases*).

### 1.4.2.1 La voie des p38

Les p38 MAPK sont impliquées dans des processus aussi divers que le cycle cellulaire, la mort cellulaire et la différenciation. Elles peuvent être fortement activées suite à un stress comme un choc osmotique induit, par exemple, par le sorbitol (Kayali et al., 2000), mais aussi par l'activation de récepteurs à Tyr kinase tel que le récepteur à l'insuline (Kayali et al., 2000) ou de récepteurs couplés aux protéines G, comme les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques (Mizuno et al., 2002). A l'origine, p38 a été identifiée en tant qu'homologue de HOG-1, une kinase activée par le choc osmotique chez *S. cerevisiae* (Van Wuytswinkel et al., 2000).

Les p38 comportent classiquement un domaine kinase N-terminal et un *common docking domain (CD)* C-terminal, qui permet l'interaction de p38 avec les MKKs et les MKPs (Tanoue et al., 2000). Quatre isoformes, codées par des gènes distincts, ont été identifiées : p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  et p38 $\delta$ . p38 $\alpha$  et p38 $\beta$  ont une répartition tissulaire ubiquiste, mais sont particulièrement abondantes dans les tissus cérébraux. p38 $\gamma$  est exprimée dans les muscles et p38 $\delta$  dans les tissus glandulaires (glandes salivaires, adrénales, pituitaire) (Wang et al., 1997).

Signalons que p38 $\alpha$  et p38 $\beta$  peuvent être inhibées par des dérivés de pyridinyl imidazoles (SB203580), mais que p38 $\delta$  et p38 $\gamma$  sont insensibles à ces molécules (Lee et al., 1999).

L'activation de la voie des p38 passe des MKKKs (TAK, PAK) qui activent MKK3 et MKK6. Celles-ci peuvent phosphoryler les p38 sur les résidus Thr180 et Tyr182. Une fois activées, les p38 phosphorylent différents facteurs de transcription, parmi lesquels CREB, ATF1 (Tan et al., 1996), ATF2 (Raingeaud et al., 1996), CHOP (Wang and Ron, 1996) et C/EBP $\alpha$  (Engelman et al., 1998). Ces facteurs de transcription, en particulier CREB et C/EBP $\alpha$ , sont impliqués dans l'adipogenèse, ce qui laisse penser que les p38 jouent un rôle dans ce processus. En effet, il a été montré que le traitement des pré-adipocytes 3T3-L1 avec le SB203580 empêche leur différenciation en adipocytes, ce qui serait dû à une diminution du taux de phosphorylation de C/EBP $\alpha$  (Engelman et al., 1998). De plus, le traitement des mêmes cellules avec du salicylate, un activateur de la voie des p38, et la surexpression d'une forme constitutivement active de MKK6 peuvent induire l'adipogenèse indépendamment de toute stimulation hormonale (Engelman et al., 1999).

#### 1.4.2.2 La voie des ERKs (*Extracellular-regulated kinases*)

Les *extracellular-regulated kinases* sont des Ser/Thr kinases ubiquistes impliquées dans plusieurs voies cellulaires, comme le contrôle de la prolifération et de la différenciation (Nishida and Gotoh, 1993). Les deux isoformes les mieux caractérisées (ERK1/p44 et ERK2/p42) sont activées par phosphorylation sur les résidus Thr202 et Tyr204 par MEK1 et MEK2, qui sont elles-mêmes activées par Raf ou par les MEKKs. Les ERKs phosphorylées transloquent alors dans le noyau, où elles peuvent phosphoryler différents facteurs de transcription (parmi lesquels c-fos, Elk1, *serum-responsive factor (SRF)* et *activating protein-1 (AP-1)*). Cette voie est classiquement activée par les facteurs de croissance (PDGF, FGF...) présents dans le sérum (Gonzalez et al., 1993) (Lenormand et al., 1993), mais également par la liaison de l'insuline à son récepteur (Kayali et al., 2000). Les ERKs peuvent aussi être activées par les récepteurs  $\beta_3$ -adrénergiques couplés aux protéines G dans les adipocytes (Mizuno et al., 2000), ce qui suggère que cette voie joue un rôle dans la régulation du métabolisme adipocytaire *in vivo* par le système nerveux orthosympathique.

Les ERKs sont constituées d'un domaine kinase central flanqué d'extensions N- et C-terminales. La phosphorylation de sites activateurs par les MEKs dans le domaine kinase induit un changement conformationnel qui permet aux ERKs de lier leurs substrats et de les

phosphoryler (Canagarajah et al., 1997). Le domaine N-terminal joue également un rôle dans la régulation de l'activité des ERKs, dans leur association avec les MEKs et dans le ciblage de leurs substrats (Eblen et al., 2001). Le domaine C-terminal est, lui, impliqué dans l'interaction des ERKs avec d'autres régulateurs (Tanoue et al., 2000).

Le rôle joué par les ERKs dans l'adipogenèse est encore controversé. S'il est bien établi qu'elles sont impliquées dans la phase d'expansion mitotique clonale (notamment *via* la phosphorylation de c-fos et Elk1), leur rôle dans la différenciation n'est pas encore clairement déterminé. En effet, l'inhibition de MEK1 par le PD98059 bloque la phase d'expansion clonale, alors que la différenciation proprement dite n'est pas affectée (Qiu et al., 2001). Cependant, d'autres études montrent que la déplétion des ERK1 et ERK2 par une approche utilisant des oligonucléotides antisens empêche l'adipogenèse dans les 3T3-L1 (Sale et al., 1995).

#### 1.4.2.3 La voie des JNKs (*c-Jun N-terminal kinases*)

La voie des JNKs (aussi appelées SAPKs : *stress-activated protein kinases*) peut être activée par différents stress cellulaires comme l'exposition aux UV ou aux rayons  $\gamma$  le choc thermique, le choc osmotique, le stress oxydatif et par des cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) et le TNF $\alpha$  (Minden and Karin, 1997) (Ip and Davis, 1998). L'activation des JNKs passe par MEKK1, qui active JNKK1/MKK4 ou MKK7 (Minden and Karin, 1997) (Ip and Davis, 1998). MKK4 et MKK7 peuvent à leur tour activer les JNKs par phosphorylation sur les résidus Thr 183 et Tyr 185. Les JNKs activées phosphorylent alors différents facteurs de transcription comme c-Jun, ATF2 (Gupta et al., 1995), Elk1 (Yang et al., 1998), HSF-1 (Dai et al., 2000) et PPAR $\alpha$  (Adams et al., 1997). Les JNKs phosphorylent préférentiellement des sites contenant le motif Pro-X-(Ser/Thr)-Pro, mais nécessitent d'abord l'interaction avec des séquences spécifiques pour une phosphorylation efficace. La fonction physiologique des JNKs n'est pas encore bien connue, mais on sait que les JNKs peuvent médier des signaux cellulaires pro-apoptotiques initiés par des stress comme les UV ou le choc thermique (Chen et al., 1996) (Zanke et al., 1996).

Les JNKs existent sous trois isoformes codées par des gènes différents : JNK1 et JNK2 sont ubiquistes, tandis que JNK3 est spécifique aux neurones. Cependant, d'autres isoformes sont générées par *splicing* alternatif des transcrits de ces trois gènes. JNK1, 2 et 3 diffèrent dans leur activité de liaison à différents facteurs de transcription. Par exemple, JNK1 et JNK2

peuvent toutes deux lier le facteur c-Jun, mais la liaison de JNK2 est 25 fois plus forte que celle de JNK1 (Kallunki et al., 1994). Les différentes isoformes des JNKs semblent donc cibler sélectivement certains facteurs de transcription plutôt que d'autres.

Les JNKs peuvent activer certains facteurs de transcription en les phosphorylant (c-Jun, ATF2, Elk1...), mais elles peuvent aussi en inhiber d'autres, comme par exemple HSF-1 (Dai et al., 2000) et PPAR $\alpha$  (Adams et al., 1997). En effet, la phosphorylation de PPAR $\alpha$  (et probablement aussi PPAR $\beta$ ) par la JNK interfère avec la liaison de son ligand et diminue son activité transcriptionnelle  $\square$  PROGCOMP ENRfu  $\square$  (Adams et al., 1997). Dans l'adipogenèse, les JNKs semblent donc jouer un rôle inhibiteur, notamment via la phosphorylation de PPAR $\alpha$  mais aussi *via* l'induction de la lipolyse induite par le TNF $\alpha$  (Ryden et al., 2002).

#### 1.4.3 L'AMPK (adenosine-5'-monophosphate-dependent kinase)

L'AMPK appartient à une famille de Ser/Thr kinases qui sont activées par les stress métaboliques provoquant une diminution de la concentration cytoplasmique en ATP, et donc une augmentation du ratio AMP/ATP (Moore et al., 1991) (Stapleton et al., 1996). L'AMPK protège les cellules d'une diminution d'ATP en inhibant les voies biosynthétiques et en stimulant les voies produisant de l'ATP (Gamble and Lopaschuk, 1997).

L'AMPK est une enzyme hétérotrimérique constituée d'une sous-unité catalytique  $\square$  (62 kDa) et de deux sous-unités régulatrices  $\square$  et  $\square$  (38 et 35 kDa respectivement). Il existe deux isoformes, codées par des gènes distincts, de la sous-unité  $\square$  :  $\square$ 1 et  $\square$ 2 (Stapleton et al., 1997) (Beri et al., 1994).

L'AMP active l'AMPK par quatre mécanismes. Il lie et active de manière allostérique (1) l'AMPK et (2) l'AMPK kinase (AMPKK). De plus, la fixation de l'AMP à l'AMPK induit un changement conformationnel qui augmente l'affinité de l'AMPKK pour l'AMPK (3) et qui diminue l'affinité des phosphatases (notamment PP2C $\square$  : *protein phosphatase 2C* $\square$  (Marley et al., 1996)) pour l'AMPK (4). Pour expliquer la régulation de l'activité de l'AMPK, un modèle a été proposé sur base du modèle classique de la régulation des enzymes allostériques (voir figure 1.15). Ce modèle suggère que l'AMPK peut exister seule (conformation T) ou liée à l'AMP (conformation R). Chacune de ces deux conformations peut exister sous la forme phosphorylée ou déphosphorylée. L'AMPK déphosphorylée est inactive en présence et en absence d'AMP, mais la forme R déphosphorylée (stabilisée par l'AMP)

devient un meilleur substrat pour l'AMPKK, qui la phosphoryle. Une fois l'AMP dissocié de l'AMPK, on obtient la conformation T, ce qui conduit à une diminution de son activité. En l'absence d'AMP, le site de phosphorylation de la forme T phosphorylée est exposé à la phosphatase PP2C et l'AMPK est totalement inactivée.

L'AMPK est généralement phosphorylée par l'AMPKK sur la Thr172, localisée entre deux motifs conservés Asp-Phe-Gly et Ala-Pro-Glu (voir figure 1.16). La mutagenèse dirigée confirme que la phosphorylation de la Thr172 est nécessaire à l'activité maximale de l'AMPK étant donné qu'un mutant T172A est partiellement inactif. Signalons qu'il n'existe actuellement aucun inhibiteur de l'AMPK, mais que l'AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside) est souvent utilisé dans les modèles d'étude *in vitro* en tant qu'activateur de cette enzyme. En effet, l'AICAR est phosphorylé dans le cytoplasme (forme ZMP) et peut ensuite activer l'AMPK en se liant au site de fixation de l'AMP. (Pour une revue des mécanismes régulateurs de l'activité de l'AMPK, lire (Hardie et al., 1998)).

Une fois activée, l'AMPK régule l'activité de plusieurs enzymes utilisant l'ATP. Par exemple, elle inhibe la 3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-CoA réductase, qui intervient dans la synthèse du cholestérol (Hardie, 1992), ainsi que l'ACC (enzyme de la voie de synthèse des acides gras) en la phosphorylant sur les Ser79, Ser1200 et Ser1215. Cependant, seule la phosphorylation de la Ser79 semble nécessaire à l'inactivation de l'ACC (Hardie, 1992) (Gamble and Lopaschuk, 1997). L'AMPK est donc une enzyme-clé dans la régulation de la synthèse et de l'oxydation des acides gras. En effet, l'ACC catalyse la carboxylation de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA. Cette molécule est un précurseur de la synthèse des acides gras en tant que substrat de la FAS, mais aussi un inhibiteur de la *carnitine palmitoyl-transferase-1 (CPT-1)*, qui participe à l'importation des acyls-CoA dans la mitochondrie (voir figure 1.17) L'inactivation de l'ACC par l'AMPK conduit donc à une diminution de la concentration cellulaire en malonyl-CoA. Ceci lève l'inhibition du malonyl-CoA sur la CPT-1 et aboutit à une entrée plus importante des acides gras dans la mitochondrie et à une plus grande disponibilité des précurseurs de la  $\beta$ -oxydation (Prip-Buus et al., 1990) (Lopaschuk et al., 1994) (Thupari et al., 2001). En effet, un traitement des pré-adipocytes 3T3-L1 avec l'AICAR afin d'activer l'AMPK empêche leur différenciation en adipocytes (Habinowski and Witters, 2001).

Nous allons maintenant développer rapidement le contexte général de notre recherche et les objectifs de ce travail.

## ***Contexte de la recherche et objectifs de ce mémoire***

Un nouveau sujet de recherche qui porte sur la différenciation des adipocytes blancs ou adipogénèse *in vitro* a récemment été lancé au sein de l'URBC. L'adipogénèse est un processus de plus en plus étudié ces dernières années, en particulier en raison de l'incidence croissante de l'obésité et des pathologies associées dans les pays industrialisés. Les nombreuses études, menées à différents niveaux, portent sur le rôle joué par certains facteurs de transcription qui contrôlent l'expression de gènes marqueurs spécifiques nécessaires à la différenciation des adipocytes, sur les voies de transduction impliquées dans la régulation de ce processus ou encore sur les interactions du tissu adipeux avec d'autres organes (foie, muscle squelettique, hypothalamus...) par la libération de différentes cytokines ou adipokines. Ces études nous montrent que le programme de différenciation est très complexe et que les adipocytes jouent plus qu'un rôle de stockage des triacylglycérols dans l'organisme.

Cependant, de nombreuses questions restent sans réponses dans ce domaine de recherche. En particulier, le rôle et le comportement des organelles subcellulaires telles que la mitochondrie au cours de la différenciation des adipocytes blancs sont très peu étudiés. Au laboratoire, nous nous focalisons essentiellement sur la contribution de la mitochondrie à l'adipogénèse. Pour ce faire, nous utilisons des inhibiteurs de l'activité mitochondriale ayant pour cible les complexes assurant les phosphorylations oxydatives, et nous observons les effets d'un dysfonctionnement mitochondrial sur la cellule pré-adipocytaire.

## ***Résumé des recherches antérieures à ce mémoire***

La lignée cellulaire utilisée est une souche de pré-adipocytes embryonnaires murins (3T3-L1) utilisée dans de nombreuses études portant sur la différenciation des adipocytes blancs. Nous avons précédemment montré qu'une inhibition de l'activité respiratoire mitochondriale dans les pré-adipocytes, induite par des inhibiteurs métaboliques tels que l'antimycine A et l'oligomycine, entraîne l'apparition de petites vésicules de triacylglycérols dans le cytoplasme de ces cellules. Ces vésicules sont mises en évidence après 8 jours d'inhibition mitochondriale par une coloration à l'Oil Red O. Ce colorant possède une affinité très forte pour les graisses neutres et permet de détecter la présence de triacylglycérols et de

quantifier leur accumulation en mesurant au spectrophotomètre l'absorbance des tapis cellulaires après coloration. Cependant, ce phénotype n'est pas induit par toutes les molécules capables d'inhiber les phosphorylations oxydatives mitochondriales. En effet, le FCCP (un agent découplant) n'entraîne pas l'apparition de ces vésicules de triacylglycérols. De plus, nous observons que les vésicules obtenues suite à une inhibition mitochondriale sont plus petites que celles accumulées dans les 3T3-L1 dont la différenciation est induite selon un protocole standard. Pour cette raison, nous appellerons le phénotype induit par les inhibiteurs mitochondriaux phénotype « adipocyte-like ». Dans le cadre de sa thèse de doctorat, S. Vankoningsloo s'intéresse aux mécanismes responsables de l'apparition de ce phénotype adipocyte-like par l'étude de l'activation de facteurs de transcription, l'importance de certaines kinases et l'expression différentielle de gènes. Nous réalisons systématiquement des études comparatives entre le modèle standard d'induction de la différenciation et le modèle d'acquisition du phénotype adipocyte-like induit par les inhibiteurs de la mitochondrie, afin de rechercher les similitudes et les différences entre ces deux modèles.

### ***Objectifs de ce mémoire***

Le but de ce travail est donc de rechercher et de mieux comprendre les mécanismes cellulaires impliqués dans l'apparition du phénotype « adipocyte-like » induit par un inhibiteur de la chaîne respiratoire. Il est évident que la cellule soumise à une inhibition mitochondriale pendant plusieurs jours doit adapter son régime métabolique et modifier l'expression d'un certain nombre de gènes. Ces événements passent par l'activation ou l'inhibition de certaines voies de transduction, par la régulation de l'activité transcriptionnelle de certains facteurs de transcription et par l'expression ou la répression de certains gènes, qui sous-tendent les réponses de la cellule au dysfonctionnement de ses mitochondries.

Dans le cadre de ce mémoire, nous étudierons la réponse des pré-adipocytes 3T3-L1 à une perturbation de la chaîne respiratoire par la stigmatelline, un inhibiteur du complexe III. Nous nous intéresserons à caractériser, dans ce modèle de stress métabolique, l'état d'activation de 6 kinases (PI3K, GSK3, p38, ERK, JNK, AMPK) connues pour jouer un rôle dans la différenciation des pré-adipocytes. Nous analyserons par la technique de *Western blotting* l'état de phosphorylation (activatrice ou inhibitrice) et le taux d'expression de ces kinases en réponse à l'inhibition de l'activité mitochondriale, et comparerons les résultats

obtenus avec ceux observés dans un modèle de différenciation adipocytaire induite par un cocktail de différenciation standard.

Nous tenterons également de mettre en évidence le rôle de ces kinases dans l'apparition du phénotype « adipocyte-like » en recherchant l'effet d'inhibiteurs de ces kinases sur l'accumulation de vésicules de triacylglycérols dans les cellules 3T3-L1. Pour cela, nous utiliserons la technique de coloration à l'Oil Red O (colorant pour les graisses neutres).

Enfin, étant donné l'importance de l'AMPK dans les réponses cellulaires aux stress énergétiques, notamment induits par l'inhibition de l'activité mitochondriale, nous doserons l'activité de cette enzyme dans les deux modèles étudiés. Nous testerons également l'effet d'une activation de l'AMPK par l'AICAR sur les phénotypes adipocytaire et « adipocyte-like ».

## **2 MATERIELS ET METHODES**

### ***2.1 CULTURE, SOUS-CULTURES***

#### **2.1.1 Méthode de culture**

Les cellules utilisées sont des pré-adipocytes embryonnaires murins (3T3-L1) provenant de l'ATCC (American Tissue and Cell Collection, USA), un modèle de référence pour étudier le processus de l'adipogenèse. Les 3T3-L1 sont cultivées dans des boîtes de culture de 75 cm<sup>2</sup> (Corning, USA) dans du milieu DHG (*Dulbecco's modified Eagle's medium+High Glucose* (4,5 g/l) (Gibco BRL, Grande-Bretagne) contenant 10% de sérum de veau foetal FCS (*Fetal Calf Serum*, Gibco BRL, Grande-Bretagne). Les cellules sont maintenues à 37°C, dans une étuve contenant 5% de CO<sub>2</sub> (Heraeus, Allemagne) et 95% d'air humide.

#### **2.1.2 Méthode de sous-culture**

Une fois les cellules à 80-90% de confluence, le milieu de culture est enlevé et les cellules sont rincées avec 10 ml de PBS (*Phosphate Buffer Saline* : 0,9 % NaCl, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7,4 ) préchauffé à 37 °C afin d'éliminer toute trace de sérum. Ensuite, on ajoute 2 ml de trypsine-EDTA (Gibco BRL, Grande-Bretagne) et le détachement des cellules est suivi au microscope à contraste de phase. Les cellules sont resuspendues dans 10 ml de DHG contenant 10% de sérum de veau foetal et la suspension cellulaire est répartie dans des boîtes de culture T75 ou des boîtes de culture multipuits en fonction du type d'expérience à réaliser.

### ***2.2 MODELE DE DIFFERENCIATION DES PREADIPOCYTES 3T3-L1***

Le modèle de différenciation des 3T3-L1 a été mis au point au laboratoire par S.Vankoningsloo sur base d'un protocole décrit dans la littérature. Les cellules 3T3-L1 sontensemencées à 50% de confluence dans des boîtes de 24 puits 3 jours avant le début du programme de différenciation (jour -3). Quand les cellules sont à confluence (jour 0), elles sont incubées 2 jours en présence d'un cocktail inducteur de la différenciation (MIX3, mixture à 3 molécules) contenant 5 µg/ml d'insuline (Gibco BRL, Grande-Bretagne), 300 µM de dibutyryl-AMP cyclique (db-AMPC, Sigma, USA) et 1 µM de dexaméthasone (DEX,

Sigma, USA). Ces molécules sont diluées dans du DHG-L1, contenant 1,5 g/l de NaHCO<sub>3</sub> et 10% de FBS. Le milieu est alors remplacé tous les 2 jours par du DHG-L1 contenant 10% de FBS et 5 µg/ml d'insuline (Gibco BRL, Grande-Bretagne). Un schéma reprenant la succession des différentes étapes du modèle de différenciation des 3T3-L1 est présenté à la figure 2.1A.

### ***2.3 CONDITIONS D'INCUBATION DES CELLULES 3T3-L1 AVEC LES INHIBITEURS MITOCHONDRIAUX***

Les cellules 3T3-L1 sontensemencées à 50% de confluence dans des boîtes à 24 puits 3 jours avant le début de l'incubation avec les inhibiteurs mitochondriaux (jour -3). Quand les cellules sont à confluence (jour 0), celles-ci sont incubées en présence de l'inhibiteur d'intérêt dilué dans du DHG-L1 contenant 10 % de FBS. Le milieu contenant l'inhibiteur mitochondrial est ensuite renouvelé tous les 2 jours.

Les inhibiteurs mitochondriaux utilisés sont le FCCP à 1 µM (Sigma, USA) et la stigmatelline à 100 nM (Fluka, Suisse).

Un schéma reprenant le programme d'inhibition mitochondriale chronique des cellules 3T3-L1 est présenté à la figure 2.1B.

### ***2.4 CONDITIONS D'INCUBATION AVEC LES INHIBITEURS OU ACTIVATEURS SPECIFIQUES DE KINASES.***

Les 3T3-L1 confluentes sont incubées en présence de stigmatelline (100 nM) *ou* du cocktail inducteur (5 µg/ml d'insuline, 300 µM de db-AMPC et 1 µM de DEX) pendant 48h. Les renouvellements de milieu sont ensuite réalisés tous les 2 jours avec respectivement du DHG+10 % de FCS contenant de la stigmatelline concentration (100 nM) ou de l'insuline (5 µg/ml). L'inhibiteur ou l'activateur est ajouté au début de l'incubation (jour 0) et ce à chaque renouvellement de milieu. Dans certaines expériences, l'inhibiteur de la voie de transduction n'est présent que pendant des périodes de 48h au cours du programme. Les inhibiteurs utilisés sont le chlorure de lithium (LiCl), un inhibiteur de la GSK-3 (*Glycogen Synthase Kinase-3*) (Sigma, USA), la wortmannine un inhibiteur de la PI3-K (*phosphatidylinositol 3-kinase*) (Biomol, USA), le PD98059 (inhibiteur des MEK *Mitogen Erk Kinase*) (Biomol, USA), le SB

203580 (inhibiteur des p38 MAPK, *Mitogen-Activated protein Kinase*, Biomol USA) et le SP600125, un inhibiteur des JNK (*c-Jun N terminale Kinase*) (Biomol, USA). L'activateur utilisé est l'AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside) qui active l'AMPK (*AMP-activated protein kinase*) (Toronto Research Chemicals, USA).

## **2.5 COLORATION DES TRIACYLGLYCÉROLS A L'OIL RED O**

L'Oil Red O (Sigma, USA) solubilisé à 0,2% dans l'isopropanol (Merck, Allemagne) est mélangé avec de la dextrine (Sigma, USA) à 1% dans l'eau dans un rapport 3/2 (:v/v). Après 10 min, ce mélange est filtré sur papier Whatman 2 V (Whatman, Grande-Bretagne). Au terme des incubations, les cellules 3T3-L1 sont rincées 1 fois avec 1 ml de PBS, puis fixées 2 min avec 500 µl de paraformaldéhyde à 3,7 % (Merck Allemagne). Ensuite, les cellules sont incubées 30 min avec 500 µl d'Oil Red O puis rincées 2 fois avec 1 ml de PBS. Les cellules contenant les vésicules de triacylglycérols sont observées au microscope à contraste de phase et photographiées. L'absorbance des tapis cellulaires est mesurée au spectrophotomètre à 490 nm (Ultramark, Biorad, Allemagne). Les résultats sont exprimés en unité de DO et représentent la DO moyenne plus ou moins un écart-type.

## **2.6 WESTERN BLOTTING**

### **2.6.1 Préparation des lysats cellulaires**

Les cellules 3T3-L1, cultivées dans des boîtes T 75 (Corning, USA), sont soumises à un programme de différenciation ou d'inhibition mitochondriale chronique.

Les lysats cellulaires sont préparés à différents temps après le début du programme aux jours 1, 2, 3, 4 et J8. Les cellules sont rincées avec 10 ml de PBS (4°C) puis elles sont raclées dans 750 µl de tampon de lyse (20 mM Tris ; pH 7,4, 150 mM KCl, 1mM EDTA, 1% de Triton-X-100 4°C (Merck, Allemagne) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche, Allemagne) et de phosphatases (1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 5 mM NaF, 10 mM p-nitrophénylphosphate et 10 mM β-glycérophosphate). Le lysat est ensuite transféré dans des eppendorfs (sur glace) et centrifugé 15 min à 13000 rpm (4 C°). Un dosage des protéines est réalisé sur les surnageants (lysats clairs), par un test au BCA (acide bicinchoninique, Pierce Grande-Bretagne).

## 2.6.2. Préparation des échantillons

De 40 µg à 80 µg de protéines sont prélevés et portés à équivalent avec du tampon de lyse contenant des inhibiteurs de phosphatases et de protéases. On ajoute aux échantillons le *Sample Buffer* (0,1 M Tris pH 6,8 ; 4% glycérol, 4% SDS ; 0,2% de bleu de bromophénol, 4% β-mercapto-éthanol dans lequel les échantillons sont bouillis à 100 C° pendant 5 min, refroidis sur glace, puis centrifugés par un spin de quelques secondes avant d'être chargés dans les puits au sommet du *stacking gel*. De manière à estimer le poids moléculaire de la protéine d'intérêt, on charge également 20 µl d'un marqueur de poids moléculaire (Seebue plus 2) ( Invitrogene, USA).

## 2.6.3 Préparation des gels et migration

### **Gel de concentration (stacking gel) (4,4%) :**

- 2,2 ml d'une solution de polyacrylamide 40% et de bis-acrylamide 3 % (Pharmacia Biotech, Suède)
- 10 ml de tampon B pH 6,8 (121 ml Tris-HCl 2 M ; 10 ml SDS 20 %et 365 ml d'H<sub>2</sub>O)
- 7,8 ml H<sub>2</sub>O
- 40 µl d'ammonium persulfate (APS) 25% (Pharmacia Biotech, Suède)
- 30 µl TEMED (Pharmacia Biotech, Suède )

### **Gel de séparation (runnig gel) (10%) :**

- 10 ml d'une solution de polyacrylamide 40% et de bis-acrylamide 3% (Pharmacia Biotech, Suède)
- 20 ml de tampon A pH 8,8 (90 ml Tris-HCL 2 M ; 285 ml Tris base 2 M ; 10 ml SDS 20 %; 115 ml d'H<sub>2</sub>O)
- 10 ml H<sub>2</sub>O
- 200 µl d'ammonium persulfate (APS) 25 % (Pharmacia Biotech , Suède)
- 75 µl TEMED (Pharmacia Biotech, Suède)
- 

Chacun de ces gels est coulé entre des plaques de montage et doit polymériser à température ambiante pendant 45 min. Des puits sont créés au sommet du gel à l'aide d'un peigne pour permettre de déposer les échantillons. La migration a lieu dans un tampon de migration ou *running buffer* (0,05 M Tris-Base, 0,38 M glycine; 0,1% SDS) et se réalise un

appliquant un courant de 35 mA pendant 1h (migration dans le *stacking gel*), puis de 45mA pendant plusieurs heures (migration dans le *running gel*).

#### 2.6.4 Transfert des protéines sur une membrane de PVDF

Après migration des échantillons et démoulage du gel, les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF (polyvinylidène difluoride) (Amersham Pharmacia Biotech, Grande-Bretagne). Cette étape se passe dans une cuve de transfert *semi-dry*. Le tampon de transfert a la composition suivante : 0,5 M Tris-base, pH 8,3; 0,76 M glycine ; 0,1% SDS et 15% en méthanol. Après le démoulage du gel, celui-ci est déposé sur une membrane de PVDF ayant la taille du gel dans un assemblage selon une disposition en sandwich. Ce montage en sandwich, schématisé à la figure 2.2, est soumis à une différence de potentiel de 55 mA pendant 16h pour permettre le transfert des protéines sur la membrane.

#### 2.6.5 Traitement de la membrane et révélation

##### 2.6.5.1 Détection de motifs phosphorylés

Pour la détection de protéines phosphorylées, la membrane est bloquée 3 h sous agitation dans du TBS (*Tris Buffer Saline* :2,4g/l Tris-HCl, 8 g/l NaCl) contenant 0,07% de Tween-20 (Sigma,USA), 5% de lait (Gloria, Nestlé, Belgique) et 5% de SAB (Sigma, USA). Ensuite, la membrane est incubée 16 h, à 4°C avec un anticorps primaire anti-phospho-p38 dirigé contre les résidus Thr 180/Tyr 182 (Cell Signaling, USA), anti-phospho-p42/44 dirigé contre les résidus Thr 202/Tyr 204 (New England Biolabs, Grande-Bretagne), anti-phospho-JNK dirigé contre les Thr 54/Tyr 48 (Santa Cruz, USA), anti-phospho-GSK3 $\beta$  dirigé contre la Ser9 (Cell Signaling, USA) ou anti-phospho Akt dirigé contre la Ser 473 (Cell Signaling, USA). Tous ces anticorps primaires sont dilués à 1 $\mu$ g/ml dans du TBS contenant 0,07 % de Tween-20, 5 % de SAB et 5 % de lait. Ensuite, la membrane est rincée 3 X 15 min et 2 X 5 min avec 20 ml de TBS Tween-20 0,1%, puis incubée 45 min à température ambiante avec un anticorps secondaire (anti-IgG de lapin ou de souris) couplé à de la peroxydase extraite de raifort (*Horse Radish Peroxidase* HRP), dilué 3000 X dans 5% de SAB et 5% de lait et 0,07% de tween-20 pour l'anticorps anti-phospho-p42/44 et 2000 X pour tous les autres anticorps. Après incubation avec l'anticorps secondaire, la membrane est rincée 3 x 15 min et 2 x 5 min

avec 20 ml de TBS-Tween 0,1% . Enfin, la membrane est incubée 2 min dans une solution de révélation (Pierce, Grande-Bretagne).

En chambre noire, on expose un film d'autoradiographie (Hyperfilm, Amersham, Grande-Bretagne) sur la membrane en faisant varier le temps d'exposition de manière à obtenir une détection optimale. Le film est placé dans une solution de révélateur (Ilford 200 RI, Ilford, Grande-Bretagne), lavé à l'eau distillée avant d'être passé dans une solution de fixateur (Ilford 200 RI, Ilford, Grande-Bretagne). Le film est ensuite rincé à l'eau courante pour éliminer toute trace de fixateur, et laissé sécher avant d'être scanné.

#### *2.6.5. 2 Détection de motifs non phosphorylés*

La membrane est bloquée 3 h sous agitation dans du TBS-T 0,1% contenant 5% de lait (Gloria, Nestlé, Belgique). Ensuite la membrane est incubée pendant 2 h, à température ambiante avec un anticorps primaire anti-GSK3 $\alpha$  (Santa Cruz, USA), anti-p38 (Santa Cruz, USA), anti-p42/44 (Transduction Laboratories), anti-JNK1 (Pharmingen, USA), anti-Akt (Cell Signaling, USA) et l'anticorps anti-AMPK. L'anticorps anti-aP2 nous a généreusement été donné par le Prof Lane (Biochemistry, The Johns Hopkins, University School of Medicine). Les anticorps dirigés contre les kinases sont dilués à 1  $\mu$ g/ml et l'anticorps Fabp2/aP2 est dilué à (0,03  $\mu$ g/ml ) dans du TBS contenant 0,1% de Tween 20 et 5% de lait. La membrane est rincée 3 x 5 min dans du TBS-T contenant 5% de lait , puis incubée 45 min à température ambiante avec l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin ou de souris couplé à la HRP, dilué 2000 fois dans du TBS-T contenant 5% de lait. Enfin la membrane est rincée 3 x 20 min dans du TBS-T, incubée avec la solution de révélation (Pierce,Grande-Bretagne).

### ***2.7 DOSAGE DES PROTEINES :TEST BCA (acide bicinchoninique)***

Cette méthode est basée sur la réduction du Cu<sup>2+</sup> en Cu<sup>1+</sup> par des protéines contenues dans un milieu alcalin. Le cuivre Cu<sup>1+</sup> va réagir avec l'acide bicinchoninique pour former un complexe BCA-Cu<sup>1+</sup> dont l'absorbance peut être lue à 570nm.

Pour déterminer la concentration en protéines dans nos échantillons, nous avons utilisé le kit *BCA protein assay* (Pierce Grande-Bretagne). 5  $\mu$ l de lysat clair sont dilués dans 20 $\mu$ l de tampon de lyse (20 mM Tris ; pH 7,4 , 150 mM KCl EDTA 1 mM, 1% de Triton-X-100 4°C (Merck, Allemagne) et sont déposés dans une plaque à 96 puits (Corning,USA). On ajoute 200  $\mu$ l de mixture réactionnelle contenant le cuivre et le BCA (préparée selon le manuel

fourni avec le kit) à chaque échantillon. Après une agitation de 30 sec on incube 30 min à 37°C avant de lire l'absorbance à 570 nm au spectrophotomètre (Ultramark Allemagne). La quantité de protéines est calculée par rapport à une droite d'étalonnage, réalisée à chaque dosage avec un standard à différentes concentrations connues (SAB, sérum albumine bovine, à 2000, 1000, 500, 250 et 125 µg/ml).

## **2.8 TEST D'ACTIVITE DE L' AMPK**

L' activité de l'AMPK est mesurée grâce à un peptide synthétique (SAMS peptide) utilisé comme substrat par l'AMPK. La séquence de ce peptide est LKKLTRRPSFSAQ. En présence d'ATP marqué au <sup>32</sup> P, ce peptide est reconnu par l'AMPK, phosphorylé et donc marqué radioactivement. On utilise un système de membrane de phosphocellulose possédant une forte affinité pour les peptides phosphorylés. Après un spin de 30 sec pour éliminer l'ATP libre, le peptide phosphorylé est élué après 3 rinçages avec de l'acide phosphorique. Le comptage de la radioactivité associée à la membrane permet donc d'estimer l'activité kinase de l'AMPK

### 2.8.1 Sous cultures et incubations

Les cellules 3T3-L1 utilisées dans cette expérience sont cultivées jusqu'à confluence dans des boîtes de 75 cm<sup>2</sup> . Elles sont traitées ou non (contrôles) avec le FCCP (1µM), la stigmatelline (100nM), ou le MIX3 , dilués dans du DHG-L1 contenant 10% de FCS.

### 2.8.2 Méthodes

Les cellules sont rincées deux fois avec 10 ml de PBS et lysées pendant 30 min (4°C) dans 550 µl de tampon de lyse (50mM Tris-HCl, pH 7,5, 1mM EDTA,10% glycérol, 1mM DTT, 1% Triton X-100) contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases. Après une centrifugation de 15 min à 12200 rpm ( 4°C) pour éliminer le matériel insoluble dans le tampon de lyse, on dose la quantité de protéines sur le surnageant par la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Une quantité égale de protéines (940µg) est prélevée et tous les échantillons sont portés à équivalent avec du tampon de lyse. On ajoute 10% de polyéthylène glycol-8000 (PEG-8000) et on incube 20 min sur glace. Ensuite les échantillons sont centrifugés pendant 15 min à 12200 rpm et le culot est resuspendu dans 40µl de tampon de lyse. Après la centrifugation, 10µl d'échantillons sont ajoutés à 40 µl de tampon de réaction (20mM

HEPES-NaOH, pH7,0, 0,4mM DTT, 200µM 5'-AMP, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 25µM SAMS peptide, 10<sup>3</sup> P-ATP(3000 mCi/mmol) -10<sup>3</sup>Ci/réaction). Les incubations permettant la réaction sont réalisées pendant 30 min à 30 °C. Des aliquots de 25 µl sont ensuite prélevés et déposés sur des membranes de phosphocellulose (Pierce USA). Une brève centrifugation (spin de 30 sec à 3000 rpm) permet l'entrée des échantillons dans la membrane et l'élimination de l'ATP radioactif. La membrane est ensuite rincée 3 fois avec 250 µl d'acide phosphorique (75 mM) et centrifugée à chaque rinçage (spin de 30 sec 3000 rpm). Les membranes sont plongées dans 5ml de liquide scintillant (Aqualuma, Lumac, Pays-Bas) et la radioactivité est mesurée dans un compteur à scintillations .

## ***2.9 ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS***

Les résultats obtenus au cours de ce travail sont exprimés comme la moyenne ou la moyenne plus ou moins un écart-type. Nous avons établi la validité statistique de nos résultats à chaque fois que c'était possible et que le nombre de réplicats le permettait. L'analyse de la variance (Anova1) est utilisée pour tester les différences entre moyennes en utilisant les contrastes de Scheffé.

## 3. RESULTATS ET DISCUSSIONS

### 3.1. Caractérisation du modèle de différenciation

#### 3.1.1. Mesure de l'accumulation de triacylglycérols dans les cellules 3T3-L1 par le test Oil Red O

Le test Oil Red O permet de quantifier les triacylglycérols grâce à la fixation d'un colorant (Oil Red O) qui a une forte affinité pour les graisses neutres. Pour induire l'accumulation de triacylglycérols dans le cas du modèle *adipocyte-like*, les cellules 3T3-L1 sont incubées en présence de stigmatelline à différentes concentrations : 10 nM, 100 nM et 1  $\mu$ M dans du milieu DHG-L1 renouvelé tous les deux jours. Pour le contrôle, les cellules 3T3-L1 sont incubées uniquement avec du DHG-L1, renouvelé également tous les deux jours. Au jour 8, les triacylglycérols sont colorés à l'Oil Red O et l'absorbance des tapis cellulaires est mesurée à 490 nm. Les résultats sont présentés à la figure 3.1. En présence de la stigmatelline, on observe une augmentation dose-dépendante de l'accumulation de triacylglycérols par rapport au contrôle de 3 fois, 6 fois et 6,5 fois pour des concentrations respectives de 10 nM, 100 nM et 1  $\mu$ M. Cette augmentation est significative pour les concentrations de 100 nM et 1  $\mu$ M. Au vu de ces résultats, nous avons choisi, pour la suite de nos expériences de conserver la concentration en stigmatelline de 100 nM qui induit un phénotype *adipocyte-like* presque maximal sans occasionner de cytotoxicité pour les cellules 3T3.L1.

#### 3.1.2. Comparaison entre le modèle classique et le modèle *adipocyte-like*

L'objectif du mémoire est de comparer les profils d'expression et de phosphorylation de différentes kinases dans la voie classique de la différenciation induite par un cocktail de référence et le modèle *adipocyte-like* engendré par l'addition d'un inhibiteur mitochondrial. Nous avons testé l'accumulation de triacylglycérols dans les cellules 3T3-L1 incubées en présence de stigmatelline (100 nM), du MIX3 (dexaméthasone 1  $\mu$ M, dibutyryl-AMP

cyclique 300  $\mu$ M, insuline 5  $\mu$ g/ml) et de FCCP (1  $\mu$ M), un agent découplant. Pour ces 3 conditions, le milieu est renouvelé tous les 2 jours et l'accumulation de triacylglycérols a été mesurée aux jours 1, 2, 3, 4, 7 et 8 par un test Oil Red O. Les résultats sont présentés à la figure 3.2. Dans le cas du MIX3, ce n'est qu'à partir du jour 3 que débute l'accumulation des triacylglycérols qui augmente au cours du temps pour atteindre son maximum au jour 8 avec une valeur de DO 25 fois plus grande que pour le contrôle. Le test statistique montre que cette augmentation est significative pour les jours 4, 7 et 8. Au jour 8 les cellules 3T3-L1 incubées en présence du MIX3 contiennent 6 fois plus de triacylglycérols (DO<sub>490nm</sub> : 0,269) que les cellules 3T3-L1 incubées en présence de stigmatelline (DO<sub>490nm</sub> : 0,045).

Concernant la stigmatelline, comme dans le cas du MIX3, ce n'est qu'à partir du jour 3 qu'on observe une accumulation de triacylglycérols. Au jour 8, la quantité de triacylglycérols est 4 fois plus importante que pour le contrôle. Pour le FCCP, on n'observe pas d'accumulation de triacylglycérols au cours du temps, ce qui est visible sur les micrographies. L'inhibition mitochondriale par la stigmatelline induit l'apparition d'un phénotype "adipocyte-like" caractérisé comme le phénotype adipocytaire par le stockage de petites et de nombreuses vésicules de triacylglycérols. Dans le cas du MIX3 les vésicules de triacylglycérols sont beaucoup plus importantes et plus nombreuses.

Au vu de ces résultats, on peut conclure que l'accumulation des triacylglycérols dans les cellules 3T3-L1 aussi bien pour le MIX3 que pour la stigmatelline augmente au cours du temps. Il est intéressant de constater que deux inhibiteurs des phosphorylations oxydatives qui induisent une diminution du contenu en ATP dans les cellules donnent deux phénotypes différents. La diminution de la charge en ATP n'est donc pas suffisante pour expliquer l'apparition des vésicules de triacylglycérols.

### 3.1.3 Détection du marqueur de différenciation adipocytaire Fabp/aP2 dans le modèle classique et le modèle *adipocyte-like*

La Fabp2 est un marqueur de différenciation des adipocytes existant sous deux formes, une forme cytosolique et une forme membranaire. Ces protéines ont plusieurs fonctions: solubiliser et transporter les acides gras, stimuler et inhiber les réactions impliquées dans le métabolisme des acides gras et diminuer la lipotoxicité (Zimmerman and Veerkamp, 2001). Afin de voir si le phénotype adipocyte-like se traduit également par l'expression de Fabp2, nous avons recherché l'abondance de cette protéine par *Western blotting* dans une expérience

réalisée sur des lysats clairs de cellules 3T3–L1 incubées avec la stigmatelline ou le MIX3. Après migration des échantillons sur un gel de polyacrylamide 12 % (40 µg de protéines sont chargés pour chaque test), transfert sur membrane de PVDF, traitement avec les anticorps et révélation en chémiluminescence, une bande apparaît au poids moléculaire attendu de 15 Kda, ce qui correspond à Fabp2/aP2 fig (voir figure 3.3).

Bien que la charge protéique de ce *Western blotting* ne soit pas homogène, comme le montre le contrôle de charge TBP (*TATA box-binding protein*), il est clair que l'expression de la Fabp2 est fortement induite après 4 et 8 jours de différenciation induite par le Mix3. Ce résultat concorde avec les données de la littérature. En effet, l'expression de la Fabp2 est connue pour être faible dans les cellules 3T3-L1 non différenciées et fortement augmentée à la fin du processus de différenciation induit par le Mix3 (MacDougald and Lane, 1995). En effet, l'expression de ce marqueur de différenciation est induite par les facteurs de transcription PPAR $\alpha$  et FAAR qui sont induits très tôt dans la différenciation (MacDougald and Lane, 1995).

En ce qui concerne la stigmatelline, nous n'observons aucune expression de la Fabp2. L'accumulation de cette protéine n'est donc pas corrélée comme dans les cellules 3T3-L1 incubées en présence de molécules pro-adipogènes à l'accumulation de vésicules de triacylglycérols en fin de programme. Bien que ces résultats demandent confirmation par un *Western blotting* dans lequel la charge protéique serait égale dans chacune des pistes, nous pouvons néanmoins conclure que l'expression du marqueur de différenciation Fabp2/aP2 augmente fortement à la fin du programme de différenciation induit de manière classique, indiquant que les conditions de différenciation sont adéquates. Par contre, un traitement à la stigmatelline n'induit pas l'expression de Fabp2/aP2, ce qui indique que l'acquisition du phénotype *adipocyte-like* se déroule très probablement suivant des mécanismes différents de ceux impliqués dans le programme de différenciation classique. De ces premières expériences menées pour caractériser les deux modèles classique (c'est-à-dire induit par le MIX3) et *adipocyte-like* (induit par la stigmatelline), nous pouvons conclure que ces deux modèles diffèrent :

- par l'abondance de l'accumulation des triacylglycérols
- par l'aspect et la taille des vésicules de triacylglycérols
- par l'expression d'un marqueur de différenciation intervenant dans le métabolisme des acides gras (la Fabp2/aP2).

Pour ces trois aspects de la différenciation adipocytaire le phénotype « *adipocyte-like* » est moins marqué que la différenciation classique et est phénotypiquement différent. Ceci

suggère des différences importantes dans les mécanismes moléculaires impliqués dans les deux processus. C'est pour tenter de rechercher ces différences que nous avons systématiquement comparé, par *Western blotting*, l'expression et l'activation potentielles de plusieurs protéines kinases participant à des voies de transduction différentes et ce, dans le modèle de la différenciation adipocytaire classique (induite par le Mix3) et dans le modèle *adipocyte-like* induit par un inhibiteur mitochondrial. Nous avons d'abord étudié la GSK3, la PI3K et l'Akt, qui font partie d'une même cascade d'activation déclenchée par l'insuline. Ensuite nous avons étudié chacune des MAPK, à savoir p38 MAPK, p44/p42 MAPK (ou ERK1/2) et JNK, et enfin l'AMPK. De plus, nous avons recherché l'implication de ces kinases dans les programmes étudiés en testant l'effet d'inhibiteurs de ces kinases sur l'accumulation de triacylglycérols dans les cellules 3T3-L1 par un test à l'Oil Red O.

### ***3.2. Implication de la voie de la GSK3 dans le processus de différenciation ou d'acquisition du phénotype adipocyte-like***

#### **3.2.1 Expression et phosphorylation de la GSK3**

La GSK3, la PI3K et l'Akt sont des enzymes faisant partie d'une cascade activée par l'insuline. En présence d'insuline, une protéine appelée IRS (*Insuline Receptor Substrate*) se fixe au récepteur à l'insuline et active diverses enzymes, dont la PI3K. Celle-ci active la PDK (*Phosphoinositide-Dependent Kinase*) qui phosphoryle Akt/PKB au niveau de la thréonine 308 et de la sérine 473 (Grimes and Jope, 2001). L'Akt peut à son tour phosphoryler la GSK3 sur la sérine 9, ce qui est considéré comme un marqueur de l'inhibition de son activité. Dans l'adipogenèse, la GSK3 phosphoryle le facteur de transcription C/EBP sur la thréonine 222 et 226 (Ross et al., 1999) mais les conséquences de cette phosphorylation sur une augmentation de l'activité transcriptionnelle ne sont pas démontrées.

Afin de rechercher l'implication éventuelle de cette kinase dans les modèles étudiés, nous avons, dans un premier temps, testé l'expression et la phosphorylation de la GSK3 au cours des traitements par la stigmatelline et le Mix3. Dans un deuxième temps nous nous sommes intéressés à l'expression et à l'activation d'Akt, une kinase en aval de la PI3K.

Des lysats clairs sont préparés à partir de cellules 3T3-L1 incubées avec le MIX3 ou avec la stigmatelline dans du DHG-L1 contenant 10% de FCS. Les formes phosphorylées et non phosphorylées de la GSK3 ont été mises en évidence par *Western blotting* à partir de 80

$\mu\text{g}$  de protéines. Les anticorps utilisés sont l'antiphospho-GSK3 $\beta$  qui reconnaît la sérine 9 phosphorylée et l'anticorps anti-GSK3 $\beta$ . Après révélation, une bande apparaît au poids moléculaire attendu de 43 kDa, ce qui correspond à la GSK3 $\beta$ . Les *Western blotting* phospho-GSK3 $\beta$  et GSK3 $\beta$  sont illustrés à la figure 3.4. Dans les 3 conditions testées (CTL, MIX3, Stigmatelline) le niveau d'expression de GSK3 $\beta$  ainsi que le niveau de phosphorylation de la GSK3 $\beta$  sont homogènes.

Dans le contrôle réalisé au jour 1, on observe un motif de phosphorylation. Ceci pourrait s'expliquer par la présence de sérum dans le milieu de culture, qui contient de l'insuline et des facteurs de croissance. On peut donc concevoir un niveau de phosphorylation et donc d'inhibition basal dans ces conditions de cultures. Dans le cas du modèle classique induit par le Mix3, on aurait pu s'attendre à observer une phosphorylation plus forte que dans le contrôle à cause de la présence de l'insuline dans le cocktail, ce qui n'est pas le cas. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la cinétique d'inactivation de la GSK3 $\beta$  par l'insuline est généralement un phénomène rapide (30 min après l'addition d'insuline) et transitoire (le niveau basal est retrouvé après 3 h) (Orena et al., 2000). On peut aussi tenter d'expliquer l'absence d'une phosphorylation plus forte dans le Mix3 par la présence dans le cocktail de la dexaméthasone qui diminue l'expression d'IRS-1 dans les cellules 3T3-L1. Cette molécule pourrait donc inhiber les effets attendus avec l'insuline seule (Sakoda et al., 2000). Dans les cellules traitées à la stigmatelline, nous n'observons pas non plus de variation dans l'expression ou la phosphorylation de la GSK3 $\beta$ .

Signalons enfin que la régulation de l'activité de la GSK3 $\beta$  ne se limite pas à la phosphorylation sur la Ser9. Il semblerait en effet que la phosphorylation du résidu Tyr216 se traduise par une augmentation de l'activité de l'enzyme. Cette phosphorylation proviendrait soit de la GSK3 $\beta$  elle-même, par un mécanisme d'autophosphorylation, soit d'autres voies de transduction, notamment dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$  (pour une revue, lire (Grimes and Jope, 2001)). Toutefois, nous ne pouvons pas conclure, sur base de ces résultats, que la GSK3 $\beta$  n'intervient pas dans l'accumulation des triacylglycérols dans le modèle « adipocyte-like » car il se pourrait que, tout comme pour le Mix3, nous n'ayons pas détecté d'inhibition transitoire de l'activité de l'enzyme.

Pour aborder le problème de manière différente et tenter de rechercher l'implication éventuelle de la GSK3 $\beta$  dans le processus d'adipogenèse sur l'accumulation de triacylglycérols nous avons utilisé le LiCl, un inhibiteur de la GSK3 $\beta$ .

### 3.2.2. Effet du LiCl, inhibiteur de la GSK3 sur l'accumulation des triacylglycérols.

Le LiCl est un inhibiteur de la GSK3 $\beta$  qui agit en mimant l'insuline (Klein and Melton, 1996). Les cellules 3T3-L1 sont incubées en présence de la stigmatelline 100 nM ou du Mix3 pendant 8 jours avec le LiCl aux concentrations de 1 mM, 5 mM, 10 mM ou 50 mM. Le milieu est renouvelé tous les deux jours. Au jour 8, les triacylglycérols sont colorés avec l'Oil Red O et l'absorbance des tapis cellulaires est mesurée à 490 nm (figures 3.5 et 3.6). Dans le cas de la différenciation induite par le Mix3 (figure 3.5), on observe une diminution dose-dépendante de l'accumulation de triacylglycérols en présence de LiCl. Le LiCl provoque une diminution de l'accumulation de triacylglycérols de 40% pour une concentration de 10 mM, et de 90% pour la concentration de 50 mM. Cette inhibition de la différenciation se traduit par une réduction de la quantité de triacylglycérols par cellule en présence de LiCl, comme le montrent les micrographies (figure 3.5 B)

Le LiCl provoque également une inhibition dose-dépendante de l'accumulation de triacylglycérols dans les cellules 3T3-L1 incubées avec la stigmatelline (figure 3.6). Comme dans le cas de la différenciation induite par le Mix3, les concentrations de 1 et 5 mM ne provoquent pas de diminution significative de l'accumulation de triacylglycérols. Par contre, une concentration de 10 mM de LiCl inhibe de manière significative (40% d'inhibition) l'accumulation des triacylglycérols induite par la stigmatelline. Le LiCl à la concentration de 50 mM a été testé pour les cellules 3T3-L1 incubées en présence de stigmatelline, mais nous avons obtenu un effet cytotoxique à cette concentration. Les résultats obtenus avec le LiCl indiquent que la GSK3 $\beta$  intervient dans le processus de différenciation adipocytaire ainsi que dans l'apparition du phénotype adipocyte-like induit par la stigmatelline.

Dans le cas du modèle de différenciation standard, le lithium est connu pour inhiber l'accumulation des triacylglycérols. Cet effet serait médié par une inhibition de la GSK3, qui phosphoryle le facteur de transcription C/EBP $\beta$ . En effet, l'insuline, tout comme le lithium, provoque une déphosphorylation C/EBP $\beta$  sur les Thr 222 et Thr 226 (Ross et al., 1999).

Rappelons que ce facteur de transcription joue un rôle prépondérant dans le processus de différenciation adipocytaire (voir point 1.3.1.2 de l'introduction). Comme le LiCl inhibe également l'accumulation de triacylglycérols induite par une inhibition mitochondriale, on peut penser que la GSK3 $\beta$  est aussi impliquée dans l'apparition de ces vésicules de lipides.

Les résultats obtenus par deux approches différentes, d'une part l'analyse de l'abondance et de la phosphorylation de la GSK3 $\beta$  par *Western blotting* sur la sérine 9, et d'autre part l'effet du LiCl sur l'accumulation des triacylglycérols peuvent paraître contradictoires. En effet, nous n'avons pas observé de variation ni de l'abondance, ni de la phosphorylation de la GSK3 $\beta$  dans les deux modèles comparés, alors que dans les deux cas le LiCl inhibe l'accumulation des triacylglycérols indiquant que la GSK3 $\beta$  participe à ce processus. Ces résultats, *a priori* contradictoires, peuvent s'expliquer par le fait que la cinétique d'inactivation de la GSK3 est généralement un phénomène rapide. De manière à vérifier l'implication de la GSK3 $\beta$  dans le phénotype *adipocyte-like*, il serait utile de réaliser une immunoprécipitation de la protéine GSK3 afin de doser directement son activité, et ce à des temps plus courts après les changements de milieu. Nous pouvons également nous intéresser à d'autres enzymes de la voie de la GSK3, comme l'Akt et la PI3K.

### 3.2.3 Expression et phosphorylation d'Akt

Le PIP3 produit par la PI3K active les PDK, qui activent à leur tour par phosphorylation la Ser/Thr kinase Akt sur les résidus Thr 308 et Ser 473. Akt activée phosphoryle à son tour la GSK3 $\beta$  sur la sérine 9, conduisant à son inactivation (Grimes and Jope, 2001). L'Akt a été identifiée comme la kinase principale qui conduit à cette phosphorylation en réponse à l'insuline (Cross et al., 1995). L'expression d'Akt ainsi que sa phosphorylation dans les conditions Mix3 et stigmatelline ont été mises en évidence par *Western blotting* (figure 3.7). On observe sur cette figure que la protéine Akt est présente dans les 3 conditions testées, à savoir CTL, Mix3 et la stigmatelline, à un niveau relativement constant au cours du temps. Concernant la forme phosphorylée d'Akt, aucune bande n'a été observée dans ces conditions.

Nous nous attendions à observer une phosphorylation d'Akt au moins dans le cas de la différenciation induite par le Mix3 puisque l'insuline est connue pour activer la PI3K qui, elle-même phosphoryle Akt. Cependant, tout comme pour la GSK 3, le schéma expérimental suivant lequel nous avons préparé les extraits cellulaires ne correspond peut-être pas à la cinétique d'activation de l'Akt. Pour contourner ce problème et rechercher l'implication éventuelle de la voie PI3K dans l'accumulation de triacylglycérols dans la cellule, nous avons utilisé la wortmannine, un inhibiteur de la PI3K couramment utilisé dans la littérature.

### 3.2.4 Effet de l'inhibiteur de la PI3K, la wortmannine, sur l'accumulation des triacylglycérols

La PI3K est une kinase activée par l'insuline et qui provoque la phosphorylation par Akt de GSK3 $\beta$  sur la sérine 9 (Grimes and Jope, 2001). La PI3K intervient dans l'adipogenèse en induisant l'expression de la FAS (*Fatty acid synthase*) et la synthèse du malonyl-CoA. Afin d'étudier l'implication de cette kinase dans les modèles *adipocyte-like* et de différenciation, nous avons utilisé la wortmannine, un inhibiteur de PI3K.

Les cellules 3T3-L1 sont incubées en présence de la stigmatelline 100 nM ou du Mix3 pendant 8 jours en présence de la wortmannine à 10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M et 100 nM. Le milieu est renouvelé tous les deux jours. Au jour 8, les triacylglycérols sont colorés avec l'Oil Red O et l'absorbance des tapis cellulaires est mesurée à 490 nm. Les résultats sont présentés aux figures 3.8 et 3.9.

A la figure 3.8, on observe qu'une concentration en wortmannine de 10  $\mu$ M inhibe significativement (90%) l'accumulation de triacylglycérols induite de manière classique par le Mix3. Ceci est visualisé par les micrographies sur lesquelles on observe une diminution de l'accumulation de triacylglycérols en présence de 10  $\mu$ M de wortmannine, alors que de grosses vésicules de triacylglycérols sont visibles dans le contrôle positif. Dans le cas du phénotype *adipocyte-like* induit par une inhibition mitochondriale, on a obtenu également une diminution significative de l'accumulation des triacylglycérols dans les cellules 3T3-L1 pour la concentration 10  $\mu$ M, bien que le degré d'inhibition soit beaucoup moins important (30 %). On peut voir sur les micrographies qu'à cette concentration, on a une légère diminution de l'accumulation de triacylglycérols par rapport à la stigmatelline 100nM. Dans les 2 modèles, la wortmannine à 1  $\mu$ M ou 100 nM n'affecte pas l'accumulation des triacylglycérols. Ces résultats suggèrent que la PI3K est impliquée dans l'accumulation de triacylglycérols aussi bien dans le modèle *adipocyte-like* que le modèle classique (Mix3) .

Toutefois, le fait que la wortmannine inhibe presque complètement l'accumulation des triglycérides induite par le Mix3 alors qu'elle ne l'inhibe que partiellement (30 %) dans le cas de la stigmatelline suggère que dans les cellules traitées par la stigmatelline un autre mécanisme indépendant participe à l'accumulation de vésicules de triacylglycérols.

La GSK3, l'Akt et la PI3K font partie de la voie de transduction du signal activée par l'insuline. Le PIP3 produit par la PI3K active les PDK (*phosphoinositide-dependent kinase*).

Ces enzymes activent alors la Ser/Thr kinase Akt (aussi appelée PKB : protein Kinase B) par phosphorylation sur les résidus Thr 308 et Ser 473 . Parmi les substrats d'Akt, la GSK3 $\beta$  est une Ser/Thr Kinase constitutivement active qui est inhibée lorsque Akt phosphoryle la sérine 9 . Malheureusement nous n'avons pas observé de différence dans les niveaux de phosphorylation de la GSK3 ni d'Akt, probablement pour des raisons de cinétique d'activation transitoire de ces enzymes. Cependant, on a néanmoins confirmé que la voie de la GSK3 intervient dans le processus de différenciation adipocytaire induit par le Mix3 puisque le LiCl (inhibiteur de la GSK3) et la wortmannine (inhibiteur de la PI3K) inhibent l'accumulation de triacylglycérols induite dans cette condition. Dans le cas du modèle *adipocyte-like* induit par la stigmatelline, la voie de la GSK3 intervient aussi puisque le LiCl et la wortmannine inhibent l'accumulation de triacylglycérols, mais dans une moindre mesure (30% d'inhibition pour la wortmannine). Par conséquent il doit exister une autre voie qui intervient dans le processus de différenciation. Nous savons par ailleurs que la PI3K est impliquée dans le transport stimulé par l'inhibition mitochondriale puisque nous avons montré au laboratoire que la wortmannine, un inhibiteur de la PI3K, inhibe ce transport du glucose.

### ***3.3 Implication de la voie des MAP kinases dans le processus de différenciation ou adipocyte-like***

#### **3.3.1 Expression et phosphorylation de p38 MAPK**

Les p38 MAPK sont principalement connues dans le cadre de la réponse aux stress (Kyriakis and Avruch, 1996), mais elles peuvent également être activées par l'insuline (Fujishiro et al., 2001). Les p38 interviennent dans la différenciation adipocytaire notamment en phosphorylant C/EBP $\beta$ , un facteur de transcription capable d'induire la transcription de PPAR $\alpha$ 2 (Engelman et al., 1999) (voir point 1.4.2.1 de l'introduction).

Nous avons analysé les taux d'expression et de phosphorylation de p38 MAPK par *Western blotting* sur des lysats clairs préparés après différents temps (1,2,3,4 et 8 jours) d'incubation des cellules 3T3-L1 avec le Mix3 ou avec la stigmatelline (100 nM). Ces lysats clairs sont soumis à un SDS-PAGE (10%) et transférés sur une membrane de PVDF. Les anticorps utilisés sont un anti-phospho-p38 MAPK qui reconnaît uniquement les

Thréonine180/Tyrosine182 phosphorylées et un anticorps anti-p38 MAPK. Les résultats obtenus sont présentés à la figure 3.10.

Le *Western blotting* réalisé avec l'anticorps anti-phospho-p38 MAPK (p-p38) n'a pas permis de détecter de signal, que ce soit dans le contrôle ou dans les deux types de traitement (inhibition mitochondriale et différenciation). Par contre, la protéine p38 MAPK est exprimée dans le contrôle et son abondance ne varie au cours des 8 jours d'incubation avec la stigmatelline, ni avec le Mix3. Nous montrons donc que l'abondance de p38 MAPK ne varie pas dans nos conditions expérimentales et que la phosphorylation des résidus Thr 180/Tyr182 qui indique une activité de p38 MAPK, n'est pas induite.

Les résultats ne concordent que partiellement avec ceux d'Engelman *et al.*, qui ont montré que p38 MAPK est exprimée de façon constante tout au long du processus de différenciation des 3T3-L1. Par contre, ces auteurs ont montré la présence de la forme phosphorylée de p38 MAPK durant les premiers jours de la différenciation induite par le Mix3 et une extinction du signal par la suite (Engelman *et al.*, 1998). Le fait que nous ne détectons pas de phospho-p38 MAPK, ni lors de la différenciation induite par le MIX3, ni lors de l'inhibition mitochondriale induite par la stigmatelline, est surprenant. En effet, la voie des p38 MAPK est normalement activée par l'insuline, présente dans le Mix3 (Fujishiro *et al.*, 2001). Nous proposons plusieurs hypothèses pour expliquer ces résultats négatifs et cette divergence par rapport aux données disponibles dans la littérature. Le protocole de différenciation suivi par Engelman *et al.* diffère du nôtre en deux points: ces auteurs induisent l'adipogenèse sur des 3T3-L1 post-confluentes de 2 jours, alors que dans notre modèle, l'induction est réalisée le jour où les cellules arrivent à confluence. De plus, ces auteurs utilisent de l'IBMX (isobutyl-méthyl-xanthine) et non du db-AMPC dans leur cocktail d'induction de la différenciation pour augmenter le taux d'AMPC dans la cellule. Nous ignorons cependant si ces différences de protocole peuvent expliquer nos résultats divergents.

Il est également possible qu'un problème technique soit à l'origine de cette non-détection de la forme phosphorylée de p38 MAPK. L'enzyme aurait pu être dephosphorylée aux cours de la préparation des échantillons. En effet, on sait que la détection d'un motif phosphorylé dépend parfois du protocole d'extraction de protéines utilisé. Pour l'ensemble de nos *Western blotting*, nous avons préparé les échantillons selon une procédure classique basée sur une lyse des cellules dans un tampon contenant 1% de triton X-100 et des inhibiteurs de phosphatases. Cependant, Engelman *et al.* suivent un autre protocole : ils lysent les cellules directement dans le *Sample Buffer* bouillant dont on sait qu'il préserve mieux les motifs de phosphorylation. L'inconvénient de ce protocole est qu'il est impossible de réaliser un dosage

des protéines et qu'il est donc très difficile de charger une quantité de protéines équivalente dans le gel. Il est donc possible que notre protocole d'extraction de protéines ne soit pas adapté au maintien de la phosphorylation de p38. Enfin nous ne pouvons exclure la possibilité que les conditions d'incubation de la membrane avec l'anticorps anti-phospho-p38 ne soient pas au point. Si nous ne pouvons pas mesurer l'état d'activation de la p38 MAPK dans nos deux modèles par *Western blotting*, nous pouvons néanmoins évaluer la contribution de cette enzyme aux phénotypes adipocytaire et *adipocyte-like* en utilisant un inhibiteur spécifique des p38 MAPK : le SB203580, qui se fixe au site de liaison de l'ATP de cette kinase (Engelman et al., 1998).

### 3.3.2 Effet du SB203580, un inhibiteur de la p38 MAPK sur l'accumulation des triacylglycérols

Nous avons mesuré l'effet du SB203580 sur l'accumulation de triacylglycérols induite par la stigmatelline ou par le Mix3. Les cellules 3T3-L1 confluentes sont incubées pendant 8 jours en présence de stigmatelline 100 nM ou en présence du Mix3. Le SB203580 (10 ou 1  $\mu$ M) est ajouté au milieu soit pendant les deux premiers jours (0-2) soit à chaque changement de milieu pendant 8 jours (0-8). Le SB203580 n'est ajouté que pendant les deux premiers jours du programme de traitement en présence de la stigmatelline de manière à éviter un effet cytotoxique éventuel et parfois observé quand on combine un inhibiteur mitochondrial et un inhibiteur de kinases. De plus, en théorie, il n'est pas nécessaire d'ajouter le SB203580 pendant les 8 jours du programme puisque l'activation de p38 MAPK n'est suspectée que durant les premiers jours. Au jour 8, les triacylglycérols sont colorés avec l'Oil Red O et l'absorbance des tapis cellulaires est mesurée à 490 nm. Ces résultats sont présentés à la figure 3.11.

En (A), nous avons d'abord vérifié que le SB203580 (10  $\mu$ M) seul n'a pas d'effet sur la synthèse de triacylglycérols. Nous avons également reproduit l'effet de la stigmatelline sur l'accumulation de triacylglycérols. Cependant, les valeurs d'absorbance obtenues quand le SB203580 est ajouté à la stigmatelline ne sont pas significativement différentes du contrôle positif et ce, quelle que soit la condition testée. Ces résultats suggèrent donc que les p38 MAPK ne sont pas impliquées dans l'apparition du phénotype *adipocyte-like*. En (B), nous avons mesuré l'effet du SB203580 sur l'accumulation de triacylglycérols induite par le Mix3. On constate que le SB203580, ajouté pendant tout le programme, diminue d'environ 25 % la

quantité de triacylglycérols accumulée pendant la différenciation. Cependant, cet effet n'est pas statistiquement significatif, peut-être en raison des écarts-types élevés. Ceci suggère que, si p38 MAPK joue un rôle dans le modèle de différenciation induit par le Mix3, ce rôle n'est que partiel. Toutefois, Engelman *et al.* ont montré que l'inhibition de p38 MAPK empêche l'adipogenèse dans les 3T3-L1, notamment en diminuant le taux de phosphorylation de C/EBP $\alpha$  (Engelman et al., 1998). Etant donné cette contradiction par rapport à la littérature, la répétition de l'expérience présentée à la figure 3.11 est indispensable car l'importante variabilité des résultats masque peut-être un effet du SB203580 dans le modèle de référence. Quant à la détection de la forme phosphorylée de p38 MAPK, il faudrait intégrer un contrôle positif pour s'assurer que la technique utilisée permet, dans nos conditions de travail, de la détecter. Par exemple l'incubation des cellules 3T3-L1 avec le salicylate, un activateur des p38 MAPK, nous permettrait de vérifier l'activation de p38 MAPK.

### 3.3.3 Expression et phosphorylation des p44/42 MAPKs

Les p44/42 MAPK sont classiquement activées sur les résidus Thr 202 et Tyr 204 par les facteurs de croissance présents dans le sérum (Gonzalez et al., 1993) et par l'insuline, un des composants du Mix3 (Kayali et al., 2000). Elles sont impliquées dans la phase d'expansion mitotique clonale qui précède la différenciation, mais leur rôle précis dans la différenciation proprement dite est controversé (Qiu et al., 2001).

Après préparation de lysats clairs de cellules 3T3-L1 incubées en présence de la stigmatelline ou du Mix3, nous avons analysé le taux de phosphorylation des p44/42 ainsi que l'abondance de ces kinases par *Western blotting*. On observe que deux bandes apparaissent aux poids moléculaires attendus de 44 et 42 kDa (figure 3.12).

Dans le contrôle, on observe une forte phosphorylation de p44/42, malgré la faible abondance des deux enzymes. Cette faible abondance de p44/42 dans le contrôle par rapport aux autres conditions s'explique par une charge protéique faible, comme l'atteste le contrôle de charge réalisé avec un anticorps dirigé contre TBP. Ceci est en accord avec le fait que les p44/42 sont activées par les facteurs de croissance, abondants dans le sérum présent dans le milieu de culture (Gonzalez et al., 1993). En ce qui concerne la comparaison des deux modèles, l'interprétation du *Western blotting* n'est pas aisée pour deux raisons : d'une part, la charge protéique est hétérogène, et d'autre part le fait de renouveler le milieu tous les deux jours influence fortement l'activation des p44/42. Après deux jours d'incubation en présence

de stigmatelline, on observe une diminution de la phosphorylation de p42 par rapport au jour 1 et une extinction de la phosphorylation de p44. On observe par contre une forte augmentation de la phosphorylation des p44/42 au jour 3 par rapport au jour 2, puis une nouvelle diminution de leur phosphorylation au jour 4, renforcée par une charge protéique élevée. Au jour 8, le signal disparaît pour les deux enzymes.

Ce profil de phosphorylation en dents de scie est également observé pour les cellules 3T3-L1 incubées avec le Mix3, bien que, de manière plus générale, on constate que la phosphorylation de p44 est plus soutenue dans le phénotype adipocytaire que dans le phénotype *adipocyte-like*. Le point le plus marquant de ce résultat est le jour 8 de la différenciation où, pour un niveau de charge comparable au contrôle, on observe que la phosphorylation de p44 est supérieure à toutes les autres conditions.

L'abondance de p42 et p44 a également été analysée sur nos échantillons. Signalons que le doublet obtenu pour p42 correspond à la partie phosphorylée de la protéine qui surmonte le signal de la protéine p42 totale. Ce phénomène, parfois observé en *Western blotting*, n'est pas expliqué. En effet, la phosphorylation d'une protéine augmente son poids moléculaire d'environ 80 Da, ce qui ne devrait pas suffire à distinguer les formes phosphorylée et déphosphorylée sur un gel de 10% d'acrylamide. Cependant, ce phénomène existe et on remarque d'ailleurs que le doublet obtenu pour p42 suit le profil de phosphorylation obtenu avec l'anticorps anti-phospho-p42/44. Remarquons aussi que le doublet de phosphorylation de p44 n'a pas été détecté, mais la détection de p44 elle-même est très faible. Ceci ne nous permet néanmoins pas de conclure que l'abondance de p44 est plus faible que celle de p42 dans nos cellules, car ces deux protéines ont été ciblées avec deux anticorps différents (anti-p42 et anti-p44), dont l'affinité peut également différer.

Ces profils montrent que les abondances de p42 et de p44 varient peu au cours de l'incubation avec la stigmatelline ou avec le Mix3, et que les légères différences observées sont liées à la charge protéique. Ceci nous permet d'affirmer que les différences obtenues dans les profils de phosphorylation ne sont pas dues à des abondances enzymatiques différentes.

Bien que ces résultats demandent confirmation par un nouveau *Western blotting* avec des charges homogènes, on peut néanmoins conclure qu'à la fin (jour 8) du processus de différenciation induit par le Mix3, p44 MAPK est fortement activée. Au contraire, l'activité de p44 et de p42 disparaît le 8<sup>ème</sup> jour de l'incubation avec la stigmatelline, alors que l'enzyme (au moins p42) est toujours présente.

Nous avons donc mis en évidence une différence du niveau d'activation des p44/42 au jour 8 entre le modèle de différenciation et le modèle *adipocyte-like*, ce qui suggère que la

régulation de l'activité des p44/42 passe par des mécanismes différents dans ces deux modèles. Il est par contre surprenant que nous n'ayons pas obtenu d'augmentation de la phosphorylation des p42/44 au début du programme adipogénique. En effet, les p44/42 MAPK sont impliquées dans la phase d'expansion mitotique clonale que subissent les pré-adipocytes avant de se différencier (Qiu et al., 2001). Il faudrait probablement préparer des extraits de cellules incubées moins de 24h avec le Mix3 pour confirmer cette activation précoce des p44/42. De manière à déterminer le rôle de p44/42 dans l'adipogenèse, nous avons utilisé le PD98059 qui est un inhibiteur de MEK1/2, situé en amont des p44/42 MAPK.

### 3.3.4 Effet de l'inhibiteur de p44/42 MAPK, PD98059, sur l'accumulation des triacylglycérols

Nous avons testé l'effet du PD98059 sur l'accumulation des triacylglycérols induite par la stigmatelline (100 nM) ou par le MIX3. Le PD98059 est ajouté au milieu soit durant les deux premiers jours de traitement (0-2) soit à chaque changement du milieu (0-8). Le PD98059 est ajouté pendant les deux premiers jours puisque l'activité de p44/42 n'est suspectée que durant le début du programme et, afin d'éviter un effet cytotoxique des cellules provoqué parfois quand on combine deux inhibiteurs. Au jour 8, pour toutes les conditions testées, les triacylglycérols sont colorés avec de l'Oil Red O et l'absorbance des tapis cellulaires est mesurée à 490 nm. Les résultats sont présentés à la figure 3.13

L'addition de cet inhibiteur n'a pas d'effet significatif par rapport au contrôle positif (stigmatelline 100 nM) sur l'accumulation de triacylglycérols dans les cellules 3T3-L1. Cependant, cet inhibiteur, ajouté pendant les 8 jours du programme de différenciation classique, induit une diminution de l'accumulation des triacylglycérols faible (20%) mais statistiquement significative (avec  $p < 0,001$ ). On peut conclure que les p44/42 MAPK ne jouent pas un rôle dans l'acquisition du phénotype *adipocyte-like* induit par la stigmatelline et que leur rôle dans la différenciation induite par le Mix3 n'est que partiel. Ce dernier résultat est compatible avec certaines données de la littérature. En effet, certains auteurs montrent que la voie des p44/42 MAPK est impliquée dans la phase d'expansion clonale mais pas dans la différenciation proprement dite (Qiu et al., 2001). Cependant, d'autres études ont montré que la déplétion de p44/42 MAPK en utilisant des oligonucléotides anti-sens empêche la différenciation (Sale et al., 1995). De plus, il est décrit que les p44/42 MAPK interviennent dans la différenciation en phosphorylant (et en inactivant) le facteur de transcription

PPAR $\alpha$  (Camp et al., 1999). Ceci montre que ces kinases auraient tendance à exercer un effet anti-adipogène et que l'implication de p44/42 dans l'adipogenèse est controversé .

### 3.3.5 Expression et phosphorylation des JNKs

La voie des JNKs est activée par différents stress cellulaires, comme l'exposition aux UV, le choc thermique ou le choc osmotique (Minden and Karin, 1997). Les JNKs sont activées par les MKK4/MKK7 par phosphorylation sur les résidus Thr183 et Tyr185 et sont décrites par certains auteurs pour jouer un rôle inhibiteur sur l'adipogenèse, notamment par la phosphorylation de PPAR $\alpha$  dans le domaine de liaison à l'ADN (Camp et al., 1999).

Afin de rechercher l'état d'activation et l'abondance de la JNK 1 dans nos modèles cellulaires, des lysats clairs ont été préparés à partir de cellules 3T3-L1 incubées avec le MIX3 ou avec la stigmatelline (100 nM). Les formes phosphorylée et non phosphorylée de la JNK1 ont été mises en évidence par *Western blotting* avec un anticorps anti-phospho-JNK (p-JNK) dirigé contre Thr 183 et Tyr 185 et un anticorps anti-JNK1.

L'anticorps anti phospho-JNK reconnaît les 3 isoformes de JNK(1-2-3), mais une seule bande apparaît à 46 kDa sur les *Western blotting*, correspondant à la forme phosphorylée de JNK2. Comme le montre la figure 3.14, nous détectons un signal pour p-JNK au poids moléculaire de 46 kDa, qui correspond au poids moléculaire de la JNK1. Ce signal ne varie pas dans nos conditions et les légères différences observées sont dues aux différences de charge, mises en évidence avec un anticorps dirigé contre TBP. Soulignons que les signaux p-JNK, JNK 1 et TBP sont très faibles. Ces résultats difficilement interprétables montrent juste que JNK1 n'est probablement pas activée en réponse à l'inhibition de la mitochondrie ou par l'incubation avec le MIX3 aux jours 1, 2, 3, 4 et 8. Cette kinase présente un taux de phosphorylation basal et ne semble pas varier au cours du temps. Il nous faudrait certainement répéter l'expérience pour l'obtention d'un signal dans le contrôle et également tester des temps plus courts. Ces résultats sont en accord avec les données disponibles dans la littérature. En effet, il est connu que les JNKs (ainsi que les p38MAPK et les p44/p42 MAPK) ont une activité basale constitutive dans les adipocytes 3T3-L1 (Ryden et al., 2002).

De manière à rechercher l'implication éventuelle des JNKs dans la synthèse et le stockage de triacylglycérols induits dans nos deux modèles d'étude, nous avons testé l'effet du SP600125, un inhibiteur des JNKs.

### 3.3.6 Effet du SP600125 sur l'accumulation des triacylglycérols

Les cellules 3T3-L1 sont incubées en présence de stigmatelline 100 nM ou du MIX3, en présence ou en absence de SP600125 aux concentrations de 50, 10 et 1  $\mu$ M. Le milieu est renouvelé tous les deux jours, et le SP600125 est ajouté à chaque renouvellement. Au jour 8, les triacylglycérols sont colorés avec l'Oil Red O et l'absorbance des tapis cellulaires est mesurée à 490 nm. Les résultats obtenus sont présentés aux figures 3.15 et 3.16.

Comme le montre la figure 3.15, le SP600125 n'inhibe pas significativement l'effet de la stigmatelline sur l'accumulation des triacylglycérols. Les micrographies illustrent le phénotype induit par la stigmatelline, caractérisé par la présence de nombreuses et petites vésicules lipidiques, et le fait que le SP600125 (50  $\mu$ M) n'affecte pas la morphologie des cellules 3T3-L1 traitées par la stigmatelline. Ceci suggère que la voie des JNKs n'est probablement pas impliquée dans l'apparition du phénotype adipocyte-like.

Par contre, l'inhibiteur de JNK inhibe de manière dose-dépendante l'accumulation des triacylglycérols dans les cellules 3T3-L1 incubées avec le Mix3 (voir figure 3.16). Le nombre de réplicats (n=2) ne permet pas de réaliser de test statistique sur ces résultats, mais les micrographies montrent clairement que les cellules incubées en présence du Mix3 et du SP600125 (50  $\mu$ M) n'accumulent pas de triacylglycérols et ont une morphologie comparable aux cellules contrôles.

Ces résultats montrent que l'inhibition de la voie des JNKs empêche la différenciation des 3T3-L1, et suggèrent donc que les JNKs jouent un rôle pro-adipogénique. Cependant, si tel était le cas, nous aurions pu nous attendre à obtenir une augmentation de la phosphorylation de JNK dans nos extraits de cellules différenciées, alors que le signal p-JNK est invariable dans toutes nos conditions (voir figure 3.14). Il est toutefois possible que l'activation des JNKs se produise dans les premières 24 h qui suivent l'induction de l'adipogenèse par le Mix3. Pour tenter de le vérifier, il faudrait préparer de nouveaux extraits en suivant une cinétique au cours des heures et non plus au cours des jours après stimulation de cellules. Si cette hypothèse est correcte, l'addition de SP600125 pendant uniquement les 24 premières heures de l'incubation en présence du Mix3 devrait inhiber l'accumulation de triacylglycérols et ce de manière aussi efficace qu'une addition de l'inhibiteur pendant 8 jours. Signalons enfin que le SP600125 est un inhibiteur commercialisé très récemment, et que nous ignorons si son action se limite uniquement aux JNKs.

Enfin l'absence d'effet de cet inhibiteur sur les cellules traitées à la stigmatelline renforce encore l'idée que les mécanismes conduisant à l'accumulation de triacylglycérols dans les deux modèles sont probablement différents.

### ***3.4 Recherche de l'implication éventuelle de l'AMPK dans le processus de différenciation et dans le phénotype adipocyte-like.***

L'AMPK est activée par une augmentation du rapport cellulaire AMP/ATP (Muoio et al., 1999). Etant donné que la concentration cytoplasmique en ATP diminue durant les programmes d'inhibition mitochondriale et de différenciation, nous avons mesuré l'activité kinase de l'AMPK pour évaluer le rôle joué par cette enzyme dans nos deux modèles.

L'approche choisie n'est plus le *Western blotting* mais une mesure de l'activité kinase *in vitro* après un enrichissement du matériel cellulaire en AMPK par une sédimentation au PEG-8000 (da Silva Xavier et al., 2000). L'activité de l'AMPK est mesurée par un test de phosphorylation d'un peptide synthétique (SAMS peptide, de séquence LKKLTRRPSFSAQ). Ce peptide est reconnu par l'AMPK, phosphorylé et en présence d'ATP radioactif marqué radioactivement. Les peptides phosphorylés sont ensuite transférés sur des membranes de phosphocellulose possédant une forte affinité pour les peptides phosphorylés. La radioactivité résiduelle est éliminée par des rinçages à l'acide phosphorique. La radioactivité associée aux membranes de phosphocellulose, proportionnelle à l'activité de l'AMPK, est mesurée dans un compteur à scintillations.

Les cellules sont incubées en présence de Mix3, de stigmatelline (100 nM) ou de FCCP (1  $\mu$ M), un agent découplant déjà utilisé pour comparer le modèle *adipocyte like* et le modèle classique. Aux jours 1, 2, 4 et 8, les cellules sont lysées et un équivalent de 940  $\mu$ g de protéines sont sédimentées par du polyéthylène-glycol-8000 (PEG-8000) 10 % et resuspendues dans 40  $\mu$ l de tampon de lyse. Un aliquot de 20  $\mu$ l est consacré au dosage de l'activité de l'AMPK, et 20  $\mu$ l sont utilisés pour contrôler l'abondance de l'enzyme présente dans les échantillons par *Western blotting* avec un anticorps dirigé contre l'AMPK. Les résultats sont présentés à la figure 3.17.

Avant de décrire les résultats du test d'activité kinase, nous constatons que l'abondance de l'AMPK récupérée après sédimentation est très variable dans nos échantillons, comme l'atteste le *Western blotting* réalisé pour l'AMPK (figure 3.17B).

Cette technique génère effectivement un problème d'hétérogénéité entre les échantillons. En effet, après sédimentation des protéines par le PEG-8000 et resuspension dans 40  $\mu$ l de tampon de lyse, il reste une quantité résiduelle de PEG-8000, qui empêche un pipetage précis. Ceci implique que nous avons récupéré une quantité variable de protéines pour réaliser le dosage de l'activité de l'AMPK, bien que la quantité de protéines prélevées pour effectuer la sédimentation au PEG-8000 soit identique pour chaque condition.

Puisque le profil du signal obtenu pour TBP (contrôle de charge) est identique à celui de l'AMPK, la grande variabilité de la quantité d'enzyme est liée à un problème de charge protéique, et non à une expression différentielle de la kinase dans nos différentes conditions expérimentales .

Si nous prélevons, dans les 20  $\mu$ l destinés au dosage d'activité kinase, plus de la moitié de l'AMPK présente dans les 40  $\mu$ l de tampon de lyse, nous surestimons l'activité de l'AMPK, et ceci est accompagné d'une diminution du signal détecté en *Western blotting* pour cette condition. Au contraire, si plus de la moitié de l'AMPK présente dans l'échantillon est consacrée au *Western blotting*, nous sous-estimons l'activité de l'AMPK. Nous ne pouvons interpréter que les tests d'activité réalisés aux jours 1 et 2, pour lesquels la quantité d'AMPK est plus ou moins comparable. Par contre, l'interprétation des résultats obtenus aux jours 4 et 8 est plus difficile.

Après un jour d'incubation des 3T3-L1 avec le Mix3, nous mesurons une augmentation de l'activité AMPK par rapport au contrôle, mais cette augmentation d'activité est corrélée à une plus faible quantité d'enzyme, ce qui ne nous permet pas de conclure que l'AMPK est activée après un jour de différenciation. Par contre, pour la stigmatelline, la quantité d'enzyme est équivalente au contrôle et, donc, l'augmentation d'activité de l'AMPK (environ 2,5 fois) que nous mesurons n'est pas surestimée. Le FCCP n'induit pas ou peu d'activation de l'AMPK après un jour d'incubation car l'activité mesurée et l'abondance de l'AMPK sont comparables au contrôle.

Pour le test réalisé au jour 2, la quantité d'AMPK est comparable dans les quatre conditions, alors que l'activité AMPK augmente avec le Mix3, la stigmatelline et le FCCP par rapport au contrôle. Ceci nous permet de conclure de l'inhibition mitochondriale et la différenciation induisent l'activation de l'AMPK, au moins après deux jours d'incubation. Au jour 4, la forte activité mesurée pour les conditions MIX3, stigmatelline et FCCP, malgré une abondance très faible de l'AMPK, pourrait refléter une forte augmentation de l'activité de l'enzyme pour des quantités d'enzyme très faibles et indétectables en *Western blotting*. Ces

résultats sont cependant très difficiles à interpréter et requièrent une reproduction de l'expérience.

Enfin, au jour 8 de la différenciation, l'activité de l'AMPK retourne au niveau du contrôle et ce, pour des abondances protéiques comparables. Quant à la forte activité mesurée dans la stigmatelline, elle est très forte ou surestimée car la détection de l'AMPK en *Western blotting* est très faible.

D'une manière générale, nous avons montré que le Mix3, la stigmatelline et le FCCP augmentent l'activité de l'AMPK. Par contre, il semble que l'activation de l'AMPK soit très soutenue en présence de stigmatelline et plus transitoire pour le FCCP. Ces résultats à considérer avec précaution suggèrent que cette activation est très probablement médiée par une élévation du ratio AMP/ATP dans le cytoplasme. Quant à la différenciation induite par le MIX3, il semble qu'elle s'accompagne d'une activation de l'AMPK au jour 2, et que cette activation soit transitoire puisqu'elle s'éteint au jour 8 du programme adipogénique. Ce résultat est compatible avec le fait que le contenu cellulaire en ATP diminue quand les 3T3-L1 sont incubées avec le Mix3. La dexaméthasone a été identifiée comme le composant du MIX3 responsable de la diminution du contenu cellulaire en ATP en agissant au niveau du complexe I mitochondrial (Morin et al., 2000).

Cependant, il faut signaler que nous n'avons pas réalisé de *Western blotting* avec l'anticorps anti-AMPK sur des lysats clairs de 3T3-L1 incubées avec le Mix3, avec la stigmatelline et le FCCP avant la sédimentation au PEG-8000. Nous ne savons donc pas si l'expression de l'AMPK est modifiée dans ces deux modèles, ce qui rend l'interprétation de nos résultats sur l'activité de l'AMPK encore plus difficile.

Afin éviter les problèmes d'hétérogénéité et de s'assurer de la spécificité de la kinase participant à la réaction, nous envisageons de faire des expériences d'immunoprécipitation de l'AMPK à partir de lysats clairs, pour faire ensuite le dosage d'activité kinase sur l'AMPK purifiée. De manière à vérifier l'implication éventuelle de l'AMPK dans l'adipogenèse, nous avons testé l'activateur de l'AMPK, l'AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside).

### ***3.5 Effet de l'AICAR, activateur de l'AMPK sur l'accumulation des triacylglycérols***

De manière à voir l'effet de l'AMPK sur l'accumulation des triacylglycérols induite par le MIX3 ou par l'inhibiteur mitochondrial nous avons testé l'effet d'un activateur de l'AMPK,

l'AICAR qui, phosphorylé par une adénosine kinase, donne du ZMP (un analogue de l'AMP), qui se lie à l'AMPK et l'active de manière allostérique (Salt et al., 2000). Les cellules 3T3-L1 sont incubées ou non (contrôle) pendant 8 jours en présence de stigmatelline avec ou sans AICAR en concentration 500, 200, 50 et 10  $\mu$ M. Le milieu est renouvelé tous les deux jours. L'AICAR est ajouté à différents moments du programme de différenciation, (de 0 à 2, de 2 à 4, de 4 à 6 ou de 6 à 8 jours). Ce choix est justifié par le fait que l'AICAR avait été préalablement testé en continu (de 0 à 8 jour) en présence de stigmatelline, mais la cytotoxicité importante n'avait pas permis de maintenir l'intégrité des tapis cellulaires jusqu'au terme des 8 jours du programme. Par contre l'AICAR est ajouté pendant tout le programme de différenciation dans le cas du Mix3 sans effet cytotoxique. Au jour 8 les triacylglycérols sont colorés avec l'Oil Red O et l'absorbance des tapis cellulaires est mesurée à 490 nm. Les résultats présentés à la figure 3.18 montrent que la présence de l'AICAR pendant 2 jours du programme n'a aucun effet significatif sur le phénotype *adipocyte-like*. Ceci suggère que l'accumulation des triacylglycérols induite par l'inhibiteur mitochondrial n'est pas influencée par l'activation de l'AMPK. Lorsque les cellules sont incubées en présence du Mix3 et d'AICAR (500  $\mu$ M), on observe une inhibition importante (85%), alors qu'à la de concentration 200  $\mu$ M, on obtient une inhibition moindre (60%). Même à 10  $\mu$ M, l'accumulation de triacylglycérols est réduite de 50% dans les cellules 3T3-L1 en différenciation. Cette diminution est compatible avec le faite que l'activation de l'AMPK stimulerait l'entrée des acides gras dans la mitochondrie et provoquerait une augmentation de la  $\beta$ -oxydation des acides gras (Hardie et al., 1998), qui s'oppose au stockage des triacylglycérols. Ceci est compatible avec la littérature puisqu'une activation de l'AMPK conduit à une augmentation des acides gras dans la mitochondrie et à leur  $\beta$ -oxydation (Muoio et al., 1999).

## 4 Conclusions et perspectives

L'obésité est une pathologie très complexe dont l'apparition est liée à de nombreux facteurs génétiques et environnementaux. Elle est caractérisée par une accumulation excessive du tissu adipeux et est associée à d'autres pathologies. Cependant, les connaissances actuelles ne permettent pas toujours de comprendre les mécanismes responsables de l'apparition de certains cas d'obésité.

De nombreuses études portent sur les mécanismes moléculaires, cellulaires et systémiques qui contrôlent le développement du tissu adipeux, mais ces mécanismes ne sont à ce jour que peu compris. En particulier, le rôle joué par les organites cellulaires comme la mitochondrie est peu étudié.

Nous avons montré au laboratoire qu'une inhibition de l'activité mitochondriale par la stigmatelline, un inhibiteur du complexe III de la chaîne respiratoire, induit l'apparition de vésicules de triacylglycérols dans le cytoplasme de pré-adipocytes 3T3-L1. Nous avons appelé ce phénotype « adipocyte-like », par comparaison avec le phénotype cellulaire induit quand la différenciation adipocytaire est stimulée selon une procédure classique. Signalons cependant que certains inhibiteurs mitochondriaux, comme le FCCP (agent découplant), n'induisent pas l'acquisition du phénotype adipocyte-like.

L'objectif de notre travail était de tenter d'étudier les mécanismes responsables de l'accumulation des triacylglycérols induite par une inhibition des phosphorylations oxydatives par la stigmatelline. Ces mécanismes peuvent être étudiés à différents niveaux : l'activation de voies de transduction cellulaires, l'étude de facteurs de transcription impliqués dans les changements d'expression génique qui sont associés à l'apparition du phénotype, ou encore l'étude des flux de métabolites énergétiques comme les acides gras et le glucose.

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à déterminer par *Western blotting* les profils d'expression et de phosphorylation de kinases appartenant à

différentes voies de transduction dans les pré-adipocytes soumis à une inhibition mitochondriale, ainsi qu'à l'importance de ces kinases dans l'apparition du phénotype adipocyte-like en utilisant des inhibiteurs de ces kinases. Nous avons de plus comparé les résultats obtenus avec les données obtenues dans un modèle de différenciation classique( fig 4.1).

Par la technique du *Western blotting*, nous avons montré que la GSK3 est exprimée et phosphorylée de manière constitutive dans les cellules 3T3-L1 incubées en présence de stigmatelline ou du Mix3. Nous n'avons cependant pas détecté de forme phosphorylée pour Akt, kinase située en amont de la GSK3 et en aval de la PI3K. D'autre part, nous avons montré qu'un inhibiteur de la PI3K (wortmannine) ou de la GSK3 (LiCl) induit une diminution de l'accumulation de triglycérides dans les deux modèles étudiés. Ces résultats suggèrent que la voie PI3K/GSK3 intervient dans le stockage de triacylglycérols induit par la stigmatelline et le Mix3. Il est intéressant de constater que ces deux inhibiteurs inhibent également l'incorporation de glucose stimulée par l'Antimycine A, un autre inhibiteur du complexe III de la chaîne de transporteurs d'électron. Ce glucose semble jouer un rôle important dans l'activation (Mémoire Marie Piens) de SREBP1 un facteur de transcription connu pour contrôler l'expression de gènes de la lipogenèse (Foretz et al., 1999).

Le second volet de cette étude concerne les voies des MAPKs, à savoir les p44/42, les JNKs et les p38. Nous avons montré que les formes phosphorylées de p42 et de p44, détectables dans les 4 jours qui suivent le début du traitement par la stigmatelline, disparaissent au jour 8 du programme. Quant au modèle de différenciation, nous avons mis en évidence la surexpression de p44 au jour 8, couplée à une augmentation de la phosphorylation de cette enzyme. Nous avons également montré que JNK1 et p38 sont constitutivement exprimées dans les pré-adipocytes 3T3-L1, et que leur abondance ne varie pas au cours des programmes d'inhibition mitochondriale et de différenciation. De plus, JNK1 est phosphorylée de manière équivalente dans toutes nos conditions. Par ailleurs, aucun des inhibiteurs agissant sur les trois voies des MAPKs n'a permis d'empêcher l'accumulation des triacylglycérols induite par la stigmatelline, ce qui suggère donc que les MAPKs ne jouent pas de rôle important dans l'apparition du phénotype adipocyte-like. Par contre, l'inhibition de la voie des JNKs bloque la

différenciation adipocytaire classique, ce qui suggère que cette voie est impliquée dans ce processus.

La deuxième partie de notre travail porte sur le rôle de l'AMPK, enzyme activée par une augmentation du ratio AMP/ATP, dans nos deux modèles d'étude. Par un test d'activité kinase *in vitro*, nous avons montré que la stigmatelline augmente l'activité de l'AMPK dans les deux premiers jours d'incubation, et que cette activation est soutenue car probablement encore observée au jour 8. Le FCCP, inhibiteur mitochondrial n'induisant pas l'apparition du phénotype adipocyte-like, est également capable d'activer transitoirement l'AMPK (après deux jours d'incubation). Cette enzyme pourrait participer à des réponses de la cellule soumise à un stress énergétique, mais nos données ne nous permettent pas d'affirmer que l'AMPK est impliquée dans le stockage des triacylglycérols. Signalons par ailleurs qu'un activateur de cette kinase (l'AICAR) n'a aucun effet sur le phénotype adipocyte-like. Nous avons également montré que la différenciation adipocytaire s'accompagne d'une augmentation transitoire d'activité de l'AMPK (après 2 jours). Ceci est intéressant, car les cellules 3T3-L1 en différenciation sont également soumises à un stress énergétique caractérisé par une diminution de la concentration cytosolique en ATP. Cependant, les rôles joués par l'AMPK dans ce modèle sont encore à déterminer, d'autant plus que l'activation continue de l'enzyme (par l'AICAR) empêche le stockage des triacylglycérols associé à l'adipogenèse, et ce probablement *via* une augmentation de l'entrée des acides gras dans la mitochondrie et de leur  $\beta$ -oxydation.

Ce travail s'inscrit donc dans le cadre de la recherche des mécanismes par lesquels une cellule répond et s'adapte à un stress métabolique résultant d'une diminution de la charge cellulaire en ATP. Nous avons obtenu des résultats intéressants mais très préliminaires, qui demandent à être reproduits et caractérisés par d'autres approches expérimentales. Par exemple, l'implication de la voie de la GSK3 dans l'apparition du phénotype adipocyte-like pourra être confirmée par des mesures d'activité kinase *in vitro* avec des substrats reconnus par la GSK3 et les effecteurs en amont (Akt, PI3K). Les *Western blotting* réalisés pour les MAPKs pourront être complétés par des cinétiques plus courtes (dans les 24 heures). Quant au dosage d'activité de l'AMPK, il devra être précédé d'une immunoprécipitation de l'enzyme pour éviter les problèmes d'hétérogénéité que nous avons rencontrés avec notre technique, et complétés d'un

*Western blotting* renseignant sur les taux d'expression et de phosphorylation de l'AMPK au cours des programmes d'inhibition mitochondriale et de différenciation adipocytaire.

Ce travail est donc une étude préliminaire, qui une fois complétée permettra d'avoir des informations précieuses sur la participation ou non de différentes voies de kinases à l'acquisition du phénotype adipocytaire ou *adipocyte-like*, tous deux caractérisés par une accumulation de triglycérols dans la cellule.

## 5 BIBLIOGRAPHIE

- Adams, M., Reginato, M.J., Shao, D., Lazar, M.A. and Chatterjee, V.K. (1997) Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen- activated protein kinase site. *J Biol Chem*, **272**, 5128-32.
- Aguirre, V., Uchida, T., Yenush, L., Davis, R. and White, M.F. (2000) The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J Biol Chem*, **275**, 9047-54.
- Barthel, A., Kohn, A.D., Luo, Y. and Roth, R.A. (1997) A constitutively active version of the Ser/Thr kinase Akt induces production of the ob gene product, leptin, in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology*, **138**, 3559-62.
- Belmonte, N., Phillips, B.W., Massiera, F., Villageois, P., Wdziekonski, B., Saint-Marc, P., Nichols, J., Aubert, J., Saeki, K., Yuo, A., Narumiya, S., Ailhaud, G. and Dani, C. (2001) Activation of extracellular signal-regulated kinases and CREB/ATF-1 mediate the expression of CCAAT/enhancer binding proteins beta and - delta in preadipocytes. *Mol Endocrinol*, **15**, 2037-49.
- Berger, J., Leibowitz, M.D., Doebber, T.W., Elbrecht, A., Zhang, B., Zhou, G., Biswas, C., Cullinan, C.A., Hayes, N.S., Li, Y., Tanen, M., Ventre, J., Wu, M.S., Berger, G.D., Mosley, R., Marquis, R., Santini, C., Sahoo, S.P., Tolman, R.L., Smith, R.G. and Moller, D.E. (1999) Novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma and PPARdelta ligands produce distinct biological effects. *J Biol Chem*, **274**, 6718-25.
- Beri, R.K., Marley, A.E., See, C.G., Sopwith, W.F., Aguan, K., Carling, D., Scott, J. and Carey, F. (1994) Molecular cloning, expression and chromosomal localisation of human AMP- activated protein kinase. *FEBS Lett*, **356**, 117-21.
- Bosello, O., Armellini, F., Ostuzzi, R., Bissoli, G. and Scuro, L.A. (1978) [Behavior of adipose tissue cellularity in gross obesity]. *Minerva Med*, **69**, 3831-3.
- Bouillaud, F., Arechaga, I., Petit, P.X., Raimbault, S., Levi-Meyrueis, C., Casteilla, L., Laurent, M., Rial, E. and Ricquier, D. (1994) A sequence related to a DNA recognition element is essential for the inhibition by nucleotides of proton transport through the mitochondrial uncoupling protein. *Embo J*, **13**, 1990-7.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-54.

- Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (1997) The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*, **89**, 331-40.
- Camp, H.S., Tafuri, S.R. and Leff, T. (1999) c-Jun N-terminal kinase phosphorylates peroxisome proliferator-activated receptor-gamma1 and negatively regulates its transcriptional activity. *Endocrinology*, **140**, 392-7.
- Camps, M., Nichols, A. and Arkininstall, S. (2000) Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. *Faseb J*, **14**, 6-16.
- Canagarajah, B.J., Khokhlatchev, A., Cobb, M.H. and Goldsmith, E.J. (1997) Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell*, **90**, 859-69.
- Cao, Z., Umek, R.M. and McKnight, S.L. (1991) Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev*, **5**, 1538-52.
- Carpenter, C.L., Duckworth, B.C., Auger, K.R., Cohen, B., Schaffhausen, B.S. and Cantley, L.C. (1990) Purification and characterization of phosphoinositide 3-kinase from rat liver. *J Biol Chem*, **265**, 19704-11.
- Caserta, F., Tchkonina, T., Civelek, V.N., Prentki, M., Brown, N.F., McGarry, J.D., Forse, R.A., Corkey, B.E., Hamilton, J.A. and Kirkland, J.L. (2001) Fat depot origin affects fatty acid handling in cultured rat and human preadipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **280**, E238-47.
- Cavelier, L., Johannisson, A. and Gyllensten, U. (2000) Analysis of mtDNA copy number and composition of single mitochondrial particles using flow cytometry and PCR. *Exp Cell Res*, **259**, 79-85.
- Chavin, K.D., Yang, S., Lin, H.Z., Chatham, J., Chacko, V.P., Hoek, J.B., Walajtys-Rode, E., Rashid, A., Chen, C.H., Huang, C.C., Wu, T.C., Lane, M.D. and Diehl, A.M. (1999) Obesity induces expression of uncoupling protein-2 in hepatocytes and promotes liver ATP depletion. *J Biol Chem*, **274**, 5692-700.
- Chen, Y.R., Wang, X., Templeton, D., Davis, R.J. and Tan, T.H. (1996) The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation. Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation. *J Biol Chem*, **271**, 31929-36.
- Christy, R.J., Kaestner, K.H., Geiman, D.E. and Lane, M.D. (1991) CCAAT/enhancer binding protein gene promoter: binding of nuclear factors during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 2593-7.
- Christy, R.J., Yang, V.W., Ntambi, J.M., Geiman, D.E., Landschulz, W.H., Friedman, A.D., Nakabeppu, Y., Kelly, T.J. and Lane, M.D. (1989) Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes: CCAAT/enhancer binding protein interacts with and activates the promoters of two adipocyte-specific genes. *Genes Dev*, **3**, 1323-35.
- Clapham, J.C., Arch, J.R., Chapman, H., Haynes, A., Lister, C., Moore, G.B., Piercy, V., Carter, S.A., Lehner, I., Smith, S.A., Beeley, L.J., Godden, R.J., Herrity, N., Skehel, M., Changani, K.K.,

- Hockings, P.D., Reid, D.G., Squires, S.M., Hatcher, J., Trail, B., Latcham, J., Rastan, S., Harper, A.J., Cadenas, S., Buckingham, J.A., Brand, M.D. and Abuin, A. (2000) Mice overexpressing human uncoupling protein-3 in skeletal muscle are hyperphagic and lean. *Nature*, **406**, 415-8.
- Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M. and Hemmings, B.A. (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, **378**, 785-9.
- da Silva Xavier, G., Leclerc, I., Salt, I.P., Doiron, B., Hardie, D.G., Kahn, A. and Rutter, G.A. (2000) Role of AMP-activated protein kinase in the regulation by glucose of islet beta cell gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 4023-8.
- Dai, R., Frejtag, W., He, B., Zhang, Y. and Mivechi, N.F. (2000) c-Jun NH2-terminal kinase targeting and phosphorylation of heat shock factor-1 suppress its transcriptional activity. *J Biol Chem*, **275**, 18210-8.
- Darlington, G.J., Ross, S.E. and MacDougald, O.A. (1998) The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J Biol Chem*, **273**, 30057-60.
- De Cesare, D., Fimia, G.M. and Sassone-Corsi, P. (1999) Signaling routes to CREM and CREB: plasticity in transcriptional activation. *Trends Biochem Sci*, **24**, 281-5.
- Descombes, P., Chojkier, M., Lichtsteiner, S., Falvey, E. and Schibler, U. (1990) LAP, a novel member of the C/EBP gene family, encodes a liver-enriched transcriptional activator protein. *Genes Dev*, **4**, 1541-51.
- Descombes, P. and Schibler, U. (1991) A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA. *Cell*, **67**, 569-79.
- Eblen, S.T., Catling, A.D., Assanah, M.C. and Weber, M.J. (2001) Biochemical and biological functions of the N-terminal, noncatalytic domain of extracellular signal-regulated kinase 2. *Mol Cell Biol*, **21**, 249-59.
- Eldar-Finkelman, H. and Krebs, E.G. (1997) Phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by glycogen synthase kinase 3 impairs insulin action. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 9660-4.
- Engelman, J.A., Berg, A.H., Lewis, R.Y., Lin, A., Lisanti, M.P. and Scherer, P.E. (1999) Constitutively active mitogen-activated protein kinase kinase 6 (MKK6) or salicylate induces spontaneous 3T3-L1 adipogenesis. *J Biol Chem*, **274**, 35630-8.
- Engelman, J.A., Lisanti, M.P. and Scherer, P.E. (1998) Specific inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase block 3T3-L1 adipogenesis. *J Biol Chem*, **273**, 32111-20.
- Enriquez, J.A., Martinez-Azorin, F., Garesse, R., Lopez-Perez, M.J., Perez-Martos, A., Bornstein, B. and Montoya, J. (1998) [Human mitochondrial genetic system]. *Rev Neurol*, **26 Suppl 1**, S21-6.
- Fajas, L., Auboeuf, D., Raspe, E., Schoonjans, K., Lefebvre, A.M., Saladin, R., Najib, J., Laville, M., Fruchart, J.C., Deeb, S., Vidal-Puig, A., Flier, J., Briggs, M.R., Staels, B., Vidal, H. and

- Auwerx, J. (1997) The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem*, **272**, 18779-89.
- Fajas, L., Schoonjans, K., Gelman, L., Kim, J.B., Najib, J., Martin, G., Fruchart, J.C., Briggs, M., Spiegelman, B.M. and Auwerx, J. (1999) Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism. *Mol Cell Biol*, **19**, 5495-503.
- Foretz, M., Pacot, C., Dugail, I., Lemarchand, P., Guichard, C., Le Liepvre, X., Berthelie-Lubrano, C., Spiegelman, B., Kim, J.B., Ferre, P. and Foufelle, F. (1999) ADD1/SREBP-1c is required in the activation of hepatic lipogenic gene expression by glucose. *Mol Cell Biol*, **19**, 3760-8.
- Freytag, S.O., Paielli, D.L. and Gilbert, J.D. (1994) Ectopic expression of the CCAAT/enhancer-binding protein alpha promotes the adipogenic program in a variety of mouse fibroblastic cells. *Genes Dev*, **8**, 1654-63.
- Friedman, J.M. (2000) Obesity in the new millennium. *Nature*, **404**, 632-4.
- Fujishiro, M., Gotoh, Y., Katagiri, H., Sakoda, H., Ogihara, T., Anai, M., Onishi, Y., Ono, H., Funaki, M., Inukai, K., Fukushima, Y., Kikuchi, M., Oka, Y. and Asano, T. (2001) MKK6/3 and p38 MAPK pathway activation is not necessary for insulin- induced glucose uptake but regulates glucose transporter expression. *J Biol Chem*, **276**, 19800-6.
- Gaillard, D., Negrel, R., Lagarde, M. and Ailhaud, G. (1989) Requirement and role of arachidonic acid in the differentiation of pre- adipose cells. *Biochem J*, **257**, 389-97.
- Gaillard, D., Wabitsch, M., Pipy, B. and Negrel, R. (1991) Control of terminal differentiation of adipose precursor cells by glucocorticoids. *J Lipid Res*, **32**, 569-79.
- Gamble, J. and Lopaschuk, G.D. (1997) Insulin inhibition of 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase in the heart results in activation of acetyl coenzyme A carboxylase and inhibition of fatty acid oxidation. *Metabolism*, **46**, 1270-4.
- Gearing, K.L., Gottlicher, M., Teboul, M., Widmark, E. and Gustafsson, J.A. (1993) Interaction of the peroxisome-proliferator-activated receptor and retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 1440-4.
- Glatz, J.F. and van der Vusse, G.J. (1996) Cellular fatty acid-binding proteins: their function and physiological significance. *Prog Lipid Res*, **35**, 243-82.
- Gonzalez, F.A., Seth, A., Raden, D.L., Bowman, D.S., Fay, F.S. and Davis, R.J. (1993) Serum-induced translocation of mitogen-activated protein kinase to the cell surface ruffling membrane and the nucleus. *J Cell Biol*, **122**, 1089-101.
- Green, D.E. and Perdue, J.F. (1966) Correlation of mitochondrial structure and function. *Ann N Y Acad Sci*, **137**, 667-84.
- Grimes, C.A. and Jope, R.S. (2001) The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Prog Neurobiol*, **65**, 391-426.

- Guo, X. and Liao, K. (2000) Analysis of gene expression profile during 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Gene*, **251**, 45-53.
- Gupta, S., Campbell, D., Derijard, B. and Davis, R.J. (1995) Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science*, **267**, 389-93.
- Habinowski, S.A. and Witters, L.A. (2001) The effects of AICAR on adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **286**, 852-6.
- Hardie, D.G. (1992) Regulation of fatty acid and cholesterol metabolism by the AMP- activated protein kinase. *Biochim Biophys Acta*, **1123**, 231-8.
- Hardie, D.G., Carling, D. and Carlson, M. (1998) The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu Rev Biochem*, **67**, 821-55.
- Hill, M.M., Clark, S.F., Tucker, D.F., Birnbaum, M.J., James, D.E. and Macaulay, S.L. (1999) A role for protein kinase Bbeta/Akt2 in insulin-stimulated GLUT4 translocation in adipocytes. *Mol Cell Biol*, **19**, 7771-81.
- Hill, M.M., Connolly, L.M., Simpson, R.J. and James, D.E. (2000) Differential protein phosphorylation in 3T3-L1 adipocytes in response to insulin versus platelet-derived growth factor. No evidence for a phosphatidylinositide 3-kinase-independent pathway in insulin signaling. *J Biol Chem*, **275**, 24313-20.
- Ip, Y.T. and Davis, R.J. (1998) Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol*, **10**, 205-19.
- Kaestner, K.H., Christy, R.J. and Lane, M.D. (1990) Mouse insulin-responsive glucose transporter gene: characterization of the gene and trans-activation by the CCAAT/enhancer binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 251-5.
- Kallunki, T., Su, B., Tsigelny, I., Sluss, H.K., Derijard, B., Moore, G., Davis, R. and Karin, M. (1994) JNK2 contains a specificity-determining region responsible for efficient c-Jun binding and phosphorylation. *Genes Dev*, **8**, 2996-3007.
- Kather, H., Walter, E. and Simon, B. (1978) [Adipose tissue and obesity. Part 1: fat cell size and fat cell number]. *Fortschr Med*, **96**, 1693-6.
- Kayali, A.G., Austin, D.A. and Webster, N.J. (2000) Stimulation of MAPK cascades by insulin and osmotic shock: lack of an involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes*, **49**, 1783-93.
- Keyse, S.M. (2000) Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr Opin Cell Biol*, **12**, 186-92.
- Kim, J.B. and Spiegelman, B.M. (1996) ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev*, **10**, 1096-107.
- Klein, P.S. and Melton, D.A. (1996) A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 8455-9.

- Kliwer, S.A., Umesono, K., Noonan, D.J., Heyman, R.A. and Evans, R.M. (1992) Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature*, **358**, 771-4.
- Kuczmarski, R.J., Flegal, K.M., Campbell, S.M. and Johnson, C.L. (1994) Increasing prevalence of overweight among US adults. The National Health and Nutrition Examination Surveys, 1960 to 1991. *Jama*, **272**, 205-11.
- Kyriakis, J.M. and Avruch, J. (1996) Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation. *J Biol Chem*, **271**, 24313-6.
- Lee, J.C., Kassis, S., Kumar, S., Badger, A. and Adams, J.L. (1999) p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors--mechanisms and therapeutic potentials. *Pharmacol Ther*, **82**, 389-97.
- Lemberger, T., Desvergne, B. and Wahli, W. (1996) Peroxisome proliferator-activated receptors: a nuclear receptor signaling pathway in lipid physiology. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **12**, 335-63.
- Lenaz, G. (1970) Studies on the structure of the mitochondrial membranes. *Ital J Biochem*, **19**, 54-82.
- Lenaz, G. (1998) Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochim Biophys Acta*, **1366**, 53-67.
- Lenormand, P., Sardet, C., Pages, G., L'Allemain, G., Brunet, A. and Pouyssegur, J. (1993) Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts. *J Cell Biol*, **122**, 1079-88.
- Lin, F.T. and Lane, M.D. (1992) Antisense CCAAT/enhancer-binding protein RNA suppresses coordinate gene expression and triglyceride accumulation during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Genes Dev*, **6**, 533-44.
- Lin, F.T. and Lane, M.D. (1994) CCAAT/enhancer binding protein alpha is sufficient to initiate the 3T3-L1 adipocyte differentiation program. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 8757-61.
- Lin, F.T., MacDougald, O.A., Diehl, A.M. and Lane, M.D. (1993) A 30-kDa alternative translation product of the CCAAT/enhancer binding protein alpha message: transcriptional activator lacking antimitotic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 9606-10.
- Lopaschuk, G.D., Witters, L.A., Itoi, T., Barr, R. and Barr, A. (1994) Acetyl-CoA carboxylase involvement in the rapid maturation of fatty acid oxidation in the newborn rabbit heart. *J Biol Chem*, **269**, 25871-8.
- MacDougald, O.A. and Lane, M.D. (1995) Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu Rev Biochem*, **64**, 345-73.
- Magun, R., Burgering, B.M., Coffey, P.J., Pardasani, D., Lin, Y., Chabot, J. and Sorisky, A. (1996) Expression of a constitutively activated form of protein kinase B (c-Akt) in 3T3-L1 preadipose cells causes spontaneous differentiation. *Endocrinology*, **137**, 3590-3.
- Marley, A.E., Sullivan, J.E., Carling, D., Abbott, W.M., Smith, G.J., Taylor, I.W., Carey, F. and Beri, R.K. (1996) Biochemical characterization and deletion analysis of recombinant human protein phosphatase 2C alpha. *Biochem J*, **320**, 801-6.

- Marques, B.G., Hausman, D.B. and Martin, R.J. (1998) Association of fat cell size and paracrine growth factors in development of hyperplastic obesity. *Am J Physiol*, **275**, R1898-908.
- Minden, A. and Karin, M. (1997) Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases. *Biochim Biophys Acta*, **1333**, F85-104.
- Mizuno, K., Kanda, Y., Kuroki, Y., Nishio, M. and Watanabe, Y. (2002) Stimulation of beta(3)-adrenoceptors causes phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase via a stimulatory G protein-dependent pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Br J Pharmacol*, **135**, 951-60.
- Mizuno, K., Kanda, Y., Kuroki, Y. and Watanabe, Y. (2000) The stimulation of beta(3)-adrenoceptor causes phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 through a G(s)- but not G(i)-dependent pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Eur J Pharmacol*, **404**, 63-8.
- Moore, F., Weekes, J. and Hardie, D.G. (1991) Evidence that AMP triggers phosphorylation as well as direct allosteric activation of rat liver AMP-activated protein kinase. A sensitive mechanism to protect the cell against ATP depletion. *Eur J Biochem*, **199**, 691-7.
- Morin, C., Zini, R., Simon, N., Charbonnier, P., Tillement, J.P. and Le Louet, H. (2000) Low glucocorticoid concentrations decrease oxidative phosphorylation of isolated rat brain mitochondria: an additional effect of dexamethasone. *Fundam Clin Pharmacol*, **14**, 493-500.
- Muoio, D.M., Seefeld, K., Witters, L.A. and Coleman, R.A. (1999) AMP-activated kinase reciprocally regulates triacylglycerol synthesis and fatty acid oxidation in liver and muscle: evidence that sn-glycerol- 3-phosphate acyltransferase is a novel target. *Biochem J*, **338**, 783-91.
- Nedergaard, J., Golozoubova, V., Matthias, A., Asadi, A., Jacobsson, A. and Cannon, B. (2001) UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. *Biochim Biophys Acta*, **1504**, 82-106.
- Nedergaard, J., Matthias, A., Golozoubova, V., Jacobsson, A. and Cannon, B. (1999) UCP1: the original uncoupling protein--and perhaps the only one? New perspectives on UCP1, UCP2, and UCP3 in the light of the bioenergetics of the UCP1-ablated mice. *J Bioenerg Biomembr*, **31**, 475-91.
- Nishida, E. and Gotoh, Y. (1993) The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *Trends Biochem Sci*, **18**, 128-31.
- Ntambi, J.M. and Young-Cheul, K. (2000) Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr*, **130**, 3122S-3126S.
- Orena, S.J., Torchia, A.J. and Garofalo, R.S. (2000) Inhibition of glycogen-synthase kinase 3 stimulates glycogen synthase and glucose transport by distinct mechanisms in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, **275**, 15765-72.
- Ozes, O.N., Akca, H., Mayo, L.D., Gustin, J.A., Maehama, T., Dixon, J.E. and Donner, D.B. (2001) A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR pathway mediates and PTEN antagonizes tumor

- necrosis factor inhibition of insulin signaling through insulin receptor substrate-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 4640-5.
- Pawson, T. (1995) Protein modules and signalling networks. *Nature*, **373**, 573-80.
- Pi-Sunyer, F.X. (1993) Medical hazards of obesity. *Ann Intern Med*, **119**, 655-60.
- Prip-Buus, C., Pegorier, J.P., Duee, P.H., Kohl, C. and Girard, J. (1990) Evidence that the sensitivity of carnitine palmitoyltransferase I to inhibition by malonyl-CoA is an important site of regulation of hepatic fatty acid oxidation in the fetal and newborn rabbit. Perinatal development and effects of pancreatic hormones in cultured rabbit hepatocytes. *Biochem J*, **269**, 409-15.
- Qiu, Z., Wei, Y., Chen, N., Jiang, M., Wu, J. and Liao, K. (2001) DNA synthesis and mitotic clonal expansion is not a required step for 3T3-L1 preadipocyte differentiation into adipocytes. *J Biol Chem*, **276**, 11988-95.
- Raha, S., McEachern, G.E., Myint, A.T. and Robinson, B.H. (2000) Superoxides from mitochondrial complex III: the role of manganese superoxide dismutase. *Free Radic Biol Med*, **29**, 170-80.
- Raingeaud, J., Whitmarsh, A.J., Barrett, T., Derijard, B. and Davis, R.J. (1996) MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol Cell Biol*, **16**, 1247-55.
- Reusch, J.E., Colton, L.A. and Klemm, D.J. (2000) CREB activation induces adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Mol Cell Biol*, **20**, 1008-20.
- Rial, E., Gonzalez-Barroso, M., Fleury, C., Iturrizaga, S., Sanchis, D., Jimenez-Jimenez, J., Ricquier, D., Goubern, M. and Bouillaud, F. (1999) Retinoids activate proton transport by the uncoupling proteins UCP1 and UCP2. *Embo J*, **18**, 5827-33.
- Ross, S.E., Erickson, R.L., Hemati, N. and MacDougald, O.A. (1999) Glycogen synthase kinase 3 is an insulin-regulated C/EBPalpha kinase. *Mol Cell Biol*, **19**, 8433-41.
- Rubin, C.S., Hirsch, A., Fung, C. and Rosen, O.M. (1978) Development of hormone receptors and hormonal responsiveness in vitro. Insulin receptors and insulin sensitivity in the preadipocyte and adipocyte forms of 3T3-L1 cells. *J Biol Chem*, **253**, 7570-8.
- Ryden, M., Dicker, A., van Harmelen, V., Hauner, H., Brunnberg, M., Perbeck, L., Lonqvist, F. and Arner, P. (2002) Mapping of early signaling events in tumor necrosis factor-alpha - mediated lipolysis in human fat cells. *J Biol Chem*, **277**, 1085-91.
- Sakoda, H., Ogihara, T., Anai, M., Funaki, M., Inukai, K., Katagiri, H., Fukushima, Y., Onishi, Y., Ono, H., Fujishiro, M., Kikuchi, M., Oka, Y. and Asano, T. (2000) Dexamethasone-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is due to inhibition of glucose transport rather than insulin signal transduction. *Diabetes*, **49**, 1700-8.
- Saladin, R., Fajas, L., Dana, S., Halvorsen, Y.D., Auwerx, J. and Briggs, M. (1999) Differential regulation of peroxisome proliferator activated receptor gamma1 (PPARgamma1) and

- PPARgamma2 messenger RNA expression in the early stages of adipogenesis. *Cell Growth Differ*, **10**, 43-8.
- Sale, E.M., Atkinson, P.G. and Sale, G.J. (1995) Requirement of MAP kinase for differentiation of fibroblasts to adipocytes, for insulin activation of p90 S6 kinase and for insulin or serum stimulation of DNA synthesis. *Embo J*, **14**, 674-84.
- Salt, I.P., Connell, J.M. and Gould, G.W. (2000) 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR) inhibits insulin- stimulated glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes*, **49**, 1649-56.
- Saraste, M. (1999) Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science*, **283**, 1488-93.
- Schulman, I.G., Shao, G. and Heyman, R.A. (1998) Transactivation by retinoid X receptor-peroxisome proliferator- activated receptor gamma (PPARgamma) heterodimers: intermolecular synergy requires only the PPARgamma hormone-dependent activation function. *Mol Cell Biol*, **18**, 3483-94.
- Seger, R. and Krebs, E.G. (1995) The MAPK signaling cascade. *Faseb J*, **9**, 726-35.
- Smas, C.M., Chen, L. and Sul, H.S. (1997) Cleavage of membrane-associated pref-1 generates a soluble inhibitor of adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol*, **17**, 977-88.
- Smas, C.M., Chen, L., Zhao, L., Latasa, M.J. and Sul, H.S. (1999) Transcriptional repression of pref-1 by glucocorticoids promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation. *J Biol Chem*, **274**, 12632-41.
- Smith, P.J., Wise, L.S., Berkowitz, R., Wan, C. and Rubin, C.S. (1988) Insulin-like growth factor-I is an essential regulator of the differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, **263**, 9402-8.
- Spiegelman, B.M. and Flier, J.S. (1996) Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. *Cell*, **87**, 377-89.
- Stapleton, D., Mitchelhill, K.I., Gao, G., Widmer, J., Michell, B.J., Teh, T., House, C.M., Fernandez, C.S., Cox, T., Witters, L.A. and Kemp, B.E. (1996) Mammalian AMP-activated protein kinase subfamily. *J Biol Chem*, **271**, 611-4.
- Stapleton, D., Woollatt, E., Mitchelhill, K.I., Nicholl, J.K., Fernandez, C.S., Michell, B.J., Witters, L.A., Power, D.A., Sutherland, G.R. and Kemp, B.E. (1997) AMP-activated protein kinase isoenzyme family: subunit structure and chromosomal location. *FEBS Lett*, **409**, 452-6.
- Surwit, R.S., Wang, S., Petro, A.E., Sanchis, D., Raimbault, S., Ricquier, D. and Collins, S. (1998) Diet-induced changes in uncoupling proteins in obesity-prone and obesity-resistant strains of mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 4061-5.
- Taanman, J.W. (1999) The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta*, **1410**, 103-23.
- Tan, Y., Rouse, J., Zhang, A., Cariati, S., Cohen, P. and Comb, M.J. (1996) FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2. *Embo J*, **15**, 4629-42.

- Tanoue, T., Adachi, M., Moriguchi, T. and Nishida, E. (2000) A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nat Cell Biol*, **2**, 110-6.
- Thupari, J.N., Pinn, M.L. and Kuhajda, F.P. (2001) Fatty acid synthase inhibition in human breast cancer cells leads to malonyl-CoA-induced inhibition of fatty acid oxidation and cytotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun*, **285**, 217-23.
- Tontonoz, P., Hu, E., Graves, R.A., Budavari, A.I. and Spiegelman, B.M. (1994) mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev*, **8**, 1224-34.
- Tontonoz, P., Kim, J.B., Graves, R.A. and Spiegelman, B.M. (1993) ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation. *Mol Cell Biol*, **13**, 4753-9.
- Valverde, A.M., Lorenzo, M., Navarro, P. and Benito, M. (1997) Phosphatidylinositol 3-kinase is a requirement for insulin-like growth factor I-induced differentiation, but not for mitogenesis, in fetal brown adipocytes. *Mol Endocrinol*, **11**, 595-607.
- Van Wuytswinkel, O., Reiser, V., Siderius, M., Kelders, M.C., Ammerer, G., Ruis, H. and Mager, W.H. (2000) Response of *Saccharomyces cerevisiae* to severe osmotic stress: evidence for a novel activation mechanism of the HOG MAP kinase pathway. *Mol Microbiol*, **37**, 382-97.
- Vander Heiden, M.G. and Thompson, C.B. (1999) Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nat Cell Biol*, **1**, E209-16.
- Vassaux, G., Gaillard, D., Ailhaud, G. and Negrel, R. (1992) Prostacyclin is a specific effector of adipose cell differentiation. Its dual role as a cAMP- and Ca(2+)-elevating agent. *J Biol Chem*, **267**, 11092-7.
- Vidal-Puig, A.J., Considine, R.V., Jimenez-Linan, M., Werman, A., Pories, W.J., Caro, J.F. and Flier, J.S. (1997) Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J Clin Invest*, **99**, 2416-22.
- Vollenweider, P., Menard, B. and Nicod, P. (2002) Insulin resistance, defective insulin receptor substrate 2-associated phosphatidylinositol-3' kinase activation, and impaired atypical protein kinase C (zeta/lambda) activation in myotubes from obese patients with impaired glucose tolerance. *Diabetes*, **51**, 1052-9.
- Wang, X.S., Diener, K., Manthey, C.L., Wang, S., Rosenzweig, B., Bray, J., Delaney, J., Cole, C.N., Chan-Hui, P.Y., Mantlo, N., Lichenstein, H.S., Zukowski, M. and Yao, Z. (1997) Molecular cloning and characterization of a novel p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, **272**, 23668-74.
- Wang, X.Z. and Ron, D. (1996) Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase. *Science*, **272**, 1347-9.
- Werman, A., Hollenberg, A., Solanes, G., Bjorbaek, C., Vidal-Puig, A.J. and Flier, J.S. (1997) Ligand-independent activation domain in the N terminus of peroxisome proliferator-activated receptor

- gamma (PPARgamma). Differential activity of PPARgamma1 and -2 isoforms and influence of insulin. *J Biol Chem*, **272**, 20230-5.
- World Health Organization. *Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic* (WHO, Geneva, 1997)
- Xia, X. and Serrero, G. (1999) Inhibition of adipose differentiation by phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors. *J Cell Physiol*, **178**, 9-16.
- Yang, S.H., Whitmarsh, A.J., Davis, R.J. and Sharrocks, A.D. (1998) Differential targeting of MAP kinases to the ETS-domain transcription factor Elk-1. *Embo J*, **17**, 1740-9.
- Yeh, W.C., Cao, Z., Classon, M. and McKnight, S.L. (1995) Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes Dev*, **9**, 168-81.
- Zanke, B.W., Boudreau, K., Rubie, E., Winnett, E., Tibbles, L.A., Zon, L., Kyriakis, J., Liu, F.F. and Woodgett, J.R. (1996) The stress-activated protein kinase pathway mediates cell death following injury induced by cis-platinum, UV irradiation or heat. *Curr Biol*, **6**, 606-13.
- Zhu, Y., Qi, C., Korenberg, J.R., Chen, X.N., Noya, D., Rao, M.S. and Reddy, J.K. (1995) Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 7921-5.
- Zimmerman, A.W. and Veerkamp, J.H. (2001) Fatty-acid-binding proteins do not protect against induced cytotoxicity in a kidney cell model. *Biochem J*, **360**, 159-65.