Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Etude de certains effecteurs et marqueurs contrôlant la biogenèse mitochondriale dans des adipocytes 3T3-L1 en dédifférenciation

Van Beersel, Guillaume

Award date:
2007

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.

Download date: 04. May. 2026

FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

Etude de certains effecteurs et marqueurs contrôlant la biogenèse mitochondriale dans des adipocytes 3T3-L1 en dédifférenciation

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de

licencié en Sciences biologiques

Guillaume VAN BEERSEL

Juin 2007

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 - http://www.fundp.ac.be/fundp.html

Étude de certains effecteurs et marqueurs de la biogenèse mitochondriale dans des adipocytes 3T3-L1 en dédifférenciation

VAN BEERSEL Guillaume

Résumé

L'obésité et la surcharge pondérale sont des problèmes majeurs en constante augmentation dans nos sociétés industrialisées. Ils sont souvent associés à de nombreuses pathologies comme l'hypertension, des complications cardio-vasculaires et le diabète de type 2. Parmi les nombreuses approches visant à combattre l'accumulation de triglycérides dans les tissus adipeux, un découplage mitochondrial modéré, mimant une activité endogène de protéines découplante comme les UCPs (Uncoupling Proteins) semble prometteur. En effet, ce découplage des phosphorylations oxydatives se traduit par l'activation de mécanismes partagés avec ceux conduisant aux effets bénéfiques d'une restriction calorique conduisant, entre autres, à une diminution de l'accumulation de triglycérides dans les adipocytes. Ce phénomène est appelé « dédifférenciation adipocytaire ». De plus, le dysfonctionnement mitochondrial, provoqué par un découplage des phosphorylations oxydatives induit dans de nombreux types cellulaires, une communication moléculaire rétrograde adaptative qui s'établit entre la mitochondrie non fonctionnelle et le noyau. Dans ces conditions, des changements dans l'expression de nombreux gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales sont souvent responsables de modifications dans la biogenèse de l'organite. Nous avons donc tenté d'étudier les effets du FCCP et du TNFα, deux molécules conduisant à la dédifférenciation d'adipocytes matures sur l'activité et/ou l'abondance de certains effecteurs et marqueurs de la biogenèse mitochondriale.

Dans ce travail, nous montrons que le découplage mitochondrial induit une dédifférenciation des adipocytes 3T3-L1 qui s'accompagne d'une diminution d'activité et/ou d'abondance nucléaire de plusieurs facteurs de transcription impliqués à la fois dans la biogenèse mitochondriale (C/EBPα, PPARγ, YY1) et l'adipogenèse (C/EBPα, PPARγ). Par contre, et contrairement aux effets du TNFα, le FCCP semble provoquer une augmentation de l'abondance du facteur NRF-2 (Nuclear Respiratory Factor-2), un facteur important de la biogenèse mitochondriale. Bien que le découplage mitochondrial ne modifie pas l'abondance de la population mitochondriale dans les adipocytes (caractérisée par les quantifications de l'abondance lipidique et de l'ADN mitochondrial), la présence de FCCP conduit à modifier spécifiquement l'abondance de plusieurs marqueurs protéiques de la mitochondrie qui se manifestent par une légère diminution de l'abondance des sous-unités α et β de la FoF1-ATP synthase et une augmentation de deux protéines du complexe TOM (TOM40 et TOM20). Dans cette étude, nous montrons également que le TNFα a des effets différents de ceux du FCCP sur l'abondance des effecteurs et des marqueurs de la biogenèse mitochondriale dans les adipocytes. Les résultats de cette étude contribuent à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la biogenèse mitochondriale en réponse à un dysfonctionnement mitochondrial dans les adipocytes.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques
Juin 2007
Promoteur : Prof. T. Arnould

Au terme de ce mémoire, il me reste néanmoins à remercier toutes les personnes de près où de loin qui ont pu contribuer à ce travail

Tout 'd'abord, je voudrais remercier Martine Raes de m'avoir accueilli au sein de l'URBC.

Je voudrais également remercier mon promoteur, Thierry Arnould de m'avoir accueilli au sein de l'équipe MITO, de m'avoir permis de travailler sur un sujet aussi intéressant que la « biogenèse mitochondriale » et enfin d'avoir pris le temps de corriger ce travail pendant de longues heures…

Merci Aurélia pour tout, la liste des choses que tu as fait pour moi est trop longue à énumérer mais je n'oublie pas tout les moments ou tu as été la pour réparer mes erreurs. Tous les moments ou tu t'es montré si patiente. Merci

Merci aux mémorants de l'URBC pour tous les bons moments passés pendant ce mémoire mais également ces 4 dernières années. Je remercie également tous mes autres amis, Nicky,tout particulièrement.

TIziano, même a des milliers de kilomètres tu as su m'écouter, me supporter, me comprendre… J'ai tellement de chance de t'avoir rencontré il y a bientôt un an…

Je n'aurais jamais pu terminer à temps sans l'aide de Damien, Deborah et Aurélie. Merci d'avoir pris le temps de corriger mes nombreuses fautes.

Enfin, Maman… Que pourrais-je dire ? Aux moments ou il n'y avait personne tu étais la, aux moments ou nus n'avions rien, tu m'as tout donné. Je suis conscient de tous les sacrifices que tu as fait pour moi depuis 21 ans … je serai toujours là pour toi Merci

Liste des abréviations

AC : Adenylate Cyclase
ACC : Acetyl-CoA Carboxylase
ACS : Acyl-coA synhthase
Akt : Protein kinase B
AMPc : Adenosine monophosphate cyclic
AMPK : AMP-activated protein kinase
ANT : Adénine Nucléotide Translocase
ANT : Adenine Nucleotide Translocator
AQP7 : Aquaporine 7
AR : Ankyrine Repeat
ATF ½ : Activating Transcription Factor ½
ATF2 : Activated Transcription Factor-2)
ATGL : Adipose Triglyceride Lipase
Bcl 2 : B-cell lymphoma 2
BD : Recepteur aux benzodiazépines (BD)
C/EBP: CAAT/ Enhancer Binding protein
CaMK : Ca^{2+}Calmodulin dependant protein Kinase
CBP/p300 : cAMP Binding protein
CD : Cyclophiline D
CD36 : Cluster Differentiation 36
CDK : Cyclin-dependent Kinase
CnA : calcineurine A
CPEO : Chronic Progressive External Ophtalmopelia
CPEO : Cchronic Pprogressive Eexternal Oophtalmopelia
CPT : Carnitine Palmitoyl Transferase
CREB : cAMP response Element Binding Protein
CREM : CRE modulator
CT: treshold
DEX : Dexaméthasone.
DG : Diacylglycérol
dibutyryl-AMPc (300 µM)
DII : type II thyroxine Deiodinase
DNP :Dinitrophénol
Drp1 : Dynamin-Related Protein 1
ECM : Extracellular Matrix
ERK ½ : Extracellular-signal Regulated Kinase ½
ERR-α: estrogen related receptor α
EWG : Erect Wing
FA : Fatty Acid
FAS : Fatty Acid Synthase
FATP : Ffatty acid transport protein
FCCP : Carbonylcyanide-p- trifluorométhoxyphenylhydrazone
FCCP :CarbonylCyanide-p-trifluorométhoxyphenylhydrazone
GABP GA Binding Protein
GFR : Growth Factor Receptor
GK : Gglycerol kinase
GMPc : GMP cyclique

GPCR : G protein Coupled Receptor,
Grb2 : Growth Factor Receptor bound protein 2
Gs : stimulatory G protein
GSK : glycogen synthse kinase
HMG : High Mobility Group
Hsc70 : 70-kda heat-shock cognate protein
HSL: Hhormone sensitive lipase
ICER :Iinductible cAMP Early Repressor
IEF: IsoElectric Focusing
IGF-1 : Insulin-like Growth Factor-1
IL-6 : Iinterleukine 6
JNK : c-jun NH2-Terminal kinase
KLFs : krupel like factor
lBMX : IsoButyl-Méthyl Xanthine
LPL : : Lipoprotéin lipase
LSP : Light Strand Promoter
MAMs: Mitochondria-Associated Membranes
MEF2c: Mmyocyte Eenhancer Ffactor 2c
MELAS : Mitochondrial Mmyopathy, Eencephalopathy, Llactic Aacidosis and Sstroke-like episodes
MELAS: Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes,
MERRF : Myoclonic epilepsy ragged red fibers
MERRF: Myoclonic epilepsy ragged red fibers
Mfn: Mitofusine
MG: : Monoacylglycérol
MGL ; Monoglyceride Lipase
MIA: Mitochondrial Intermembrane Space Import and Assembly)
MIP: Mitochondrial Intermediate Peptidase)
MIX: Méthyl Isobutyl Xanthine
MPP : Mitochondrial Processing Peptidase)
MSF : Mitochondrial Import Stimulation Factor)
mtPTP : mitochondrial Permeability transition Pore)
NEFA : : non Eesterified Ffatty Aacid
NF-κB : Nuclear factor kappa B
NO : l'Ooxyde nitrique (NO
NOS : : (NO synthase),
NRF-1 ; Nuclear respiratory factor 1
NRF-2 : Nuclear respiratory factor 2
p38 MAPK : (p38 mitogen-activated protein kinase)
p42/p44 MAPK : (Mitogen Activated Protein Kinase)
p90RSK : p90 Ribosomal S6 Kinase 2
pCREB : phosphorylate cAMP Responsive Element binding protein
PD3B : Phosphodiesterase 3B
PDK1: Phosphoinositide- Dependant Proteine Kinase
PE : Phosphatidylethanolaminee
PECK: Phosphoénol Pyruvate Carboxikinase)
PGC-1 : PPAR-γ co-activator-1
PH : domain: Pleckstrin-Homology domain
PI3K : PhosphatidylInositol-3-phosphate Kinase
PI-3K : PI-3kinase (P1-3K)

PI-3K ; Phosphatidyl Inositol-3 kinase)
PKA : Protéine Kinase A
PKA : Protéine kinase A
PKC : Protein kinase C
PKG : Protéine kinase G (PKG)
PNT ; Pointed domain
PPAR-γ: Peroxisome Proliferator-Activated receptor gamma
PPAR-γ; Peroxisome-Proliferator Activated Receptor gamma
PPRE :PPAR-responsive elements
PRC : PGC-related coactivator
Pref-1 Preadipocyte factor 1
PRMT1 :Protein méthyltransférase 1
PS : Phosphatidylserine (PS)
PVDF : Polyvinylidene difluoride
Rb : Retinoblastome
RE : Reticulum endoplasmique
ROS : Radical oxygen specie
RTK :Récepteurs à tyrosine kinase
RXR :Retinoid X receptor
SAM : Sorting and Assembly Machinery
SCR-1 :Steroid coactivator 1
Sir2 : Silencing information regulator 2
SIRT : Sirtuins
SOS : Son of seveless
Sp1 : Special protein 1
SREBP-1C: Sterol Regulatory Element-Binding protein-1c)
T3 : triidothyronine
TFAM : Mitochondrial transcription factor
TG: triglycérides
TIM: Translocase of inner membrane
TNF-R: Tumor necrosis factor α Receptor
TNFα: Tumor necrosis factor α
TOM: Translocase of outer membrane
TRAP220: Thyroid hormone Receptor-Associated Proteins
UCP-1: Uncoupling protein-1.
VDAC: Voltage dependent Anion Channel
VGCC: Voltage-Gated Calcium Channel
YY1 : Ying-Yang 1

Table des matières

1. Introduction 1
1.1 Contexte général 1
1.1.1 Les modèles animaux pour étudier l'obésité 1
1.2. Les tissus adipeux et la différenciation adipocytaire 2
1.2.1 Le tissu adipeux 2
1.2.2 La différenciation des pré-adipocytes en adipocytes blanc 3
1.3 Les différentes stratégies pour lutter contre l'obésité 6
1.4 Le découplage mitochondrial et la dédifférenciation adipocytaire 7
1.4.1 La mitochondrie 7
1.4.2 Les protéines découplantes (UCPs) 8
1.4.3 Le découplage mitochondrial et la dédifférenciation adipocytaire 9
1.5 La dédifférenciation adipocytaire induite par le TNF-α 10
1.5.1 La cytokine TNFα 10
1.5.2 Mécanismes responsables des changements d'expression génique dans les adipocytes matures stimulés par le TNF-α 10
1.6 Dysfonctionnement mitochondrial et biogenèse mitochondriale 12
1.6.1 La communication rétrograde entre la mitochondrie et le noyau initiée par un dysfonctionnement mitochondrial 12
1.6.2 La biogenèse mitochondriale 13
1.7 Objectifs du mémoire 24
2. Matériel et méthodes 25
2.1 Type cellulaire utilisé 25
2.2 Culture de cellules 25
2.3 Le programme de différenciation des pré-adipocytes 3T3-L1 en adipocytes 25
2.4 Le programme de dédifférenciation des adipocytes induit par le FCCP ou le TNFα 26
2.5 Dosage des protéines 26
2.5.1 Dosage de protéines par la méthode de Bradford 26
2.5.2 Dosage des protéines par la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA) 27
2.6 Western Blotting sur gel SDS-PAGE 27
2.6.1 Principe 27
2.6.2 Matériel et méthode 27
2.7 Immunoprécipitation du co-activateur transcriptionnel PGC-1α 29
2.7.1 Principe 29
2.7.2 Matériel et méthode 30
2.8 PCR en temps réel 30
2.8.1 Principe 30
2.8.2 Matériel et méthode 31
2.9 Electrophorèse bidimensionnelle 2D-DIGE (2D Differential In-Gel Electrophoresis) 32
2.9.1 Principe 32
2.9.2 Matériel et méthode 33
2.10 Marquage en immunofluorescence 36
2.10.1 Principe 36
2.10.2 Matériel et méthode 36
2.11 Analyse par cytométrie de flux 37
2.11.1 Principe 37
2.11.2 Matériel et méthode 37
2.12 Test de liaison des facteurs de transcription PPAR-γ et C/EBPα 38

2.12.1 Principe 38
2.12.2 Matériel et méthode 38
2.13 Marquage de l'abondance mitochondriale à l'aide de la sonde Mitotracker Red 38
2.13.1 Principe 38
2.13.2 Matériel et méthodes 39
3. Résultats et discussion 40
3.1 Etude de facteurs de transcription impliqués dans la biogenèse mitochondriale 41
3.1.1 Etude de l'abondance des facteurs de transcription NRF-1 et NRF-2 par Western Blotting 41
3.1.1.1 Etude de l'abondance du facteur de transcription NRF-1 par Western Blotting.. 41
3.1.3 Etude de l'abondance et/ou de la liaison à l'ADN de facteurs de transcription pro-adipogéniques impliqués dans la biogenèse mitochondriale comme PPARγ et C/EBPα 43
3.3 Caractérisation du co-activateur transcriptionnel PGC-1α dans des adipocytes 3T3-L1 incubés en présence de FCCP ou de TNFα 50
3.3.1 Effet du FCCP et du TNFα sur l'abondance relative du transcrit de PGC-1α 50
3.3.2 Effet du FCCP et du TNFα sur l'abondance nucléaire de la protéine PGC-1α par Western Blotting 52
3.3.3 Effets du FCCP et du TNFα sur les modifications post-traductionnelles (phosphorylation et acétylation) du co-activateur transcriptionnel PGC-1α 53
3.4. Caractérisation de la population mitochondriale 55
3.4.1 Etude de l'abondance de la population mitochondriale dans des adipocytes en dédifférenciation : marquage à l'aide de la sonde fluorescente Mitotracker Green et quantification en cytométrie de flux 55
3.4.2 Effet du FCCP et du TNFα sur la structure de la population mitochondriale d'adipocytes : marquage par le Mitotracker Red et observations en microscopie confocale 57
3.4.3 Etude de l'abondance de certaines protéines mitochondriales utilisées comme marqueurs de l'abondance de la population de l'organite dans des adipocytes incubés en présence de FCCP et de TNFα. 58
4.Conclusion et perspectives 65

Introduction

1. Introduction

1.1 Contexte général

L'obésité est un phénomène pouvant être qualifié aujourd'hui de véritable « problème/fléau » de société. En effet, près de 5,7% des hommes et 9,4% des femmes dans le monde sont obèses et l'importance de cette pathologie ne cesse de croître depuis plusieurs années dans nos pays industrialisés (Yach, Stuckler et al. 2006). De manière encore plus inquiétante, les enfants sont également touchés puisque l'on considère que près de 22 millions d'enfants de moins de 5 ans dans le monde sont en situation de surcharge pondérale. En Europe, les estimations sont tout aussi inquiétantes et laissent supposer qu'en 2010, 6,4 millions d'enfants seront obèses et 26 millions en surpoids (Kosti and Panagiotakos 2006). Ces chiffres moyens cachent cependant une grande variabilité puisque les pourcentages d'individus de la population aux USA et en Europe présentant une obésité caractérisée sont respectivement de 25% et 10 à 27% selon la classe d'âge (d'après l'EASO European Association for the Study of Obesity, 2003).

Une approche un peu réductionniste pourrait conduire à penser que l'obésité est une maladie chronique résultant d'un déséquilibre entre les apports caloriques et les dépenses énergétiques de l'organisme. Cependant outre les nombreux problèmes esthétiques et psychologiques engendrés par l'obésité, elle représente également un facteur de risque important dans le développement de nombreuses autres pathologies associées à cet état comme le diabète de type 2, l'hypertension, certaines pathologies cardio-vasculaires et certains cancers (Muoio and Newgard 2006). L'association de plusieurs de ces symptômes étant connue sous le nom du syndrome métabolique (Muoio and Newgard 2006). La sévérité de la surcharge pondérale est généralement évaluée grâce au calcul de l'indice de masse corporelle (IMC) qui peut être défini comme le rapport entre la masse (kg) et le carré de la taille (m^2) **(Figure 1.1)**. Alors qu'un IMC normal est compris entre 18.5 et 25, une personne est en état de surcharge pondérale entre 25 et 29 et est atteinte d'obésité si elle possède un IMC supérieur ou égal à 30 (Spiegel and Alving 2005). L'obésité morbide est atteinte lorsque l'IMC atteint 40 ou plus. Cependant, outre l'IMC, la mesure du tour de taille est également un bon indicateur de la gravité de la surcharge et souligne le rôle prépondérant que joue le tissu adipeux viscéral dans le développement des pathologies associées à l'obésité (Despres and Lemieux 2006).

1.1.1 Les modèles animaux pour étudier l'obésité

Les premiers modèles décrits dans la littérature ont été les souris *ob/ob* et *db/db (Houseknecht, Baile et al. 1998)*. Alors que la souris ob/ob est caractérisée par une mutation du gène codant la leptine, une adipokine impliquée dans le contrôle des dépenses énergétiques et produite presque exclusivement par le tissu adipeux et de manière proportionnelle à sa masse, la souris db/db n'exprime pas le récepteur de cette adipokine (Houseknecht, Baile et al. 1998). Les observations effectuées dans ces modèles ainsi que sur d'autres **(Figure 1.2)** dont la souris *Agouti* (A^Y) caractérisée par un phénotype complexe comprenant l'obésité, le diabète de type 2 et une hyperleptinémie, ont permis de déterminer les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de la masse corporelle graisseuse. Celle-ci demande une communication moléculaire entre les centres régulant l'appétit localisés dans le système

(A)

Classification	IMC kg/m^2	Mortalité et/ou Morbidité associées à l'obésité
Maigre	< 18.5	Basses (mais risques d'autres problèmes cliniques)
Normal	18.5 à 25	Moyennes
Pré-obèse	25.0 à 29.9	Augmentées
Obèse de classe 1	30.0 à 34.9	Modérées
Obèse de classe 2	35.0 à 39.9	Sévères
Obèse de classe 3	> ou = 40	Très sévères

(B)

Risques de morbidité	Tour de taille (cm)	
	Homme	Femme
Niveau 1	> ou = 80	> ou = 94
Niveau 2	> ou = 88	> ou = 102

Figure 1.1 : (A) Classification des indices de masse corporelle par l'organisation mondiale de la santé (OMS) et (B) tour de taille déterminé par l'OMS prédisposant les individus à l'obésité ainsi qu'à d'autres pathologies (d'après James *et al.*, 2001).

Name	Allele	Gene Product	Inheritance	Degree/ onset
Mice				
Agouti	Ay	AGOUTI protein	Dominant	Moderate/adult
Obese	ob	OB protein (leptin)	Recessive	Extreme/early
Diabetes	db	OB-R receptor	Recessive	Extreme/early
Fat	fat	Carboxypeptidase E	Recessive	Moderate/adult
Tubby	tub	TUB protein	Recessive	Moderate/adult

Figure 1.2 : Tableau reprenant les différents modèles murins permettant d'étudier l'obésité ainsi que les allèles mutés, les gènes cibles, le mode de transmission et la sévérité de la pathologie (d'après Houseknecht *et al.*, 1998).

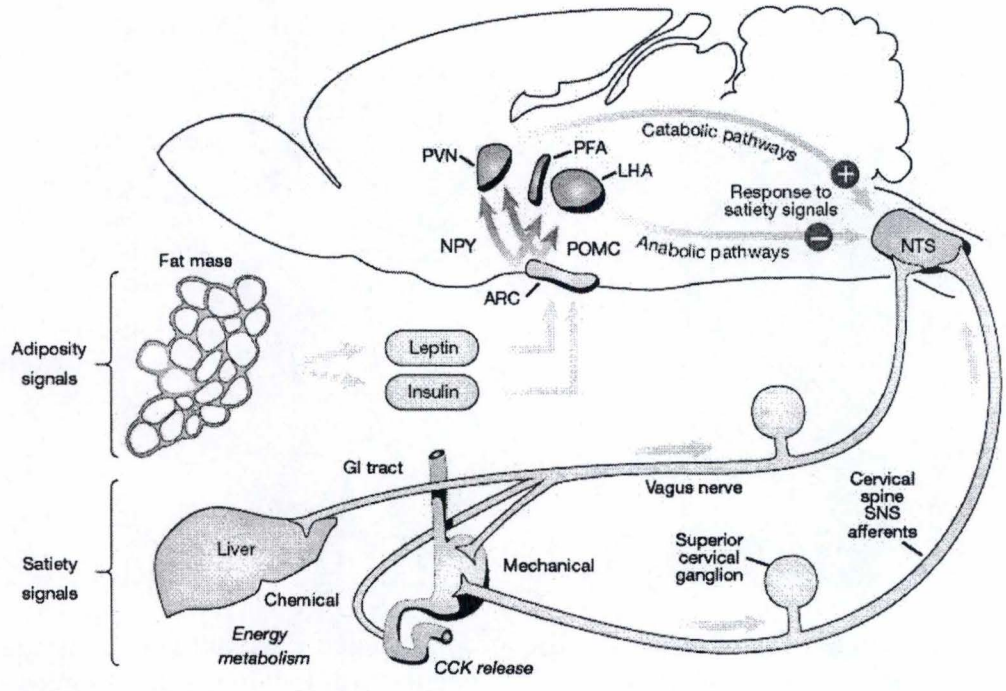


Figure 1.3 : Modèle schématique du contrôle du comportement alimentaire dans lequel la leptine et l'insuline interagissent avec le système nerveux central pour réguler l'appétit. La leptine et l'insuline stimulent la voie catabolique (neurones POMC) et inhibent la voie anabolique (neurones AGRP). Ces différentes voies aboutissent dans différentes zones de l'hypothalamus. Des signaux afférents provenant du foie et du tractus gastro-intestinal sont transmis via le nerf vague au noyau du tractus solitaire (NTS) ou tout les signaux sont intégrés (d'après Schwartz *et al*,. 2000).

(a) (b)

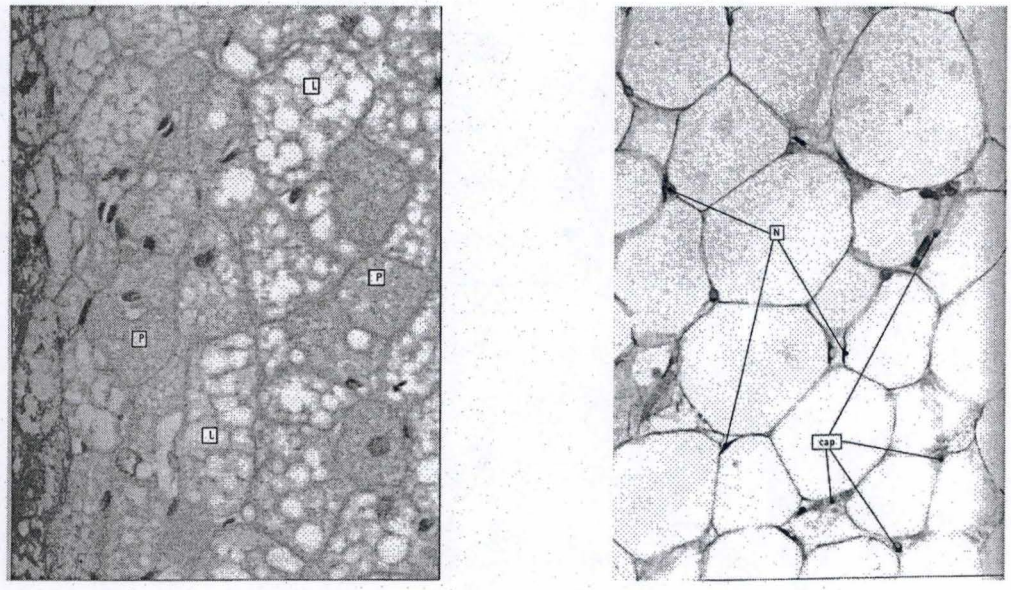


Figure 1.4 : Micrographies prises au microscope photonique illustrant (a) du tissu adipeux brun et du (b) tissu adipeux blanc humains. Les coupes histologiques sont colorées à l'H.E (Hématoxyline-Eosine). Les adipocytes brun (a) sont caractérisés par un noyau central, la présence de plusieurs vésicules lipidiques (L et P) et de nombreuses mitochondries. Les adipocytes blancs (b) possèdent in vivo une seule vésicule de lipides qui occupe pratiquement tout le volume cellulaire. Le noyau (N) et les organites sont repoussés près de la membrane plasmique. Cap : capillaire sanguin (d'après Stevens et Lowe, 1997).

nerveux central (SNC) et les sites de stockage et d'utilisation des graisses de l'organisme (Morton, Cummings et al. 2006) **(Figure 1.3)**. Cette communication repose sur les taux de plusieurs hormones circulantes dont la leptine exerçant son contrôle sur la balance énergétique en se liant à son récepteur fortement exprimé dans l'hypothalamus. L'activation de ce dernier induit la répression des voies orexigéniques, active les voies anorexigéniques (ce qui conduit à une diminution de l'appétit) et stimule les dépenses énergétiques de type métabolique (Rosen and Spiegelman 2006; Van Gaal, Mertens et al. 2006).

Récemment, des études d'invalidation de gènes utilisant une approche siRNA visant à identifier les gènes potentiellement impliqués dans le métabolisme lipidique effectuées sur le ver *Caenorhabditis elegans* ont permis d'identifier 417 gènes sur les 16575 analysés dans le génome de cet organisme dont les produits sont susceptibles d'affecter le stockage des graisses. La plupart des gènes identifiés ont des orthologues mammaliens. Parmi ceux-ci, on retrouve des gènes codant pour des enzymes impliquées dans la biosynthèse des membranes, la β–oxydation des acides gras ou encore des récepteurs nucléaires (Ashrafi, Chang et al. 2003). Ces résultats mettent en évidence le rôle joué par les facteurs génétiques dans le développement de l'obésité. Cependant, ils ne rendent pas compte de la prévalence du développement de cette maladie dans notre société. En effet, peu d'individus atteints de mutations dans les gènes codant la leptine ou son récepteur sont effectivement retrouvés parmi les patients atteints d'obésité (Barsh, Farooqi et al. 2000). Dans la population humaine, les aspects environnementaux et psychologiques sont autant de facteurs susceptibles de modifier l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme du glucose et des lipides conduisant à l'acquisition d'un phénotype obèse (Barsh, Farooqi et al. 2000).

Au niveau cellulaire et moléculaire, l'obésité est caractérisée par une hypertrophie et/ou, dans les cas les plus graves, d'une hyperplasie des cellules adipeuses qui composent, en grande partie, les tissus adipeux. Dans la suite de cette introduction, nous allons donc nous intéresser aux tissus adipeux et au phénomène de la différenciation adipocytaire.

1.2. Les tissus adipeux et la différenciation adipocytaire

1.2.1 Le tissu adipeux

On distingue deux types de tissus adipeux, le tissu adipeux brun et le tissu adipeux blanc connus pour jouer un rôle important dans l'homéostasie énergétique de l'organisme **(Figure 1.4)**. Le tissu adipeux brun, particulièrement abondant chez le fœtus humain, les rongeurs et les mammifères hibernant, disparaît au cours du développement chez l'homme. Il est caractérisé par la présence d'un grand nombre de vésicules lipidiques de petite taille, de nombreuses mitochondries (témoignant d'une biogenèse de l'organite très active) et par une forte expression de la protéine découplante UCP-1 (*uncoupling protein-1*). Le tissu adipeux brun est également fortement vascularisé et innervé par le système nerveux sympathique. Il a comme principale fonction de dissiper l'énergie sous forme de chaleur et permet ainsi un contrôle de la thermorégulation constitutive et adaptative (Hansen and Kristiansen 2006).

Le tissu adipeux blanc se développe après la naissance chez l'homme et prend toujours la forme de dépôts très structurés localisés à divers endroits de l'organisme. Ainsi, il peut être viscéral (péritonéal, péristomacal, mésentérique) intra- et inter-musculaire, sous-cutané ou encore localisé dans la moëlle osseuse ou la glande mammaire après la lactation (Rosen and Spiegelman 2006). Le tissu adipeux blanc permet le stockage de grandes quantités d'énergie sous forme de triacylglycérols ou triglycérides (TG). Ajoutons encore que le tissu adipeux blanc est également un organe endocrine impliqué, comme nous l'avons déjà mentionné, dans

Hormone	Cible principale	Fonctions principales
Leptine	Système nerveux central	Stimulation des voies anorexigéniques
	Cellules musculaires et cellules hépatiques	Augmentation de la sensibilité à l'insuline Réduction de l'abondance des triacylglycérols
	Cellules β de Langherans	Inhibition de la production d'insuline
Adiponectine	Cellules musculaires et cellules hépatiques	Stimulation de l'AMPK, induction de la β oxydation des acides gras Augmentation de la sensibilité à l'insuline
	Cellules β de Langherans	Induction de la production d'insuline
Vivastine	Cellules musculaires	Induction de la prise de glucose
	Cellules hépatiques	Diminution de la sécrétion de glucose
Résistine	Cellules hépatiques et adipocytes	Diminution de la prise de glucose
Retinol-binding protein 4	Cellules hépatiques et cellules musculaires	Diminution de la sensibilité à l'insuline

Figure 1.5 : Tableau reprenant les principales hormones sécrétées par le tissu adipeux , leurs cibles ainsi que leurs fonctions principales dans l'organisme (d'après Morton et al.; 2000)

la régulation de nombreux processus physiologiques tels que la régulation de la masse corporelle, l'homéostasie nutritionnelle, la réponse immunitaire, le contrôle de la pression sanguine et la reproduction (Rosen and Spiegelman 2006). Les différentes fonctions endocrines du tissu adipeux blanc sont assurées par la synthèse et la libération d'hormones circulantes **(Figure 1.5)** et de cytokines pro-inflammatoires («adipokines») comme l'IL-6 (*Interleukine 6*) et le TNF-α (*Tumor-Necrosis factor α*) (Muoio and Newgard 2006). Morphologiquement, les adipocytes blancs *in vivo* sont principalement caractérisés par la présence d'une seule vésicule lipidique de grande taille occupant la majorité du cytoplasme alors que la différenciation *in vitro* conduit à un phénotype multivésiculaire (Student, Hsu et al. 1980).

1.2.2 La différenciation des pré-adipocytes en adipocytes blancs

1.2.2.1 Les adipocytes blancs

Les adipocytes dérivent de cellules souches mésenchymateuses pluripotentes potentiellement capables de se différencier en adipoblastes, mais également en myoblastes et chondroblastes. On distingue généralement deux phases dans l'adipogenèse. La première appelée la « *détermination adipocytaire* » implique l'engagement des cellules souches dans la voie adipocytaire. Le pré-adipocyte qui en résulte ne peut pas être distingué de son précurseur mais a perdu la capacité de se différencier en d'autres types cellulaires comme les myocytes et les chondrocytes. Au cours de la seconde phase appelée la « *différenciation adipocytaire* », on observe une activation séquentielle en cascade de nombreux régulateurs transcriptionnels ce qui se traduit par une modification de l'expression de nombreux gènes comme l'ont montré des études transcriptomiques à grande échelle. Citons par exemple, une étude réalisée par Gharold et son équipe qui ont mis en évidence que sur 6347 gènes étudiés, 579 voient leur expression augmentée ou diminuée de plus de 1.5 fois lors de la différenciation adipocytaire (Gerhold, et al. 2002). C'est également pendant cette deuxième étape que le pré-adipocyte acquiert les effecteurs et les marqueurs moléculaires nécessaires au transport et à la synthèse des lipides, à la sensibilité à l'insuline et à la sécrétion des adipokines comme la leptine (Rosen and MacDougald 2006).

1.2.2.2 Caractérisation des mécanismes moléculaires de la différenciation adipocytaire

La compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la différenciation adipocytaire *in vivo* est compliquée car les précurseurs se différencient de manière relativement asynchrone et ces mécanismes sont difficiles à identifier et à étudier *in situ*. L'utilisation de lignées cellulaires immortalisées comme la lignée de fibroblastes murins 3T3-L1 capables de se différencier en adipocytes blancs a donc permis de mettre en évidence les différentes étapes de l'adipogenèse. Student et son équipe ont mis au point le modèle de différenciation des pré-adipocytes 3T3-L1 que nous utilisons au sein du laboratoire. Ces auteurs ont ainsi montré que la différenciation induite par un cocktail hormonal est régulée par l'expression et/ou l'activation séquentielle de nombreux facteurs de transcription **(Figure 1.6)** (Student, Hsu et al. 1980).

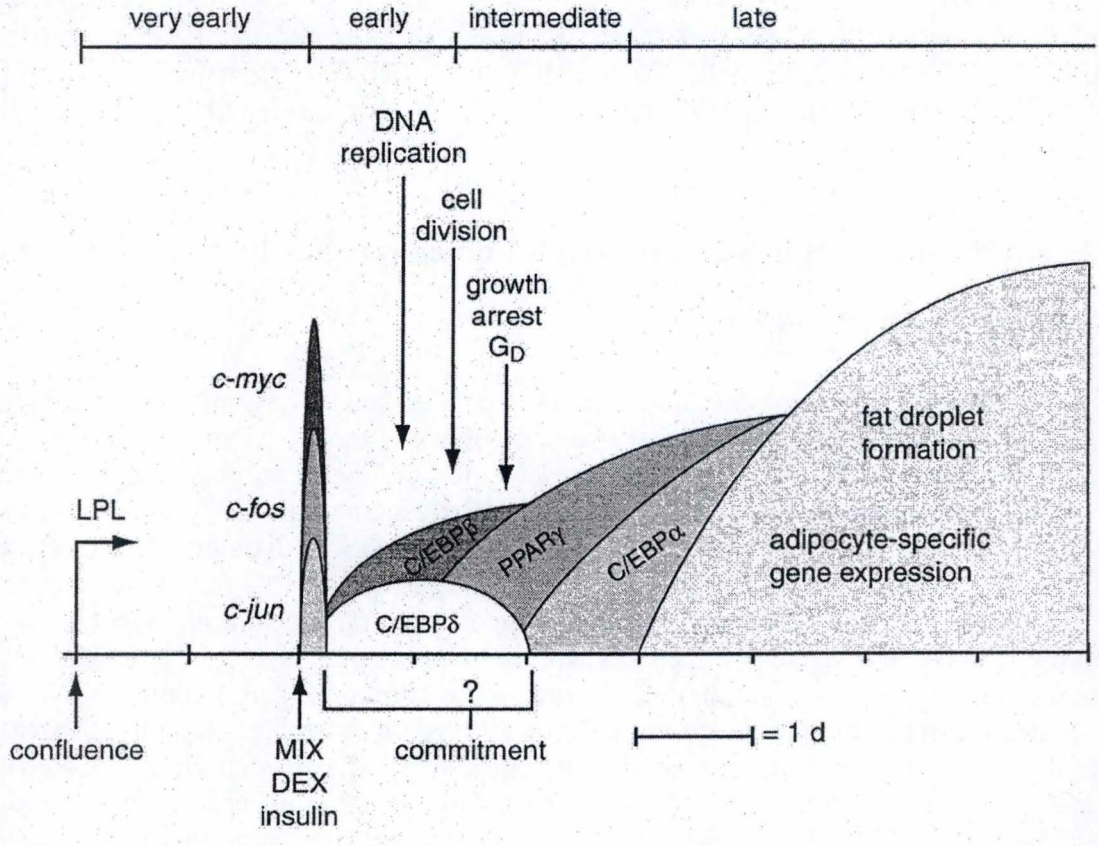


Figure 1.6: Schéma reprenant, de manière chronologique, les différents événements se déroulant lors de la différenciation des cellules 3T3-l. LPL : Lipoprotéin Lipase, pCREB : phosphorylated cAMP Responsive Element Binding Protein, C/EBP β, γ, α: CAAT/ Enhancer Binding Protein Beta, Gamma, Alpha, MIX Méthyl-Isobutyl Xanthine, DEX : Dexaméthasone. (d'après Ntambi *et al*, 2001)

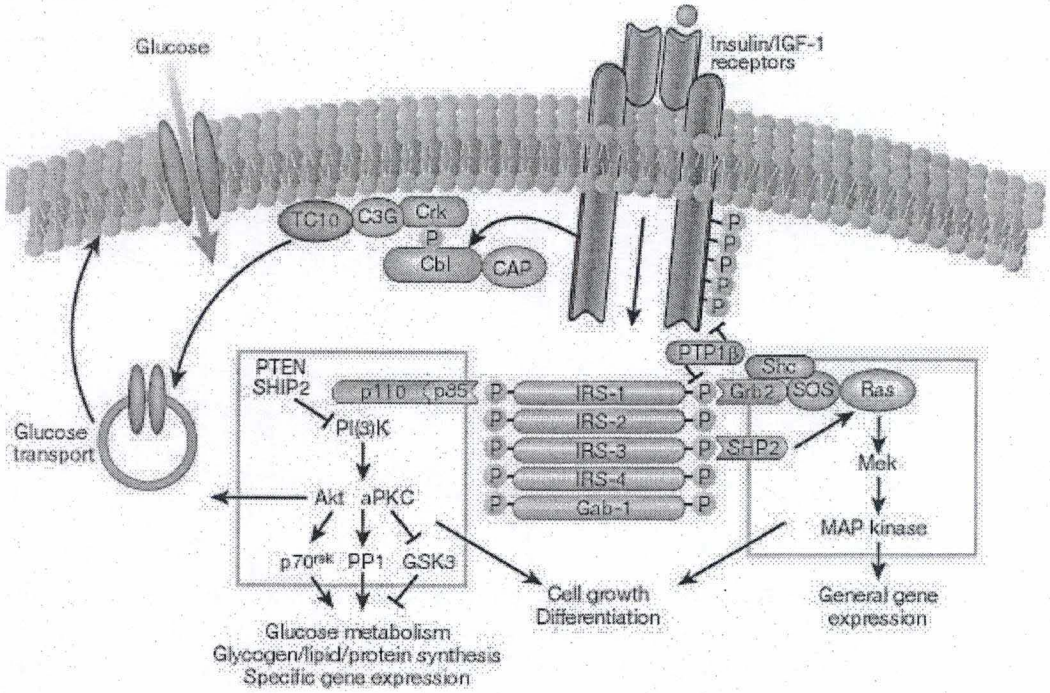


Figure 1.7 : Schéma reprenant les voies de signalisation activées par l'Insuline. Le récepteur à l'insuline (IR) appartient à la famille des récepteurs de facteurs de croissance RTK (*receptor tyrosine kinase*) possédant une activité tyrosine kinase dans son domaine cytosolique. Il est constitué de 2 sous-unités α extracellulaires et 2 sous unités β intracellulaires liées entre elles par des ponts disulfure. La liaison de l'hormone induit un changement conformationnel, le rapprochement des deux-sous unités β et leur transphosphorylation. Une fois actif le récepteur à l'insuline catalyse la phosphorylations de résidus tyrosine cibles dans les protéines cellulaires ce qui permet l'activation de voies de signalisation distinctes comme celle de la phosphatidyl-inositol PI-3kinase (P1-3K) ou recrute des protéines adaptatrices comme Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*). La PI-3K activée catalyse la phosphorylation (en position 3) des phosphoinositides membranaires et le PIP3 agit alors comme un messager secondaire pour d'autres kinases possédant un domaine PH (*pleckstrin-homology domain*) comme la PDK1 (*Phosphoinositide- Dependant Proteine Kinase 1*). Cette enzyme est responsable de l'activation des kinases en aval comme PKB/AKT (proteine kinase B) et PKCλ. AKT est une sérine/thréonine kinase essentielle à la plupart des effets de de l'insuline. Elle phosphoryle de nombreux substrats dont la GSK3 (*Glycogen-synthase kinase 3*) ce qui diminue son activité et augmente la synthèse du glycogène. La voie des p42/p44 MAPK est également activée suite à la liaison de l'insuline à son récepteur. En effet, la liaison de la protéine Grb2 permet l'activation d'un facteur d'échange nucléotidique SOS (*son of seveless*) qui à son tour active Ras, une petite protéine G présente dans la membrane plasmique conduisant à l'activation de la voie p42/p44 MAPK et à la translocation de kinases dans le noyau. L'activaion de ces différentes voies de signalisation conduit à modifier l'activité de facteurs de transcription et change l'expression de nombreux gènes. (Saltiel et Kahn,. 2001).

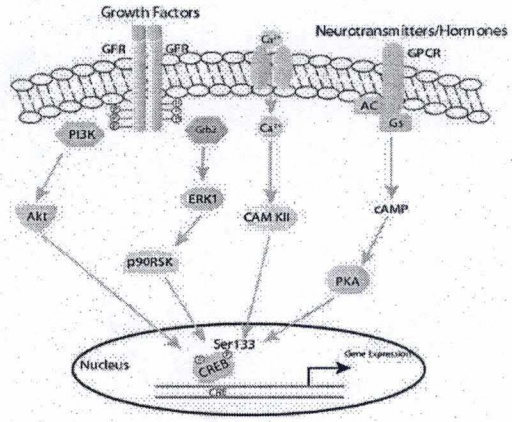


Figure 1.8 : Voies de transduction du signal aboutissant à la phosphorylation du facteur de transcription CREB. Différents stimuli comme des facteurs de croissance, des hormones tellesque l'insuline et des neurotransmetteurs activent le facteur de transcription CREB. Ces stimuli activent différentes voies de signalisation intracellulaires qui aboutissent à l'activation de différentes kinases comme Akt, la PKA, la CAMKII et la p90RSK. Celles ci peuvent phosphoryler le facteur de transcription CREB. GFR : Growth Factor Receptor, PI3K : Phosphatidyl Inositol-3-phosphate Kinase, Grb2 : Growth Factor Receptor bound protein 2, GPCR : G protein Coupled Receptor, cAMP Adenosine MonoPhosPhate cyclique, PKA : Protéine Kinase A, CAM KII : Calmodulin-dependant kinase II, ERK ½ : Extracellular-signal Regulated Kinase ½, p90RSK : p90 Ribosomal S6 Kinase 2, AC : Adenylate Cyclase, Gs : stimulatory G protein, Akt Protein kiase B (d'après www.panomics.com)

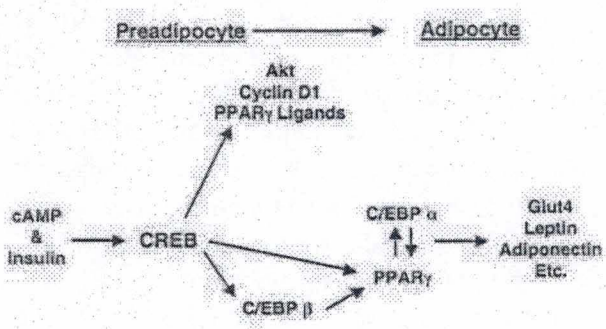


Figure 1.9 : Modèle représentant le rôle de CREB à l'adipogenèse. Le cocktail proadipogénique induit l'activation du facteur de transcription CREB qui peut alors induire l'expression des C/EBPβ. CREB et C/EBPβ stimulent l'expression de PPAR-γ. Ce dernier avec C/EBPα régule l'expression des gènes typiques du phénotype adipocytaire. CREB promeut également l'adipogenèse en augmentant l'expression de la kinase Akt, la cycline D1 et des ligands de PPAR-γ (d'après Fox *et al.*, 2007).

1.2.2.3 Les inducteurs de l'adipogenèse

L'addition d'un cocktail hormonal composé d'insuline (à forte concentration), d'un glucocorticoïde synthétique comme la dexaméthasone et d'un analogue stable de l'AMPc comme le dibutyryl-AMPc ou d'un inhibiteur de phosphodiestérase comme l'IBMX (IsoButyl-Méthyl Xanthine) qui augmente le taux d'AMPc dans la cellule, induit la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes (Student, Hsu et al. 1980).

L'insuline exerce un effet positif sur l'adipogenèse, non pas en se liant à son récepteur (très peu exprimé dans les pré-adipocytes) mais en liant le récepteur à l'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1) fortement exprimé en membrane plasmique des pré-adipocytes (Rosen, Walkey et al. 2000). Les récepteurs à l'IGF-1 et à l'insuline appartiennent à la famille de récepteurs à tyrosine kinase (RTK) et leurs substrats respectifs ont une affinité croisée pour ces récepteurs. Toutefois, l'affinité du récepteur à l'IGF pour l'insuline est très faible et pour pouvoir être activé, la concentration en insuline doit être très élevée et atteindre environ 800 nM (Rosen and Spiegelman 2000). La liaison de l'insuline à ces récepteurs induit ensuite l'activation de nombreuses voies de signalisation et notamment les voies de la PI-3K (*Phosphatidyl Inositol-3 Kinase*). Les voies de signalisation activées par l'insuline sont illustrées à la **Figure 1.7**.

Les glucocorticoïdes présents dans le cocktail pro-adipogène, sous la forme de dexaméthasone, participent à l'induction de la différenciation adipocytaire en activant un récepteur cytosolique aux glucocorticoïdes. Suite à sa translocation dans le noyau, ce récepteur activé permettra d'induire l'expression de C/EBPβ (*CAAT enhancer Binding protein β),* facteur de transcription pro-adipogénique, et de réprimer l'expression de Pref-1, (*Preadipocyte Factor 1*) un inhibiteur de l'adipogenèse que l'on trouve dans les pré-adipocytes (Rosen, Walkey et al. 2000).

Les analogues de l'AMPc comme le db-AMPc activent la PKA (*protéine kinase A*), une sérine/thréonine kinase qui phosphorylera et activera, entre autres, le facteur de transcription CREB sur la Serine-133 (*Cyclic Responsive-Element Binding Protein*) (Rosen, Walkey et al. 2000).

1.2.2.4 Caractérisation moléculaire de la différenciation adipocytaire

La différenciation adipocytaire est donc un processus complexe contrôlé et régulé par de multiples facteurs de transcription exprimés et/ou activés de manière séquentielle tout au long du programme de différenciation. Elle débute par un arrêt de la prolifération des pré-adipocytes 3T3-L1 ayant atteint la confluence (Patel and Lane 2000) et leur maintien dans un état non différencié suite à l'action d'une protéine transmembranaire Pref-1 qui inhibe la voie des p42/p44 MAPK et diminue ainsi la sensibilité des pré-adipocytes à l'insuline et à l'IGF-1 (Zhang et al., 2003). L'ajout du cocktail pro-adipogénique induit l'activation de facteurs de transcription dont CREB appartenant à une famille de facteurs de transcription caractérisés par un domaine de liaison à l'ADN de type bZIP-leucine comprenant également ATF 1/2 (Activating Transcription Factor 1/2), CREM (CRE modulator) et ICER (Inductible cAMP Early Repressor) (Reush et al., 2002). Lors de l'induction de la différenciation adipocytaire, la PKA activée par l'AMPc catalyse la phosphorylation de CREB sur la ser-133. La p90 RSK située en aval de la voie de la p42/p44 MAPK peut également activer ce facteur **(Figure 1.8)** Les effets de CREB lors de la différenciation adipocytaire seraient médiés, du moins en partie, par l'induction de l'expression de membres de la famille C/EBP et PPARγ, des facteurs de transcription nécessaires et suffisants pour permettre la différenciation adipocytaire **(Figure 1.9)** (Fox, Fankell et al. 2006). Ces derniers appartiennent à une famille de facteurs

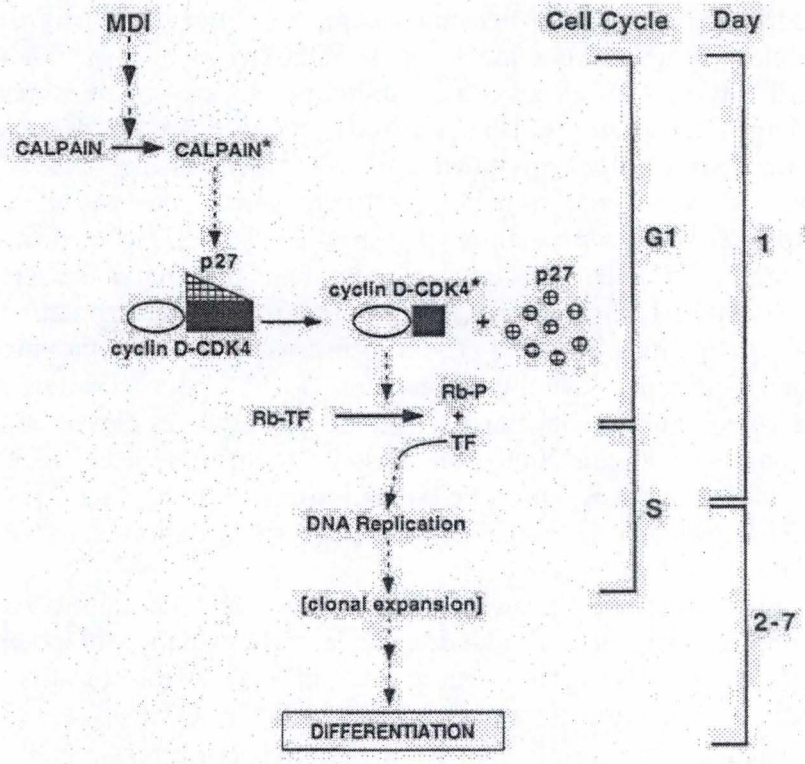


Figure 1.10 : Modèle proposé pour expliquer la reprise du cycle cellulaire lors de l'expansion mitotique clonale des pré-adipocytes 3T3-L1 en réponce à une l'incubation en présence du cocktail inducteur de la différenciation et composé de MIX, de dexaméthasone et d'insuline (MDI) (Patel *et al.*, 2000).

de transcription possédant un domaine C-terminal de type « leucine zipper » qui permet leur dimérisation et un domaine basique liant l'ADN (Hamm, Park et al. 2001).

C/EBPβ et C/EBPδ sont exprimés rapidement, mais de manière transitoire, en réponse au cocktail hormonal et sont impliqués dans une reprise du cycle cellulaire connue sous le nom « d'expansion mitotique clonale ». Cette reprise d'un ou deux cycles de divisions cellulaires précède l'adipogenèse et est requise pour la différenciation maximale des pré-adipocytes 3T3-L1 (Rosen and MacDougald 2006). L'expansion mitotique clonale serait due, du moins en partie, à l'activation de la calpaïne, une protéine activée par l'augmentation en calcium cytosolique. Celle-ci peut alors dégrader p27 un inhibiteur de la CDK4 (*Cyclin-Dependent Kinase 4*) dont l'activité est régulée par la cycline D (*D-CDK4*). D-CDK4 phosphoryle alors la protéine Rb (*Retinoblastoma*) ce qui induit l'activation du facteur de transcription E2F impliqué dans la reprise du cycle cellulaire **(Figure 1.10)** (Burtan et al., 2004). De plus, C/EBPβ et C/EBPδ sont tous deux impliqués dans l'induction de la transcription de gènes codant PPARγ, un facteur clé de la différenciation adipocytaire mais également dans l'expression des facteurs de transcription KLFs (*Krupel Like Factor)* connus pour réguler différents processus cellulaires comme l'apoptose, la prolifération et la différenciation cellulaire (Rosen and MacDougald 2006). En effet, il a été montré que les protéines KLF 15 et 5 lient et activent, en synergie avec les membres de la famille C/EBP, le promoteur du gène codant PPARγ (Mori, Sakaue et al. 2005; Oishi, Manabe et al. 2005). Mentionnons également que C/EBPβ et C/EBPδ induisent aussi l'expression de C/EBPα, un facteur qui exerce un effet anti-mitotique en augmentant l'expression de la protéine $p21^{Waf1-Cip1}$, (protéine inhibitrice de complexes cycline/CDK) et contribue au maintien de l'état différencié des adipocytes 3T3-L1 (Timchenko, Wilde et al. 1996). C/EBPα et PPARγ sont responsables de la transcription de la plupart des gènes codant des protéines impliquées dans la différenciation adipocytaire et le maintien du phénotype adipocytaire comme l'aP2 (ou FABP pour *Fatty Acid-Binding Protein*), GLUT4, la PECK (*Phosphoenol Pyruvate Corboxykinase*) (Rosen and Spiegelman 2000).

Le facteur de transcription PPAR-γ, est, avec PPARα et PPARδ, un membre de la famille des récepteurs nucléaires NR1C (*Nuclear Receptor 1C*) (**Figure 1.11**). Ces récepteurs forment des hétérodimères avec RXR (*retinoid X receptor*) et se lient à leur site consensus PPRE *(PPAR-responsive elements*) dans les promoteurs de leurs gènes cibles (Zhang, Lavan et al. 2007). PPARγ est le principal régulateur de la différenciation adipocytaire (Rosen and MacDougald 2006). Cette protéine existe sous 3 isoformes (PPARγ1, PPARγ2, PPARγ3) résultant d'un « splicing » alternatif. Les deux premières isoformes sont induites lors de la différenciation adipocytaire mais au contraire de PPARγ2 qui est spécifique aux adipocytes, PPARγ1 et PPARγ3 sont également exprimés dans d'autres types cellulaires comme les macrophages (Rosen and MacDougald 2006). Une fois lié à la séquence d'ADN consensus dans le promoteur, le facteur PPARγ peut encore être activé par la liaison de ligands lipidiques à son extrémité C-terminale (Rosen and Spiegelman 2000). Parmi les ligands naturels, on retrouve la prostaglandine PGJ2, l'acide arachidonique, l'acide linolénique mais également des molécules synthétiques comme les thiazolidinediones et des anti-inflammatoires non stéroidiens (**Figure 1.12**) (Zhang, Lavan et al. 2007).

Ajoutons encore que, en plus des facteurs mentionnés ci-dessus, le régulateur SREBP-1C (*Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1c*) qui appartient à une famille de facteurs de transcription de type « basic helix-loop-helix leucine zipper » induit également l'expression de PPARγ. L'activation de ce facteur permet également, bien qu'indirectement, la production de ligands de PPARγ comme les acides gras néosynthétisés (Rosen and MacDougald 2006).

Enfin, pour la bonne compréhension de ce travail visant à étudier les effets de la dédifférenciation adipocytaire sur la biogenèse mitochondriale, il est important de signaler

	PPARα	PPARγ	PPARδ
Sites of highest expression	Liver, kidney, heart	Adipose tissue, macrophages	Adipose tissue, skin, brain, but widespread
Cellular processes activated	Fatty acid β-oxidation, lipoprotein synthesis, amino acid catabolism	Adipocyte differentiation, triglyceride synthesis	Fatty acid β-oxidation
Physiological function	Coordination of metabolic response to fasting	Differentiation of adipocytes, FA trapping	Muscle fiber type determination?
Examples of target genes	*Carnitine palmitoyl transferase I, HMG CoA synthase 2, apoA-I*	*Fatty acid–binding protein 4, lipoprotein lipase, adiponectin*	*Acyl-CoA oxidase, carnitine palmitoyl transferase I*

Figure 1.11 : Tableau reprenant les différents membres de la famille PPAR (PPARα, PPARβ et PPARγ) ainsi que leurs fonctions, leurs principaux sites d'expression certains de leurs gènes cibles, et leur fonctions physiologique (d'après Semple *et al.*, 2006)

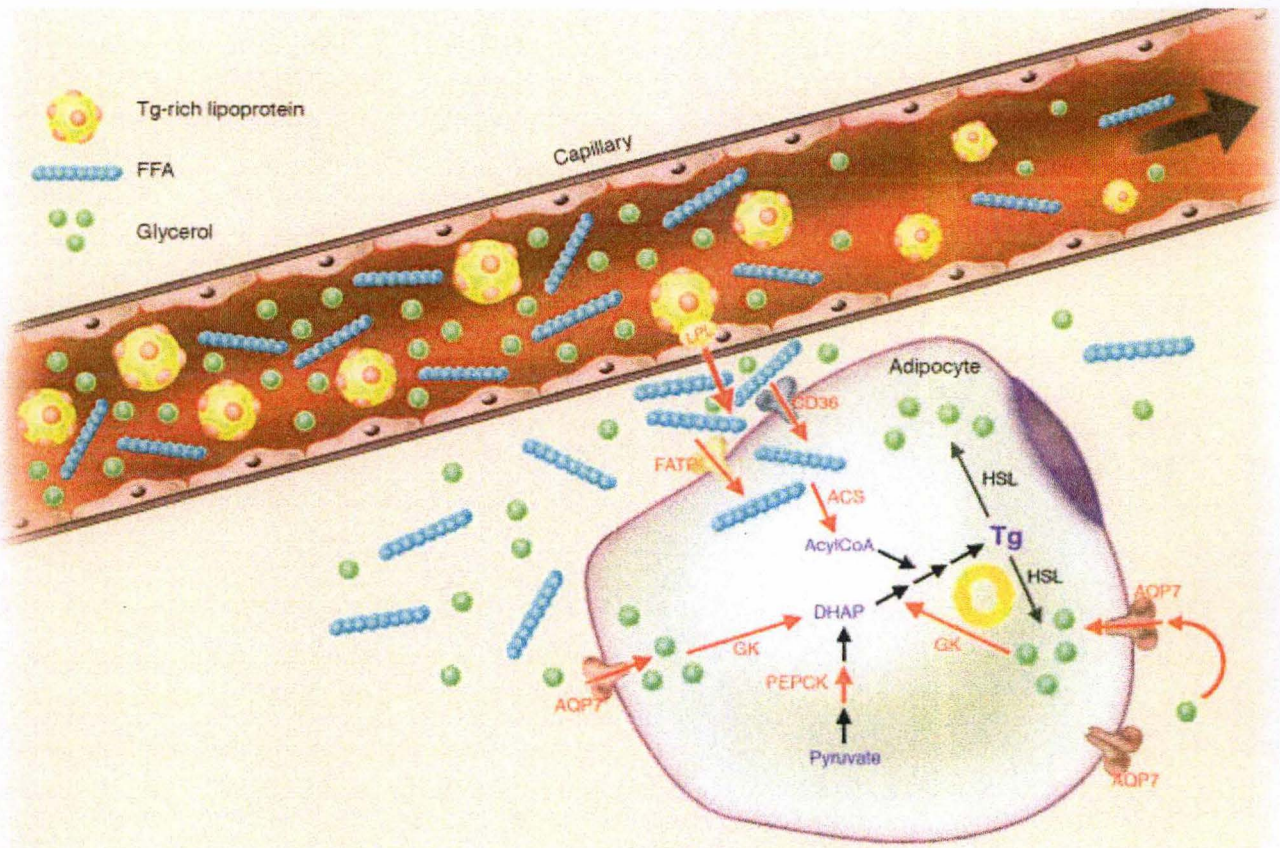


Figure 1.12 : Représentation schématique de plusieurs gènes cibles de PPARγ impliqués dans la synthèse et l'accumulation des triglycérides (en rouge) comme l'ACS (acyl-coA synhthase), la PECK (phosphoénol pyruvate carboxikinase), la GK (glycerol kinase), la FATP (Fatty Acid Transport Protein), la CD36 (Cluster Differentiation 36) et l'AQP7 (aquaporine 7). (Semple et al., 2006).

que les facteurs de transcription CREB, PPARγ et C/EBPα jouent également des rôles essentiels dans la biogenèse mitochondriale (Rosen and MacDougald 2006). Nous en reparlerons au point 1.6.2.1.

La différenciation adipocytaire est donc le résultat d'un programme conduisant à la formation d'un adipocyte mature caractérisé par la présence d'une vésicule (*in vivo*) ou de plusieurs vésicules (*in vitro*) de triglycérides. Nous venons de voir que l'obésité résulte essentiellement d'une hypertrophie et d'une hyperplasie des cellules adipeuses. Les stratégies visant à limiter l'accumulation de TG au sein des adipocytes se présentent donc comme une approche intéressante pour lutter contre l'obésité. Dans le chapitre suivant, nous passerons en revue les quelques pistes de recherches qui à ce jour sont envisagées pour lutter contre l'obésité.

1.3 Les différentes stratégies pour lutter contre l'obésité

Parmi les différentes approches décrites pour lutter contre l'obésité et les pathologies qui lui sont associées, le régime à basse calorie est sans doute la plus commune. Il existe cependant d'autres moyens envisageables comme l'utilisation de substances médicamenteuses diminuant l'appétit et/ou l'absorption des nutriments au niveau du tractus digestif ou encore des interventions chirurgicales (Spiegel and Alving 2005). A l'heure actuelle, des études sont également en cours sur la possibilité d'induire l'apoptose des cellules adipeuses à l'aide de composés comme l'Ajoene (Yang, Della-Fera et al. 2007) ou de provoquer leur *dédifférenciation*. C'est cette dernière approche qui nous intéresse au laboratoire. En effet, nous étudions la possibilité d'induire la dédifférenciation des adipocytes par un *découplage mitochondrial*. De nombreuses informations présentes dans la littérature soutiennent notre hypothèse. Citons par exemple que des souris transgéniques exprimant la protéine découplante UCP-3 dans leur tissu musculaire squelettique sont hyperphagiques mais ne présentent pas de modification de leur masse corporelle. Ces animaux présentent également un taux de glucose et une concentration en insuline dans le sang plus faibles (Clapham, et al. 2000). D'autre part, la sur-expression de UCP-1 dans le tissu adipeux blanc à partir du promoteur du gène codant la protéine aP2 (un transporteur des acides gras intracellulaires dont un gène est régulé par le facteur de transcription PPARγ), induit une biogenèse mitochondriale et une diminution du contenu en triglycérides (Rossmeisl, Barbatelli et al. 2002). Enfin, plus récemment encore, Si et son équipe ont montré que la surexpression de UCP1 dans des cellules 3T3-L1 induit une diminution de la synthèse des TG au cours de la différenciation des cellules (Si, Palani et al. 2007).

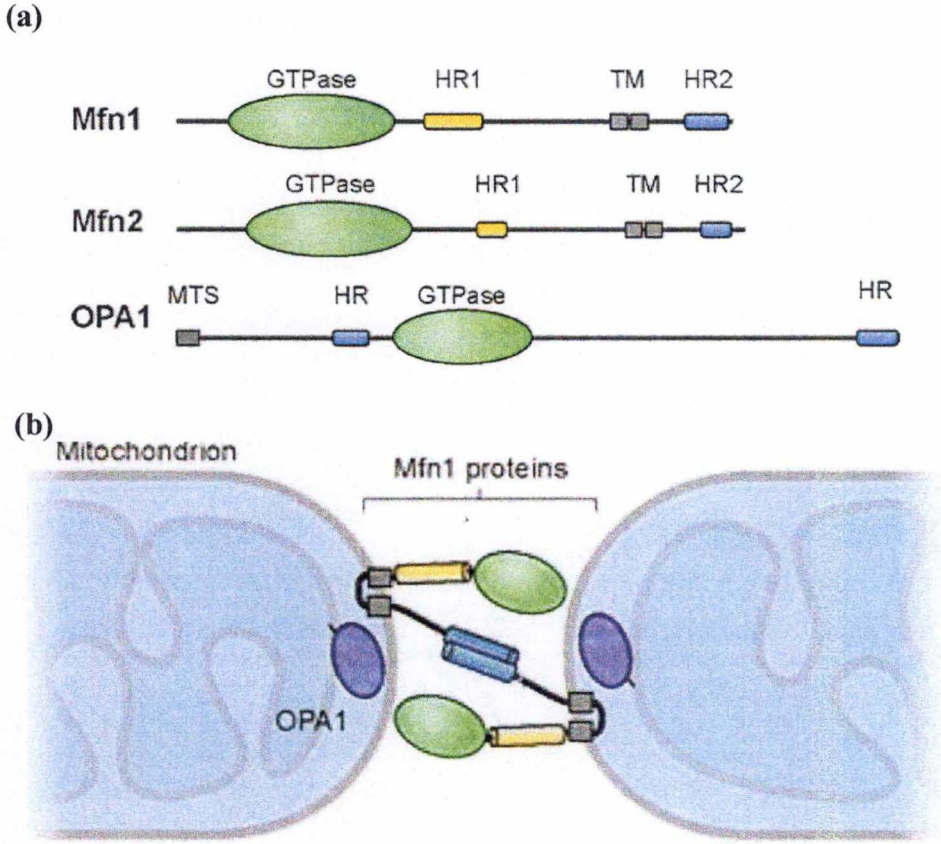


Figure 1.13 : Représentation des acteurs et des mécanismes impliqués dans la fusion du réseau mitochondrial dans les cellules de mammifères. (a) Les protéines Mitofusine 1 (Mfn1), Mitofusine 2 (Mfn2) et OPA1 contiennent des 3 des domaines GTPase et des régions hydrophobes répétées (HR). Les Mitofusines possèdent en plus un domaine transmembranaire (TM). (b) L'interaction homotypique de 2 protéines Mfn1 permet le rapprochement des 2 membranes mitochondriales externes et leur fusion. OPA1, situé dans l'espace inter-membranaire serait impliqué dans la fusion des membranes interne (d'après Chan 2006).

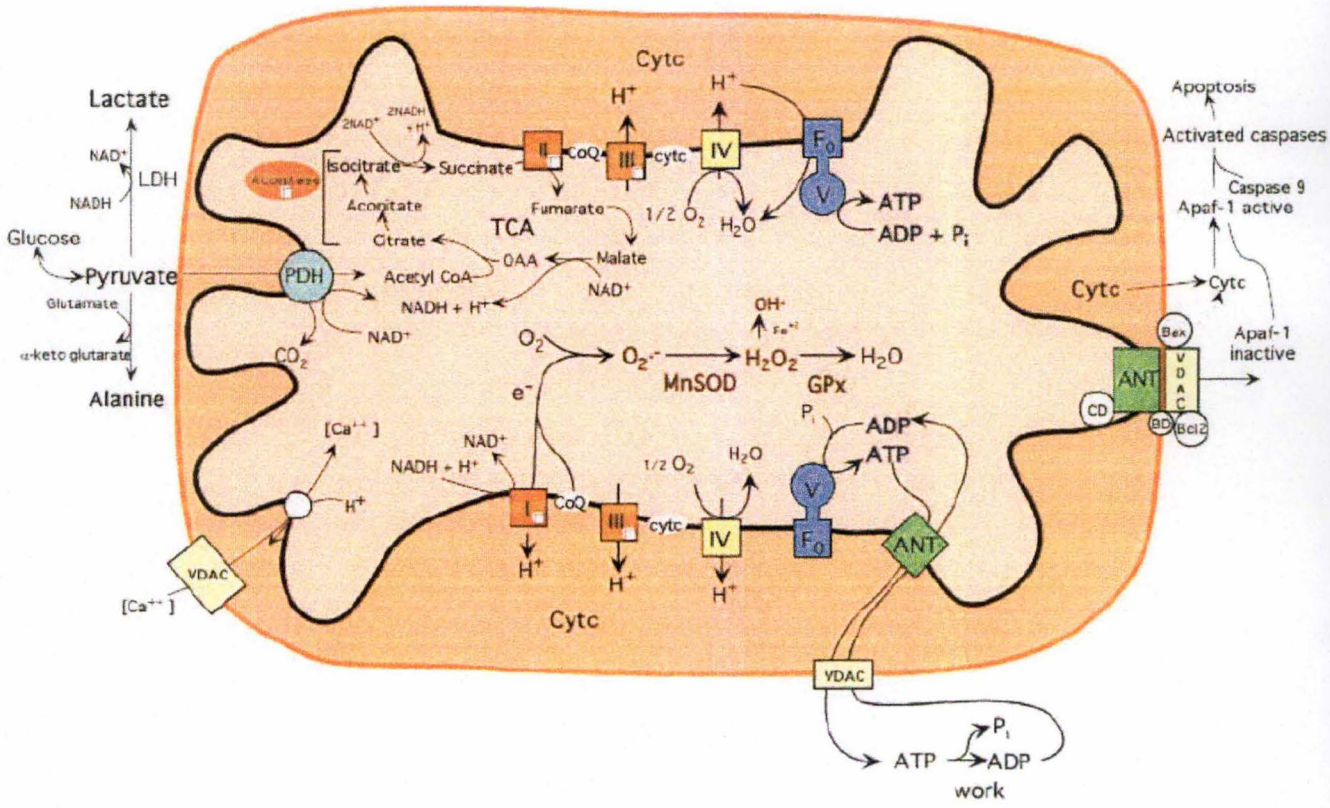


Figure 1.14 : Représentation schématique de la mitochondrie illustrant les relations existant entre les phosphorylations oxydatives, la production d'énergie (ATP), la génération des espèces radicalaires et l'initiation de l'apoptose suite à l'activation du mtPTP (mitochondrial permeability transition pore) formé par le VDAC (Voltage Dependent Anion Channel) , ANT (Adenine Nucleotide Translocator), Bax, Bcl2, le récepteur aux benzodiazépines (BD) et la cyclophiline D (CD). Les complexes constituants la chaîne respiratoire sont également représentés : complexe I (NADH : Ubiquinone oxydoréductase), II (succinate : ubiquinone oxydoreductase), III (ubiquinol : cytochrome c oxydoréductase), IV (cytochrome c oxydase) et V (FoF1-ATP synthase) (Wallace 1999).

1.4 Le découplage mitochondrial et la dédifférenciation adipocytaire

1.4.1 La mitochondrie

1.4.1.1. La structure et morphologie de la mitochondrie

La morphologie, l'abondance, la masse des mitochondries sont très variables en fonction du type cellulaire, de la demande énergétique, du stade du cycle cellulaire, des conditions physio-pathologiques (Duchen 2004). En effet, cet organite peut former un réseau dynamique subissant continuellement des évènements de fusion et de fission dans certains tissus ou encore être présent sous forme d'entités individuelles (Duchen 2004). Dans les cellules de mammifères, les processus de fusion et fission sont sous le control de deux grandes classes de protéines différentes. Les protéines Mfn1 et 2 (*Mitofusine 1 et 2*) et la protéine OPA1 qui sont impliquées dans la fusion du réseau mitochondrial (**Figure 1.13**) et les protéines Drp1 (*Dynamin-Related Protein 1*) et Fis1 impliquées dans le processus de fission (Chan 2006).

Plus généralement, la mitochondrie est un organite comportant deux systèmes membranaires, la membrane externe (MME) et la membrane interne (MMI) pouvant occasionnellement fusionner et former des complexes de jonctions (Duchen 2004) (**Figure 1.14**). Les membranes externe et interne possèdent des compositions biochimiques différentes. La MME est riche en lipides et est relativement perméable à de nombreuses petites molécules comme les ions (calcium, potassium, sodium) grâce à la présence de porines, des protéines formant des canaux à travers la membrane. On y trouve également le complexe TOM (*Translocase of Outer Membrane*) impliqué dans l'importation des protéines mitochondriales (**voir point 1.6.1.2**). Parmi les nombreuses protéines de ce complexe, on retrouve TOM 40, une protéine formant un canal transmembranaire (Neupert and Herrmann 2007). La MMI quant à elle, joue le rôle de barrière majeure entre le cytosol et la matrice mitochondriale et est imperméable. On y trouve de nombreuses protéines dont les complexes respiratoires impliqués dans la phosphorylation oxydative et un grand nombre de canaux spécifiques dont le transporteur ANT (*Adénine Nucléotide Translocase*) servant à l'échange électrogénique de l'ADP contre l'ATP (Berdanier 2001). De plus, la MMI forme les «crêtes mitochondriales», habituellement de longs tubules pouvant être anastomosés et s'invaginant dans la matrice (Duchen 2004). Ces deux membranes délimitent un espace inter-membranaire contenant quant à lui de nombreuses molécules impliquées dans le processus de l'apoptose comme le cytochrome c (McBride, Neuspiel et al. 2006). Enfin, la matrice mitochondriale est un espace aqueux contenant la grande majorité des protéines mitochondriales, dont le nombre total est estimé à environ 1500 (Ryan and Hoogenraad 2007). On y trouve évidemment les nombreuses enzymes impliquées dans différentes voies métaboliques dont la mitochondrie est le siège (comme la β–oxydation des acides gras et le cycle de l'urée) mais également un grand nombre de copies du génome mitochondrial ainsi que les protéines impliquées dans sa maintenance, sa réplication et sa transcription. Ces dernières s'assemblent en structures complexes et dynamiques, «les nucléoïdes» (Ryan and Hoogenraad 2007).

1.4.1.1.2 Les fonctions de la mitochondrie

La mitochondrie est un organite multifonctionnel jouant un rôle central dans de nombreux processus cellulaires comme la synthèse d'ATP, l'apoptose, l'homéostasie du calcium, le cycle de l'urée, la synthèse des acides aminés, la production de monoxyde d'azote et comme nous l'avons déjà mentionné ci-dessus, le métabolisme lipidique (Duchen 2004).

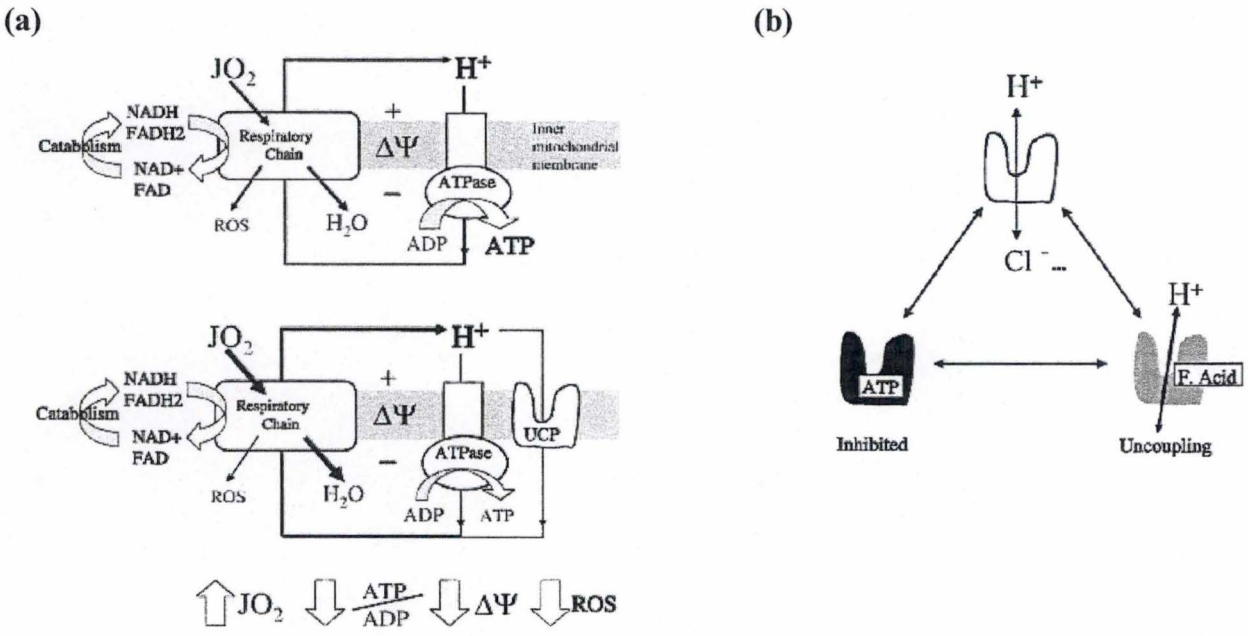


Figure1.15 : **(a)** Représentation schématique de l'effet d'un découpage mitochondrial sur la respiration, la production d'ATP, le potentiel de membrane, la production d'espèces radicalaires. En absence de protéine découplante (UCP), le catabolisme conduit à la réduction des coenzymes NADH et FADH2 qui fournissent les électrons à la chaîne respiratoire de la mitochondrie. Le transport de ces électrons au sein de la chaîne est couplé au transport de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire. Les radicaux libres dérivés de l'oxygène sont produits quand les électrons s'échappent de la chaîne de transporteurs d'élecrons. La FoF1-ATP synthase couple la rentrée des protons dans la matrice mitochondriale à la synthèse d'ATP. Les UCPs offrent une voie alternative aux protons qui n'est pas couplée à la synthèse d'ATP si bien que la consommation en oxygène augmente alors que le ratio ATP/ADP, le potentiel de membrane et la production d'espèces radicalaire diminuent. **(b)** Schéma représentant les 3 états fonctionnels de la protéine découplante UCP1. En absence de ligands (blanc) UCP1 est capable de transporter différents ions. La liaison de nucléotides inhibe ce transport (noir), alors que les acides gras induisent l'activation du transport des protons (gris) (Criscuolo *et al.*, 2006).

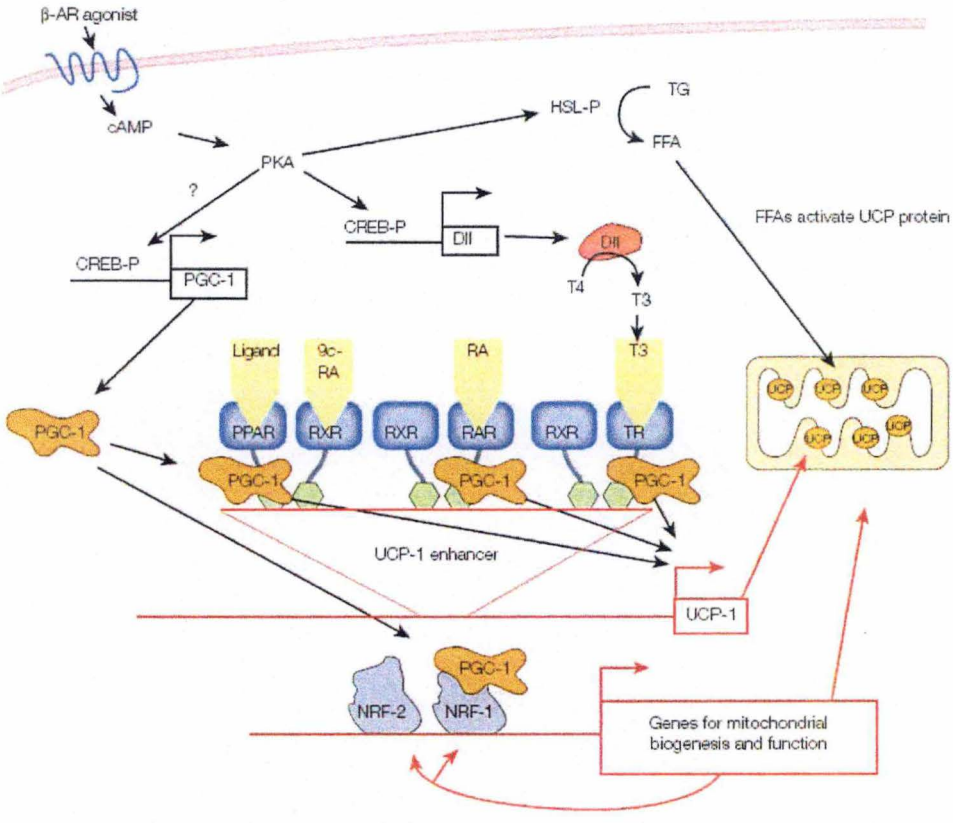


Figure 1.16 : Représentation schématique de l'induction du processus de thermogenèse adaptative dans un adipocyte brun. L'activation du récepteur β–adrénergique induit la production d'AMPc et l'activation de la PKA qui peut phosphoryler le facteur de transcription CREB. CREB induit alors l'expression du co-activateur transcriptionnel PGC-1α et DII (type II thyroxine Deiodinase). PGC-1α co-active les facteurs de transcription situés sur le promoteur du gène codant UCP1 ce qui induit l' expression de la protéine découplante. L'expression est d'autant plus forte que DII augmente la synthèse de triidothyronine (T3), un ligand du récepteur à l'hormone thyroïdienne lui aussi impliqué dans l'expression d'UCP1. PGC-1α co-active également les facteurs de transcription NRF-1 et NRF-2 ce qui conduit à une augmentation de la biogenèse mitochondriale. Enfin la PKA active la HSL (Hormone Sensitive Lipase), ce qui augmente la concentration d'acides gras, susceptibles d'augmenter l'activité de UCP1 (Lowell and Spiegelman, 2000).

Un schéma reprenant les fonctions essentielles de l'organite est présenté à la **figure 1.14.** Rappelons que l'objectif de ce mémoire sera d'étudier certains effecteurs impliqués dans la biogenèse mitochondriale dans des adipocytes soumis à un découplage mitochondrial. Nous allons donc maintenant passer en revue les différents aspects du découplage mitochondrial.

1.4.2 Les protéines découplantes (UCPs)

Les UCPs sont des protéines de la membrane mitochondriale interne d'environ 32 kDa appartenant à la superfamille des transporteurs mitochondriaux. A ce jour, six homologues ont été découverts dont 5 sont exprimés chez les mammifères. Ces protéines sont exprimées à des niveaux divers et présentent, à l'exception d'UCP-2, une expression tissulaire spécifique. En effet, alors que la protéine découplante UCP1 est exprimée dans le tissu adipeux brun et le thymus (Porter 2006), UCP3 est spécifiquement exprimée dans les cellules musculaires. Par contre, UCP4 et UCP5 sont exclusivement exprimées dans le cerveau. Seule la protéine UCP2 est exprimée de manière ubiquiste (Krauss, Zhang et al. 2005). L'activité des UCPs est régulée par la liaison de ligands qui peuvent, selon les cas, inhiber ou activer leur activité. Alors que les acides gras sont de puissants activateurs des UCPs et que l'anion superoxide ($O_2^{\cdot-}$) peut également activer le découplage mitochondrial, les nucléotides puriques inhibent l'activité de ces protéines (Dlaskova, Spacek et al. 2006). Cette inhibition dépend, en partie, de l'état d'oxydo-réduction du coenzyme Q9 (Sluse, Jarmuszkiewicz et al. 2006). Les UCPs peuvent donc exister sous trois stades fonctionnels différents qui sont repris à la **figure 1.15**.

La protéine découplante UCP1 est une protéine impliquée dans le processus de la thermogenèse adaptative dans le tissu adipeux brun (**Figure 1.16**). Ce phénomène consiste en une production de chaleur en réponse à une stimulation du tissu adipeux par le système nerveux sympathique. Mécanistiquement, ce processus implique une biogenèse mitochondriale, une augmentation de l'oxydation des acide gras ainsi que l'expression de la protéine découplante UCP1 à un niveau élevé et pendant une période prolongée (Porter 2006). Le(s) rôle(s) des protéines découplantes UCP2 et UCP3 est encore sujets à débat bien que, contrairement à UCP1, elles ne soient pas impliquées dans la thermogenèse. UCP2 est un transporteur mitochondrial qui régule la production d'espèces radicalaires et dont l'expression est fortement inductible et contrôlée au niveau traductionnel (Rousset, Mozo et al. 2007). Les données actuelles montrent que cette protéine pourrait être impliquée dans le métabolisme de la glutamine, puissant inducteur de l'expression d'UCP2 (Criscuolo, Mozo et al. 2006). Enfin, le rôle d'UCP3 dans la régulation de la production d'espèces radicalaires est moins bien connu. En effet, sa surexpression dans des cellules musculaires n'a que peu d'effets sur la production de ROS (Duval, Camara et al. 2007). Cependant, dans ce type cellulaire, UCP3 pourrait jouer le rôle d'uniporteur à pyruvate bien que cette hypothèse reste encore à confirmer (Criscuolo, Mozo et al. 2006).

Il existe maintenant un grand nombre de molécules comme le DNP (*Dinitrophénol*), les benzimidazoles, les phénylhydrazones et le FCCP (*CarbonylCyanide-p-trifluorométhoxyphenylhydrazone*) qui sont connues pour jouer un rôle analogue à celui des UCPs et découplent la mitochondrie. La plupart de ces molécules sont des acides faibles hydrophobes possédant une action protonophore, (capacité de transporter des protons à travers des membranes imperméables) (Terada 1990). En présence de ces composés, les protons expulsés dans l'espace intermembranaire mitochondrial lors du transfert des électrons dans la chaîne respiratoire peuvent donc diffuser de manière passive vers la matrice. L'oxydation des substrats est alors accompagnée d'une plus faible phosphorylation de l'ADP en ATP (moindre

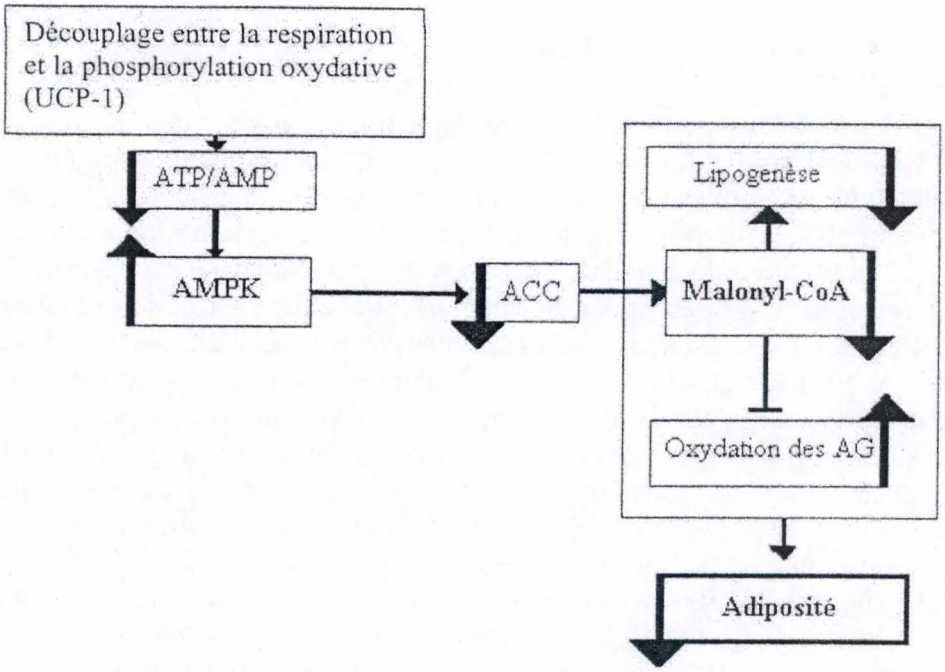


Figure 1.17: Représentation schématique des mécanismes impliqués dans la diminution de l'adiposité suite à un découplage mitochondrial par l'UCP1. La surexpression d'UCP1 induit une diminution du ratio ATP/AMP, ce qui active l'AMPK. L'AMPK phosphoryle alors l'ACC (Acetyl-CoA Carboxylase) ce qui inactive cette enzyme et induit une diminution de la concentration en malonyl-CoA, un inhibiteur allostérique de la CPT-1 (Carnitine-Palmitoyl Transferase-1) point de control essentiel à l'entrée de tous les acides gras dans la mitochondrie. La lipogenèse est inhibée et l'oxydation des acides gras est favorisée dans les adipocytes en réponse au découplage (d'après Rossmeisl *et al.*, 2004)

efficacité de la phosphorylation oxydative), ce qui se traduit par un stress énergétique (Kuruvilla, Qualls et al. 2003).

Dans une cellule adipeuse 3T3-L1, ce stress énergétique se traduit par une modification phénotypique que nous appellerons dans la suite de ce travail «*dédifférenciation adipocytaire*». La dédifférenciation adipocytaire est un processus pouvant être défini comme la modification phénotypique d'une cellule adipeuse (spécialisée), se manifestant essentiellement par une réduction, même partielle, de la quantité de lipides et une diminution de l'expression de marqueurs spécifiques des adipocytes (Song, Kim et al. 2007). Ce programme, tout comme la différenciation, est donc probablement le résultat de changements dans le niveau d'expression et d'activité des effecteurs de la différenciation comme PPARγ et/ou l'activation d'autres facteurs. Cela se traduit par une modification de l'expression de leurs gènes cibles. À ce jour, il a été démontré que plusieurs cytokines pro-inflammatoires comme le TNFα (Petruschke and Hauner 1993), l'IL-6 (Coppack 2001) et plus récemment, l'oncostatine M, une cytokine produite par les monocytes et les lymphocytes T (Song, Kim et al. 2007) inhibent non seulement la différenciation des pré-adipocytes mais induisent également le processus de dédifférenciation d'adipocytes matures.

Nous allons maintenant donner quelques informations fragmentaires sur les mécanismes impliqués dans la dédifférenciation adipocytaire induite par un découplage mitochondrial, un phénomène encore mal compris, avant de terminer par ce qui est actuellement le mieux décrit dans la littérature à propos des mécanismes impliqués dans la dédifférenciation des adipocytes induite par une cytokine proinflammatoire, TNFα.

1.4.3 Le découplage mitochondrial et la dédifférenciation adipocytaire

La dédifférenciation adipocytaire induite par des molécules découplantes comme le FCCP est peu étudiée et les mécanismes sont encore peu connus. Cependant, le déficit énergétique résultant de la diminution de la production d'ATP entraîne l'activation de l'AMPK (AMP-activated protein kinase), une Serine/Thréonine kinase hétéotrimérique constituée d'une sous-unité α catalytique et de deux sous-unités régulatrices β et γ qui est activée suite à une augmentation du ratio AMP/ATP (**Figure 1.17**). L'AMPK protège la cellule d'un manque d'énergie en stimulant les voies permettant d'augmenter la production d'énergie comme la β-oxydation des acides gras dans la mitochondrie et en réprimant celles qui en consomment comme la lipogenèse et la synthèse des protéines (Daval, Foufelle et al. 2006). De plus, cette enzyme a un impact négatif sur le processus de différenciation adipocytaire et sur le maintien du phénotype différencié en régulant négativement la traduction des facteurs de transcription PPARγ et C/EBPα (Dagon, et al. 2006). A notre connaissance, il n'existe qu'une seule étude dans la littérature traitant des effets du FCCP sur le métabolisme des adipocytes blancs 3T3-L1 (Sun and Zemel, 2003). Ces auteurs montrent que les effets du découplage par le FCCP sont complexes. En effet, ils montrent des actions antagonistes du FCCP sur la lipolyse qui serait inhibée par un mécanisme dépendant du calcium et la synthèse des acides gras, elle aussi réprimée, suite à une diminution de l'activité de la FAS (Sun and Zemel , 2003). En conclusion, la lipogenèse et la lipolyse ne sont donc pas toujours des processus coordonnés en vue d'une augmentation ou d'une diminution globale de la quantité de TG dans les adipocytes.

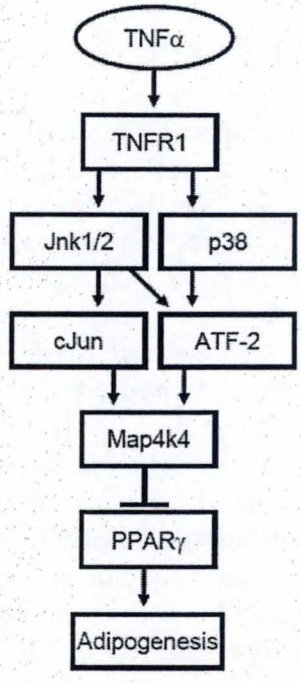


Figure 1.18 : Schéma reprenant l'effet de la protéine Map4k4 sur l'expression de PPARγ dans des cellules stimulées par le TNFα. Le TNFα induit l'activation des voies de la JNK1/2 et p38MAPK qui, à leur tour induisent la phosphorylation des facteurs de transcription cJun et ATF-2. Ces deux facteurs de transcription induisent alors l'expression du gène codant la Map4k4 qui régule négativement l'expression du facteur de transcription PPARγ (Tesz *et al* 2007).

1.5 La dédifférenciation adipocytaire induite par le TNFα

1.5.1 La cytokine TNFα

Le TNFα est une cytokine pro-inflammatoire synthétisée sous la forme d'un précurseur membranaire de 26 kDa et libérée dans la circulation sanguine sous la forme d'une protéine soluble de 17 kDa suite à un clivage par une métalloprotéase (Chae and Kwak 2003). Le TNFα, qui est produit par les macrophages activés mais également par les adipocytes matures, est responsable de la *cachexie*, un état rencontré chez des personnes atteintes d'infections sévères, de traumatismes ou de cancers et qui se caractérise par une diminution des masses adipeuses musculaires et de l'anorexie (Ryden, Arvidsson et al. 2004). Cette cytokine a des effets pléiotropiques dans l'organisme et est notamment impliquée dans l'induction de l'apoptose des cellules tumorales, des réponses inflammatoires et immunes mais joue également un rôle clé dans le développement de l'obésité, la résistance à l'insuline ainsi que le diabète de type II. De plus, les adipocytes hypertrophiés sont caractérisés par une hyperproduction de TNFα qui, par son effet auto- et paracrine, induit la synthèse et la sécrétion d'autres cytokines pro-inflammatoires. Ces molécules chémoattractantes comme l'IL-6 et le MCP-1 seraient alors responsables du recrutement de macrophages au sein du tissu adipeux renforçant ainsi la composante inflammatoire dans le tissu (Xu, et al. 2003). Les effets du TNFα sont médiés par deux récepteurs distincts, TNF-R1 et TNF-R2 qui forment des complexes multimériques en membrane plasmique des cellules de mammifères et qui activent différentes voies de signalisation suite à leur activation par la cytokine. Le récepteur de type 1 (TNFR-1) médie la plupart des effets du TNFα dans les cellules 3T3-L1 et est le seul à lier le TNFα d'origine humaine que nous avons utilisé au cours de notre travail (Stephens, Lee et al. 1997).

1.5.2 Mécanismes responsables des changements d'expression génique dans les adipocytes matures stimulés par le TNFα

Le TNFα diminue l'expression de nombreux gènes dans les adipocytes 3T3-L1. Parmi ceux-ci, on trouve des facteurs de transcription indispensables à la différenciation adipocytaire ainsi qu'au maintien du phénotype différencié comme PPARγ, RXRα et CEBPα. L'effet de cette cytokine serait médié par l'activation du facteur de transcription NF-κB (Ruan, Hacohen et al. 2002) mais également par la protéine MAP4K4 NIK (*Mitogen-Activated Protein 4 Kinase 4/nck Interacting Kinase*) dont l'expression est régulée par le TNFα (Tesz, Guilherme et al. 2007) (**Figure 1.18**). Par ailleurs, le TNFα active également la MEK1/2 et donc la voie des p42/p44 MAPK qui phosphorylent PPARγ dans son domaine de liaison à l'ADN (Arner 2005). Ce dernier ne peut donc plus se lier à sa séquence consensus dans le promoteur de ses gènes cibles. A travers son action sur l'activité de ces facteurs, le TNFα est donc capable d'induire une diminution de l'expression des gènes codant pour la FAS mais également l'expression des gènes codant pour Glut4, un transporteur au glucose, la HSL et la périlipine (Ryden, Arvidsson et al. 2004). Au contraire, le TNFα induit l'expression de gènes normalement exprimés dans les pré-adipocytes comme Pref-1, un régulateur négatif de l'adipogenèse (Ruan, Hacohen et al. 2002). En plus de son action inhibitrice globale sur la synthèse des acides gras et donc des TG, le TNFα stimule également la lipolyse (Ryden, Arvidsson et al. 2004).

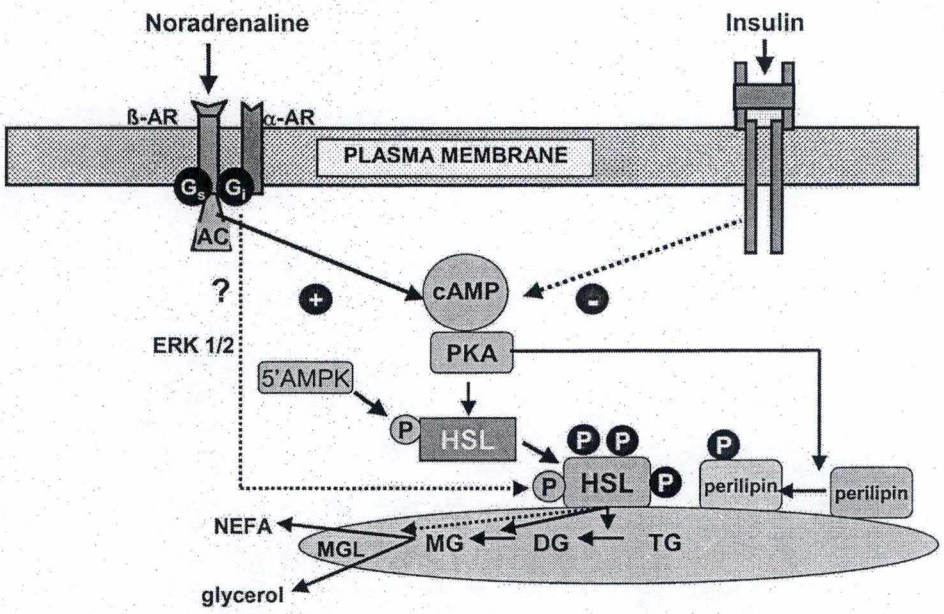


Figure 1.19 : Mécanisme responsables de l'activation de la lypolise par les agonistes des récepteurs β3-adrénergique et l'insuline. L'activation des récepteurs adrénergiques couplés aux protéines Gs, stimule la production d'AMPc par l'AC (adenylate cyclase), ce qui active la PKA. Celle-ci phosphoryle ensuite la HSL et la périlipine A ce qui permet la translocation de la HSL à la surface des vésicules de TG. Trois hydrolases successives libèrent alors le glycerol et les acides gras (NEFA : Non Esterified Fatty Acid). Les effets de la phosphorylation de la HSL par les ERK (Extracellular Signal-Regulated Kinase) sont encore débattus. DG : diacylglycérol, MG : monoacylglycérol, MGL ; monoglyceride lipase (Holm, 2003)

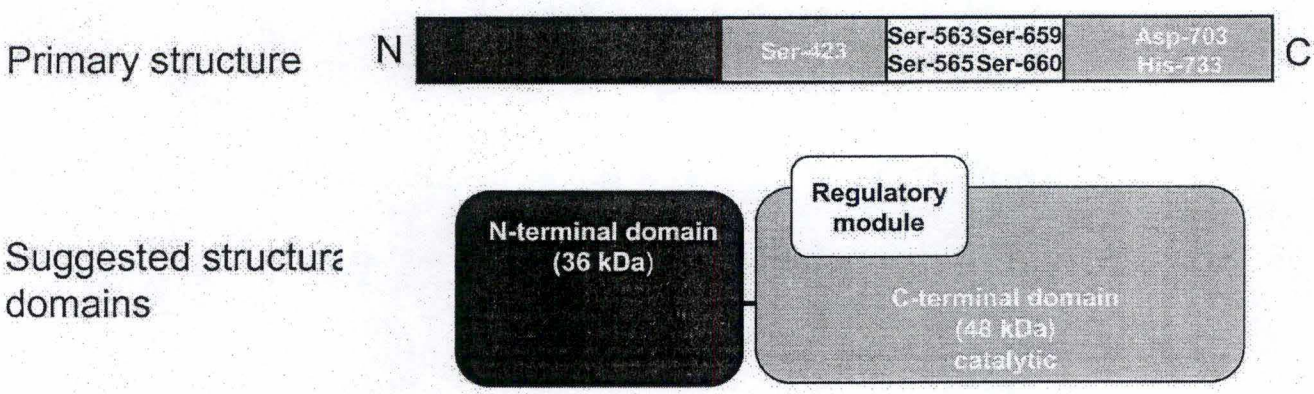


Figure 1.20 : Structure schématique de l'enzyme HSL de rat. Les 320 acides aminés du domaine NH2-terminal de la HSL forment une structure globulaire encore mal définie. L'extrémité C-terminale forme une hydrolase de structure α/β à l'intérieur de laquelle se trouve la triade impliqués dans la formation du site catalytique Ser-423, Asp-703 et His-733. On y trouve le module régulateur contenant des résidus sérines pouvant être phosphorylés par les différentes kinases (d'après Holm, 2003).

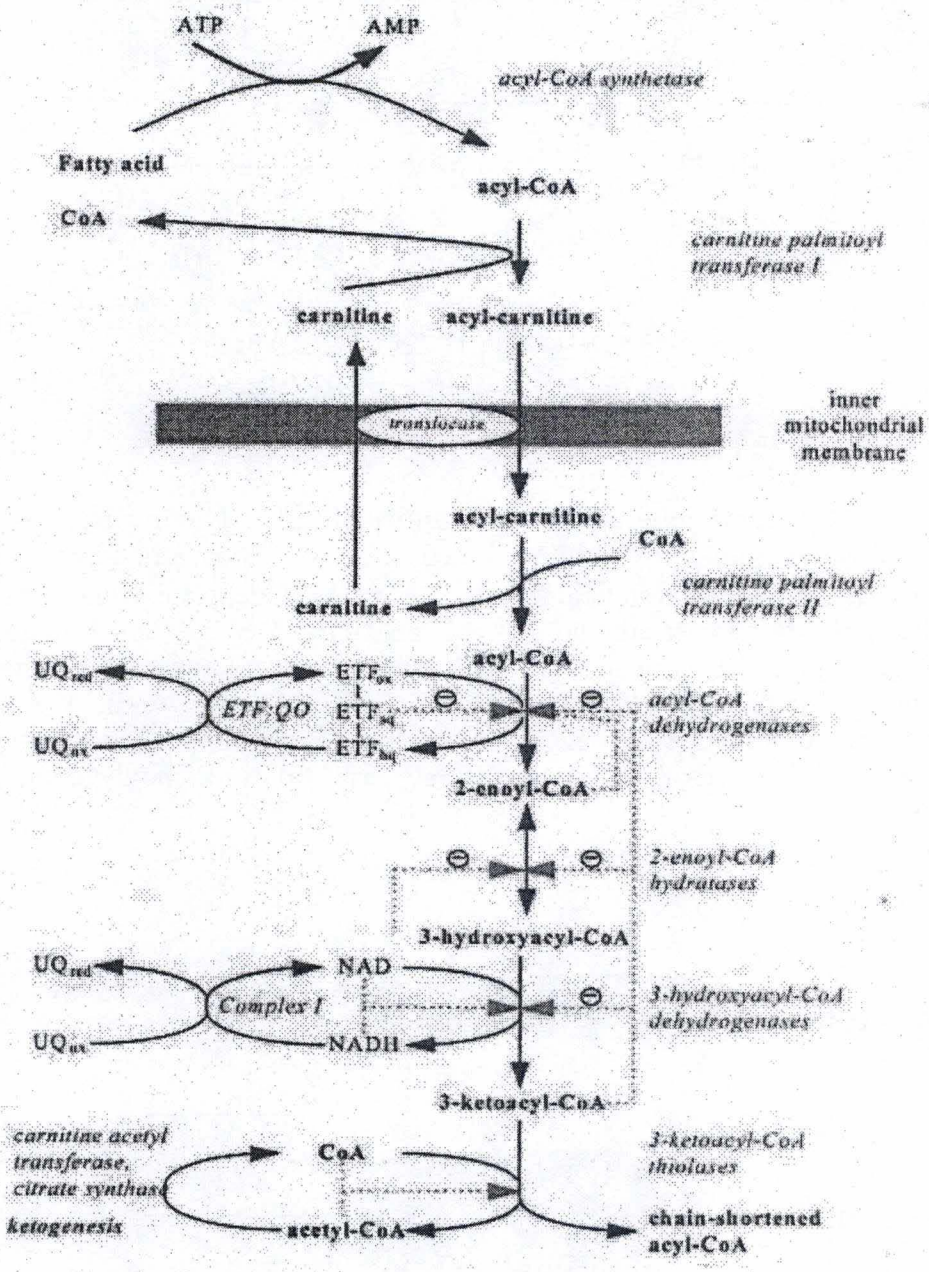


Figure 1.21 : Schéma reprenant les différentes étapes de la β-oxydation des acyl-CoA dans la mitochondrie. La β-oxydation est une voie métabolique cyclique qui débute avec une première oxydation de l'acyl CoA sur le carbone β catalysée par l'acyl-CoA déshydrogénase. Cette réaction est suivie d'une hydratation par l'enoyl-CoA hydratase d'une seconde oxydation par l'hydroxyacyl-CoA déshydrogénase et se termine par le clivage d'un acétyl-CoA par la thiolase (Bartlett et Eaton 2004).

1.5.2.1. La lipolyse

Le mécanisme le mieux connu régulant la mobilisation des acides gras à partir de triglycérides est la lipolyse, voie canonique activée par l'AMPc. Des neurotransmetteurs ou des hormones comme les catécholamines stimulent la lipolyse dans les adipocytes en se liant à leurs récepteurs de type β3-adrénergique. Ces récepteurs sont couplés à des protéines G de type Gs (stimulation) qui lient et hydrolysent le GTP en GDP (**Figure 1.19**) (Carmen and Victor 2006). La protéine Gs peut alors stimuler l'adénylate cyclase et augmenter ainsi la production d'AMPc dans la cellule adipocytaire. La PKA, une fois activée par l'augmentation de la concentration en AMPc, phosphoryle et active la HSL sur des résidus Ser-565, Ser-559 et Ser-563 contenus dans un motif de régulation de l'activité de l'enzyme (**Figure 1.20**) (Su, Sztalryd et al. 2003). Cette triple phosphorylation induit la translocation de l'enzyme vers les vésicules lipidiques spécifiquement entourées de la périlipine A (Granneman, Moore et al. 2007). Les périlipines sont des phosphoprotéines dont les isoformes A et B, particulièrement exprimés dans les adipocytes, sont associées aux gouttelettes lipidiques. Elles ont longtemps été considérées comme une simple barrière entre le cytosol et les gouttelettes lipidiques mais sont maintenant décrites comme une cible de la PKA et seraient impliquées dans le recrutement de la HSL (Granneman, Moore et al. 2007). Ces protéines phosphorylées joueraient également un rôle dans l'activation de l'ATGL (*Adipose Triglyceride Lipase*) (Granneman et al., 2007), une lipase récemment identifiée catalysant la première étape du catabolisme des triglycérides en hydrolysant la première liaison ester, libérant ainsi des diglycérides (Kralisch, Klein et al. 2005).

La HSL peut également être phosphorylée sur les Ser-560 et la Ser-565 par d'autres kinases comme les kinases p42/p44 MAPK, l'AMPK, la GSK et la CaMKII (Carmen and Victor 2006). Ces phosphorylations inhibent l'activité de la HSL et auraient donc un effet anti-lipolytique (Roepstorff, Vistisen et al. 2004).

Une fois cette étape terminée, les acides gras peuvent être ré-esterifiés et servir à la synthèse de phospholipides ou subir une activation. Celle-ci nécessite la formation d'un lien thioester entre le carboxyle de l'acide gras et le groupement thiol du coenzyme A. Cette réaction est catalysée par *l'Acyl-CoA Synthase (ACS)*. L'acyl-CoA ainsi formé doit ensuite être importé dans la mitochondrie par les systèmes CPT1 et 2 (*Carnitine Palmitoyl Transferase)* pour y subir *la* β–oxydation proprement dite. Ce processus métabolique est détaillé à la **figure 1.21.**

1.5.2.1.2 La lipolyse induite par le TNFα

Dans les adipocytes 3T3-L1, la stimulation de la lipolyse induite par le TNFα n'est visible qu'après 6 ou 8 h et dépend, partiellement du moins, des modifications de l'expression génique et d'une inhibition des voies activées par l'insuline (Ryden, Arvidsson et al. 2004). En effet, le TNFα induit la résistance à l'insuline par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes. Dans des adipocytes 3T3-L1, cette cytokine induit l'activation de la voie de la JNK1 (C-Jun NH2-Terminal Kinase-1) et la phosphorylation du récepteur à l'insuline sur la Ser-307, ce qui inhibe son activité (Rui, Aguirre et al. 2001). De plus, le TNFα conduit à la répression des gènes codant les protéines GLUT4 et IRS-1 (Stephens, Lee et al. 1997). Par ailleurs, le TNFα inhibe également l'expression du gène codant la kinase Akt et induit la dégradation de cette protéine par le protéasome 26S (Medina, Afsari et al. 2005). La PD3B, dont le rôle est d'hydrolyser l'AMPc, sera donc moins activée par Akt. L'AMPc qui s'accumule conduira alors à l'activation de la PKA, de la HSL et à la stimulation de la

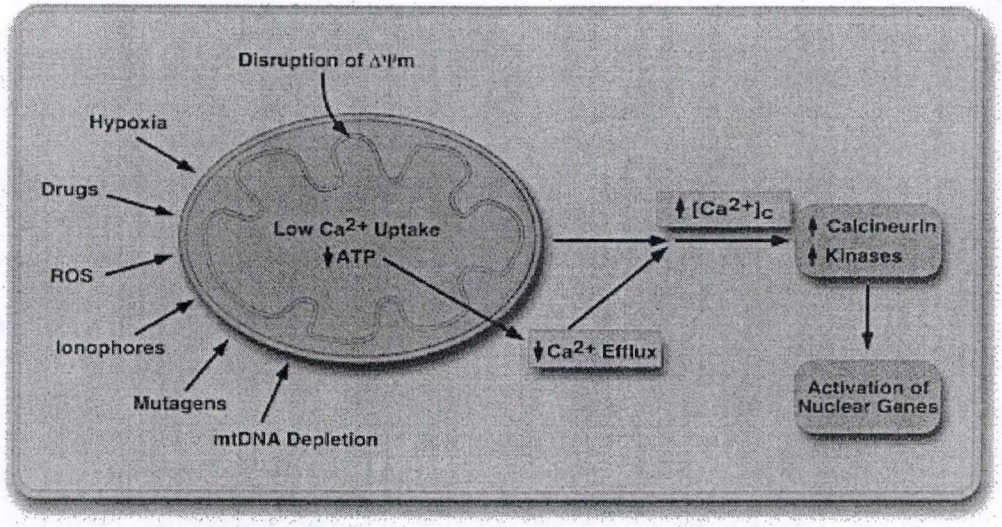


Figure 1.22 : Différentes conditions susceptibles de conduire à un dysfonctionnement mitochondrial et une augmentation de la concentration en calcium cytosolique libre. L'augmentation de Ca^{2+} induit l'activation de kinases et de phosphatases comme la calcineurine dépendantes du calcium et donc à une modification de l'expression de gènes cibles (Biswas *et al.*, 2005).

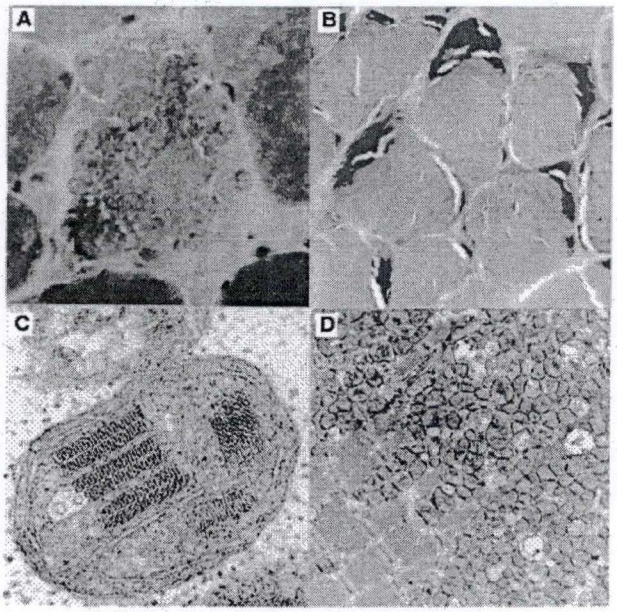


Figure 1.23 : Micrographies (A et B) de fibres musculaires squelettiques colorées au Gomori ayant l'apparence RRF (ragged-red fibers) et microscopies électroniques (C et D) de mitochondries anormales ayant des inclusions paracristallines qui illustrent la myopathie mitochondriale chez l'homme et la souris. (A) et (C) proviennent d'une biopsie de muscle squelettique prélevé chez un patient souffrant du syndrome MERRF (myoclonic epilepsy and ragged-red fibers) causé par une mutation dans le gène codant l'ARNt-lys du génome mitochondrial. (B) et (D) proviennent de muscles squelettiques prélevés chez une souris atteinte de la myopathie mitochondriale et de cardiomyopathie hypertrophique résultant d'une inactivation ciblée du gène codant l'isoforme ANT1 (adenine nucleotide translocator 1), isoforme exprimée spécifiquement dans le muscle et le cœur (Wallace, 1999)

lipolyse. De plus, le TNFα réprime l'expression du gène codant la périlipine A et induit sa phosphorylation à travers la voie de la p42/p44 MAPK.

Signalons enfin que le TNFα exerce également ses effets sur la mitochondrie dans les adipocytes. Dans ce type cellulaire, il inhibe non seulement la biogenèse mitochondriale mais par des mécansimes qui sont encore peu connus, induit la production de ROS (*Oxygen Reactive Specie*) par cette organite (Houstis, Rosen et al. 2006). Or, un dysfonctionnement mitochondrial induit une réponse rétrograde vers le noyau et la modification de l'expression de certains gènes. Nous allons donc continuer cette introduction en détaillant ce mécanisme (Biswas, Guha et al. 2005).

1.6 Dysfonctionnement mitochondrial et biogenèse mitochondriale

1.6.1 La communication rétrograde entre la mitochondrie et le noyau initiée par un dysfonctionnement mitochondrial

Il est connu qu'un dysfonctionnement mitochondrial active des voies de signalisation au sein de la cellule pouvant conduire à une modification de l'expression de certains gènes entrainant souvent une réponse adaptatrice. Les stress peuvent prendre différentes formes (**Figure 1.22**) mais provoquent bien souvent une diminution du potentiel de membrane de l'organite (Biswas et al., 2005). De plus, la diminution de l'activité mitochondriale provoque une augmentation de la concentration en calcium cytosolique libre résultant de l'activation des canaux au calcium dépendant du voltage membranaire (VGCC : Voltage-Gated Calcium Channel). Ce messager secondaire peut alors activer des kinases comme certaines PKCs (*protein kinase C α, β1, β2 et γ*), les CaMKs II et IV (Arnould, Vankoningsloo et al. 2002) et les MAPK (Biswas, Guha et al. 2005) mais également des phosphatases comme la calcineurine (Dolmetsch, Lewis et al. 1997). Ces enzymes modifient alors l'activité de facteurs de transcription comme CREB, ATF2 (*Activated Transcription Factor-2*) et NF-kB et donc l'expression de leurs gènes cibles (Arnould, Vankoningsloo et al. 2002; Biswas, Guha et al. 2005). Il est intéressant de noter que, parmi les gènes différentiellement exprimés en réponse à un dysfonctionnement mitochondrial, on retrouve des gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales mais également l'activation de régulateurs impliqués dans la biogenèse mitochondriale comme le facteur de transcription CREB ou NRF-1 (Mercy, Pauw et al. 2005; Desquiret, Loiseau et al. 2006). Ajoutons encore que dans de nombreuses pathologies mitochondriales, les mitochondries s'accumulent dans les cellules en réponse au dysfonctionnement de l'organite (**Figure 1.23**) (Wallace 1999). En effet, dans les syndromes CPEO (*chronic progressive external ophtalmopelia*), MELAS (*mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes*), et MERRF (*myoclonic epilepsy ragged red fibers*), respectivement causés par des délétions, des mutations ponctuelles dans l'ARNt^{Leu} et l'ARNt^{Lys}, on retrouve une accumulation de mitochondries anormales (Wallace 1999). Ces données suggèrent donc que le dysfonctionnement mitochondrial conduit à augmenter la biogenèse mitochondriale.

1.6.2 La biogenèse mitochondriale

La biogenèse mitochondriale est un processus extrêmement complexe qui fait partie intégrante de processus physiologiques répondant à des modifications de l'équilibre « production-demande » énergétique.

De manière générale, la biogenèse mitochondriale est observée lors d'un déficit énergétique qui peut, par exemple, résulter d'une restriction calorique, connue pour allonger l'espérance de vie des organismes (Weindruch, Naylor et al. 1988). La vision actuelle de cette restriction calorique est une diminution de la production de ROS qui s'accompagne pourtant, chez les rongeurs (Lopez-Lluch, Hunt et al. 2006) et les humains (Civitarese, Carling et al. 2007), d'une biogenèse mitochondriale accrue. La meilleure efficience énergétique (définie comme étant l'oxydation des nutriments / énergie stockée pour faire face aux demandes énergétiques) observée dans ces conditions permet de réconcilier une plus grande quantité de mitochondries qui consomment moins d'oxygène (et donc génèrent moins de ROS). L'exercice physique, condition qui peut être mimée expérimentalement par une stimulation électrique de fibres musculaires, est également un puissant inducteur de la biogenèse mitochondriale dans les cellules musculaires. L'effet sur la population mitochondriale dépend du type d'activité contractile (résistance ou endurance) et aboutit également à une modification de la composition en protéines de l'organite (Hood, Irrcher et al. 2006). Bien que longtemps considérées comme indépendantes du cycle cellulaire, la biogenèse mitochondriale et la dynamique du réseau mitochondrial semblent également être augmentées au cours de la division cellulaire (Lee, Kim et al. 2007). En effet, ces auteurs montrent que la masse mitochondriale par cellule augmente graduellement entre la phase G1/S et la mitose.

Enfin, une augmentation de la biogenèse mitochondriale est également obervée lors de l'adipogenèse. La différenciation adipocytaire s'accompagne en effet d'une augmentation quantitative de la population mitochondriale, mais également de modifications qualitatives de cet organite qui, dans les adipocytes matures, est enrichi en enzymes participant au métabolisme des lipides (Wilson-Fritch, Burkart et al. 2003). Ces modifications qualitatives et quantitatives pourraient être sous le contrôle, du moins en partie, du facteur de transcription PPARγ puisque ces changements sont sensibles aux agonistes de ce facteur appartenant aux thiazolidinediones comme la rosiglitazone). Rappelons que PPARγ est un facteur essentiel de l'adipogenèse qui contrôle également l'expression de nombreux gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales (Wilson-Fritch, Burkart et al. 2003).

La biogenèse mitochondriale met en jeu des événements de fusion-fission, une synthèse et un assemblage de phospholipides constituants les MME et MMI ainsi que la synthèse de protéines codées par des gènes mitochondriaux et nucléaires, ces dernières étant synthétisées dans le cytosol avant d'être importées et éventuellement assemblées au sein des différents complexes. La biogenèse mitochondriale requiert donc la coordination de l'expression des génomes nucléaire et mitochondriaux et une synchronisation de la réplication de l'ADN mitochondrial et de la synthèse des protéines constitutives de l'organite. En effet, la grande majorité des protéines mitochondriales, dont les enzymes impliquées dans la réplication, la transcription et le maintien de l'ADN mitochondrial sont codées dans le génome nucléaire et synthétisées dans le cytosol. L'ADN mitochondrial, quant à lui, ne code que pour 13 sous-unités de la chaîne respiratoire. Tous ces événements nécessitent donc une communication finement régulée et bidirectionnelle entre les deux organites et l'existence de facteurs coordonnant l'expression des gènes codant les protéines mitochondriales.

Deux grandes classes de molécules impliquées dans la biogenèse mitochondriale ont été identifiées. D'une part, des facteurs de transcription se liant à leur(s) séquence(s) consensus présente(s) au sein des promoteurs des gènes cibles et d'autre part des co-activateurs impliqués dans la régulation de la transcription médiée par leur interaction avec les

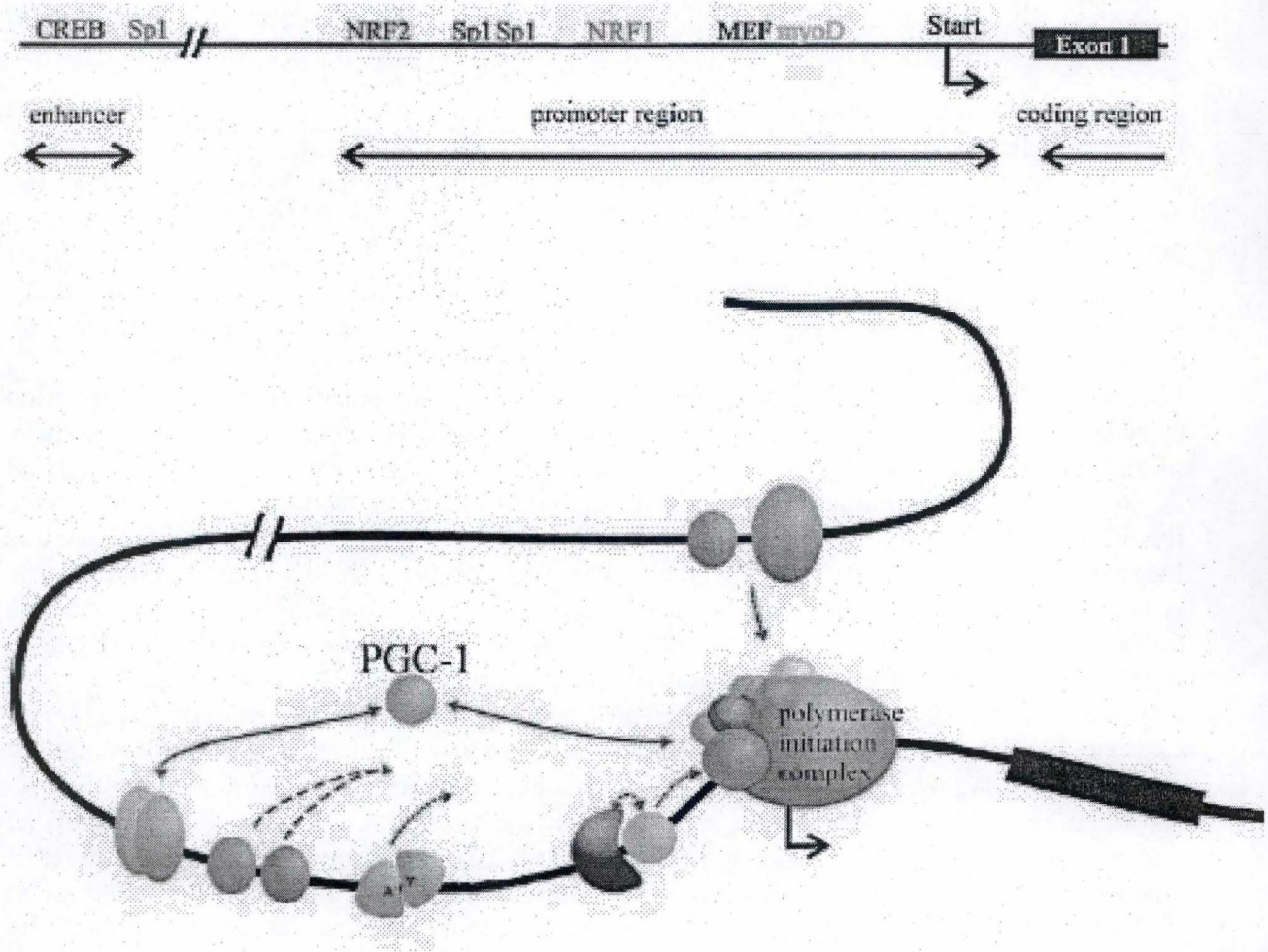


Figure 1.24 : Représentation schématique du promoteur d'un gène nucléaire codant un protéine mitochondriale. La partie supérieure du schéma représente la séquence « type » d'un promoteur d'un gène nucléaire codant une protéine mitochondriale. La partie inférieure illustre les interactions pouvant exister entre les différents effecteurs impliqués. Des facteurs de transcription se lient à leur séquence consensus dans le promoteur du gène cible et activent la transcription en stabilisant le complexe d'initiation de la transcription. Des co-activateurs peuvent influencer la transcription par l'intermédiaire d'interactions avec les facteurs de transcription ou avec le complexe d'initiation de la transcription. Des protéines liées à une grande distance du site d'initiation de la transcription peuvent également réguler la transcription par l'intermédiaire de modification de l'ADN permettant un contact étroit entre ces 2 régions (d'après Goffard et Wiesner, 2003). Sp1 : Special protein1, NRF2 : Nuclear Respiratory factor2, NRF1 : Nuclear Respiratory factor-1, MEF: Myocyte-Specific Enhancer Factors (d'après Goffard et Wiesner, 2003) .

facteurs de transcription ou d'autres co-activateurs. Parmi ceux-ci, de nombreuses études ont montré le rôle prépondérant joué par le co-activateur PGC-1 (PPARγ co-activator-1) (Puigserver, Wu et al. 1998; Puigserver, Adelmant et al. 1999; Lin, Handschin et al. 2005). En effet, comme nous allons l'expliquer dans la suite de cette introduction, cette protéine, par le nombre et la nature des facteurs de transcription avec lesquels elle interagit, est un coordinateur essentiel non seulement de la biogenèse mitochondriale mais également de nombreux processus métaboliques.

1.6.2.1 Régulation transcriptionnelle des gènes nucléaires codant des protéines mitochondriales

La transcription des gènes nucléaires codant des protéines mitochondriales suit le même principe que tous les gènes eucaryotes. Elle est contrôlée au niveau de l'initiation de la transcription par l'interaction du complexe d'initiation comprenant la RNA polymérase II et des douzaines d'autres protéines liant le promoteur du gène cible (Goffart and Wiesner 2003). En général, ceux-ci ne contiennent pas de boîtes TATA et CAAT (**Figure 1.24**) (Garesse and Vallejo 2001). L'étude des promoteurs des gènes codant pour le cytochrome c et la cytochrome c oxydase a permis d'identifier les facteurs de transcription impliqués dans la biogenèse mitochondriale, parmi lesquels on retrouve deux régulateurs essentiels : NRF-1 (*Nuclear Respiratory Factor 1*) et NRF-2 (*Nuclear Respiratory Factor 2*) (**Figure 1.25**). Ces deux facteurs de transcription sont impliqués dans la régulation de l'expression des gènes nucléaires codant pour des sous-unités de la chaîne respiratoire comme les sous unités COXIVc et COXVb de la cytochrome c oxidase, le cytochrome c (Scarpulla 2002), des enzymes impliquées dans la synthèse des groupements hémiques comme la 5-aminolévulinate synthase (Li, Holloszy et al. 1999)et enfin des protéines constitutives des complexes d'importation membranaire comme les protéines TOM 20 et TOM 70 (Blesa, Hernandez et al. 2004; Blesa, Prieto-Ruiz et al. 2007). Ces facteurs jouent donc un rôle prépondérant dans la biogenèse mitochondriale. C'est pour cette raison que nous allons nous y intéresser plus en détail dans la suite de cette introduction avant de présenter d'autres facteurs également impliqués dans le contrôle de l'expression de nombreux gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales comme YY-1 (*Ying Yang-1*) et Sp-1 (*Special Protein-1*) et de mettre en évidence les rôles de certains facteurs de transcription proadipogéniques comme CREB, C/EBPα et PPAR-γ dans ce processus.

1.6.2.1.1 Les facteurs de transcription impliqués dans la biogenèse mitochondriale

Le facteur de transcription **NRF-1** fait partie d'une famille de facteurs de transcription comprenant également P3A2 et EWG (*Erect Wing*) impliqués dans le développement de la drosophile (DeSimone and White 1993). Il est caractérisé par un domaine de liaison à l'ADN situé à son extrémité NH_2-terminale (Gugneja and Scarpulla 1997). L'extrémité COOH-terminale contient une série d'acides aminés hydrophobes qui sont absolument nécessaires pour son rôle d'activateur transcriptionnel (Gugneja, Virbasius et al. 1996). Le facteur NRF-1 a non seulement été décrit pour son rôle dans le contrôle de la transcription des gènes codant 5 unités de la chaîne respiratoire, dont les sous-unités A, B et C du complexe II, les sous-unités IV,Vb et VIIc de la cytochrome c oxidase, le cytochrome c (Garesse and Vallejo 2001), mais il contrôle également l'expression des gènes codant des transporteurs mitochondriaux comme TOM20 et le facteur de transcription mitochondrial Tfam *(Mitochondrial Transcription Factor*) (Goffart and Wiesner 2003). Le facteur de transcription NRF-1 est la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles qui peuvent, selon leur nature, augmenter ou

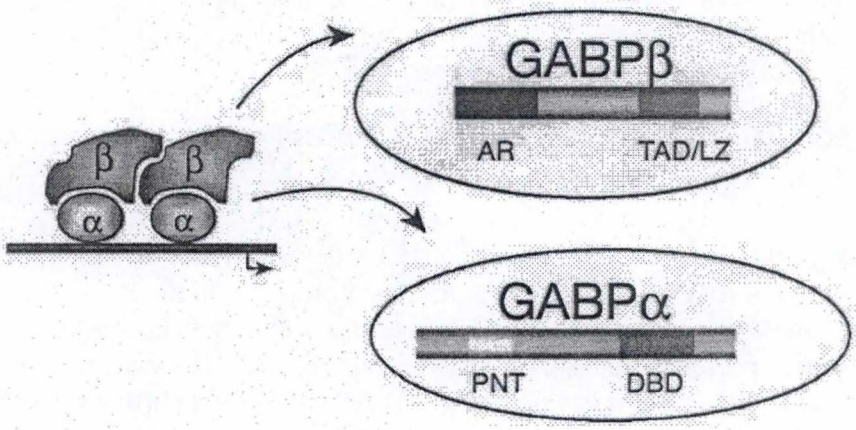


Figure 1.25 : Représentation schématique du facteur de transcription NRF-2. La sous unité GABPβ contient à son extrémité NH2-terminale un domaine ankyrine repeat (AR) qui médie l'interaction avec la sous-unité GABPα et un domaine d'activation transcriptionnel (TAD) ainsi qu'un domaine de type leuzine zipper permettant l'homodimérisation. La sous-unité GABPα contient un domaine de liaison à l'ADN (DBD) à son extrémité COOH-terminale et un domaine PNT (Pointed domain) impliqués dans les interactions protéines protéines (Rosmarin *et al.*, 2003).

diminuer son activité. En effet, ce facteur de transcription peut être phosphorylé par la caséine kinase 2 sur les résidus Ser39, Ser44, Ser46, Ser47 et Ser52, ce qui induit un changement de conformation du dimère et facilite sa liaison à l'ADN. NRF-1 est également un substrat du complexe cycline D1/Cdk 4 kinase qui le phosphoryle sur la Ser47 ce qui diminue son activité de transactivation de gènes cibles (Wang, Li et al. 2006). L'abondance de la cycline D1 coordonne la synthèse de l'ADN nucléaire et les fonctions mitochondriales. Enfin, la kinase Akt phosphoryle NRF-1 sur la Thr-109, ce qui induit sa translocation dans le noyau et augmente l'expression du gène codant la protéine Tfam (Piantadosi and Suliman 2006).

Le facteur de transcription **NRF-2** fait partie d'une famille de facteurs de transcription comprenant près de 30 membres caractérisés par la présence d'un domaine de liaison à l'ADN de type « winged-helix-turn-helix » se liant préférentiellement à des séquences riches en guanine et adénine (GA) situées dans les promoteurs des gènes cibles. (Bush, St Coeur et al. 2003). Le complexe dans lequel NRF-2 est actif est un tétramère composé de deux protéines GABPα et GABPβ. La sous-unité α comporte un domaine de liaison à l'ADN à son extrémité COOH-terminale et permet donc le recrutement du facteur de transcription aux promoteurs des gènes cibles ainsi qu'un domaine d'interaction à la protéine GABPβ (Bush, St Coeur et al. 2003; Blesa and Hernandez-Yago 2006). Outre son rôle dans la biogenèse mitochondriale, ce facteur de transcription est impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire, l'embryogenèse et l'apoptose (Rodriguez-Pena, Escriva et al. 2002). Parmi les gènes impliqués dans la biogenèse mitochondriale et régulés par NRF-2, on trouve plusieurs sous-unités de la cytochrome c oxydase (Ongwijitwat, Liang et al. 2006), de la Fo/F1 ATP synthase (Patton, Block et al. 2006) mais également des sous-unités du complexe TOM comme TOM20 et TOM70 (Blesa, Hernandez et al. 2004; Blesa, Prieto-Ruiz et al. 2007). L'activité de ce facteur peut être augmentée par des modifications post-traductionnelles, comme une phosphorylation activatrice de la JNK-1 qui augmente l'activité du facteur (Hoffmeyer, Avots et al. 1998).

Le facteur de transcription **YY1** est un facteur de transcription ubiquiste et multifonctionnel, membre de la famille des protéines polycomb, qui est caractérisé par la présence de 4 domaines de liaison à l'ADN de type «C_2H_2 doigts de zinc» (Gordon, Akopyan et al. 2006). Outre son rôle dans le contrôle du cycle cellulaire ou l'hematopoiese, YY1 est impliqué dans la régulation d'un certain nombre de gènes codant des protéines mitochondriales dont la sous-unité α de l'ATP synthase (Breen and Jordan 1997) et les sous-unités COXVIIc et COXVb de la cytochrome c oxydase (Basu, Lenka et al. 1997). Signalons que dans les myoblastes, YY1 réprime l'expression de la COXVb. Ce facteur de transcription peut donc selon les cas jouer le rôle d'activateur ou de répresseur de l'expression des gènes cibles.

Le facteur de transcription **Sp1** fait partie d'une famille de facteurs de transcription comprenant également les protéines Sp3 et Sp4. Sp1 est caractérisé par un domaine de liaison à l'ADN de type « doigts de zinc » à son extrémité COOH-terminale (Hagen, Muller et al. 1992). Il est exprimé de façon ubiquiste et est requis pour l'expression d'un grand nombre de gènes dont les gènes nucléaires codant des sous-unités de la chaîne respiratoire comme la sous-unité β de la Fo/F1 ATP synthase (Zaid, Li et al. 1999) mais également d'autres protéines comme l'ANT2 (*Adenine Nucleotide Translocator 2*) (Li, Hodny et al. 1996) et Tfam (Zaid, Li et al. 1999)). Bien que Sp1 soit généralement décrit comme un activateur de la transcription, l'expression de ses gènes cibles dépend fortement du nombre et l'organisation des sites reconnus par la protéine (Li, Hodny et al. 1996). Citons par exemple que l'expression du gène codant la protéine ANT2 est fortement diminuée lors de la liaison de Sp1 à un de ses 3 sites présents dans le promoteur (Li, Hodny et al. 1996). L'activité de Sp1 peut

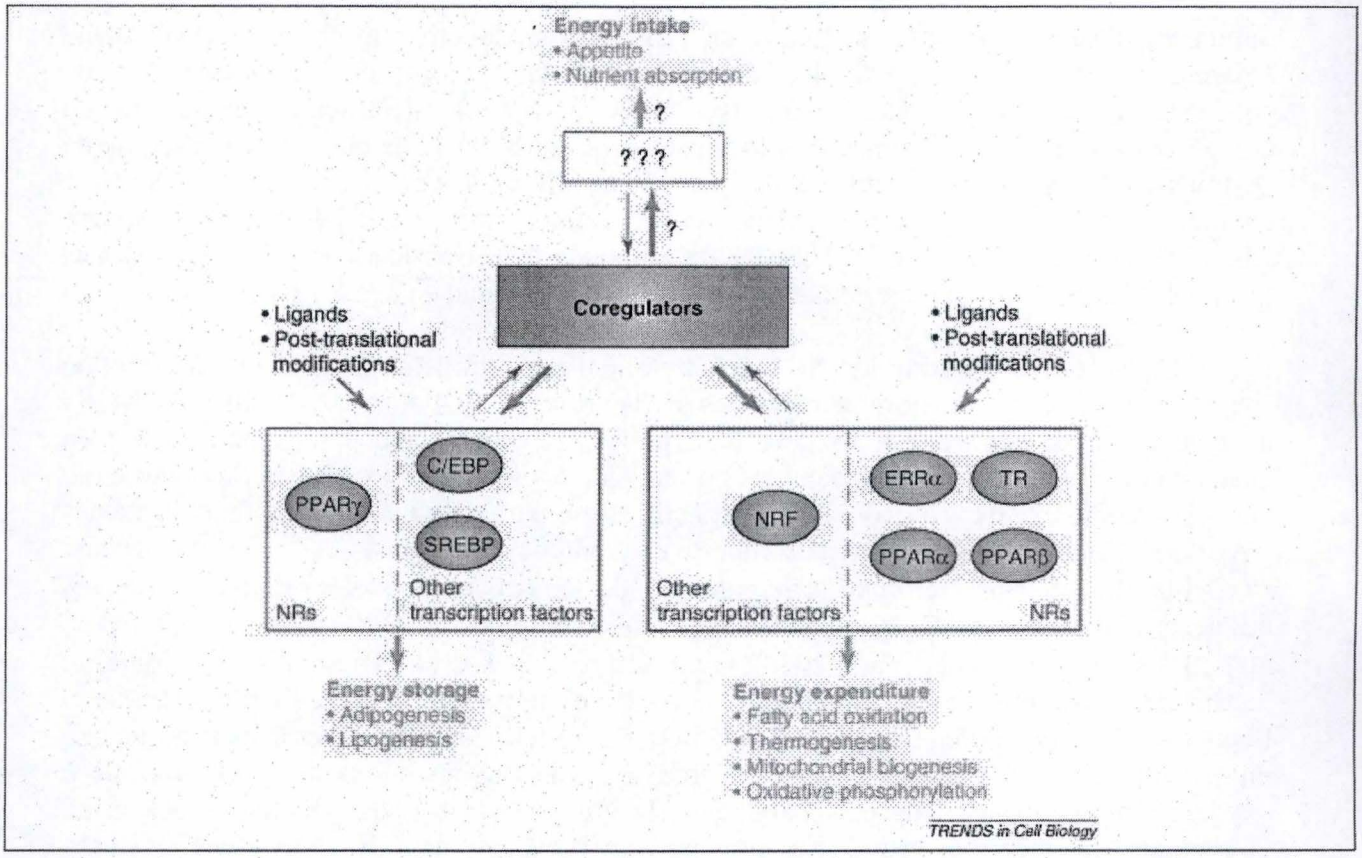


Figure 1.26 : Représentation schématique du rôle des co-activateurs dans le contrôle des processus métaboliques. Les co-activateurs (ou co-régulateurs) affectent le métabolisme en conférant un second niveau de contrôle transcriptionnel. Ils modulent l'activité des facteurs de transcription (en bleu). En effet et influencent les processus métaboliques (orange). Une relation existe entre les co-régulateurs et les facteurs de transcription. Les facteurs de transcription pouvent réguler la transcription des co-activateurs (Feige *et al.*, 2007).

être supprimée par différents mécanismes. En effet, le facteur peut entrer en compétition avec Sp3, un autre membre de sa famille ne possédant pas d'activité transcriptionnelle et se comportant donc comme un dominant négatif endogène pour Sp1 (Hagen, Muller et al. 1994).

Outre les facteurs de transcription NRF-1, NRF-2, YY1 et Sp1, d'autres facteurs de transcription ont été décrits pour leurs rôles potentiels à la fois dans la différenciation adipocytaire et la biogenèse mitochondriale. C'est notamment le cas du facteur de transcription **PPARγ** qui outre son rôle indispensable dans l'adipogenèse (Rosen and MacDougald 2006), est également impliqué dans ce processus. En effet, de nombreux ligands de PPARγ comme le Roziglitazone ou le Pioglitazone connus pour leurs effets antidiabètiques, sont de puissants inducteurs de la biogenèse mitochondriale dans les adipocytes blancs (Bogacka, Xie et al. 2005). D'autre part, des études récentes ont mis en évidence le rôle important joué par certains membres de la famille **C/EBP**. En effet C/EBPα qui, lors de l'adipogenèse induit la transcription des protéines GLUT-4, est indispensable à la biogenèse mitochondriale dans le tissu adipeux brun (Chiu, Lin et al. 2004).

Signalons encore que le facteur de transcription **CREB** est décrit dans la littérature comme étant un régulateur-clé de la transcription du gène codant le cytochrome c (Herzig et Al. , 2000) (Mercy et Al, 2005).

Enfin, le facteur de transcription **ERR-α**, indispensable à la différenciation des cellules 3T3-L1, est également décrit pour son rôle positif dans la biogenèse mitochondriale. ERR-α est un membre de la superfamille des récepteurs « orphelins » faisant partie des récepteurs nucléaires pour lesquels aucun ligand lipidique n'a encore identifié. Le facteur de transcription ERR-α est la cible de la PKCδ qui en le phosphorylant induit sa dimérisation et son activation. ERR-α se lie alors à des séquences ERRE (*Estrogen Related Response Element)* situés dans les promoteurs de ses gènes cibles. Parmi eux, signalons que ERR-α régule l'expression du facteur de transcription NRF-2 dans les cellules musculaires et participe à l'expression de protéines mitochondriales comme Tim22, la sous-unité β de la Fo/F1 ATP synthase et le cytochrome c (Huss, Torra et al. 2004).

1.6.2.1.2 Les régulateurs transcriptionnels

Les facteurs de transcription lient l'ADN de manière spécifique, mais ne possèdent pas la capacité de modifier la chromatine ni de recruter la RNA polymérase II. Ces fonctions sont assurées par d'autres protéines, les co-régulateurs transcriptionnels, qui existent sous forme de complexes multi-protéiques dans le noyau et sont recrutés par les facteurs de transcription (Lin, Handschin et al. 2005). Parmi ces régulateurs, on distingue les co-activateurs, facilitant l'expression génique et les co-répresseurs qui, au contraire, répriment l'expression des gènes cibles. De plus, les co-activateurs sont classés selon leur mécanisme d'action. En effet, certains possèdent une activité enzymatique intrinsèque et exercent leur activité sur la transcription en modifiant la structure de la chromatine et les histones (acétylation, méthylation, déacétylation…). D'autres modifient le repliement de l'ADN, permettant ou non l'accès à la machinerie de transcription. Enfin, une troisième grande classe de co-activateurs comporte des régulateurs qui se lient aux facteurs de transcription et permettent le recrutement de protéines additionnelles dont certaines sont également des co-activateurs (Spiegelman and Heinrich 2004).

Les co-régulateurs confèrent donc un second niveau de spécificité à la réponse transcriptionnelle (**Figure 1.26**) (Feige and Auwerx 2007) et sont d'importants régulateurs de l'homéostasie énergétique. Parmi ces régulateurs CBP/p300 (*CREB Binding Protein /P300*) et TRAP220 (*Thyroid hormone receptor-associated proteins*), indispensables à l'activité de PPARγ sont pro-adipogéniques. D'autres co-régulateurs exercent leurs effets en régulant

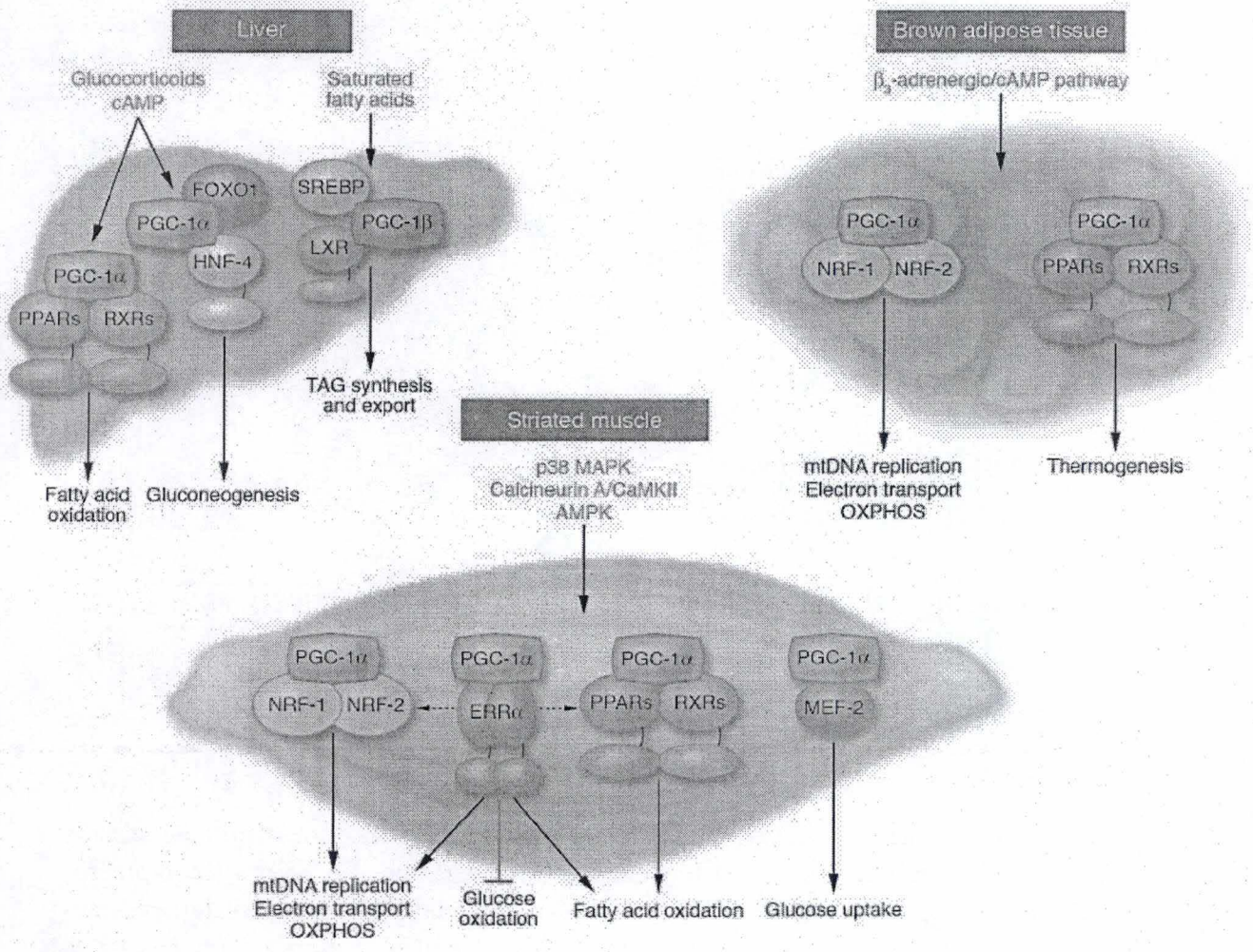


Figure 1.27 : Résumé des différentes fonctions assurées par le co-activateur PGC-1α dans le tissu adipeux brun, le foie et le muscle strié squelettique. Le schéma indique les voies de signalisation aboutissant à l'activation de PGC-1α, les facteurs de transcription impliqués ainsi que les voies métaboliques activées par ce facteur. (Rem : le schéma montre également le rôle particulier que joue l'isoforme PGC-1β dans la synthèse des acides gras dans le foie) (Finck et Kelly, 2006).

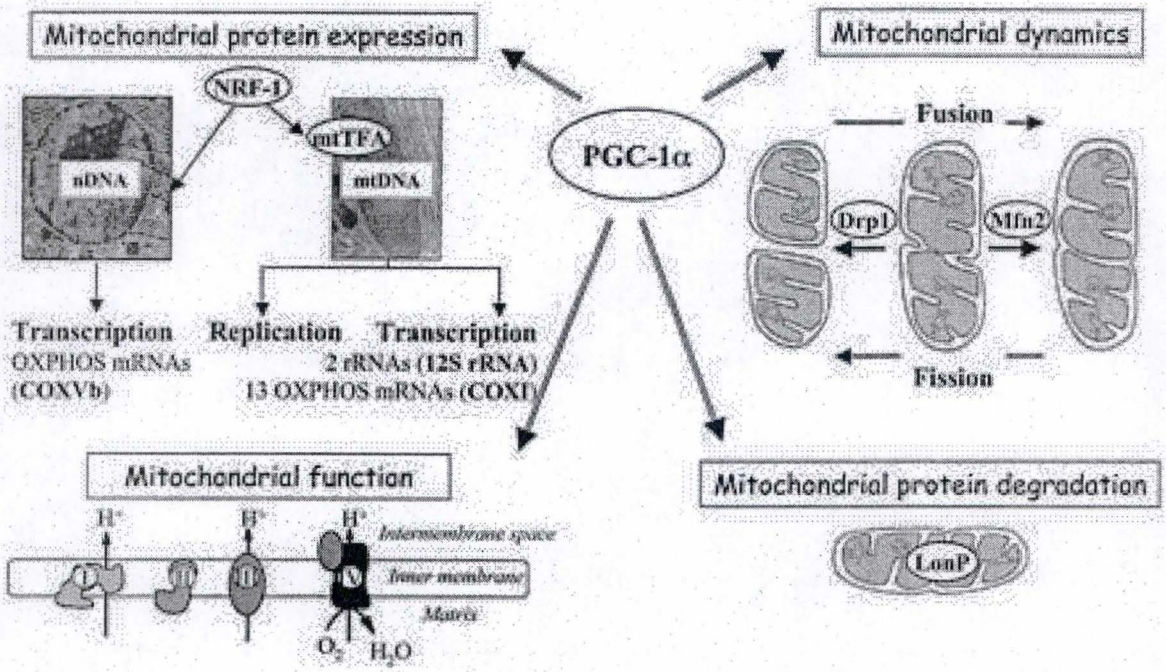


Figure 1.28 : Synthèse des rôles du co-activateur PGC-1α dans la biogenèse mitochondriale. PGC-1α est un puissant inducteur de la biogenèse mitochondriale. En agissant comme co-activateur du facteur de transcription NRF-1, PGC-1α augmente l'expression de ses gènes cibles parmis lesquels se trouvent des sous-unités de la chaîne respiratoire ou encore la protéine Tfam. A travers l'augmentation de l'expression de Tfam, PGC-1α induit également la réplication et la transcription de l'ADN mitochondrial. PGC-1α régule également l'expression du gène codant la protéine Mnf2 impliquée dans la fusion du réseau mitochondrial et pourrait être également impliqué dans la régulation de la dégradation des protéines mitochondriales par la protéase LonP (Hood *et al.*, 2006).

l'expression de protéines impliquées dans des voies cataboliques. Citons par exemple le co-activateur RIP140, qui dans le tissu adipeux blanc inhibe la β-oxydation des acides gras (Christian, White et al. 2006), l'expression du transporteur au glucose GLUT4, ainsi que la protéine découplante UCP1 (Christian, Kiskinis et al. 2005). Dans le cadre de ce mémoire nous nous sommes particulièrement intéressés à PGC-1α qui est bien connu pour son rôle-clé dans la biogenèse mitochondriale (Lin, Handschin et al. 2005).

1.6.2.1.2.1 La famille des co-activateurs PGC-1

Le premier membre de la famille PGC, PGC-1α, a été identifié comme étant une protéine interagissant avec le facteur de transcription PPARγ dans les cellules adipeuses brunes (Puigserver, Wu et al. 1998). Ce facteur fait aujourd'hui partie d'une famille de co-activateurs transcriptionnels comprenant également PGC-1β et PRC (*PGC-related coactivator*) (Nisoli, Clementi et al. 2004). Les effets physiologiques médiés par ces co-activateurs sont à la fois fonction de la régulation sur l'expression et donc l'abondance de ces protéines et des facteurs de transcription avec lesquels ils interagissent. Dans ce travail, nous ne nous intéresserons qu'à PGC-1α étant donné son rôle majeur dans la biogenèse mitochondriale dans de nombreux types cellulaires (Lin, Handschin et al. 2005).

1.6.2.1.2.2 Le co-activateur PGC-1α

PGC-1α est un co-activateur inductible fortement exprimé dans les tissus métaboliquement actifs comme le cœur, le cerveau, les reins et les muscles squelettiques et qui interagit de nombreux de facteurs de transcription impliqués dans des réponses biologiques comme la thermogenèse adaptative, la néoglucogenèse et la différentiation des cellules musculaires striées squelettiques (**Figure 1.27**) De plus, PGC-1α est puissant activateur de la biogenèse mitochondriale dans différents types cellulaires (**Figure 1.28**). L'extrémité N-terminale de PGC-1α (les 200 derniers acides aminés) contient un domaine d'activation transcriptionnel riche en acide aminés acides et comporte un motif LXXLL (acides aminés 142-146) impliqué dans l'interaction ligand dépendante d'autres co-activateurs comme CBP et SCR-1 (steroid coactivator 1) avec les récepteurs nucléaires (Puigserver, Rhee et al. 2003). Ce domaine de PGC-1α est absolument nécessaire pour son interaction avec différents facteurs de transcription comme ERR-α (*Estrogen related receptor alpha.*) , PPAR-α, RXR-α et le récepteur aux glucocorticoïdes (Puigserver, Rhee et al. 2003). PGC-1α contient également un domaine pour interagir avec PPARγ et NRF-1. Une région située entre les acides aminés 400 et 500 lui permet également d'interagir avec le facteur de transcription MEF2-c (Puigserver, Rhee et al. 2003) Cette protéine contient également 2 domaines impliqués dans le « processing » de l'ARNm (Monsalve, Wu et al. 2000). Enfin, PGC-1α contient 3 signaux de localisation nucléaire (acides aminés 326-333, 627-633 et 651-667) (**Figure 1.27**) {Puigserver, 2003 #85}.

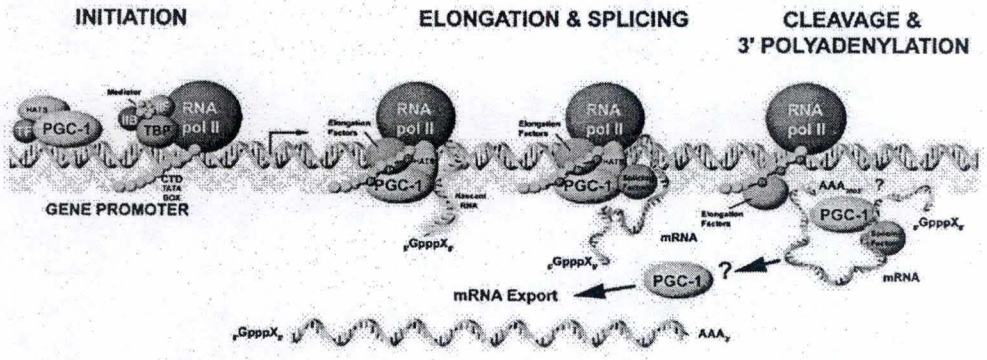


Figure 1.29 : Illustration des différens rôles de PGC-1α lors de la transcription. PGC-1α est une molécule dynamique qui est impliquée dans différentes étapes de l'expression génique. Elle est recrutée au promoteur du gène par son interaction avec les facteurs de transcription. Une fois la transcription initiée, PGC-1α interagit avec les facteurs d'élongation et les facteurs de splicing qui participent à ces processus. Enfin, PGC-1α pourrait participer au clivage, à la polyadénylation et à l'exportation de l'ARNm (Puigserver et Spiegelman, 2003).

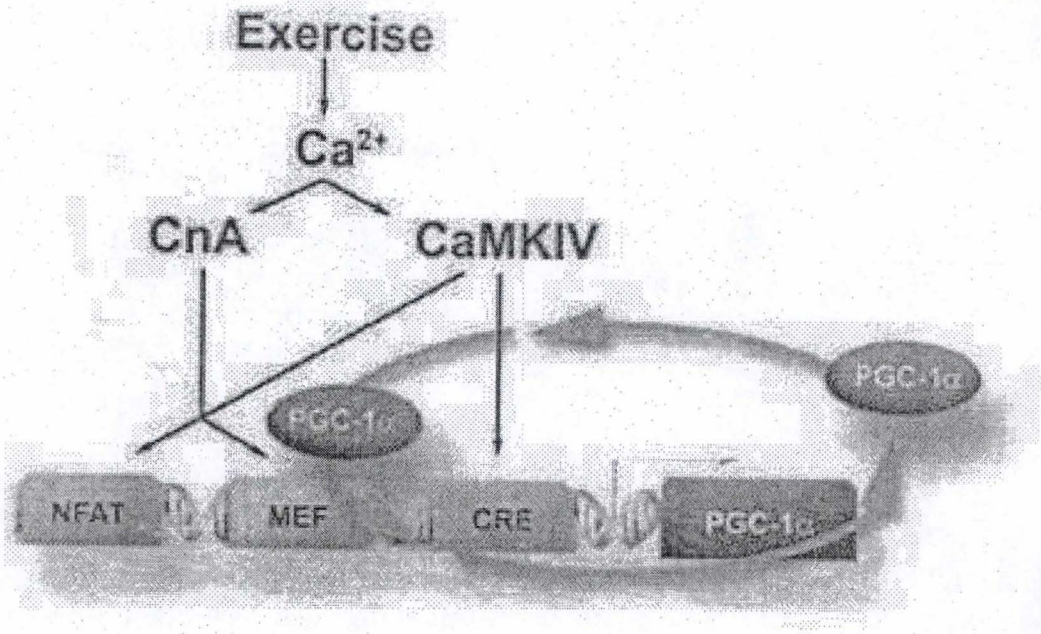


Figure 1.30 : Conrole de l'autorégulation de l'expression du co-activateur PGC-1α dans les cellules musculaires de souris. Une concentration élevée en calcium cytosolique induit l'activation de CaMKIV et la CnA. La CaMKIV phosphoryle CREB qui active la transcription du gène codant PGC-1α. La CaMKIV et la CnA activent également le facteur de transcription MEF2 et augmentent son activité transcriptionnelle. Le co-activateur nouvellement transcrit peut alors co-activer MEF2c et ainsi favoriser sa propre transcription (d'après Hanschin et Al., 2003).

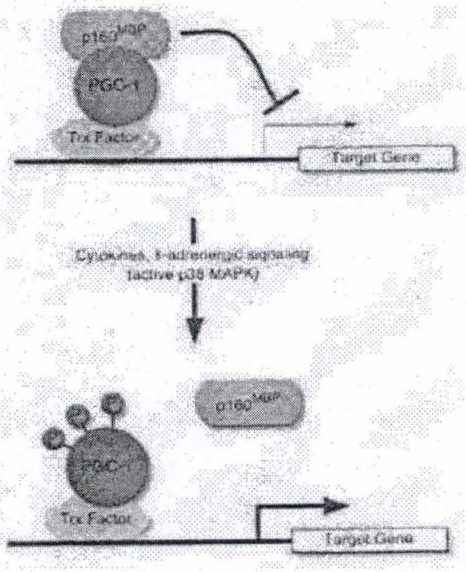


Figure 1.31: Représentation schématique de la répression de l'action de PGC-1α par la protéine p160 ^{myb}. La protéine P160^{myb} se lie à PGC-1α et répresse la transcription des gènes cibles de ce denier. Suite à son activation, la p38 MAPK phosphoryle PGC-1α ce qui disrupte la liaison de p160 ^{myb} et augmente l'expression des gènes cibles de PGC-1α (d'après Fan *et al.*, 2004).

1.6.2.1.2.2.1 Mécanisme d'action de PGC-1α

Spiegelman et son groupe ont proposé un modèle pour expliquer le mécanisme d'action de PGC-1α qui nécéssiterait 3 phases successives. Premièrement, PGC-1α, à l'état basal est inactif et possède peu d'affinité pour d'autres co-activateurs comme SRC-1 et CBP/p300 qui, contrairement à PGC-1α, sont des co-activateurs possédant une activité acétyltransférase intrinsèque (Wallberg, Yamamura et al. 2003). Cet état serait maintenu grace à la présence d'un domaine auto-inhibiteur qui lie un co-répresseur p160 Myb-binding protein. Deuxièmement, la dissociation de ce facteur se produit lorsque PGC-1α est phosphorylé, par exemple par p38 MAPK, ce qui libère le facteur de son répresseur (**Figure 1.29**) (Fan, Rhee et al. 2004). Le recrutement de PGC-1α par le facteur de transcription d'intérêt comme PPAR-γ induit alors son changement de conformation (Puigserver, Adelmant et al. 1999). La portion amino-terminale de la protéine médie son interaction avec la RNA polymerase II ainsi que les autres acteurs du complexe d'initiation de la transcription. L'interaction de PGC-1α avec la RNA polymérase II et le remodelage chromatinien permettent donc l'initiation de la transcription (Monsalve, Wu et al. 2000).

1.6.2.1.2.2.2 Régulation transcriptionnelle de PGC-1α

1.6.2.1.2.2.2.1 Les voies de transduction du signal conduisant à modifier l'expression de PGC-1α

Certaines voies de signalisation dépendantes du calcium jouent un rôle important dans la régulation de la transcription du gène de PGC-1α (Ryan and Hoogenraad 2007). A titre d'exemple, mentionnons qu'une augmentation de la concentration en calcium cytosolique active notamment deux enzymes-clés de cette voie, la CaMKIV et la CnA. Ces 2 enzymes induisent l'activation du facteur de transcription MEF2c (*Myocyte Enhancer Factor 2c*) qui se lie alors à deux séquences consensus (CTATATTTAA et CTAAATATAA) présentes dans le promoteur du gène de PGC-1α Le facteur de transcription MEF2c peut également former des complexes avec d'autres co-activateurs comme p300, CBP mais également PGC-1α créant ainsi une boucle de régulation positive sur l'expression de ce dernier. Enfin, la CaMKIV phosphoryle également le facteur de transcription CREB sur la sérine 133 (**Figure 1.30**). La voie dépendante de l'AMPc augmente également la transcription du gène de PGC-1α à travers l'activation du facteur de transcription CREB (Cao, Medvedev et al. 2001).

Signalons encore que le stress énergétique est également un puissant inducteur de la biogenèse mitochondriale dans les cellules musculaires suite à l'activation de l'AMPK (Winder 2001). Bien que le mécanisme impliqué ne soit pas totalement élucidé, il a été montré que l'AMPK exerce son effet à travers le co-activateur PGC-1α dont elle augmente l'expression en réponse à un manque chronique d'énergie ou lors d'un exercice modéré (Zong, Ren et al. 2002; Atherton, Babraj et al. 2005). D'autre part, l'AMPK induit également l'expression de la CaMKIV connue pour être impliquée dans la biogenèse mitochondriale suite à la phosphorylation de CREB (Mercy, Pauw et al. 2005) (Czubryt, McAnally et al., 2003; Handschin et al., 2003).

Enfin, la transcription du gène codant la protéine PGC-1α est également régulée par l'oxyde nitrique (NO). Le NO est synthétisé par les NOS (*NO synthase*), dont il existe 3 isoformes (eNOS (*endothelial NOS*), iNOS (*inductible NOS*) et nNOS (*neurone NOS*)) dans

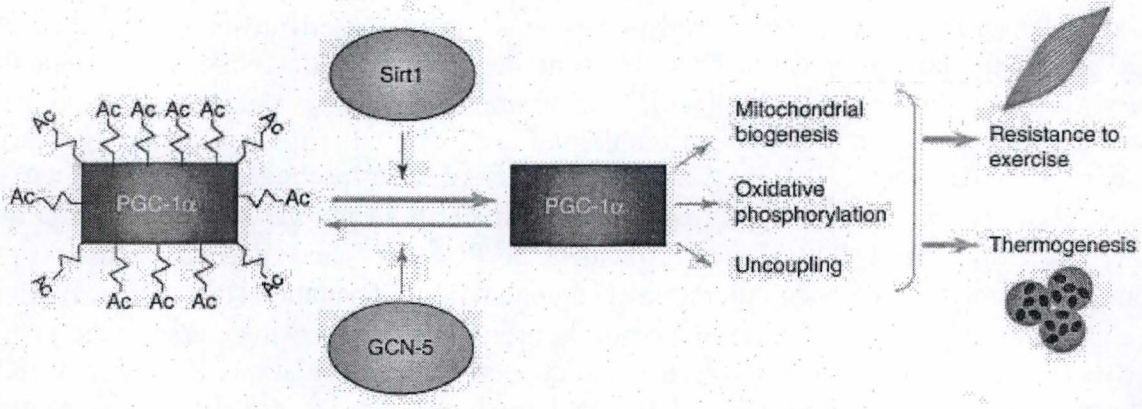


Figure 1.32 : Résumé schématique des effets des protéines GCN5 et Sirt1 sur l'activité du co-activateur PGC-1α. L'activité du co-activateur PGC-1α est régulée par des modifications post-traductionnelles. PGC-1α acétylé par la protéine GCN-5 est incapable d'induire la transcription de ces gènes cibles. Une acétylation par la protéine Sirt1 induit l'activation de PGC-1α qui peut alors participer à différents processus métaboliques comme la biogenèse mitochondriale et la thermogenèse adaptative (Feige *et al.*, 2007).

les cellules mammaliennes à partir de l'acide aminé arginine et d'oxygène (Clementi and Nisoli 2005). Outre ses effets pro-et anti-oxydants sur la mitochondrie et qui dépendent de sa concentration, le NO est également impliqué dans la régulation du gène codant PGC-1α et est un puissant inducteur de la biogenèse mitochondriale dans différents types cellulaires parmi lesquels les cellules adipeuses brunes et blanches (Nisoli, Tonello et al. 2005). Mécanistiquement, le NO induit l'activation d'une guanylyl cyclase sensible au NO, qui synthétise alors du GMP cyclique (GMPc)(Borniquel, Valle et al. 2006). Ce dernier, peut activer une protéine kinase G (PKG) qui induirait la transcription du gène codant PGC-1α, du moins en partie, en phosphorylant le facteur de transcription CREB (Borniquel, Valle et al. 2006).

1.6.2.1.2.2.2.2 Régulation de l'activité de PGC-1 par les modifications post-traductionnelles

Nous avons vu que le co-activateur PGC-1α joue un rôle-clé dans l'intégration des voies de signalisation qui contrôlent l'homéostasie énergétique et la biogenèse mitochondriale (Liang and Ward 2006). Cependant, si les fonctions de ce co-activateur sont fortement dépendantes de l'abondance et donc, bien souvent, de l'expression de ce facteur au niveau transcriptionnel, un deuxième niveau de régulation se situe au niveau post-traductionnel comme nous allons le détailler maintenant (Liang and Ward 2006).

La p38 MAPK activée en réponse à de nombreuses cytokines mais également suite à une stimulation des récepteurs β-adrénergiques, phosphoryle PGC-1α sur 3 résidus (Thr262, Ser265 et Thr298). La phosphorylation de PGC-1α augmente la stabilité de la protéine (Puigserver, Rhee et al. 2001). La phosphorylation de PGC-1α augmente également son activité en inhibant la liaison de la protéine inhibitrice p160 ^{mbp} (**Figure I.31** ; Fan, Rhee et al. 2004) et/ou en induisant la translocation de PGC-1α dans le noyau (Wright, Han et al. 2007). La forme phosphorylée de PGC-1α possède certaines caractéristiques distinctes qui permettent de modifier l'expression des gènes cibles du co-activateur comme l'induction de l'expression du gène codant la protéine découplante UCP3 qui n'est pas la cible de la forme non phosphorylée (Puigserver, Rhee et al. 2001).

La méthylation constitue également une modification susceptible d'affecter l'action de PGC-1α. La Protein Methyltransférase 1 méthyle PGC-1α sur les arginines Arg665, Arg667 et Arg669 à l'extrémité COOH-terminale (Teyssier, Ma et al. 2005). La méthylation a comme conséquence une augmentation de l'activité transcriptionnelle médiée par la protéine PGC-1α . Stallcup et ses collaborateurs supposent que cette modification pourrait induire un changement de conformation de PGC-1α et faciliterait sa liaison avec d'autres protéines comme le co-activateur TRAP220 ou inhiberait la liaison de répresseurs (Stallcup et al.,2002) Enfin, l'activité de la protéine PGC-1α est régulée par son degré d'acétylation. Alors que dans les hépatocytes, l'acétyltransférase GCN5 inhibe l'activité de PGC-1α (Lerin, Rodgers et al. 2006). La protéine SIRT1 *(sirtuin 1),* augmente l'activité transcriptionnelle du co-activateur en le désacétylant (**Figure 1.32**). SIRT1 appartient à la famille des SIRT comprenant 4 membres. Les membres de cette famille sont des protéines orthologues de Sir2 (*Silencing Information Regulator 2*) qui est connue pour augmenter la longévité de *Saccharomyces cerevisiae* et *Caenorhabditis elegans* en cas de restriction calorique (Lopez-Lluch, Hunt et al. 2006). Sir2 et les membres de la famille SIRT exercent leurs fonctions en désacétylant leurs substrats via une réaction dépendante du NAD (Rodgers, Lerin et al. 2005). Dans les cellules eucaryotes de mammifères, la protéine SIRT1 est activée en cas de restriction calorique et contrôle différents processus métaboliques. Dans les hépatocytes, SIRT1 activée suite à une

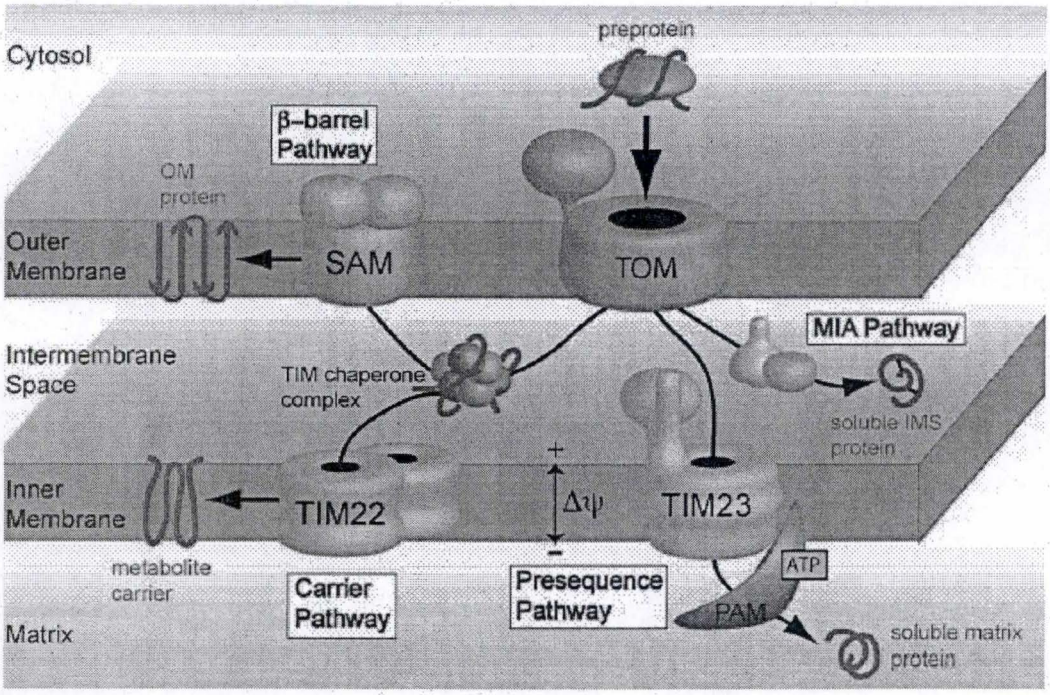


Figure 1.33 : Représentation schématique des voies d'importation empruntées par les futures protéines mitochondriales. La voie d'entrée de toutes les pré-protéines dans la mitochondrie est assurée par le complexe TOM (Translocase of Outer Membrane). Les futures protéines mitochondriales peuvent ensuite suivre quatre voies distinctes en fonction de leur destination finale. Les pré-protéines à destination de la membrane externe transitent à travers le complexe SAM (Sorting and Assembly Machinery) dont le rôle est d'empêcher l'agrégation de ces polypeptides hydrophobes. Le complexe MIA (Mitochondrial Intermembrane Space Import and Assembly), quant à lui, reconnaît des motifs riches en cystéine caractéristiques des protéines résidantes de l'espace intermembranaire. Les protéines de la membrane interne sont reconnues le complexe TIM22. Enfin, le complexe TIM23 importe les protéines à destination matricielle. L'importation des protéines dans la matrice nécéssite de l'ATP et le potentiel de membrane Une fois dans la matrice, les séquences signales à l'extrémité N-terminale des protéines sont clivées par des peptidases dont la MPP (Mitochondrial Processing Peptidase) et la MIP (Mitochondrial Intermediate Peptidase) et subissent un repliement contrôlé par des chaperonnes comme la Hsp70 (Bohnert et al., 2007).

augmentation de la concentration en pyruvate, désacétyle 13 lysines de la protéine PGC-1α et interagit avec cette dernière pour induire l'expression des gènes impliqués dans la néoglucogenèse (Rodgers, Lerin et al. 2005). SIRT1 active également PGC-1α dans les myocytes, ce qui induit l'expression du gène codant le cytochrome c et d'autres gènes impliqués dans la biogenèse mitochondriale (Civitarese et al., 2007)

1.6.2.2 Mécanismes moléculaires impliqués dans la biogenèse mitochondriale

1.6.2.2.1 L'importation des protéines mitochondriales

1.6.2.2.1.2 Les événements cytosoliques

La grande majorité des protéines mitochondriales (99 % d'un total qui est estimé à environ 1500) sont codées par des gènes nucléaires et synthétisées par des ribosomes cytosoliques libres (Hoogenraad, Ward et al. 2002). Ces précurseurs possèdent une séquence signal à leur extrémité N-terminale et sont reconnus par des facteurs cytosoliques comme la chaperonne Hsc70 (*70-kda heat-shock cognate protein*) qui maintient les polypeptides nouvellement synthétisés dans une conformation dépliée facilitant l'importation (Hoogenraad, Ward et al. 2002). D'autres facteurs, comme le MSF (*Mitochondrial Import Stimulation Factor*), participent à l'adressage vers la membrane mitochondriale externe (Komiya, Sakaguchi et al. 1996).

1.6.2.2.1.3 La machinerie d'importation des précurseurs des protéines mitochondriales

L'importation des protéines mitochondriales est rendue possible par la présence d'une machinerie complexe comprenant une série de translocases reconnaissant des séquences spécifiques au sein des protéines mitochondriales et les ciblant vers leur compartiment de destination finale (**Figure 1.33**) (Bohnert, Pfanner et al. 2007).

Signalons que si l'importation des protéines membranaires commence à être bien connue, les données relatives à l'importation des phospholipides (un processus essentiel à la biogenèse mitochondriale) sont par contre beaucoup plus fragmentaires. La grande majorité des phospholipides des membranes interne et externe est synthétisée par le reticulum endoplasmique (*RE*). La phosphatidylserine (*PS*) est convertie en phosphatidylethanolamine (*PE*) via une PS décarboxylase au niveau de la MMI. Les phospholipides sont ensuite transférés dans la mitochondrie à travers des régions du RE appelées les MAMs (*Mitochondria-Associated Membranes*) par une voie encore inconnue à l'heure actuelle mais qui semble consommer de l'énergie. La membrane interne de la mitochondrie est le siège de la synthèse de cardiolipine, un phospholipide acide et très hydrophobe essentiel à la fonction de nombreuses protéines mitochondriales comme la cytochrome c oxydase. Signalons également que la régulation de la masse totale de la mitochondrie et la régulation des lipides mitochondriaux est contrôlée par la protéine MIDAS qui s'accumule dans l'organelle en cas de déplétion en ADNmt (Nakaschima-kamimura *et al.*, 2005).

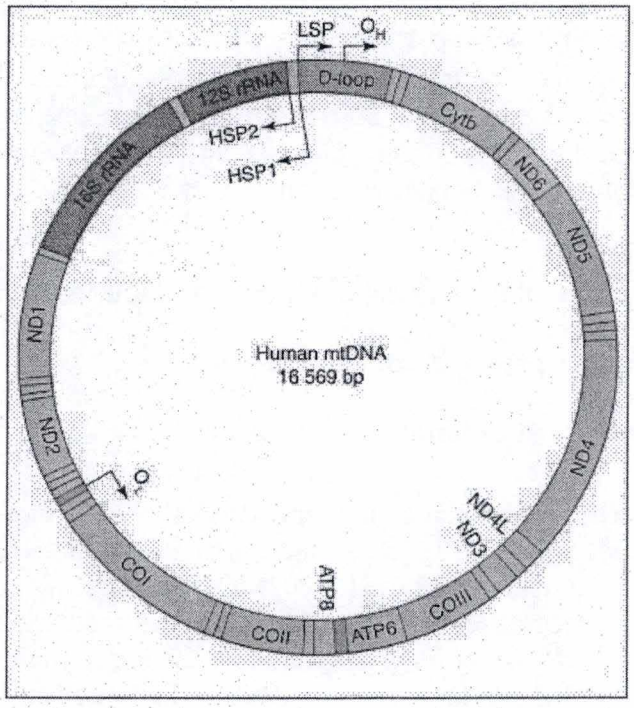


Figure 1.34 : Carte du génome mitochondrial chez l'homme. Le brin d'ADN circulaire encode les 13 protéines constitutives de la chaîne respiratoire (ND 1, 2, 3, 4, 4L, 5 et 6 : les 7 sous unités du complexe 1 ; cyt b : une sous unité du complexe 3 ; CO I, II, et III : 3 sous unités du complexe 4 ; ATP6 et 8: 2 sous unités du complexe 5) 2 ARNr et 22 ARNt. Les sites d'initiation de la transcription du brin lourd (HSP1 et HSP2) et le site d'initiation de la transcription du brin léger (LSP) sont indiqués comme les origines de réplication du brin lourd (Oh) et du brin léger (Ol) ainsi que la région régulatrice non codante (D-loop) (d'après Asin-Cayuela et Gustafsson, 2007).

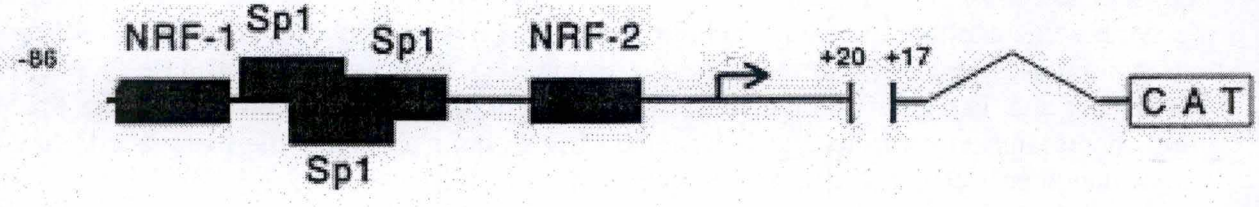


Figure 1.35 : Représentation schématique du promoteur de la protéine TFAM contenant des sites reconnus par les facteurs de transcription Sp1, NRF2 et NRF1 (d'après Desimone *et al.*, 1993)

1.6.2.2.2 Transcription et réplication de l'ADN mitochondrial

1.6.2.2.2.1 L'ADN mitochondrial

Comme nous l'avons déjà mentionné, les mitochondries possèdent leur propre génome sous la forme d'une molécule d'ADN double brin circulaire d'environ 16.6 kb chez l'homme (16,3 kb chez la souris) et composé d'un brin lourd et d'un brin léger distinguables sur base de leur coefficient de sédimentation (**Figure 1.34**). L'ADN mitochondrial, présent en plusieurs copies (1000 à 10000), n'est pas associé à des protéines histones mais bien à des protéines « *knob* » jouant un rôle dans sa structuration. Il a été montré très récemment que le principal facteur de transcription mitochondrial Tfam joue un rôle essentiel dans le maintien de l'ADN mitochondrial, la transcription, la réplication, la formation des nucléoïdes (des complexes protéiques impliqués dans l'attachement de l'ADN à la MMI et contrôlant la ségrégation du génome mitochondrial, la détection des dommages à l'ADNmt, et sa réparation) (Kang and Hamasaki 2005)

Le génome mitochondrial comporte seulement 37 gènes : 24 codant pour des composants de la machinerie de traduction (22 ARNts et 2 ARNr (12s et 16s)), 13 autres codant des protéines de la chaîne de transport d'électrons qui en compte environ 90 (7 sous-unités de la NADH ubiquitinone oxydoréductase, 3 sous-unités de la cytochrome c oxydase et 2 sous-unités de l'ATP-synthase). Outre le faible nombre de gènes encodés, l'ADN mitochondrial possède un certain nombre d'autres caractéristiques qui lui sont propres comme une organisation extrêmement compacte. En effet, il est caractérisé par une absence d'intron et de séquence intergénique. De plus, ce génome est exclusivement d'origine maternelle (Fernandez-Silva, Enriquez et al. 2003).

1.6.2.2.2.2 La transcription et la réplication du génome mitochondrial

La transcription et la réplication de l'ADN mitochondrial sont deux processus interdépendants puisque la transcription du brin léger produit également les amorces d'ARN nécessaires à l'initiation de la réplication de l'ADN mitochondrial.

1.6.2.2.2.2.1 La transcription

La RNA polymérase mitochondriale est une protéine de 120 kd possédant une forte homologie avec l'extrémité COOH-terminale de la RNA polymérase de bactériophages (Kelly and Lehman 1986). Cette protéine possède une extension à son extrémité amino-terminale qui contient deux séquences de 35 acides aminés (des motifs PPR) caractéristiques des protéines médiant l'interaction entre l'ARN et les enzymes de processing (Falkenberg, Larsson et al. 2007). Cette protéine est incapable d'initier la transcription et de reconnaître les promoteurs mitochondriaux. Cette étape nécessite la présence de protéines additionnelles, telles que TFBM1, TFBM2 et Tfam (Fernandez-Silva, Enriquez et al. 2003; Falkenberg, Larsson et al. 2007).

Tfam appartient à la famille HMG (*High Mobility Group*) comprenant également de nombreuses protéines composant la chromatine et qui sont connues pour être impliquées dans les modifications de la structure de l'ADN facilitant certains processus comme la transcription, la réplication et la recombinaison. Elles sont caractérisées par un domaine de

liaison à l'ADN HMG d'environ 80 acides aminés. La famille HMG est elle-même subdivisée en 3 sous-familles dénommées respectivement HMG-I(Y), HMG-14/-17 et HMG-1/-2. Cette dernière sous famille dont fait partie Tfam comprend des protéines exprimées de manière ubiquiste et reconnaissant l'ADN avec peu de spécificité (Inagaki et al., 2000). L'expression du gène codant la protéine Tfam est régulée par les facteurs de transcription Sp1 NRF-2 et NRF-1 bien que ce dernier soit particulièrement important à l'expression de la protéine (**Figure 1.35**) (Virbasius and Scarpulla 1994). TFAM, comme les autres protéines mitochondriales, est synthétisée dans le cytosol sous la forme d'un précurseur puis importée dans la matrice mitochondriale (Ekstrand, Falkenberg et al. 2004). Elle possède deux domaines HMG séparés par une région basique de 27 acides aminés et une séquence de 25 acides aminés à son extrémité COOH-terminale qui est indispensable à la transcription (Falkenberg, Larsson et al. 2007). Elle est extrêmement abondante (près de 1000 protéines par molécule d'ADN mitochondrial) et serait un composant essentiel à la formation de la structure nucléoïdale formée par l'ADN mitochondrial et d'autres protéines. Des études ont montré qu'il existait une corrélation fine entre la quantité d'ADN mitochondrial et le nombre de molécules de Tfam. En effet, la surexpression ectopique de la protéine Tfam induit une augmentation de la quantité d'ADN total alors que la diminution de son expression s'accompagne d'une diminution de la quantité d'ADN mitochondrial. Etant donné le couplage existant entre la transcription et la réplication de l'ADN mitochondrial, il est probable que les modifications d'abondance de l'ADN mitochondrial soient respectivement causées par une augmentation ou une diminution de la transcription activée par Tfam (Falkenberg, Larsson et al. 2007). Signalons que cette protéine peut également être modifiée posttraductionnellement, une acétylation sur une lysine augmentant ainsi son activité (Dinardo, Musicco et al. 2003).

Les protéines TFBM1 et TFBM2 appartiennent à la famille des ARNr méthyltransférases et participent à la biogenèse ribosomale. TFBM1 entre en contact avec l'extremité COOH-terminale de Tfam et méthyle l'ARN ribosomal 12S. Des systèmes de reconstitution *in vitro* ont permis de mettre en évidence que TFBM2 est plus actif que TFBM1 à induire la transcription du génome mitochondrial. Chacune de ces protéines a la capacité de former un complexe avec la RNA polymerase (Falkenberg, Larsson et al. 2007).

1.6.2.2.2.2.2 La régulation de la transcription de l'ADN mitochondrial

La régulation de la transcription du génome mitochondrial en réponse aux besoins métaboliques d'une cellule est peu connue. Cependant, des données récentes laissent supposer l'existence d'autres facteurs de transcription pouvant influencer la transcription du génome mitochondrial. Ainsi, le facteur de transcription CREB qui est présent à l'intérieur de la mitochondrie peut, une fois phosphorylé, lier sa séquence consensus présente dans la région D-Loop et activer la transcription de l'ADN mitochondrial (Ryu, Lee et al. 2005). D'autre part, il existe également des séquences nucléotidiques HREs dans la région D-Loop mais aussi à l'intérieur de gènes structuraux, différents endroit du génome mitochondrial pouvant être reconnues par des récepteurs aux hormones thyroïdiennes et stéroïdiennes comme les récepteurs aux glucocorticoïdes et les récepteurs aux oestrogènes (Psarra, Solakidi et al. 2006). Le facteur de transcription P53 peut aussi être transloqué dans la mitochondrie où il peut interagir avec la mtDNA polymérase γ en réponse à un dommage à l'ADN et augmenter son activité (Higuchi 2007).

La transcription de l'ADN mitochondrial débute à 3 sites d'initiation différents, chacun d'entre eux étant situés dans la région D-Loop (Fernandez-Silva, Enriquez et al. 2003). La transcription du brin léger est initiée à un seul promoteur (*LSP*) et produit un seul mRNA polycistronique dont sont issus les 8 tRNAs et le mRNA du gène ND6. Ce transcrit sert également de précurseur servant d'amorce nécessaire au mécanisme de réplication. La

transcription du brin lourd est initiée à deux sites différents, les sites HSP1 et HSP2 dont la fréquence d'initiation est différente. Le site HSP1 est responsable de la synthèse des 2 RNA ribosomaux codés par l'ADN mitochondrial et le site HSP2 produit quant à lui une molécule d'ARN correspondant à tout le brin lourd et couvrant les deux gènes codant pour les rRNA et les 12 rRNA (Asin-Cayuela and Gustafsson 2007).

1.6.2.2.2.2.3 La réplication de l'ADN mitochondrial

On a longtemps pensé que la synthèse de l'ADN mitochondrial s'effectuait de manière indépendante de celle du génome nucléaire. Cependant, Wang et collaborateurs ont récemment mis en évidence que la cycline D1 diminue l'expression et l'activité de NRF-1 et par là, qu'elle contrôle l'expression de TFAM et régule donc l'abondance de la population mitochondriale au cours du cycle cellulaire. La kinase dépendante de la cycline D1 (CDK4/cycline D1) pourrait donc phosphoryler NRF-1 sur la sérine 47 et coordonner ainsi la synthèse d'ADN nucléaire et mitochondrial. (Wang, Li et al. 2006). La réplication de l'ADN mitochondrial débute par la transcription d'un brin d'ARN par la RNA polymérase mitochondriale à partir de l'origine de transcription du brin léger. Ce transcrit, une fois clivé, peut jouer le rôle d'amorce pour la synthèse de l'ADN mitochondrial (Fernandez-Silva, Enriquez et al. 2003). Cette amorce s'hybride dans la région en amont de l'origine de réplication du brin lourd (O_h) (= région D-Loop, boucle de déplacement), ce qui permet à l'ADN polymérase gamma de débuter la réplication de l'ADN. Celle-ci se poursuit alors de manière unidirectionnelle jusqu'à l'origine de réplication du brin léger (O_l) où la réplication peut alors commencer dans la direction opposée (Garesse and Vallejo 2001).

1.7 Objectifs du mémoire

L'importance et le rôle de l'activité mitochondriale dans le tissu adipeux et les mécanismes moléculaires par lesquels l'altération de l'activité mitochondriale (dysfonctionnement) conduisent à des modifications du métabolisme lipidique et contribuent aux pathologies associées à l'obésité comme le diabète de type 2, l'hypersinsulinémie sont encore peu connus (Sartipy and Loskutoff 2003*) De plus*, il est connu qu'une augmentation de la demande d'ATP (comme l'exercice physique) ou une diminution de sa production (induite par un dysfonctionnement mitochondrial) s'accompagne souvent d'une augmentation de la masse mitochondriale et donc de la biogenèse de l'organite. La biogenèse de l'organite demande en effet une coordination de l'expression des deux génomes et une intégration de nombreux signaux intracellulaires qui converge vers l'activation de plusieurs facteurs de transcription et co-activateurs comme respectivement PPARγ (Wilson-Fritch, Burkart et al. 2003) (Desquiret, Loiseau et al. 2006) et PGC-1α (Puigserver, Adelmant et al. 1999)

Dans ce travail, nous avons donc tenté de mieux caractérisé les effets potentiels du dysfonctionnement mitochondrial induit par le FCCP ou le TNFα sur des effecteurs et des marqueurs de la biogenèse mitochondriale dans des adipocytes différenciés.

Dans un premier temps, nous avons voulu caractériser l'abondance et/ou l'état d'activation de plusieurs facteurs impliqués dans la biogenèse mitochondriale et/ou la différenciation adipocytaire dans des extraits de protéines nucléaires préparés à partir d'adipocytes différenciés inbubés en présence de FCCP, une molécule découplant la respiration de la phosphorylation de l'ADP en ATP ou de TNFα, une cytokine pro-inflammatoire connue, depuis longtemps déjà, pour induire la dédifférenciation adipocytaire (Ron, Brasier et al. 1992)

Dans un deuxième temps, nous avons réalisé une approche protéomique subcellulaire dite « sans à priori » à partir de protéines nucléaires. L'objectif de cette partie, , était de tenter d'identifier un ou plusieurs régulateur(s) transcriptionnels dont l'abondance nucléaire seraient différentiellement modifiée dans les adipocytes présentant un découplage mitochondrial ou répondant à une stimulation par le TNFα.

Enfin, dans une troisième étape, sur base d'un certain nombre de modifications observées de l'abondance d'effecteurs de la biogenèse mitochondriale, nous avons cherché à caractériser l'abondance de la population mitochondriale dans les adipocytes en dédifférenciation induit par le FCCP ou le TNFα. Nous avons ainsi recherché l'abondance de l'ADNmt par PCR en temps réel, nous avons visualisé l'abondance de la population mitochondriale par cytométrie de flux à l'aide d'une sonde fluorescente spécifique comme le « Mitotracker Green » ; Nous avons également visualisé l'abondance de la population mitochondriale par microscopie confocale à l'aide de la sonde « MitoTracker Red » et nous avons déterminé l'abondance relative de plusieurs marqueurs protéiques mitochondriaux en Western blotting dans des cellules adipocytaires dédifférenciées en présence de FCCP ou de TNFα.

Matériel et méthodes

2. Matériel et méthodes

2.1 Type cellulaire utilisé

Les cellules qui sont utilisées dans le cadre de ce travail sont des pré-adipocytes d'embryons murins 3T3-L1 provenant de la firme ATCC (*American Tissue and Cell Collection, USA).* Ces cellules vieillissent au cours des passages en culture et leur efficience de différenciation diminue avec le nombre de passages en culture. Nous devons donc tenir compte des générations cellulaires. Nous considérons que les cellules achetées à l'ATCC sont en génération 1 (G1) et en fonction des dilutions réalisées, par exemple 1 en 2 ou 1 en 4, au cours des passages en culture, nous comptons respectivement une ou deux générations supplémentaires. En pratique, seules des cellules dont la génération est inférieure ou égale à quinze ($G \leq 15$) sont utilisées pour des programmes de différenciation et de dédifférenciation.

2.2 Culture de cellules

Les pré-adipocytes sont cultivés dans des boîtes de culture de 75 cm^2 (*Corning, USA*) et 15 ml de milieu de culture DHG (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-High Glucose, 4,5g/l de glucose,*Gibco BRL, UK*) contenant 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) (Gibco BRL, UK). Lorsque les cellules sont à 90 % de confluence, le milieu est décanté et les cellules sont rincées avec 10 ml de PBS (Phosphate Buffer Saline) stérile (150 mM NaCl ; 10 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4; pH 7,4) préchauffé à 37 °C. Les cellules sont ensuite détachées par l'addition de 2 ml d'une solution de trypsine et EDTA (EthylenDiamine Tetraacetic Acid). La trypsine est une protéase qui clive les protéines d'adhésion intercellulaire et les protéines liées à la matrice extracellulaire au niveau des acides aminés basiques arginine et lysine. Le calcium complexé par l'EDTA, un agent chélateur du calcium, ne peut plus stabiliser les cadhérines, des molécules d'adhésion impliquées dans les interactions intercellulaires. Le détachement progressif des cellules est suivi au microscope à contraste de phase. La solution de trypsine-EDTA est décantée avant que les cellules ne soient complètement détachées. Les cellules sont resuspendues dans du milieu DHG contenant 10 % de SVF puis réparties dans de nouvelles boîtes de culture dont le format dépend du type d'expérience à réaliser. Les cellules sont ensuite incubées dans une étuve à 37 °C, dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO_2.

2.3 Le programme de différenciation des pré-adipocytes 3T3-L1 en adipocytes

Les cellules sont ensemencées à 50 % de confluence 3 jours avant d'initier le programme de différenciation. Ce délai permet aux cellules d'atteindre la confluence. Les pré-adipocytes sont ensuite incubés pendant 48 h en présence d'un cocktail hormonal servant à induire la différenciation adipocytaire et contenant de l'insuline (5 µg/ml), de la dexaméthasone (1 µM) et du dibutyryl-AMPc (300 µM) (db-AMPc) dilués dans du milieu de culture DHG-L1 (DHG avec 1,5g /l de $NaHCO_3$) contenant 10 % de SVF (**Figure 2.1**). La plus faible concentration en carbonate de sodium permet d'atténuer l'acidification du milieu de culture due à une activité métabolique intense des pré-adipocytes au cours de l'adipogenèse. Le milieu de culture est renouvelé tous les deux jours et contient alors uniquement de l'insuline à 5 µg/ml. Le traitement est maintenu pendant 10 à 12 jours selon l'état de différenciation des pré-adipocytes en adipocytes. Les adipocytes différenciés sont des

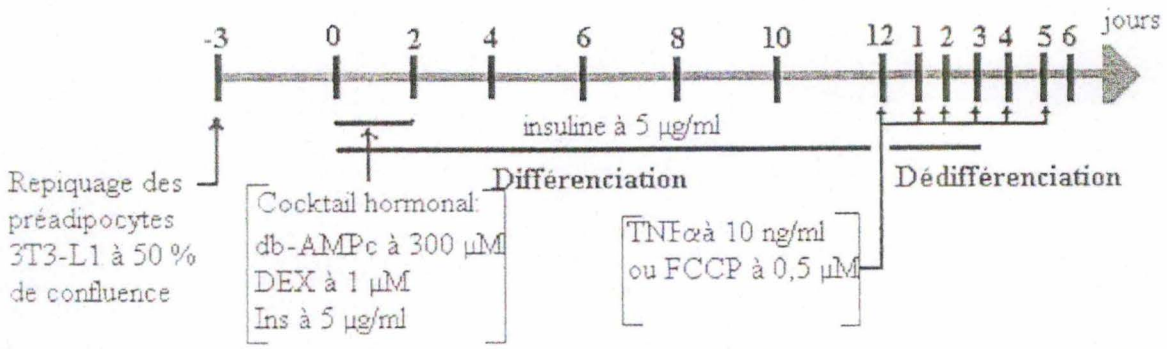
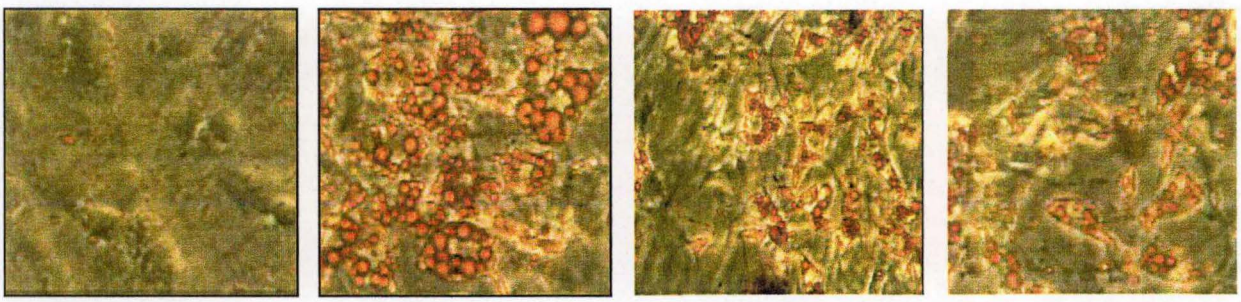


Figure 2.1 : Représentation schématique des différentes étapes du modèle expérimental utilisé : db-AMPc : dibutiryl-AMPc, DEX : Dexamethasone, Ins : Insuline ; TNF-α: Tumor Necrosis Factor alpha, FCCP : Carbonylcyanide-p-trifluorométhyoxyphenylhydrazone.



Pré-adipocytes **Adipocytes** **Adipocytes + TNFα** **Adipocytes + FCCP**

Figure 2.2 : Micrographies prises au microscope à contraste de phase mettant en évidence le contenu en triglycérides dans des pré-adipocytes 3T3-L1 différenciés pendant 12 jours puis incubés ou non (adipocytes) en présence du découplant mitochondrial FCCP (0,5 µM) ou de TNFα (10 ng/ml) pendant 6 jours (grossissement : 150x). La présence des vésicules de triglycérides cytosoliques est révélée par une coloration des graisses neutres à l'Oil Red O.

cellules arrondies contenant de nombreuses vésicules de triglycérides dans le cytosol (**Figure 2.2**).

Des pré-adipocytes qui sont maintenus en culture pendant le même temps dans du milieu DHG-L1 contenant 10 % de SVF seul constituent des cellules contrôles du programme de différenciation. Ce milieu est également renouvelé tous les deux jours.

2.4 Le programme de dédifférenciation des adipocytes induit par le FCCP ou le TNFα

Après différenciation des pré-adipocytes en adipocytes, les adipocytes sont incubés pendant 1, 3 ou 6 jours en présence de 0,5 µM de FCCP (Carbonylcyanide-p-trifluorométhoxyphenylhydrazone) (*Sigma, USA*) ou de 10 ng/ml de TNFα (Tumor Necrosis Factor alpha) (*R&D Systems*) (**Figure 2.1**). Au cours du programme de dédifférenciation, les milieux sont renouvelés toutes les 24 h, en raison de l'acidification du milieu (attestant d'une activation de la glycolyse) des cellules incubées en présence de FCCP. Les adipocytes incubés en présence de FCCP ou de TNFα présentent un phénotype de type dédifférenciation adipocytaire, caractérisé par une diminution des vésicules de triglycérides dans le cytosol (**Figure 2.2**).

Des adipocytes non traités utilisés comme contrôle des effets des molécules induisant la dédifférenciation sont également maintenus pendant 1, 3 ou 6 jours dans du milieu DHG-L1 contenant 10 % de SVF.

2.5 Dosage des protéines

2.5.1 Dosage de protéines par la méthode de Bradford

2.5.1.1 Principe

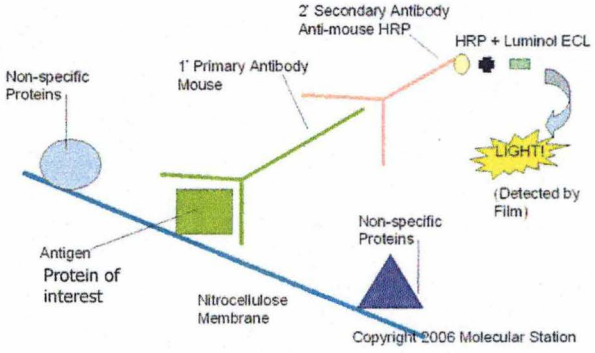
Cette technique repose sur l'utilisation d'un colorant, le bleu de Coomassie G250, qui a comme propriété de changer de coloration après adsorption sur l'arginine et les résidus aromatiques phénylalanine, tryptophane et proline des acides aminés présents dans les protéines. Cette modification du comportement optique de la solution en présence de protéines est mesurée par spectrophotométrie. La fixation du colorant est quantitative et peu sensible à la composition des protéines.

2.5.1.2 Matériel et méthode

Un volume donné de protéine à doser (1 ou 2 µl d'échantillon) ou 2,5 µl d'étalon BSA (Bovine Serum Albumin ; *Merck, Germany*) de concentration connue (2mg/ml) est ajouté à 1 ml de colorant de Bradford (*Biorad, Allemagne*) préalablement dilué 5 fois dans de l'eau distillée et filtré. Deux types de blancs sont également réalisés : un blanc étalon (2,5 µl d'eau) et un blanc échantillon (2,5 µl de tampon de lyse cellulaire). Les échantillons sont vortexés, incubés pendant 5 minutes et l'absorbance du produit de la réaction est mesuré au spectrophotomètre à 595 nm. Les temps d'incubations de chaque échantillon en présence de la solution de Bradford doivent être identiques. La concentration en protéines de l'échantillon est calculée par rapport à l'étalon selon la formule suivante:

$$Conc_{éch} = ((Abs_{éch} - Abs_{blanc\ éch})/(Abs_{étalon} - Abs_{blanc\ étalon})) \times ((Vol_{étalon} \times Conc_{étalon}/Vol_{éch}))\ (\mu g/ul)$$

Avec : Conc = concentration, Abs = absorbance, Vol volume)



http://www.molecularstation.com/images/western-blot.gif

Figure 2.3 : Principe de révélation de l'abondance relative d'une protéine d'intérêt par le système ECL (Enhanced Chemiluminecence) dans la technique du Western Blotting.

Tableau 2.1: Composition du tampon de lyse

Composants	**Concentration finale**
Tris (*Merck,germany*)	20 mM; pH 7,4
KCl (*Merck,germany*)	150 mM
EDTA (*Merck,germany*)	1 mM
Triton X-100 (*Sigma, USA*)	1%

Tableau 2.2 : Composition du PIB (Phosphatase Inhibitor Buffer)

Sels	**Concentration finale**
Na_3VO_4 (*Sigma, USA*)	1 mM
PNPP (p-notrophénylpyrophosphate) (*Sigma, USA*)	10 mM
β-glycerophosphate (*Sigma, USA*)	10 mM
NaF (*Merck, Germany*)	6,08 mM

Tableau 2.3 : Composition du tampon Hypotonic Buffer (HB) concentré 10 fois.

Composants	**Concentration finale**
NaF *(Merck,Germany)*	50 mM
Na_2MoO_4 (*Merck,Germany*)	10 mM
Hepes (*Merck,Germany*)	200 mM
EDTA (*Merck,Germany*)	1 mM

2.5.2 Dosage des protéines par la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA)

2.5.2.1 Principe

Cette méthode repose sur la réduction des ions cuivre (Cu^{2+}) par les atomes d'azote des liens peptidiques des protéines dénaturées par une lyse alcaline. L'ion monovalent Cu^{+} réagit avec l'acide bicinchonique (BCA) formant ainsi un complexe violet qui possède une forte absorbance à 562 nm.

2.5.2.2 Matériel et méthode

Pour déterminer la concentration en protéines dans les échantillons, une courbe d'étalonnage réalisée à partir de solutions standard contenant respectivement de 0,3125 à 25 µg de BSA, ce qui correspond à des concentrations croissantes en protéines allant de 25 à 2000 µg/ml. Un volume de 12,5 µl d'échantillon, des standards et des blancs réalisés (12,5 µl de tampon de lyse pour les échantillons et 12,5 d'eau pour l'étalon) sont ajoutés à 100 µl de "working reagent" du BCA protein kit (*Pierce, Grande Bretagne*). Les solutions sont vortexées 30 s et incubées pendant 30 min à 37 °C dans une plaque 96 puits (*Promega, USA*). L'absorbance de l'échantillon est mesurée au lecteur de plaque (*Bio-Rad, Allemagne*) à 562 nm. La concentration en protéines de l'échantillon est calculée à l'aide de l'équation de la droite de régression réalisée à partir de la courbe d'étalonnage : $x = (y-b)/a$

Avec : x = concentration en protéines de l'échantillon, y = absorbance des échantillons, b = ordonnée à l'origine de la droite de régression, a = pente de la droite de régression

2.6 Western Blotting sur gel SDS-PAGE

2.6.1 Principe

Le Western Blotting est une technique semi-quantitative permettant d'analyser l'abondance des protéines. Lors de ce mémoire, cette technique a été utilisée afin de caractériser d'une part l'abondance nucléaire du co-activateur PGC-1α et des facteurs de transcription NRF-1, NRF-2, YY1 et PPAR-γ , et d'autre part de déterminer l'abondance totale des protéines mitochondriales TOM 40, TOM 20, TFAM, les sous-unités α et β de l'ATP synthase et l'ubiquinol coenzyme Q réductase dans des pré-adipocytes 3T3-L1 différenciés ou non en adipocytes puis incubés en présence de FCCP ou de TNFα pendant 1, 3 ou 6 jours.

2.6.2 Matériel et méthode

2.6.2.1 Sous-culture

Des cellules 3T3-L1 sont ensemencées à 50% de confluence dans des boîtes de culture de 75 cm^2. Lorsque la confluence est atteinte, les pré-adipocytes sont différenciés ou non pendant 10 ou 12 jours puis incubés ou non en présence de FCCP ou de TNFα pendant 1, 3 ou 6 jours.

Tableau 2.4 : Composition du tampon de resuspension (RE)

Composants	**Concentration finale**
HB (concentré 10 fois)	10%
Glycérol (*Merck, Germany*)	20%
H_2O	70%

Tableau 2.5 : Composition du tampon salin SA

Composants	**Concentration finale**
HB (concentré 10 fois)	10%
Glycérol (*Merck germany*)	20%
NaCl 4M (*Merck, Germany*)	20%
H_2O	50%

Tableau 2.6 : Composition du tampon SB (Sample Buffer) concentré 5 fois

Composants	**Concentration finale**
Tris HCl (*Merck, Germany*)	1 M; pH 6,8
SDS (*ICN Biomedicals, USA*)	20%
Glycerol (*Merck, Germany*)	20%
β-mercaptoéthanol (*Flukachemie AG, Suisse*)	4%
Bleu de bromophénol (*Janssens Chimica Belgium*)	1%

Tableau 2.7 : Composition du gel séparateur

Composants	**Concentration finale**
Tris-HCl (*Merck, Germany*)	1 M pH 8,9
SDS (*ICN Biomedicals, USA*)	10%
Acrylamide Ilbis (*Bio-Rad, USA*)	15,12 ou 10%
Ammonium persulfate (APS) (*Pharmacia, Biotech, Suede*)	0,083%
Tétraméthyle éthylène diamine (TEMED) (*Pharmacia Biotech, Suède*)	0,111%

Tableau 2.8 : Composition du gel concentrateur

Composants	**Concentration finale**
Tris-HCl (*Merck, Germany*)	0.28 M
SDS (*ICN Biomedicals, USA*)	7
Acrylamide Ilbis (*Bio-Rad, USA*)	5.128
Ammonium persulfate (APS) (*Pharmacia Biotech, Suède*)	0.1
Tétraméthyle éthylène diamine (TEMED) (*Pharmacia Biotech, Suède*)	0.15

2.6.2.2 Préparation des échantillons

2.6.2.2.1 Préparation des extraits de protéines nucléaires

Des cellules 3T3-L1 sont préalablement rincées 2 fois dans 10 ml de PBS glacé et ensuite incubées pendant 5 min dans 10 ml d'une solution hypotonique (Hypotonic Buffer) (HB) (**Tableau 2.1**) qui induit un choc osmotique et le gonflement des cellules. Les boîtes de culture sont ensuite décantées, et le tapis cellulaire est raclé dans 1 ml de tampon de lyse contenant 0,5% de NP-40, un détergent qui facilite la lyse des cellules. Les lysats cellulaires sont ensuite transférés dans des microtubes et centrifugés 30 s à 13 000 rpm. Le surnageant est décanté et le culot contenant les noyaux est remis en suspension avec un volume de tampon RE (RE ; **Tableau 2.2**). Deux volumes de tampon salin (SA ; **Tableau 2.3**) sont ensuite ajoutés et les échantillons sont incubés sur roue à 4 C° pendant 30 min avant d'être centrifugés 10 min à 13 000 rpm. Le surnageant, contenant les protéines nucléaires extraites des noyaux, est récupéré et fractionné en aliquots de 15 µl conservés à -70°C. La concentration en protéines des échantillons est déterminée par la méthode de Bradford (décrite au paragraphe 2.5.1).

2.6.2.2.2 Préparation des lysats cellulaires

Au cours de la préparation de lysats cellulaires, les protéines intracellulaires sont récupérées par lyse des membranes avec un détergent.

Les pré-adipocytes 3T3-L1 et les adipocytes dédifférenciés ou non en présence de FCCP ou de TNFα pendant 1, 3 ou 6 jours sont rincés une fois dans 10 ml de PBS glacé puis raclés dans 1 ml de tampon de lyse (**Tableau 2.4**) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (*PIC, Roche,Allemagne*) et d'inhibiteurs de phosphatases (PIB, **Tableau 2.5**). Afin de maximiser la lyse cellulaire, les échantillons sont incubés 15 min sur glace, puis centrifugés pendant 15 min à 13 000 rpm à 4°C. Le surnageant est récupéré et fractionné en aliquots de 50 µl conservés à -20 °C. La concentration en protéines des échantillons est déterminée grâce à la technique du "BCA protein kit" (décrite au paragraphe 2.5.2).

Des volumes d'échantillons correspondant à 30 µg (pour les extrais nucléaires) et 10 µg (pour les lysats clairs) sont portés respectivement à 50 µl et 15 µl avec la solution dans laquelle ils ont été resuspendu et du tampon Sample Buffer (SB, **Tableau 2.6**) concentré 5 fois. Le glycérol contenu dans le tampon SB alourdit les échantillons et facilite ainsi leur dépôt dans les puits du gel d'électrophorèse, le β-mercaptoéthanol réduit les ponts disulfures des protéines et aide ainsi à leur dénaturation, et le bleu de bromophénol permet de visualiser le front de migration. Les échantillons sont ensuite portés à ébullition pendant 5 min à 100°C puis centrifugés pendant 5 min à 13 000 rpm. Les échantillons et un étalon de poids moléculaire See Blue (*Invitrogen, USA*) sont alors chargés sur le gel d'électrophorèse.

2.6.2.3 Migration des échantillons

Le gel SDS-PAGE séparateur (**Tableau 2.7**) est coulé entre deux plaques de montage et polymérise pendant 45 min à température ambiante. Le gel concentrateur (**Tableau 2.8**) est coulé sur le gel séparateur et polymérise également pendant 45 min. Les échantillons sont chargés et le montage est placé dans la cuve d'électrophorèse préalablement remplie de tampon de migration (**Tableau 2.9**). La cuve est fermée, et les électrodes sont branchées. Les échantillons migrent pendant 45 min à 25 mA dans le gel de concentration puis pendant 2h30 à 45 mA dans le gel de séparation.

Tableau 2.9 : Composition du tampon de migration

Composants	**Concentration finale**
Tris-HCl (*Merck, Germany*)	0.05 M ; pH 8.8
Glycine *(ICN Biomeducals, USA*)	0.3 M
SDS (*ICN Biomedicals, USA*)	1%

Tableau 2.10 : Composition du tampon de transfert

Composants	**Concentration finale**
Tris-HCl (*Merck, Germany*)	0.5 M ; pH 8.5
Glycine (*ICN biomedicals, USA*)	0.76 M
SDS (*ICN, biomédicals USA*)	0.1%
Méthanol	15%

Tableau 2.11 : Composition du TBS (Tris Buffer Saline)

Composants	**Concentration finale**
Tris (*Merck, Germany*)	20 mM ; pH 7.4
NaCl (*Merck, Germany*)	140 mM

2.6.2.4 Transfert des échantillons sur une membrane de PVDF

Lorsque l'étape de migration est terminée, le gel contenant les protéines est démoulé et ces dernières sont transférées sur une membrane de PVDF (Polyvinylidene difluoride) (*Amersham, UK*) par la méthode dite « semi sec ». Le gel est placé délicatement sur la membrane hydrophobe préalablement activée dans un bain de méthanol pendant 1 min et imbibée de tampon de transfert (**Tableau 2.10**). Trois papiers Whatman (*Marcherey-Nagel, Allemagne*) imbibés de tampon de transfert sont placés de part et d'autre du montage gel-membrane de PVDF. Le montage gel-membrane de PVDF-papier Whatman, est réalisé dans une cuve de transfert. Le transfert des protéines du gel vers la membrane s'effectue à un ampérage constant et qui dépend de la surface de la membrane utilisée : 0,8 cm^2/A.

2.6.2.5 Incubation de la membrane avec les anticorps et révélation

La membrane sur laquelle les protéines ont été transférées est placée dans une solution de blocage composée de TBS (Tris Buffer Saline, **Tableau 2.11**) contenant 0.1% de Tween-20 (polyéthylène sorbitan monolaurate) (*Sigma, USA*) (TBS-T 0.1%) et 2% de lait (Amersham, UK). Cette première incubation permet de minimiser la liaison aspécifique des anticorps qui seront utilisés ultérieurement. La membrane est bloquée pendant 2 h à température ambiante ou pendant 16 h à 4°C, puis elle est incubée en présence de l'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt dans une solution de TBS-T 0.1% contenant 2% de lait. Le **tableau 2.12** reprend les anticorps utilisés lors de ce mémoire. Après trois lavages successifs de 15 min dans une solution de TBS-T 0.1%, la membrane est incubée en présence de l'anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps primaire et conjugué à l'enzyme HRP (**Figure 2.3**). La membrane est de nouveau rincée trois fois dans du TBS-T 0,1% pendant 15 min, puis les protéines d'intérêt sont détectées à l'aide de la méthode de chémiluminescence : La membrane est incubée pendant 5 min en présence d'une solution de révélation issue du kit ECL (*Enhanced Chemiluminescence Advance™ Western Blotting Detection Kit, Amersham, UK*) qui contient le substrat de la peroxydase et du luminol. La membrane est ensuite placée dans l'obscurité en présence d'un film photographique (*Amersham, UK*). Les photons produits par la réaction enzymatique catalysée par la peroxydase impressionnent le film. Le film est alors plongé successivement dans un bain de fixation (*Ilford Imaging, UK*), de l'eau de ville et une solution de fixation (*Ilford Imaging, UK*) puis il est lavé à l'eau de ville et séché. Les bandes correspondant à la protéine d'intérêt sont scannées (*ImageMaster Labscan V2003.01*) et quantifiées (*ImageQuant TL V2003.03*). Les densités optiques ainsi obtenues sont normalisées par celles correspondant au contrôle de charge puis rapportées aux valeurs obtenues pour les cellules contrôles adipocytaires.

2.7 Immunoprécipitation du co-activateur transcriptionnel PGC-1α

2.7.1 Principe

Cette technique permet d'enrichir un lysat cellulaire en une protéine d'intérêt en immunoprécipitant cette protéine à l'aide d'un anticorps. Des billes couvertes de protéines A et/ou G (ayant comme caractéristique une forte affinité pour le fragment Fc des anticorps) sont ajoutées au lysat cellulaire contenant les complexes immuns formés par la protéine et l'anticorps. Après plusieurs étapes de rinçages en présence du tampon de lyse, une centrifugation permet de sédimenter les complexes immuns. Les protéines d'intérêt sont ensuite détachées des anticorps et des billes d'agarose par dénaturation. Une dernière étape de centrifugation permet de récupérer les protéines d'intérêt présentes dans le surnageant. La

Tableau 2.12 : Tableau reprenant le nom, l'origine et les dilutions des anticorps primaires et secondaires utilisés au cours de ce mémoire.

	Anticorps primaire		**Anticorps secondaire**	
Protéines d'intérêt	Nom et origine	Dilution	Nom et origine	Dilution
	Anti-PGC1-α (don du professeur Kelly, Washington University School, USA)	1000	HRP anti-lapin (*Amersham, UK*)	200 000
	Anti-NRF-1 (Santa Cruz Biothechnology)	1000	HRPanti-chèvre (*Amersham, UK*)	150 000
	Anti-NRF-2 (Santa Cruz Biothechnology)	5000	HRP anti-lapin (*Amersham, UK*)	200 000
	Anti PPAR-γ (Santa Cruz Biothechnology)	5000	HRP anti-lapin (*Amersham, UK*)	200 000
	Anti YY1 (Abnova corporation)	1000	HRP anti-souris (Amersham, UK)	200 000
	Anti-TOM 40 (Santa Cruz Biothecnology)	5000	HRP anti-lapin (*Amersham, UK*)	200 000
	Anti-TOM 20 (Transduction laboratories)	5000	HRP anti-souris (*Amersham, UK*)	200 000
	Anti Ubiquinone enzyeme Q reductase (Mitosciences)	5000	HRP anti-souris (*Amersham, UK*)	200 000
	Anti-Tfam (don du professeur Wiesner (University of Khorn, Gernmany)	5000	HRP anti-lapin (*Amersham, UK*)	200 000
	Anti-ATP synthase (sous-unité α) (Molecular Probes)	5000	HRP anti-souris (*Amersham, UK*)	200 000
	Anti-ATP synthase (sous unité β) (Molecular probes)	5000	HRP anti-souris (*Amersham, UK*)	200 000
	Anti cytochrome c (Santa Cruz)	100	HRP anti-lapin (*Amersham, UK*)	1000
	Anti C/EBPα (Santa Cruz)	500	HRP anti-chevre (*Amersham, UK*)	1000
	Anti-Phospho thréonine (Cell signaling)	1000	HRP anti-lapin (*Amersham, UK*)	150 000
	Anti-Acétyl Lysine (Cell Signaling)	1000	HRP anti-lapin (*Amersham, UK*)	150 000
Controles de charge	Anti-TBP (Santa Cruz biothecnology)	5000	HRP anti-lapin (*Amersham, UK*)	200 000

présence et l'abondance de la protéine d'intérêt et de ses modifications post-traductionnelles sont identifiées par la technique de Western Blotting.

2.7.2 Matériel et méthode

Des cellules 3T3-L1 sont ensemencées à 50% de confluence dans des boîtes de cultures de 75 cm^2. Lorsque la confluence est atteinte, les pré-adipocytes sont différenciés ou non pendant 10 ou 12 jours puis incubés ou non en présence de FCCP ou de TNFα pendant 1 jour.

Les cellules sont rincées trois fois dans 10 ml de PBS glacé et raclées dans 1 ml de tampon de lyse utilisé pour réaliser des lysats clairs (Tableau 2.4). Les échantillons sont incubés pendant 15 min sur glace puis soniqués pendant 5 s et à quatre reprises. Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 10 min à 13 000 rpm. Le surnageant est récupéré et 80 µl est conservé à -20°C afin de comparer ultérieurement l'abondance de la protéine d'intérêt dans 50 µg de lysat total et dans une fraction enrichie en protéines d'intérêt.

Une étape de « pre-clearing » est ensuite réalisée sur les lysats obtenus afin d'éliminer les protéines s'adsorbant de manière non spécifique sur les billes d'agarose. Les lysats sont incubés en présence de 60 µl de billes d'agarose couvertes de protéines A (*Oncogène, USA*) sur roue pendant 2 h à 4°C. Une centrifugation pendant 30 s à 12 000 g à 4°C permet de sédimenter les complexes billes-protéines. Les surnageants récupérés sont alors incubés sur roue 2 h à 4°C en présence de l'anticorps primaire anti-PGC-1α. Deux contrôles sans anticorps sont également réalisés, l'un sur des lysats de pré-adipocytes et l'autre sur celui d'adipocytes. Ces contrôles ont pour rôle de vérifier la spécificité de l'immunoprécipitation de la protéine PGC-1α. Puis les surnageants sont incubés en présence de 60 µl de billes d'agarose couvertes de protéine A sur roue pendant 16 h à 4°C. Une centrifugation de 20 s à 12 000 g permet de récupérer les complexes immuns formés. Ceux-ci sont rincés trois fois avec 1 ml de tampon de lyse puis resuspendus dans 60 µl de tampon SB concentré deux fois et incubés à 100 °C pendant 5 min. La chaleur dénature les anticorps et le β-mercaptoéthanol présent dans le tampon SB réduit leurs ponts disulfures. Une dernière centrifugation de 5 min à 11 400 rpm sédimente les billes d'agarose et permet de récupérer les protéines PGC-1α libérées des anticorps, dans le surnageant.

L'abondance de la protéine PGC-1α et ses modifications post-traductionnelles sont recherchées par Western Blotting.

2.8 PCR en temps réel

2.8.1 Principe

La PCR en temps réel (Real-Time Polymerase Chain Reaction) permet d'amplifier un fragment d'ADN de manière spécifique et exponentielle à partir d'un couple d'amorces spécifiques du fragment d'ADN d'intérêt. Dans ce mémoire, la PCR en temps réel nous a permis de quantifier d'une part l'expression relative des gènes codant PGC-1α et SIRT 1 dans des pré-adipocytes et des adipocytes incubés ou non en présence de TNFα ou de FCCP pendant 1, 3 et 6 jours, et d'autre part de déterminer le taux d'ADN mitochondrial dans des adipocytes incubés en présence de TNFα ou de FCCP pendant 6 jours par rapport aux adipocytes en amplifiant et en quantifiant une séquence non codante de l'ADNmt, la séquence D-loop.

Tableau 2.13 : Tableau récapitulatif des différentes amorces utilisées lors des PCR en temps réel.

Gènes	Séquences des amorces
TBP	*Amorce sens* $^{5'}$CAG TTA CAG GTG GCA TGA$^{3'}$ *Amorce anti-sens* $^{5'}$TAG TGC TGC AGG GTG ATT TCA G$^{3'}$
D-Loop	*Amorce sens* $^{5'}$TAC CAT CCT CCG TGA AAC CAA$^{3'}$ *Amorce anti-sens* $^{5'}$GCATTTGATGGCCCTGAAGTA$^{3'}$
PGC-1α	*Amorce sens* *5'TGAGCACGAAAGGCTCAAGA3'* *Amorce anti-sens* *5'CTCTCTGTTTGGCCCTTTCAGA3'*

Tableau 2.14 : Composition du tampon de digestion

Composants	Concentration finale
NaCl (*Merck, Germany*)	100 mM
Tris (*Merck, Germany*)	10 mM
EDTA (*Merck, Germany*)	25 mM
SDS (*ICN Biomedicals, USA*)	0.5%

2.8.2 Matériel et méthode

2.8.2.1 Sous-culture

Des cellules 3T3-L1 sont ensemencées à 50% de confluence dans des boîtes de cultures de 75 cm^2. Lorsque la confluence est atteinte, les pré-adipocytes sont différenciés ou non pendant 10 ou 12 jours puis incubés ou non en présence de FCCP ou de TNFα pendant 1, 3 ou 6 jours.

2.8.2.2 Choix des amorces

Le choix des amorces sens et anti-sens utilisées pour l'amplification d'une part des transcrits de PGC-1α et de la séquence non codante D-loop est effectué à l'aide du programme Primer Express (*Applied Biosystem*) (**Tableau 2.13**). Ce programme permet de choisir des amorces permettant une amplification optimale de l'ADN par l'appareil ABI Prim 7000.

2.8.2.3 Extraction de l'ARN total et rétrotranscription des ARNm en ADNc

L'ARN total des cellules 3T3-L1 différenciées ou non pendant 10 jours puis incubées ou non en présence de FCCP ou de TNFα pendant 1, 3 ou 6 jours est extrait à l'aide du kit « RNAgents Total RNA Isolation System » (*Promega, USA*). La concentration de l'échantillon est déterminée par une mesure de la densité optique à 260 nm.

La rétrotranscription de l'ARNm des échantillons en ADNc est effectuée sur une quantité de 5 µg au moyen de la transcriptase inverse Super Script II (*Invitrogen, Pays Bas*).

2.8.2.4 Extraction d'ADN génomique (ADNg)

Les adipocytes incubés ou non en présence de TNFα ou de FCCP pendant 6 jours sont rincés trois fois avec 10 ml de PBS glacé et raclés dans 500 µl de solution contenant du tampon de digestion (**Tableau 2.14**) et de la protéinase K (à une concentration finale de 0,1 mg/ml). Le lysat obtenu est transféré dans un microtube et incubé sur roue à 50°C pendant 12 à 18 heures. Un volume de phénol-chloroforme-isoamyl à pH 8.0 (*Promega, USA*) est ensuite ajouté au lysat. La solution est mélangée par inversion et centrifugée pendant 10 min à 1700 g. La phase supérieure (contenant l'ADN) est récupérée délicatement dans un autre microtube auquel on ajoute un demi volume d'acétate d'ammonium 7,5 M et deux volumes d'éthanol 100 %, ce qui précipite l'ADN sous forme de filaments blancs. La solution obtenue est mélangée par inversion et incubée pendant 30 min à -20°C puis centrifugée 5 min à 1700 g. Le culot, contenant l'ADN, est lavé dans 500 µl d'éthanol 70% (*Merck, Germany*). Le culot est ensuite séché à température ambiante pendant approximativement une heure avant d'être resuspendu dans 50 µl d'H_2O DNAse-free. Une dernière incubation des échantillons pendant 1 h à 65°C permet la solubilisation complète de l'ADN. La concentration en ADN génomique des échantillons est déterminée par une mesure de la densité optique à 260 nm. Les échantillons sont conservés à -20°C.

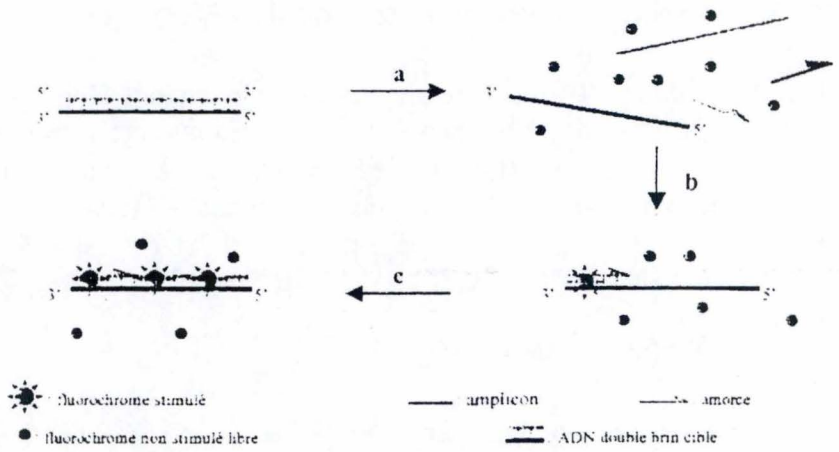


Figure 2.4 : Visualisation du mécanisme d'action de l'agent intercalant Syber Green lors de la PCR en temps réel (real time polymerase chain reaction). (a) Pendant la dénaturation l'agent Syber Green I exhibe peu de fluorescence. (b) A température d'appariement, quelques molécules se lient au double brin d'ADN naissant résultant en une émission de fluorescence lors de l'excitation. (c) Durant la phase de polymérisation de plus en plus de molécules de Syber Green se lient au brin naissant et l'accroissement de la fluorescence peut être suivie en temps réel (Houde,2002).

2.8.2.5 Amplification de l'ADNg ou de l'ADNc par PCR en temps réel

Un « Master mix » composé du mix SYBR Green I (12.5 µl/microtube) (*In Virogen, Pays Bas*), d'eau (5.84 µl/ par microtube), de 9 µM d'amorces sens et de 9 µM d'amorces anti-sens est réalisé. Un volume de 20 ul de cette solution « Master Mix » est déposé dans chaque puits, ainsi que 5 µl d'ADNc dilué de 10 à 10 000 fois ou 1 ng d'ADNg. Le mix Syber Green contient outre l'agent intercalant, une enzyme ADN polymérase thermostable ainsi que des nucléotides. Une amplification d'un ADNc dont l'abondance du transcrit est identique dans toutes nos conditions expérimentales (ADNc de TFIID) et l'amplification d'une séquence codante du noyau permettent de normaliser respectivement l'abondance relative du transcrit d'intérêt et l'abondance de l'ADN mitochondrial.

La plaque 96 puits est fermée et spinée avant d'être placé dans un appareil PCR en temps réel (ABI Prim 7000). L'utilisation du programme « SDS software » permet la détection de le fluorescence de l'agent intercalant Syber Green quand ce dernier s'intercale dans l'ADN double brin (**Figure 2.4**). Un contrôle négatif contenant uniquement de l'eau distillée permet de s'assurer qu'aucun contaminant n'a été amplifié lors de l'expérience.

2.8.2.6 Analyse des résultats

Les dilutions d'ADN effectuées permettent de déterminer une droite de régression pour les fragments d'ADN d'intérêts. La pente de cette droite renseigne sur l'efficience de la PCR : une efficience optimale est obtenue pour une pente de -3,2 selon la formule :
$E = 10^{-1/pente} - 1$

Seule l'expression des gènes pour lesquels les droites de régression sont parallèles peut être comparée. L'abondance relative des transcrits peut être déterminée par soustraction du cycle seuil ou cycle treshold (Ct) du gène choisi comme référence des Cts des fragments d'ADN d'intérêts pour les différentes conditions expérimentales selon la formule : $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ avec $\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct_{test}) - (\Delta Ct_{CTL})$. Le Ct peut être défini comme le cycle de la PCR au cours duquel la fluorescence émise se distingue du bruit de fond et se situe dans la phase exponentielle de la réaction d'amplification. Il permet donc de calculer la quantité d'ADN de départ sans que cela soit influencé par la limitation des amorces. Le Ct étant inversement proportionnel à la quantité d'ADN de départ, il est d'autant plus faible que la quantité d'ADN de départ est élevée.

2.9 Electrophorèse bidimensionnelle 2D-DIGE (2D Differential In-Gel Electrophoresis)

2.9.1 Principe

L'analyse protéomique est une technique permettant l'identification simultanée de protéines provenant soit d'une lyse totale des cellules soit d'une fraction subcellulaire. Cette technique peut être séparée en différentes étapes. La préparation des échantillons est suivie de la séparation des protéines en fonction de leur point Isoélectrique (pI) puis en fonction de leur poids moléculaire. L'analyse en spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time Of Flight*) des peptides provenant des protéines digérées et l'interrogation des banques de données permettent l'identification des protéines.

Plus précisément, les protéines extraites de cellules d'intérêts sont séparées pour obtenir in fine des protéines isolées. La séparation se fait selon 2 caractéristiques à savoir la charge (IEF : IsoElectric Focusing) et le poids moléculaire (électrophorèse SDS-PAGE). La

technique 2D-DIGE repose sur l'utilisation de sondes de faible poids moléculaire (cyanine 2, cyanine 3 et cyanine 5) qui marquent les résidus lysines des protéines avant les étapes de séparation. L'atout majeur de cette technique réside dans le marquage différent (cyanine 3 ou cyanine 5) de protéines provenant de 2 conditions expérimentales différentes ce qui permet leur migration sur un seul et même gel. Les protéines sont ensuite détectées en scannant le gel aux longueurs d'onde correspondant à chacune des trois cyanines, 2, 3 et 5. Un mélange d'une même quantité de protéines issues des différentes conditions expérimentales est de plus traité avec la cyanine 2 et constitue le standard interne. Celui-ci, en étant présent sur tous les gels, permet d'éliminer les variations de gel à gel en les normalisant par rapport à l'un d'entre eux, le gel « Master ». L'analyse terminée, une liste des spots présentant une modification de leur abondance dans la condition test par rapport à la condition contrôle est déterminée. Ce type de gel, dit analytique, ne permet pas en théorie une identification des protéines correspondant aux spots d'intérêt car la quantité engagée est généralement trop faible. Cependant, dans certains cas, on peut tenter une identification des protéines. Dans ce cas, une coloration des gels avec le fluorochrome Krypton est nécessaire car les cyanines ne marquant que les lysines, 3% seulement de chaque protéine est marqué. Le Krypton marquant la totalité des protéines, l'ensemble de la ou des protéines constituant un spot est bien défini. Les gels colorés doivent être scannés et une nouvelle liste des spots d'intérêt est définie par identification des spots entre les gels marqués avec les cyanines et les mêmes gels marqués avec le Krypton. Les spots d'intérêt sont ensuite découpés puis digérés en présence de trypsine et les peptides sont analysés en spectrométrie de masse à l'aide d'un appareil MALDI-TOF qui est un tandem MS/MS permettant l'obtention de la séquence et de la masse des peptides issus de la digestion. Cette méthode consiste à co-cristalliser les peptides sur une cible avec une matrice (généralement l'acide alpha-cyno-4-hydroxycinnamique). Un laser vient ensuite frapper la matrice ce qui provoque l'ionisation des peptides. Les peptides étant chargés, les ions sont accélérés à l'aide d'un champ électrique et volent dans un tube de vol sous vide. Le temps de vol d'un peptide dépend à la fois de son poids moléculaire et de sa charge, il est donc possible de déterminer le rapport masse/charge en fonction du temps de vol.

Dans ce mémoire, nous avons contribué à une première analyse subprotéomique à partir d'extraits de protéines nucléaires dans le but d'identifier d'éventuels régulateurs transcriptionnels (facteurs de transcription, co-activateurs,...) dont l'abondance est modifiée dans des adipocytes soumis à un dysfonctionnement mitochondrial (FCCP) ou incubés en présence de TNFα pendant 1 jour par rapport aux adipocytes.

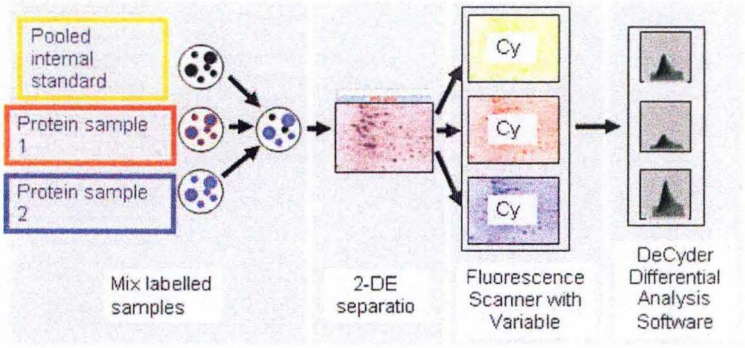
2.9.2 Matériel et méthode

2.9.2.1 Sous-culture

Des cellules 3T3-L1 sont ensemencées à 50% de confluence dans des boîtes de culture de 75 cm^2. Lorsque la confluence est atteinte, les pré-adipocytes sont différenciés ou non pendant 10 jours puis incubés ou non en présence de FCCP ou de TNFα pendant 1 jour.

2.9.2.2 Préparation des échantillons

Au terme des traitements (pré-adipocytes, adipocytes, adipocytes incubés en présence de FCCP ou de TNFα pendant 1 jour), une extraction des protéines nucléaires est réalisée (décrite au paragraphe 2.6.2.2.2). Nous avons réalisé des triples indépendants pour chaque condition expérimentale. Une étape de précipitation des protéines est ensuite réalisée afin



http://www.smbs.buffalo.edu/bch/images/figures/Dige.JPG

Figure 2.5 :Principe de fonctionnement de l'électrophorèse bidimensionnelle

Tableau 2.15 : Composition du tampon DLA

Composition	**Concentration finale**
Urée (*Amersham , UK*)	7 M
Thiourée (*Amersham , UK*)	2 M
Chaps (*Amersham , UK*)	2%
DTT (*Amersham , UK*)	2%

Tableau 2.16 : Préparation des échantillons pour le 2D-DIGE

Gel	**Cy 2**	**Cy 3**	**Cy 5**
Gel 1	14,5 µg de chaque échantillon	25 µg de TNF 1	25 µg de DIFF 1
Gel 2	14,5 µg de chaque échantillon	25 µg de FCCP 3	25 µg de DIFF 2
Gel 3	14,5 µg de chaque échantillon	25 µg de DIFF 3	25 µg de CTL 3
Gel 4	14,5 µg de chaque échantillon	25 µg de CTL 1	25 µg de FCCP 1
Gel 5	14,5 µg de chaque échantillon	25 µg de TNF 2	25 µg de FCCP 2
Gel 6	14,5 µg de chaque échantillon	25 µg de CTL 2	25 µg de TNF 3

d'éliminer les sels et détergents chargés qui pourraient perturber la migration des échantillons en fonction de leur point isoélectrique.

La quantité de protéines et le volume ne pouvant excéder respectivement 100 µg et 100 µl, nous avons réalisé cette étape de précipitation des protéines à partir de 95 µg de protéines de départ, le volume étant inférieur à 100 µl. Pour chacune des quatre conditions expérimentales en triples, soit 12 échantillons, 95 µg de protéines d'extraits nucléaires sont mélangés à 300 µl de solution de précipitant (*Amersham, UK*). La solution obtenue est vortexée pendant 30 sec, mélangée par inversion et incubée sur glace pendant 15 min. Un volume de 300 µl de co-précipitant (*Amersham, UK*) est ensuite ajouté et les échantillons sont à nouveau vortexés pendant 30 sec avant d'être centrifugés à 13 000 rpm pendant 5 min à 4°C. Le culot obtenu est constitué des protéines précipitées. Le surnageant est délicatement décanté et les échantillons sont de nouveau centrifugés comme précédemment afin de décanter totalement le surnageant. Un volume de 40 µl de solution de co-précipitant est déposé au-dessus du culot et les échantillons sont incubés sur glace pendant 5 min puis centrifugés à 13 000 rpm et à 4 C° pendant 5 min. Le surnageant est décanté et 25 µl d'eau distillée est ensuite déposé sur le culot. Les échantillons sont vortexés à deux reprises pendant 30 sec. Un volume de 1 ml de solution « wash buffer » (*Amersham, UK*) et 5 µl de solution « wash additive » (*Amersham, UK*) sont successivement déposés sur le culot. Les échantillons sont incubés pendant 10 min à -20 C° puis vortexés pendant 30 s et ce à trois reprises. Puis ils sont incubés à -20 °C pendant 1h30 et centrifugés à 13 000 rpm à 4 °C pendant 5 min afin de précipiter les protéines. Le surnageant est décanté et le culot est séché à température ambiante pendant 3 min puis resuspendus dans un volume adéquat de solution DLA (**Tableau 2.15**) afin que la concentration finale des échantillons soit approximativement de 5 µg/µl en tenant compte d'une perte de matériel de l'ordre de 30 % au cours de la purification des échantillons. Les échantillons sont ensuite incubés pendant 30 min sous agitateur à 18 °C puis soniqués pendant 10 min sur glace afin de solubiliser totalement les échantillons. La concentration en protéine est déterminée une première fois par la méthode de Bradford (décrite au paragraphe 2.5.1). Enfin, les échantillons sont centrifugés à 13 000 rpm à 4 °C pendant 5 min et la concentration en protéines est à nouveau déterminée. Si les protéines ont été solubilisées correctement c'est-à-dire si l'on retrouve une concentration en protéines équivalente avant et après la dernière centrifugation, les échantillons sont conservés à -70 °C.

2.9.2.3 Marquage des échantillons

Lorsque la précipitation des protéines est effectuée et la concentration en protéines déterminée, chaque échantillon est mis à pH entre 8 et 8,5. Ensuite 14.5 µg de protéines provenant de chaque condition expérimentale est prélevé dans un microtube auquel on ajoute 7 µl de cyanine 2 (*Amersham, UK*). Le mélange ainsi préparé constitue le standard interne. 25 µg de protéines est également prélevé dans d'autres microtubes auxquels sont ajoutés 1µl de cyanine 3 (Amersham, UK) ou 1µl de cyanine 5 (*Amersham, UK*) avant d'être mélangés et laissé incubé 30 minutes à l'obscurité à 4°C. Après avoir ajouté 1 µl et 7 µl de lysine (*Sigma, USA*) respectivement aux différentes conditions expérimentales et au standard interne, les tubes sont à nouveau mélangé et incubés à 4°C à l'obscurité pendant 10 minutes. Enfin, les mélanges des différentes conditions expérimentales (**Tableau 2.16**) sont préparés, dilués deux fois dans du tampon DLA, et incubés 15 minutes à température ambiante avant d'être chargés sur les gels. Nous avons réalisé 6 gels de type 2D-DIGE car nous disposions de quatre conditions expérimentales en triple indépendant, deux conditions expérimentales étant chargées sur un gel.

Tableau 2.17 : Composition du tampon de réhydratation des gels non linéaires de pH 3-11

Composants	**Concentration finale**
Urée	7 M
Thiourée	2 M
CHAPS	2%

Tableau 2.18: Programme suivi par l'IPGphor

Etapes	**Programme suivi**
Etape 1	300 V-3 h
Etape 2	1000 V -6h
Etape 3	8000 V -3 h
Etape 4	8000 v -50000Vh

Tableau 2.19 : Composition des gel de 2nde dimension SDS-PAGE

Composants	**Concentration finale**
Acrylamide 30/0.8 (*Bio-Rad, USA*)	10%
Tris 1.5 M pH 8.8 (*Merck, Germany*)	0.375 M
SDS 10% (*ICN biomedicals, USA*)	0.1%
APS 10% (*Pharmacia Biotech, Suède*)	0.1%
TEMED 10% (*Pharmacia Biotech, Suède*)	0.0139%

Tableau 2.20 : Composition de la solution d'équilibration

Composants	**Concentration finale**
Tris HCL 1.5M pH 8.8 (*Merck,Germany*)	0.05M
Urée	6M
Glycérol (*Merck ,Germany*)	30%
SDS (*ICN biomedicals, USA*)	2%

Tableau 2.21 : Composition du tampon d'électrophorèse

2.9.2.4 Electrophorèse en Isoelectric Focusing (IEF)

Du tampon de réhydratation (**Tableau 2.17**) auquel a été ajouté du DTT (*Amersham, UK*) 2.8% et des IPGphor (*Pharmacia Biotech*) est placé dans 6 rangées d'un Reswelling Tray (Amersham, UK). Le gel de migration des protéines en fonction de leur pI, un gel dont le pH s'étend de manière non linéaire de 3 à 11 (NL 3-11) (Amersham, UK), est incubé sur le tampon de réhydratation pendant 15 minutes avant d'être recouvert de « cover fluid » (*Amersham, UK*) pour éviter qu'il ne se dessèche. Ce dernier doit être ajouté délicatement de part et d'autre du gel afin d'éviter la perte du tampon de réhydratation. Après une nuit de réhydratation, deux « paper wicks »(*Amersham, UK*) préalablement découpés et mouillés avec de l'eau milli Q sont placés aux deux extrémités du gel. Ils permettront de recueillir les sels encore présents dans l'échantillon et qui migrent avant les échantillons. Le gel est à nouveau recouvert de « cover fluid ». La cupule de chargement est placée près de l'électrode positive et le « strip holder » est déposé sur l'IPGphor (*Pharmacia Biotech*). Enfin les mélanges contenant les protéines marquées aux cyanines sont chargés entièrement dans la cupule. La migration s'effectue pendant 16h et permet successivement, l'entrée des échantillons dans le gel, la migration des sels vers les extrémités du gel, et la migration des protéines qui se positionnent à leur pI. Le programme que suit l'IPGphor lors de la migration des échantillons se trouve dans le tableau 2.17.

2.9.2.5 Electrophorèse SDS-PAGE

Au cours de cette seconde étape, les protéines sont séparées selon leur poids moléculaire. Cette migration se passe donc en conditions dénaturantes dans un gel de type SDS-PAGE. Les plaques de verre sont placées dans le « gel caster » (*Amersham, UK*) (en alternant une plaque avec un espaceur, une plaque sans espaceur), la solution de deuxième dimension est préparée (**Tableau 2.18**), coulée dans le « gel caster » et recouverte d'1 ml d'isobutanol. Nous utilisons l'isobutanol afin d'éviter tout contact entre l'oxygène et le gel ce qui pourrait nuire à la polymérisation. Les gels NL 3-11 sont rincés à l'eau distillée et placés à deux reprises dans une solution d'équilibration (**Tableau 2.19**) contenant du DTT (*Amersham, UK*) 1% la première fois et de l'IODOacétamide (*Biorad, Allemagne*) 2.5% la deuxième fois avant d'être trempés dans du tampon d'électrophorèse. Les gels NL 3-11 sont ensuite placés entre deux plaques de verre à 0,5 cm du bord des gels SDS-PAGE préalablement rincés à l'eau. Une solution d'agarose est versée entre les plaques et le gel NL 3-11 est placé contre le gel SDS-PAGE.

Les plaques sont ensuite placées dans l'Ettan Dalt (*Amersham, UK*) préalablement rempli de tampon d'électrophorèse. La migration s'effectue pendant 17 heures.

2.9.2.6 La révélation

Cette dernière migration terminée, les gels sont rincés à l'eau et placés dans le scanner Typhoon 9400 (*Amersham, UK*). Chacun des gels est scanné à 3 longueurs d'onde différentes correspondants aux longueurs d'ondes d'absorbance des 3 fluorochromes utilisés. Le programme Typhoon Scanner Control permet d'optimiser les paramètres d'optimisation du scanner. L'image des gels scannés est analysée à l'aide du programme DeCyder 6 (*Amersham, UK*). Ce dernier dénombre le nombre de spots sur chacun des 6 gels et défini un gel dit « master » qui servira de références pour chacune des analyses des autres. Les spots présentant des variations d'expression significatives (test de Student < 0.05) sont répertoriés dans une liste.

Composants	Concentration finale
Tris (*Merck,Germany*)	15.12g/l
Glycine (*ICN biomedicals, USA*)	72g/l
SDS (*ICN biomedicals, USA*)	5g/l

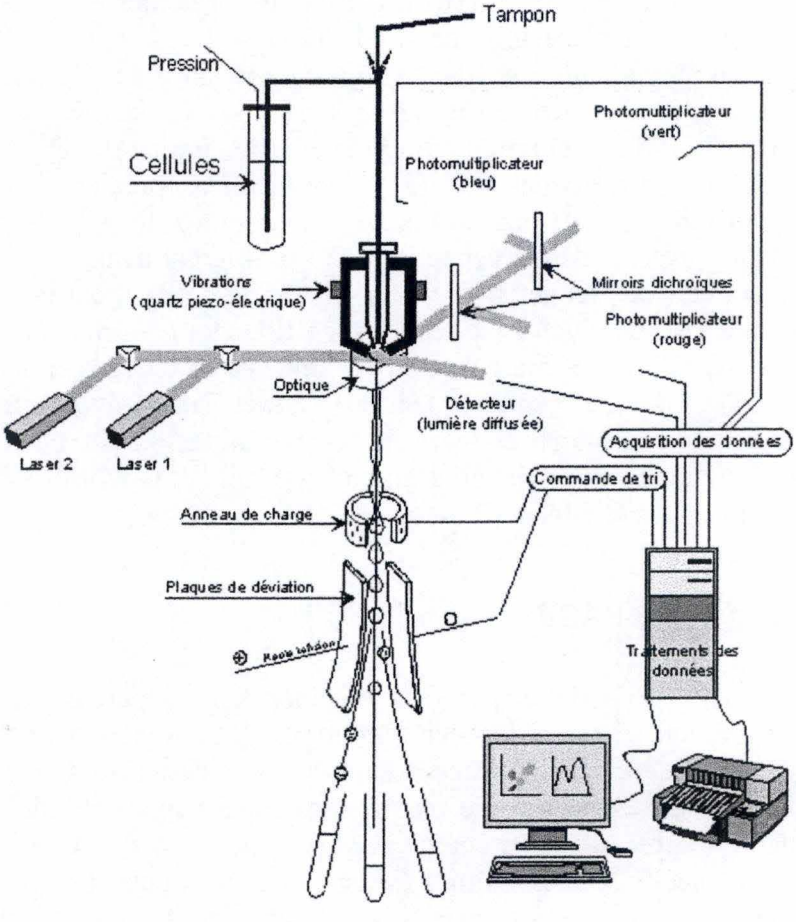


Figure 2.6: Schéma représentant les différentes étapes d'une analyse au FACS: Une légère pression permet l'injection de la suspension dans le dispositif. A l'intérieur de celui-ci, le jet contenant les cellules intercepte un ou plusieurs faisceaux laser. La fluorescence et la lumière diffusée sont collectées par un système optique et mesurées au moyen de photomultiplicateurs. La diffusion aux petits angles est également mesurée au moyen d'une photodiode.
Le cytomètre est piloté par un système informatique. Après acquisition et traitement des signaux générés par les différents détecteurs, les résultats sont affichés à l'écran et/ou stockés sur disque pour des analyses ultérieures.

Les cyanines ne marquant que 3% de chaque protéine, il existe une certaine inégalité entre le signal émis par la sonde et la véritable position de la protéine dans le gel. Les gels sont donc colorés avec un fluorochrome, le Krypton, qui par interactions ioniques et hydrophobes se fixe sur les protéines. Les gels sont donc démoulés, rincés dans de l'eau distillée pendant 5 min puis fixés dans une solution contenant 40 % d'éthanol (*Merck, Germany*) et 10% d'acide acétique (*Merck, Germany*) pendant deux fois 30 min. Cette étape est nécessaire afin de précipiter les protéines au sein du gel. Ensuite, les gels sont à nouveau rincés avant d'être incubés pendant au moins 2 h dans une solution de 10 % Krypton. Les gels sont ensuite rincés pendant 30 min dans une solution d'acide acétique 10 % puis lavés dans de l'eau distillée pendant deux fois 5 min afin d'éliminer l'excès de Krypton.

Les gels sont à nouveau scannés et analysés à l'aide du programme DeCyder 6 d'une manière identique à celle effectuée précédemment. Les spots obtenus après le marquage au Krypton sont comparés à ceux qui avaient été obtenu lors de la première analyse. Les coordonnées des spots d'intérêt sont envoyées au Spot Picker (*Amersham, UK*) qui grâce à la présence des deux pastilles de référence, extrait les protéines d'intérêt avant de les placer dans un puit d'une plaque multipuits contenant 200 µl d'eau distillée.

Les protéines après avoir été digérées par la trypsine sont analysées en spectrométrie de masse à l'aide d'un appareil MALDI-TOF et une identification des peptides et des protéines correspondantes est réalisée par rapport aux banques de données.

2.10 Marquage en immunofluorescence

2.10.1 Principe

Des cellules traitées et préalablement fixées sont perméabilisées et incubées en présence d'un anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt. Un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome permet ensuite la détection du premier anticorps. Le fluorochrome excité à une longueur d'onde spécifique par le laser émit par le microscope confocal réémet des photons dont le nombre est amplifié dans un photomultiplicateur et numérisés. Le plan de l'objet est ensuite balayé point par point suivant les axes X et Y et l'image de l'échantillon est reconstruite. Enfin, le TO-PRO 3 (*Molecular Probes, USA*), un agent intercalant fluorescant une fois inséré entre les doubles brins de l'ADN, permet la localisation du noyau.

2.10.2 Matériel et méthode

Des cellules 3T3-L1 sont ensemencées à 50% de confluence dans des boîtes de culture à 12 puits (*Corning, USA*) contenant des lamelles couvres-objets (*Vel, Knittel Glaser, Allemagne*) préalablement stérilisées. Lorsque la confluence est atteinte, les pré-adipocytes sont différenciés ou non pendant 10 jours, puis incubés ou non en présence de FCCP ou de TNF-α pendant 3 jours.

Les pré-adipocytes 3T3-L1 et les adipocytes dédifférenciés ou non en présence de de FCCP ou TNFα pendant 3 jours sont rincés à 3 reprises avec 4 ml de PBS préchauffé à 4°C et fixés pendant 10 min avec 2 ml dans une solution de 3% de paraformaldéhyde (*Merck, Allemagne*) également à 37°C. Les cellules sont rincées 3 fois avec 3 ml de PBS et perméabilisées pendant 5 min avec 2 ml de PBS contenant 1% de Triton-X100. Afin de réduire le nombre de liaisons non spécifiques, les cellules sont rincées 2 fois avec 3 ml de PBS contenant 2% de BSA (bovine Serum Albumin) (*Sigma, USA*), avant d'être retournées sur une goutte de 60 µl d'anticorps primaire anti-cytochrome c (*Santa Cruz, USA*) préalablement dilué 100 fois dans du PBS à 1% de BSA déposée sur un parafilm et placée

dans une chambre humide. Les cellules ayant été perméabilisées, l'anticorps anti- cytochrome c peut diffuser dans les cellules et marquer la protéine d'intérêt.

Après une incubation de 16 h à 4°C, les lamelles sont remises dans les boîtes de culture et rincées 3 fois avec 2 ml de PBS contenant 2% de BSA avant d'être incubées 1h à température ambiante dans l'obscurité en présence de l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin couplé à une sonde fluorescente Alexa 488 nm (*Molecular Probes, USA*) diluée 1000 fois dans du PBS/BSA 1%. Les cellules sont ensuite incubées en présence de 60 µl de TO-PRO 3 (*Molecular Probes, USA*) préalablement dilué 80 fois dans une solution de PBS à 2mg/ml de RNAse d'une manière identique à celle décrite pour l'anticorps primaire. Les cellules sont ensuite rincées 3 fois avec du PBS et les lamelles couvre-objet sont retournées sur une goutte de Mowiol préalablement préchauffé à 56°C et déposé sur une lame porte-objet (*Assistant, Allemagne*). Ces lames sont ensuite placées à 4°C à l'obscurité pendant 16h. Enfin, les cellules sont observées au microscope confocal (*Leica, Allemagne*).

2.11 Analyse par cytométrie de flux

2.11.1 Principe

La cytométrie de flux (FACS ; *Fluorescence Activated Cell Sorter)* est une technique permettant des analyses multiparamétriques et simultanées de chaque cellule d'un échantillon préalablement marquée avec une sonde fluorescente ou un anticorps couplé à un fluorochrome et qui est touchée par un faisceau lumineux émis à une longueur d'onde déterminée. Les signaux lumineux réémis sont séparés par différents filtres optiques avant d'être collectés par des photomultiplicateurs, amplifiés et analysés par ordinateur. Les signaux mesurés dépendent non seulement des caractéristiques physiques des cellules (volume, longueur, granulosité) mais également des propriétés induites de fluorescences obtenues de manière directe par marquage spécifique à l'aide d'une sonde comme le MitoTracker Green ou de manière indirecte par immunomarquage avec anticorps. Dans ce mémoire, la cytométrie de flux nous à permis de quantifier l'abondance de la population mitochondriale à l'aide de la sonde MitoTracker Green (*Molecular Probes, USA*).

2.11.2 Matériel et méthode

Des cellules 3T3-L1 sont ensemencées à 50% de confluence dans des boîtes de culture 6 puits (*Corning, USA*). Lorsque la confluence est atteinte, les pré-adipocytes sont différenciés ou non pendant 10 jours puis incubés ou non en présence de FCCP ou de TNFα pendant 6 jours. Au terme de ces traitements, les cellules sont rincées dans 2 ml de PBS préalablement chauffé. Une fois celui-ci décanté, les cellules sont trypsinisées dans 1 ml de trypsine-EDTA pendant 5 min à 37°C sur agitation avant d'être transférées dans des tubes de 10 ml (*Becton Dickinson Labware, France*) auxquels on ajoute 5ml de milieu DHG contenant 10% de SVF. Les cellules sont centrifugées pendant 5 min à 1000 rpm à 20°C. Le surnageant est ensuite décanté et les cellules sont resuspendues dans 3 ml de milieu DHG contenant ou non la sonde Mitotracker Green à une concentration finale de 100 nM. Cette sonde a la capacité de s'accumuler de manière spécifique dans l'environnement lipophile des mitochondries. Les cellules sont alors incubées pendant 30 min à 37°C à l'obscurité avant d'être centrifugées pendant 10 min à 1000 rpm à 20°C. Enfin, le surnageant est décanté, les cellules resuspendues dans 2 ml de milieu DHG sans sérum et analysée au cytomètre de flux (*Calibur; BD, France*) à la longueur d'onde d'excitation de 488 nm.

Tableau 2.22: Composition du Tampon de Binding 10 fois concentré

Composition	**Concentration finale**
Tris HCl	100 mM pH 7.5
Mg Cl_2 (*Merck, Germany*)	10 mM
EDTA (*Merck, Germany*)	5 mM
NaCl (*Merck, Germany*)	500mM
Glycérol (*Merck, Germany*)	40%

Tableau 2.23 : Composition du Tampon de Binding complet

Composition	**Concentration finale**
Tampon de binding 10 fois concentré	10 %
DTT 1 M	0.2 %
DSS	0.2 %
H_2O	89.6 %

2.12 Test de liaison des facteurs de transcription PPAR-γ et C/EBPα

2.12.1 Principe

Cette technique repose sur la liaison d'un facteur de transcription d'intérêt sur des sondes de capture double brins contenant un site consensus reconnu par le facteur de transcription et fixées au fond des puits d'une plaque 96 puits. Lorsque les protéines provenant d'extraits de protéines nucléaires sont déposées dans ces puits, le facteur de transcription d'intérêt peut se lier spécifiquement à sa séquence consensus. La détection de cette liaison se fait par incubation d'un anticorps primaire dirigé spécifiquement contre le facteur de transcription d'intérêt et d'un anticorps secondaire anti-IgG couplé à la péroxydase HRP. En présence du substrat de cette enzyme, un résultat colorimétrique facilement quantifiable par un spectrophotomètre est obtenu et rend compte de la liaison du facteur de transcription à sa séquence consensus.

2.12.2 Matériel et méthode

Des cellules 3T3-L1 sont ensemencées à 50% de confluence dans des boîtes de culture de 75 cm^2. Lorsque la confluence est atteinte, les pré-adipocytes sont différenciés ou non pendant 10 jours puis incubés ou non en présence de FCCP ou de TNFα pendant 1 ou 3 jours. Les échantillons sont réalisés en triplicats.

Des extraits de protéines nucléaires sont réalisés selon la méthode décrite au paragraphe 2.6.2.2.1. Un volume de 20 µl de protéines nucléaires est déposé dans les puits d'une plaque 96 puits auxquels on a préalablement ajouté 30 µl de Tampon de Binding complet (**Tableau 2.21**). Après une incubation d'une heure à température ambiante les puits sont lavés à 3 reprises avec 200 µl du tampon PBS contenant du Tween 1% (PBS-T à 1%) et l'anticorps primaire anti-PPAR-γ (*Santa Cruz, USA*) ou l'anticorps anti-C/EBPα (*Santa Cruz, USA*) préalablement dilué 500 fois dans du PBS/BSA 1% y est ajouté. La plaque est ensuite à nouveau incubée pendant 60 min à température ambiante et lavée 4 fois avec 200 µl du tampon PBS-T 1%. Au terme de cette incubation, on ajoute 100 µl de l'anticorps secondaire anti-IgG de chèvre couplé à une péroxidase préalablement dilué 1000 fois dans du PBS contenant 1% de gloria (*Nestlé*) dans chaque puits. La plaque est mise à incuber à température ambiante pendant 60 min et les puits sont rincés à 4 reprises avec 200 µl du tampon PBS-T à 1%.

Pour mettre l'activité de la HRP en évidence, 100 µl de TMB sont déposés dans chaque puits. Après une incubation de 10 min à l'abri de la lumière, 100 µl de solution stop sont ajoutés dans chaque puits pour arrêter la réaction. La liaison du facteur de transcription à sa séquence consensus est alors estimée grâce à un lecteur de multi-plaques à 450 et 655 nm.

2.13 Marquage de l'abondance mitochondriale à l'aide de la sonde Mitotracker Red

2.13.1 Principe

Des pré-adipocytes et des adipocytes incubés en présence ou en absence de FCCP ou de TNFα sont incubés en présence de la sonde Mitotracker Red CM-H_2XRos (*Molecular Probes, USA*) qui a comme principale caractéristique de pouvoir s'accumuler dans la mitochondrie. Cette sonde, oxydée à son entrée dans la mitochondrie, émet de la lumière rouge (Em : 599 nm) une fois excitée à une longueur d'onde spécifique (Ex: 579 nm). Le

nombre de photons réémis par la sonde est amplifié dans un photomultiplicateur et numérisés. Le plan de l'objet est ensuite balayé point par point suivant les axes X et Y et l'image des cellules est reconstruite.

2.13.2 Matériel et méthodes

Des cellules 3T3-L1 sont ensemencées à 50% de confluence dans des boîtes de culture à 12 puits (*Corning,USA*) contenant des lamelles couvre-objets (*Vel, Knittel Glaser, Allemagne*) préalablement stérilisées. Lorsque la confluence est atteinte, les pré-adipocytes sont différenciés ou non pendant 10 jours, puis incubés ou non en présence de FCCP ou de TNF-α pendant 3 jours.

Une fois arrivé au terme de ces traitements, le milieu des cellules est délicatement décanté et 1 ml de milieu DHG sans sérum contenant la sonde MitoTracker Red CM-H_2XRos à une concentration finale de 500 nM est ajouté dans chaque puits. Les cellules sont ensuite incubées pendant 15 minutes à 37°C à l'obscurité. Les différents puits sont ensuite rincés à 2 reprises avec du milieu DHG préchauffé à 37°C et les cellules sont fixées pendant 10 min dans du PBS préchauffé contenant 0.5% de glutaraldéhyde (*Merck, Germany*). Les cellules sont ensuite rincées 3 fois avec du PBS et les lamelles couvre-objet sont retournées sur une goutte de Mowiol préalablement préchauffé à 56°C et déposé sur une lame porte-objet (*Assistant, Allemagne*). Ces lames sont ensuite placées à 4°C à l'obscurité pendant 16h. Enfin, les cellules sont observées au microscope confocal (*Leica, Allemagne*).

Résultats et discussion

3. Résultats et discussion

Ce mémoire s'inscrit dans le cadre de la thèse d'Aurélia De Pauw (thèse en cours) qui porte sur l'étude et la caractérisation de la population mitochondriale dans des adipocytes 3T3-L1 soumis à un dysfonctionnement mitochondrial induit par un agent découplant, le FCCP. La dédifférenciation des adipocytes 3T3-L1 est un processus cellulaire peu étudié et les principales publications sur ce sujet traitent des effets qu'a le TNFα (Petruschke and Hauner 1993; Ruan, Hacohen et al. 2002). C'est pourquoi, dans ce travail, nous étudierons également les effets éventuels qu'exerce cette cytokine pro-inflammatoire sur la population mitochondriale dans des adipocytes 3T3-L1.

La première partie de ce travail a consisté, d'une part, à étudier l'état d'activation ou l'état d'abondance de certains régulateurs connus pour leur rôle joué dans la biogenèse mitochondriale dans des adipocytes 3T3-L1 incubés en présence de FCCP ou de TNFα. Nous nous sommes tout d'abord intéressés aux facteurs de transcription régulant l'expression de la plupart des gènes nucléaires codant des protéines mitochondriales. Nous avons donc déterminé l'abondance des facteurs de transcription NRF-1 et NRF-2 décrits pour réguler l'expression transcription de la plupart des gènes nucléaires codant des protéines mitochondriales. Nous nous sommes ensuite intéressés à d'autres facteurs de transcription comme PPARγ et C/EBPα qui ont également une contribution importante dans la biogenèse mitochondriale mais ayant d'autres rôles C/EBPα puisqu'ils sont indispensables à la différenciation adipocytaire. Le facteur de transcription YY1 a été également étudié. Son rôle dans la coordination et l'expression de nombreux gènes codant pour des protéines mitochondriales est particulièrement bien décrit.

La biogenèse mitochondriale étant un processus complexe nécessitant l'expression et/ou l'activation de multiples facteurs de transcription, nous avons porté un intérêt particulier au co-activateur transcriptionnel PGC-1α qui, à ce jour, est considéré comme le régulateur majeur de la biogenèse mitochondriale dans de nombreux types cellulaires (Puigserver, Adelmant et al. 1999; Arany, He et al. 2005).

En plus de la caractérisation de l'abondance de facteurs de transcription connus pour leur(s) rôle(s) dans la biogenèse, nous avons également, en collaboration avec Edouard Dehaive et Aurelia De Pauw, eu l'occasion de faire une première expérience dans le cadre d'une étude protéomique ayant pour but l'identification des nouveaux facteurs de transcription dont l'abondance serait éventuellement modifié dans des adipocytes en dédifférenciation induit par le TNFα ou le FCCP. Nous avons donc réalisé des gels 2D-DIGE à partir d'extraits de protéines nucléaires. Après identification par la spectrométrie de masse, nous discuterons rapidement des quelques résultats.

Dans la dernière partie de notre travail, nous avons tenté de mieux caractériser la population mitochondriale au sein des adipocytes 3T3-L1 incubés en présence de TNFα ou de FCCP. Nous avons commencé l'étude de la population mitochondriale dans ces conditions en nous intéressant à l'abondance et la localisation de l'organite avant de rechercher d'éventuelles modifications d'abondance de certaines protéines mitochondriales utilisées comme marqueurs parmi lesquelles des sous-unités de la chaîne respiratoire et des protéines du complexe TOM de la membrane mitochondriale externe. Enfin, la présence du génome mitochondrial étant une des caractéristiques majeures de cet organite, nous avons quantifié l'abondance de ce dernier dans des adipocytes 3T3-L1 incubés en présence de TNFα ou de FCCP.

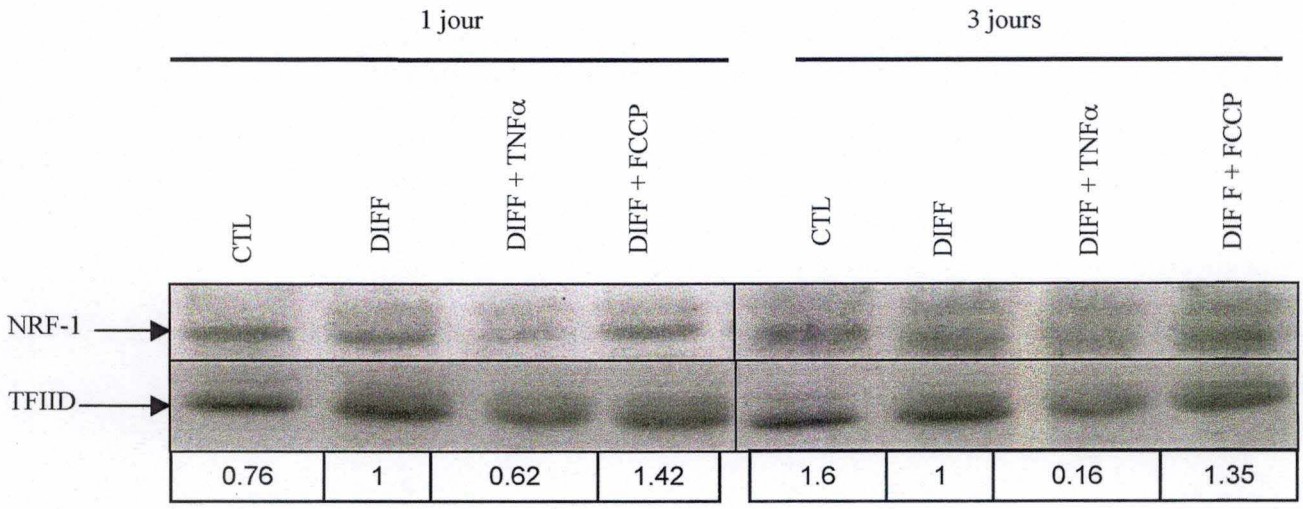


Figure 3.1 : Analyse de l'abondance nucléaire du facteur de transcription NRF-1 en Western Blotting dans des pré-adipocytes (CTL) et des adipocytes différenciés (DIFF) pendant 10 jours puis incubés pendant 1 ou 3 jour(s) en absence ou en présence de 0,5 μM de FCCP (DIFF + FCCP) ou 10 ng/ml de TNFα (DIFF + TNFα). Au terme de ces incubations, les extraits de protéines nucléaires ont été préparés et l'abondance de la protéine NRF-1 a été recherchée en Western Blotting réalisé sur 30 μg de protéines. La détection des protéines d'intérêt a été révélée en chémiluminescense (ECL) sur des films radiographiques qui ont ensuite été séchés et scannés. La charge protéique a été vérifiée par l'immunodétection de la protéine TFIID. La densité optique des bandes correspondant à la protéine NRF-1 et déterminée à l'aide du programme Image Quant, a ensuite été normalisée par la densité optique des bandes corresponds à dans chacune des pistes. Les ratios ont ensuite été exprimés par rapport aux valeurs obtenues pour les adipocytes portées arbitrairement à 1.

3.1 Etude de facteurs de transcription impliqués dans la biogenèse mitochondriale

3.1.1 Etude de l'abondance des facteurs de transcription NRF-1 et NRF-2 par Western Blotting

Pour débuter notre travail nous avons donc tout d'abord recherché d'éventuelles modifications d'abondance des facteurs de transcription NRF-1 et NRF-2 dans des adipocytes 3T3-L1 incubés en présence de FCCP ou de TNFα. Ces facteurs sont en effet impliqués dans le contrôle de l'expression de nombreux gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales dont les sous unités de la chaîne respiratoire (Lescuyer, Martinez et al. 2002), des protéines récepteurs impliqués dans l'importation des protéines mitochondriales comme TOM 70 et TOM 20 (Blesa, Prieto-Ruiz et al. 2007) ainsi que Tfam, un facteur de transcription mitochondrial primordial impliqué dans la transcription et la réplication de l'ADN mitochondrial (Scarpulla 2006) et le cytochrome c (Garesse and Vallejo 2001).

3.1.1.1 Etude de l'abondance du facteur de transcription NRF-1 par Western Blotting

NRF-1 est un facteur de transcription actif sous forme de complexe homodimérique. pour lequel l'état d'activation est souvent correlée à son abondance nucléaire. Bien que NRF-1 est également la cible de modifications post-traductionnelles qui peuvent selon le cas activer ou inhiber son activité. Il a été décrit dans la littéraure que la phosphorylation de NRF-1 par la kinase Akt sur une Thr109 induit la translocation du facteur de transcription dans le noyau (Piantadosi and Suliman 2006). Afin de rechercher les effets éventuels d'une incubation des adipocytes 3T3-L1 en présence de FCCP ou de TNFα sur l'abondance de la protéine NRF-1, des pré-adipocytes 3T3-L1 ont été différenciés ou non pendant 10 jours puis incubés pendant 1 ou 3 jours en présence de 0,5 μM de FCCP ou 10 ng/ml de TNFα . Au terme de ces incubations, des extraits de protéines nucléaires ont été préparés et l'abondance de la protéine NRF-1 a été recherchée en Western Blotting. Les résultats présentés à la **figure 3.1** ne nous montrent pas de grandes modifications de l'abondance de la protéine NRF-1 au cours de la différenciation adipocytaire. Cependant, nous pouvons dire que l'abondance nucléaire de la protéine NRF-1 diminue dans des adipocytes incubés en présence de TNFα et ce, déjà après 24 h de traitement. L'effet est encore plus visible après 3 jours d'incubation en présence de la cytokine. Par contre, dans les cellules incubées en présence de FCCP, nous n'observons pas de diminution de l'abondance de la protéine dans le noyau. Bien que ce résultat devrait être confirmé, on observe même une légère augmentation de la quantité de NRF-1 dans les noyaux de cellules incubées en présence du découplant mitochondrial. Bien que nous sommes conscients des limites du Western Blotting pour quantifier des différences, une augmentation de l'abondance du facteur de transcription NRF-1 dans le noyau de cellules adipocytaires subissant un découplage mitochondrial n'a jamais été mis en évidence. Il est cependant bien connu qu'un dysfonctionnement mitochondrial induit une réponse rétrograde qui, dans de nombreux types cellulaires, conduit à modifier l'activité de certains facteurs de transcription comme NF-κB, NFAT, et NRF-1, susceptible de modifier le taux de transcription de leur(s) gène(s) cible(s) (Biswas, Guha et al. 2005). L'effet du TNFα est plus facile à interpréter et est en parfait accord avec les données de la littérature qui montrent que la cytokine induit une diminution de l'expression de la eNOS et de la biogenèse mitochondriale dans les tissus adipeux et musculaires de rongeurs obèses (Valerio, Cardile et al. 2006). De plus, ces auteurs montrent que les effets du TNFα sur la biogenèse mitochondriale s'accompagnent d'une

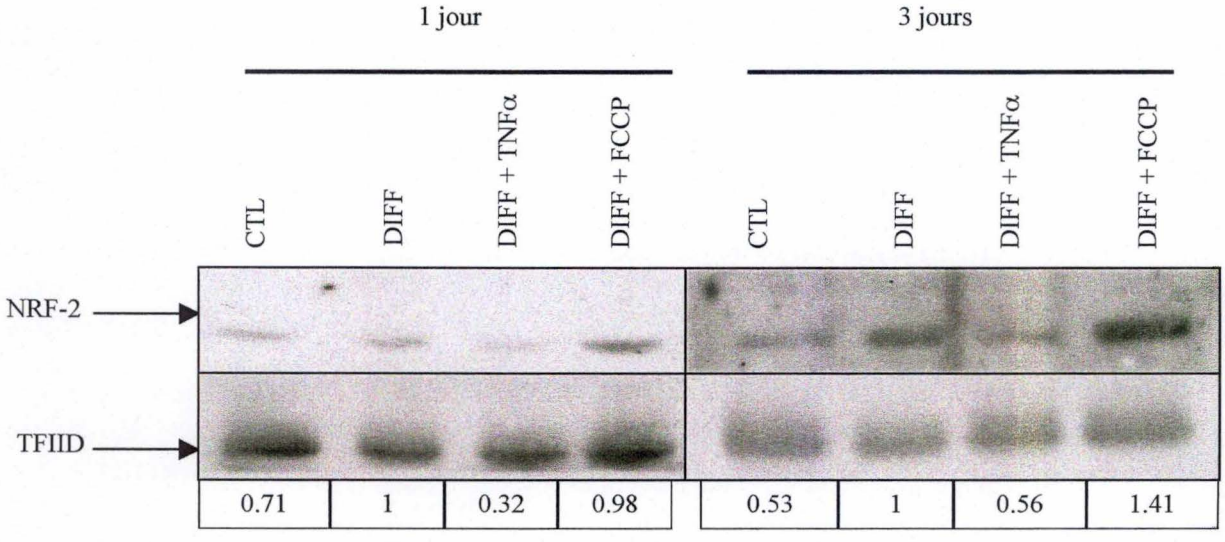


Figure 3.2 : Analyse de l'abondance du facteur de transcription NRF-2 en Western Blotting dans des pré-adipocytes (CTL) et des adipocytes différenciés (DIFF) pendant 10 jours puis incubés pendant 1 ou 3 jour(s) en absence ou en présence de 0.5 μM de FCCP (DIFF + FCCP) ou de 10 ng/ml de TNFα (DIFF + TNFα). Au terme de ces incubations, les extraits de protéines nucléaires ont été préparés et l'abondance de la protéine NRF-2 a été recherchée en Western Blotting réalisé sur 30 μg de protéines. La détection des protéines d'intérêt a été révélée en chémiluminescense(ECL) sur des films radiographiques qui ont ensuite été séchés et scannés. La charge protéique a été vérifiée par l'immunodétection de la protéine TFIID. La densité optique des bandes correspondant à la protéine NRF-2 et déterminée à l'aide du programme Image Quant, a ensuite été normalisée par la densité optique des bandes corresponds à TFIID dans chacune des pistes. Les ratios ont ensuite été exprimés par rapport aux valeurs obtenues pour les pour les adipocytes (DIFF) portées arbitrairement à 1.

diminution de l'abondance relative des transcrits pour Tfam, PGC-1α, NRF-1, COXIV et le cytochrome c qui peut être prévenue en présence de donneurs de NO comme le S-nitroso-acetyl penicillamine (SNAP). Ces résultats suggèrent que le NO est un médiateur du contrôle de la biogenèse mitochondriale dans ces conditions (Valerio, Cardile et al. 2006).

NFR-1 ne contrôle pas, à lui seul, la biogenèse mitochondriale En effet, un autre senseur important de la demande énergétique dans une cellule est le facteur NRF-2 qui a été décrit pour son contrôle dans l'expression d'une sous-unité de la cytochrome oxydase (Ongwijitwat, Liang et al. 2006). Ce dernier régule également l'expression des gènes codant des protéines mitochondriales comme la sous-unité β de la FoF1-ATP synthase dans les adipocytes bruns (Villena, Vinas et al. 1998). De plus, il semble que l'expression de NRF-1 soit également sous le contrôle du facteur NRF-2 puisque dans les myoblastes de souris (C2C12) la transcription du gène codant le facteur de transcription NRF-1 est régulée par le facteur NRF-2 (Mootha, Handschin et al. 2004). C'est la raison pour laquelle dans la suite de notre travail nous nous sommes intéressés aux éventuelles modifications d'abondance de ce facteur dans le noyau de cellules adipocytaires incubées pendant un ou plusieurs jours en présence de FCCP ou de TNFα.

3.1.1.2 Etude de l'abondance du facteur de transcription NRF-2 par Western Blotting

Rappelons que le facteur de transcription NRF-2 est un membre de la famille des facteurs de transcription ETS et est actif exclusivement sous la forme d'un complexe multimérique composé de deux sous-unités : GABPα et GABPβ (GA-binding protein) (Bush, St Coeur et al. 2003; Blesa and Hernandez-Yago 2006). Afin de rechercher l'effet éventuel du FCCP et du TNFα sur une modification de l'abondance nucléaire de la protéine NRF-2 dans les adipocytes, des pré-adipocytes 3T3-L1 ont été différenciés pendant 10 jours puis incubés pendant 1 ou 3 jours en présence ou en absence de 0,5 μM FCCP ou 10 ng/ml de TNFα. Au terme de ces incubations, l'abondance de la protéine NRF-2 a été recherchée en Western Blotting réalisés à partir d'extraits nucléaires. Comme on peut l'observer à la **figure 3.2**, l'abondance du facteur de transcription NRF-2 est plus importante dans le noyau des adipocytes différenciés que dans le noyau de pré-adipocytes. Nous montrons également que le TNFα induit une diminution de l'abondance nucléaire du facteur de transcription NRF-2 après 1 et 3 jours d'incubation. Par contre, nous observons une légère augmentation de l'abondance de NRF-2 dans les noyaux des adipocytes présentant un découplage mitochondrial.

Ces résultats suggèrent donc que le TNFα et le FCCP modifient l'abondance des 2 facteurs de transcription NRF-1 et NRF-2 de manière opposée. En effet, nous observons que le TNFα provoque une diminution de l'abondance nucléaire des deux facteurs et ce, déjà après un jour d'incubation. Par contre le FCCP ne provoquerait pas de réelle modification de l'abondance de NRF-1 et une légère augmentation de NRF-2 dans le noyau des adipocytes. Ces résultats devront être confirmés. Rappelons que dans les myocytes murins, la transcription du gène codant le facteur de transcription NRF-1 est régulée par le facteur NRF-2 (Mootha, Handschin et al. 2004). La diminution de l'abondance de ce facteur dans les adipocytes incubés en présence de TNFα pourrait donc également être responsable de la diminution d'abondance de NRF-1 dans ces conditions. Cependant, soyons prudent dans l'interprétation de ces résultats. En effet, il est important de signaler que les modifications d'abondance que nous observons pourraient résulter de modifications de la synthèse de ces protéines, d'une modification de leur translocation dans le noyau, d'une charge imparfaite (même après détermination des D.O.) et/ou d'un rendement d'extraction différent entre nos

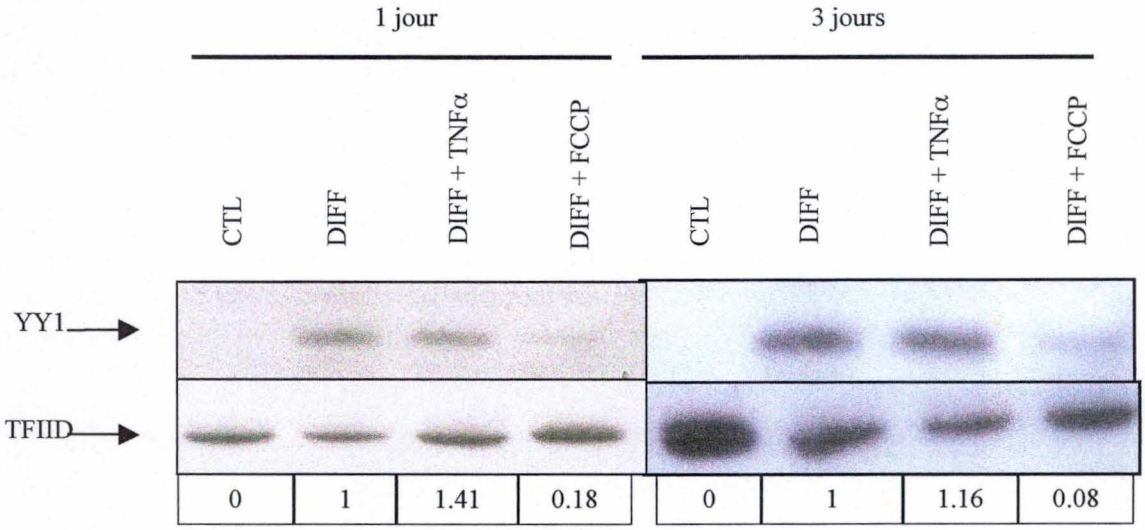


Figure 3.3 : Analyse de l'abondance du facteur de transcription YY1 en Western Blotting dans des pré-adipocytes (CTL) et des adipocytes différenciés (DIFF) pendant 10 jours puis incubés pendant 1 ou 3 jour(s) en présence ou en absence de 0.5 μM de FCCP (DIFF + FCCP) ou 10 ng/ml de TNFα (DIFF + TNFα). Au terme de ces incubations, les extraits de protéines nucléaires ont été préparés et l'abondance de la protéine YY1 a été recherchée en Western Blotting réalisé sur 30 μg de protéines. La détection des protéines d'intérêt a été révélée en chémiluminescense(ECL) sur des films radiographiques qui ont ensuite été séchés et scannés. La charge protéique a été vérifiée par l'immunodétection de la protéine TFIID. La densité optique des bandes correspondant à la protéine YY1 et déterminée à l'aide du programme Image Quant, a ensuite été normalisée par la densité optique des bandes corresponds à TFIID dans chacune des pistes. Les ratios ont ensuite été exprimés par rapport aux valeurs obtenues pour les pour les adipocytes (DIFF) portées arbitrairement à 1.

différentes conditions expérimentales dans la préparation des protéines nucléaires entre les conditions expérimentales.

3.1.2 Etude de l'abondance nucléaire du facteur de transcription YY1 par Western Blotting

Dans notre démarche de vouloir « cartographier » l'abondance nucléaire de plusieurs facteurs de transcription impliqués dans la biogenèse mitochondriale dans des adipocytes dédifférenciés en présence de FCCP ou de TNFα, nous sous sommes ensuite intéressés à YY1. Ce régulateur transcriptionnel est un facteur de transcription ubiquiste possédant un domaine de liaison de type doigts de zinc. YY1 est un membre de la famille des protéines « Polycomb » qui jouent un rôle important dans le contrôle du cycle cellulaire (Patton, Block et al. 2006). Dans le cadre de la biogenèse mitochondriale, ce facteur de transcription participe au contrôle de l'expression de la sous-unité COXVb de la cytochrome c oxydase et de la sous-unité α de la FoF1-ATP synthase (Basu, Lenka et al. 1997; Breen and Jordan 1997; Lescuyer, Martinez et al. 2002). L'abondance de ce facteur de transcription a donc été recherchée en Western Blotting sur des échantillons de protéines nucléaires préparés à partir de pré-adipocytes et d'adipocytes différenciés pendant 10 jours puis incubés en présence ou en absence de 0,5 µM de FCCP ou de 10 ng/ml de TNFα pendant 1 ou 3 jours **(figure 3.3)**. On peut observer que la protéine est beaucoup plus abondante dans les adipocytes que dans les pré-adipocytes. A notre connaissance, un rôle éventuel de YY1 dans la différenciation adipocytaire n'a jamais été mis en évidence dans la littérature. Rappelons cependant que la biogenèse mitochondriale est augmentée au cours du programme de différenciation des adipocytes (Wilson-Fritch, Burkart et al. 2003). De manière très intéressante, nous mettons en évidence un effet différentiel du TNFα et du FCCP sur l'abondance de ce facteur dans les noyaux des adipocytes. En effet, alors qu'en présence de TNFα, l'abondance de la protéine semble peu ou pas modifiée et ce quel que soit le temps de traitement, elle diminue très fortement dans le noyau des adipocytes incubés en présence de FCCP et ce, déjà après 24 h d'incubation. Une telle diminution de l'abondance nucléaire de cette protéine dans les cellules répondant à un découplage mitochondrial induit par le FCCP ne peut que nous faire penser à une modification importante de l'activité de ce facteur dans les cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial. Les mécanismes impliqués dans la régulation de l'abondance et de l'activité de ce facteur de transcription ubiquiste sont nombreux. En effet, l'expression de YY1 est fortement régulée au niveau transcriptionnel, notamment par le facteur de transcription NF-κB (Wang, Hertlein et al. 2007) mais son abondance est également contrôlée au niveau protéique, puisque YY1 est la cible de la calpaine, une protéase activée par le calcium, mais est également dégradée par le protéasome (Walowitz, Bradley et al. 1998). Une recherche de l'abondance relative du transcrit de YY1 et l'état d'activité de ces différents acteurs devrait nous permettre de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la diminution de l'abondance de YY1 dans ces conditions.

3.1.3 Etude de l'abondance et/ou de la liaison à l'ADN de facteurs de transcription pro-adipogéniques impliqués dans la biogenèse mitochondriale comme PPARγ et C/EBPα

Les facteurs de transcription PPARγ et C/EBPα sont connus pour leurs rôles dans l'adipogenèse (voir introduction point 1.2.2.4). En effet, ces facteurs de transcription sont

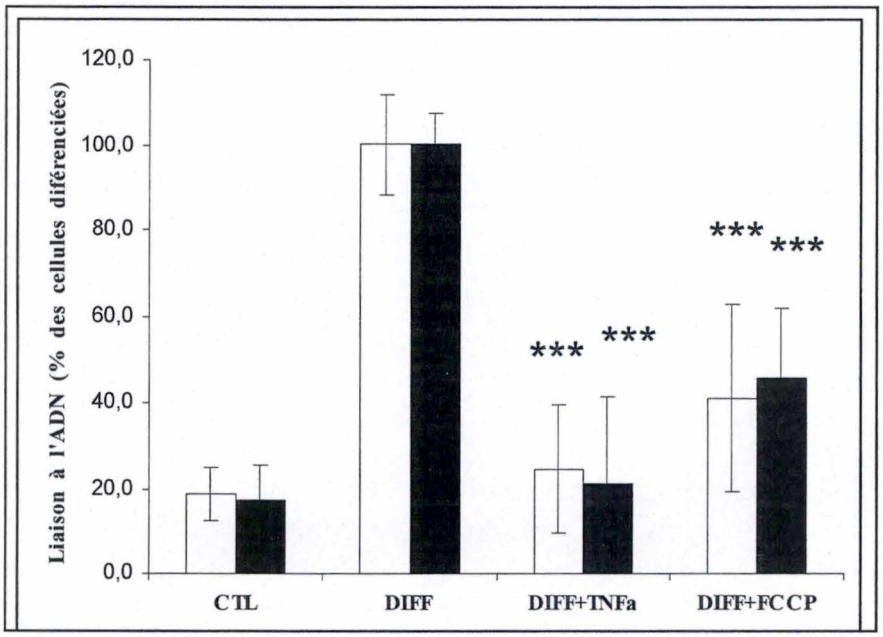


Figure 3.4 : Dosage de l'activité de liaison de C/EBPa à une séquence consensus d'ADN. Des pré-adipocytes (CTL) et des adipocytes 3T3-L1 différenciés (DIFF) pendant 10 jours ont été incubés pendant 1 jour (blanc) ou 3 jours (noir) en présence ou en absence de 0.5 mM de FCCP (DIFF+FCCP) ou de 10 ng/ml de TNFa (DIFF+ TNFa). Au terme de ces incubations, les lysats clairs ont été préparés et la liaison à l'ADN du facteur de transcription C/EBPa a été quantifiée par spectrophotométrie. Les résultats représentent la moyenne +/- un écart type (n = 3).

** ; ***: statistiquement significativement différent par rapport aux adipocytes différenciés avec respectivement $P< 0.01$; $P< 0.001$ comme mesuré par une ANOVA II et un test de Holm-Sidak.

capables d'induire et de maintenir l'augmentation d'expression de gènes codant pour des marqueurs du phénotype adipocytaire comme GLUT4, aP2, la FAS (Gregoire, Smas et al. 1998). La mise en évidence de modifications d'activité de ces facteurs dans les adipocytes incubés en présence de FCCP ou de TNFα pourrait donc nous donner des indications intéressantes sur les mécanismes conduisant à la dédifférenciation des adipocytes observée dans ces conditions. De plus, ces facteurs de transcription contrôlent également l'expression de gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales comme UCP-1 (Wu, Puigserver et al. 1999) et sont donc également des effecteurs important de la biogenèse mitochondriale. Alors que le rôle de PPARγ dans la biogenèse mitochondriale au cours de la différenciation des adipocytes 3T3-L1 a déjà été mis en évidence précédemment (Wilson-Fritch, Burkart et al. 2003), la participation de C/EBPα à la biogenèse mitochondriale et le caractère essentiel de ce facteur à la biogenèse mitochondriale dans le tissu adipeux brun ont été démontrés plus récemment (Huerta-Yepez, Vega et al. 2006).

Rappelons que C/EBPα est un facteur de transcription caractérisé par la présence d'un domaine de liaison à l'ADN de type leucine zipper basique qui participe au maintien du phénotype adipocytaire, une fois les cellules différenciées. Parmi les gènes cibles essentiels de ce facteur, on retrouve comme aP2, le transporteur de glucose Glut4, la PEPCK et le récepteur à l'insuline (Gregoire, Smas et al. 1998). Afin d'étudier l'effet éventuel du FCCP et du TNFα sur l'activité de C/EBPα dans des adipocytes 3T3-L1 des pré-adipocytes 3T3-L1 ont été différenciés pendant 10 jours puis incubés en présence ou en absence de 0,5 μM de FCCP ou de 10 ng/ml de TNFα pendant 1 ou 3 jours. Au terme de ces traitements des extraits de protéines nucléaires ont été préparés et l'activité de liaison à l'ADN de CEBP/α a été quantifiée par un test colorimétrique Trans^{AM} (Active Motif). Rappelons que ce test repose sur la liaison d'un facteur d'intérêt à une séquence d'ADN contenant la séquence consensus du facteur (**Figure 3.4).** Nous observons que l'activité de ce facteur de transcription à l'ADN est augmentée dans les adipocytes. Ce résultat est attendu puisque, l'expression de C/EBPα est sous le contrôle des facteurs de transcription C/EBPβ et C/EBPδ dont l'activité augmente au cours de la différenciation adipocytaire (Rosen and MacDougald 2006). De plus, nous observons que l'incubation des cellules en présence de FCCP ou de TNFα, pendant 1 jour ou 3 jours, conduit à une diminution significative de l'activité de liaison de C/EBPα à une séquence consensus d'ADN. Notons également que, de manière très comparable, l'activité de liaison de C/EBPα diminue également de manière significative dans les adipocytes incubés en présence de FCCP et ce, quel que soit le temps d'incubation considéré. Bien que nous n'ayons pas recherché l'abondance nucléaire de la protéine dans les adipocytes incubés dans ces conditions par Western Blotting, les résultats obtenus sont en accord avec les données de la littérature. En effet, Ruan et son équipe ont montré que, par l'intermédiaire du facteur de transcription NF-κB, le TNFα induit une diminution de l'expression du gène codant CEBP/α dans les cellules 3T3-L1 (Ruan, Hacohen et al. 2002). Le TNFα induit également l'expression de la kinase MAP4K4/NIK (voir point 1.4) régulant également négativement l'expression des facteurs de transcription PPARγ et C/EBPα (Tang, Guilherme et al. 2006). D'autre part, il a été montré que l'expression de ce facteur de transcription est également régulée négativement dans des adipocytes incubés en présence d'AICAR (5-AminoImidazole-4-Carboxamide-1-β-D-Ribofuranoside), un activateur de l'AMPK, par un mécanisme qui impliquerait la phosphorylation inhibitrice du facteur eIF2α (un facteur d'initiation), ce qui conduit à une répression non spécifique de la traduction de cette protéine (Dagon, Avraham et al. 2006). Dans nos conditions expérimentales, mentionnons simplement que le FCCP active également fortement l'AMPK dans les adipocytes (Silvia Tejerina, thèse en cours), et qu'un mécanisme comparable pourrait donc expliquer la diminution d'abondance

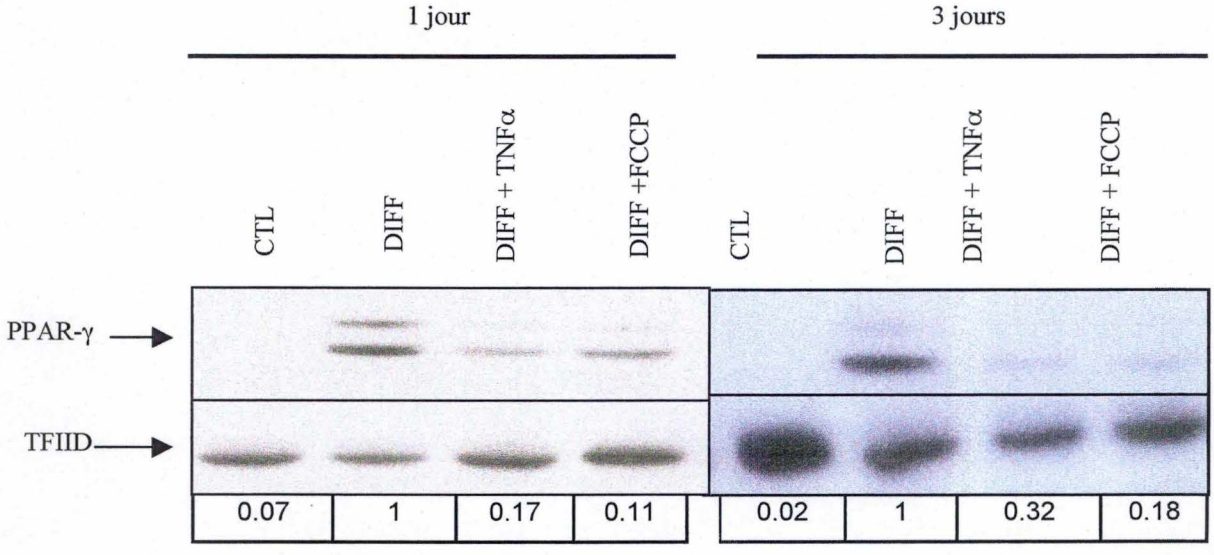


Figure 3.5 : Analyse de l'abondance du facteur de transcription PPARγ en Western Blotting dans des pré-adipocytes (CTL) et des adipocytes différenciés (DIFF) incubés pendant 1 ou 3 jour(s) en présence ou en absence de 0.5 μM de FCCP (DIFF + FCCP) ou 10 ng/ml de TNFα (DIFF + TNFα) . Au terme de ces incubations, les extraits de protéines nucléaires ont été préparés et l'abondance de la protéine PPARγ a été recherchée en Western Blotting réalisé sur 30 μg de protéines. Les films radiographiques ont été révélé à l'ECL puis séchés et scannés. La charge protéique a été vérifiée par l'immunodétection de la protéine TFIID. La densité optique des bandes correspondant à la protéine PPARγ et déterminée à l'aide du programme Image Quant, a ensuite été normalisée par la densité optique des bandes corresponds à TFIID dans chacune des pistes. Les ratios ont ensuite été exprimés par rapport aux valeurs obtenues pour les adipocytes portées arbitrairement à 1.

du facteur C/EBPα et donc la diminution de sa liaison à l'ADN. Ces données sont encore à vérifier.

PPAR-γ est un récepteur nucléaire activé par la liaison de nombreux ligands lipidiques comme l'acide arachidonique. Il est transcriptionnellement actif sous la forme d'un hétérodimère avec le récepteur nucléaire RXR (Retinoid X Receptor). Outre son rôle essentiel dans la différenciation adipocytaire, ce facteur est nécessaire et suffisant pour induire la différenciation des pré-adipocytes (Rosen and MacDougald 2006), il est également impliqué dans la biogenèse mitochondriale (Wilson-Fritch, Burkart et al. 2003). En effet, de nombreux ligands de PPARγ appartenant à la famille des thiazolidinedione (TZD) comme le roziglitazone, le ciglitazone ou le pioglitazone sont connus pour induire la biogenèse mitochondriale dans les adipocytes blancs (Bogacka, Ukropcova et al. 2005; Bogacka, Xie et al. 2005). On explique l'action positive des ligands sur l'activation du facteur PPARγ par des modifications de conformation spécifiques, responsables du recrutement de différents co-activateurs particuliers tels que PGC-1α. Au laboratoire, Silvia Tejerina a déjà montré que l'abondance du transcrit correspondant au gène codant pour PPARγ est diminuée dans les cellules incubées en présence de FCCP ou de TNFα (Silvia Tejerina, thèse en cours).

Nous avons donc tenté de relier la diminution de l'abondance du transcrit de ce facteur de transcription à l'abondance de la protéine dans ces conditions expérimentales. Ceci a été réalisé par une analyse de l'abondance de PPARγ en Western Blotting réalisée sur des extraits de protéines nucléaires de pré-adipocytes 3T3-L1 différenciés pendant 10 jours puis incubés en présence ou en absence de 0,5 μM de FCCP ou de 10 ng/ml de TNFα **(Figure 3.5).** Nous observons que la protéine est indétectable dans les pré-adipocytes, ce qui est en accord avec les données de la littérature (Rosen and Spiegelman 2000). En effet, comme nous l'avons déjà mentionné dans l'introduction (point 1.2.2.4), l'expression du gène codant PPARγ est induite lors de la différenciation adipocytaire en réponce à l'activation des facteurs de transcriptions C/EBPβ, C/EBPδ, C/EBPα et certains membres de la famille KLFs (Rosen and MacDougald 2006). Comme attendu, nous montrons également que l'abondance de la protéine diminue très fortement dans les cellules incubées en présence de TNFα pendant 1 ou 3 jours. Comme nous l'avons déjà mentionné, le TNFα inhibe l'expression des facteurs de transcription impliqués dans l'adipogenèse dont PPARγ (Ruan et al., 2002). D'autre part, le TNFα induit l'expression de la MAP4K4/NIK qui régule négativement l'expression de PPARγ (Tang, Guilherme et al. 2006). Bien que cela n'ait pas encore été démontré, nous ne pouvons pas non plus exclure que le TNFα exerce son effet, partiellement du moins, en modifiant l'activité de plusieurs protéases responsables de la modification du temps de demi-vie de ce facteur de transcription. Signalons que lors de l'adipogenèse des cellules S-13, l'abondance de PPARγ est contrôlée par la calpaine, (Yajima, Sato et al. 2006). Dans les cellules 3T3-L1, PPARγ est aussi une cible du protéasome (Hauser, Adelmant et al. 2000).

Mentionnons encore que le signal correspondant à PPARγ apparaît comme un doublet dont la signification est inconnue mais qui pourrait correspondre à une forme phosphorylée de PPARγ. En effet ce facteur de transcription est la cible de plusieurs kinases pouvant selon le cas activer ou inhiber son activité. Zhang et son équipe ont montré que dans des cellules CHO (Chinese hamster Ovary), PPARγ est phosphorylé en réponse à l'insuline ce qui se traduit par une augmentation de son activité (Zhang, Berger et al. 1996). D'autre part, PPARγ peut aussi être phosphorylé dans son domaine de liaison par la voie des p42/p44 MAPK, ce qui conduit à une diminution de la liaison du facteur à l'ADN et donc à une diminution de son activité (Carmen and Victor 2006).

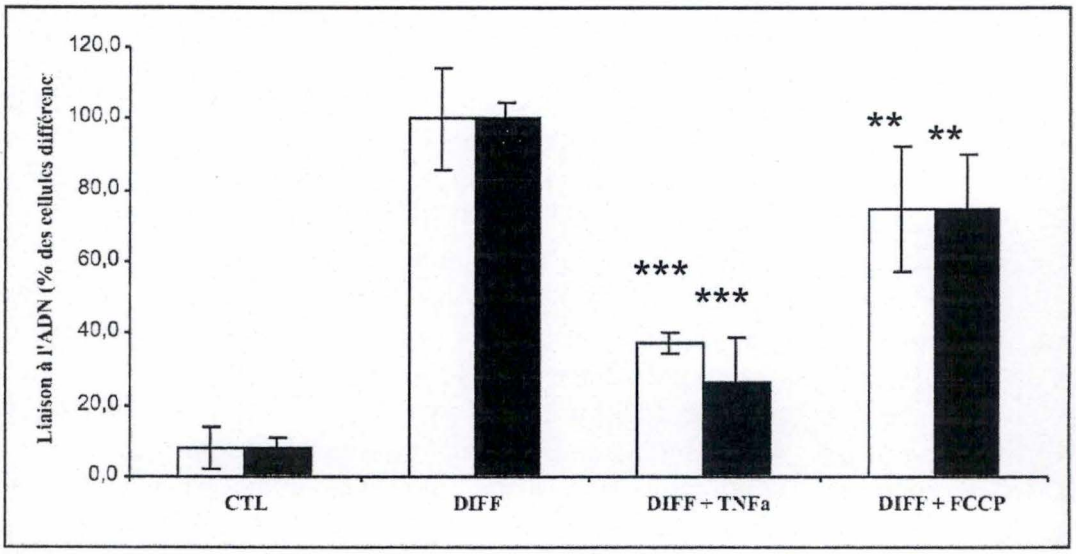


Figure 3.6 : Dosage de l'activité de liaison de PPARγ à une séquence consensus d'ADN. Des pré-adipocytes (CTL) et des adipocytes 3T3-L1 (DIFF) différenciés pendant 10 jours ont été incubés pendant 1 jour (blanc) ou 3 jours (noir) en présence ou en absence de 0.5 μ M de FCCP (DIFF+FCCP) ou de 10 ng/ml de TNFα (DIFF+ TNFα). Au terme de ces incubations, les lysats clairs ont été préparés et la liaison à l'ADN du facteur de transcription PPARγ a été quantifiée par spectrophotométrie. Les résultats représentent la moyenne +/- un écart type (n = 3).

** ; ***: statistiquement significativement différent par rapport aux adipocytes différenciés avec respectivement $P< 0.01$; $P< 0.001$ comme mesuré par une ANOVA II et un test de Holm-Sidak.

Nous venons de voir que l'abondance nucléaire du facteur de transcription PPARγ diminue dans des adipocytes 3T3-L1 incubés pendant 1 ou 3 jour(s) en présence de TNFα ou de FCCP. Pour tenter de rechercher l'effet de cette diminution d'abondance sur l'activité de ce facteur de transcription nous avons dosé l'activité de liaison de ce facteur à une séquence d'ADN consensus par un test de liaison (en utilisant un kit de dosage Trans^{AM} (Active Motif)) réalisé sur des extraits de protéines nucléaires préparés à partir de noyaux de pré-adipocytes ou de cellules différenciées incubées en présence ou en absence de 0,5 μM FCCP ou de 10 ng/ml de TNFα **(Figure 3.6)** Comme attendu, nous montrons que l'activité du facteur de transcription est beaucoup plus élevée dans les adipocytes que dans les cellules pré-adipocytaires. Il est également possible d'observer une diminution significative de l'activité de PPARγ tant après 1 jour qu'après 3 jours d'incubation en présence de TNFα. Dans ces conditions, la diminution de la liaison est respectivement de 54.7 et de 65.6 %. Ces résultats sont en accord avec les données obtenues pour l'abondance nucléaire de la protéine **(Figure 3.5)** qui montrent une diminution de l'abondance de la protéine après 1 jour et 3 jours de traitement. Une incubation en présence de FCCP induit également une diminution statistiquement significative de l'activité de liaison du facteur de transcription. La diminution de l'activité de liaison en réponse au FCCP est plus faible que celle obtenue pour un traitement en présence de TNFα mais qui est cependant plus faible. En effet, en présence de FCCP, la diminution de la liaison de PPARγ n'est que de 17.1% et 17.7% après respectivement 1 et 3 jours de traitement. Cette diminution est également en accord avec les résultats obtenus pour l'abondance nucléaire de PPARγ dans ces conditions. Cette donnée est compatible avec la stimulation de la biogenèse mitochondriale et le remodelage de la structure de l'organite observés au cours de l'adipogenèse induite par la rosiglitazone, un agoniste du facteur de transcription PPARγ (Wilson-Fritch, Burkart et al. 2003)

En conclusion, nous venons de voir que les adipocytes incubés en présence de TNFα pendant 1 et 3 jour(s) présentent une diminution d'abondance et/ou d'activité de certains facteurs de transcription impliqués dans la biogenèse mitochondriale. En effet, nous observons une diminution de l'abondance nucléaire des facteurs de transcription NRF-1 et NRF-2 mais également une diminution de l'abondance des facteurs de transcription connus pour contrôler la différenciation cellulaire comme PPARγ et C/EBPα dans les adipocytes incubés en présence de la cytokine pro-inflammatoire

Pour ces deux derniers facteurs, l'activité de liaison à l'ADN a également été mesurée. Les résultats obtenus montrent que l'activité de liaison du facteur de transcription PPARγ diminue significativement après 1 jour et se maintient après 3 jours de traitement. L'action du TNFα sur l'inhibition de la différenciation est déjà bien connu et cette cytokine semble libérer par les cellules cancéreuses pour inhiber l'adipogenèse par un mécanisme qui impliquerait la répréssion des facteurs PPARγ et C/EBPα (Meng, Zhou et al. 2001). Si le mécanisme conduisant à la rèpression de C/EBPα est encore peu connu, la répression de l'expression de PPARγ dans les adipocytes incubés en présence de TNFα passerait par la production de céramides C-6 et C-2, l'activation de l'isoforme β atypique de la PKCz et l'activation de NF-kB qui exerce un effet répresseur dans le promoteur du gène codant pour PPARγ (Kajita, Mune et al. 2004). Au contraire, dans les cellules incubées en présence de FCCP, l'abondance des facteurs de transcriptions NRF-1 et NRF-2 est respectivement peu et légèrement modifiée.

Dans le but de vérifier et de compléter ces résultats, il serait évidemment nécessaire de déterminer l'abondance globale de NRF-1 et NRF-2 dans des lysats totaux, les taux d'ARN messagers pour ces facteurs à l'aide de la technique de RT-PCR en temps réel (ce qui donnerait une indication sur les modifications d'expression éventuelles). Des marquages en immunofluorescence pour confirmer les changements d'abondance nucléaires de ces facteurs dans les adipocytes en cours de dédifférenciation seraient également à réaliser. Enfin, des

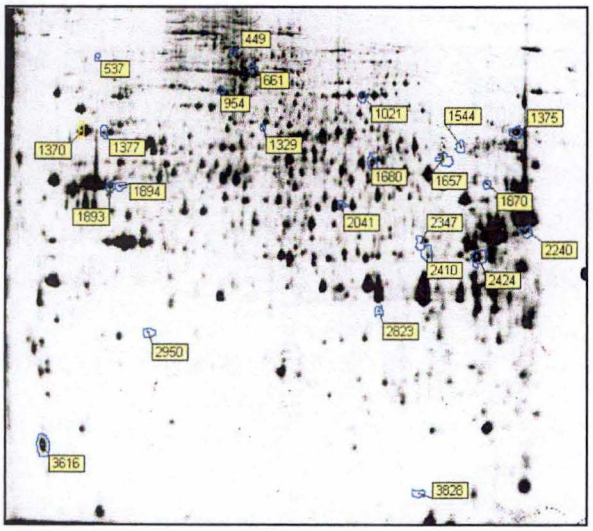
expériences complémentaires de transfection à l'aide de gènes rapporteurs luciférase répondant aux facteurs de transcription NRF-1 ou NRF-2 permettraient également de déterminer si oui ou non les modifications d'abondance de ces protéines se manifestent bien par des changements de leur activité. La grande difficulté de transfecter ces cellules différenciées est maintenant levée car au laboratoire, Aurélia Depauw, vient de mettre au point les conditions d'électroporation (Nucléofector Amaxa) des adipocytes matures et obtient plus de 60 % d'efficacité de transfection dans des conditions optimalisées.

Par ailleurs, le découplage mitochondrial est également capable d'induire une diminution de l'abondance nucléaire et de l'activité de liaison à l'ADN de PPARγ dans des adipocytes 3T3-L1 et ce, déjà après 1 jour d'incubation en présence de FCCP. Remarquons cependant que cette diminution est plus faible que celle observée pour un traitement en présence de TNFα. Enfin, mentionnons encore que l'activité de liaison de C/EBPα diminue également dans les adipocytes incubés pendant 1 ou 3 jour(s) en présence de FCCP.

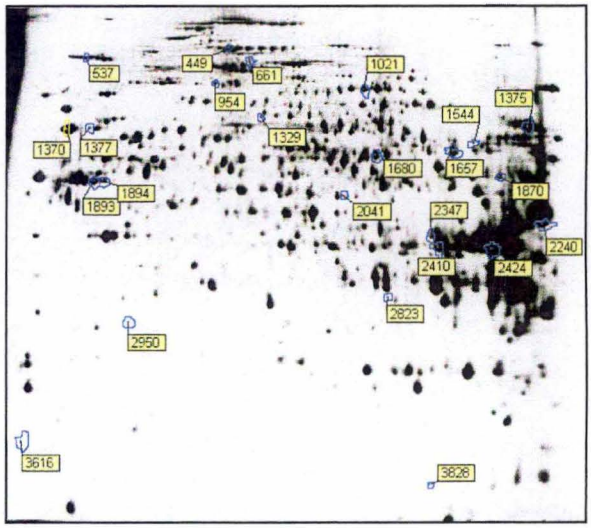
La diminution d'abondance et d'activité de ces facteurs de transcription dans les adipocytes répondant au FCCP est donc très intéressante car elle pourrait, au moins en partie expliquer la dédifférenciation des cellules observées dans ces conditions. Cependant, il semble que l'activation compensatrice exercée sur PPARγ observée en présence de rosiglitazone, un agoniste de PPARγ, ne prévient la diminution de TG que dans des adipocytes incubés en présence de TNFα. En effet, ce ligand synthétique est sans effet sur le contenu en lipides dans les adipocytes présentant un découplage mitochondrial (Silvia Tejerina, manuscrit en préparation). De plus, la diminution de l'activité de PPARγ dans des adipocytes incubés en présence de TNFα semble conduire à une diminution de l'expression de l'ATGL (Adipose tissue TriGlyceride Lipase), une lipase récemment clonée sensible aux hormones et décrite comme un gène cible de PPARγ une donnée cependant difficilement réconciliable avec la stimulation de la lipolyse observée dans ces conditions (Kim, Tillison et al. 2006).

En conclusion, nous pouvons penser que l'abondance et l'activité de certains effecteurs de la biogenèse mitochondriale sont modifiées dans des adipocytes 3T3-L1 incubés en présence de FCCP et que des différences importantes sont observées entre des adipocytes incubés en présence de l'agent découplant ou simulés par le TNFα.

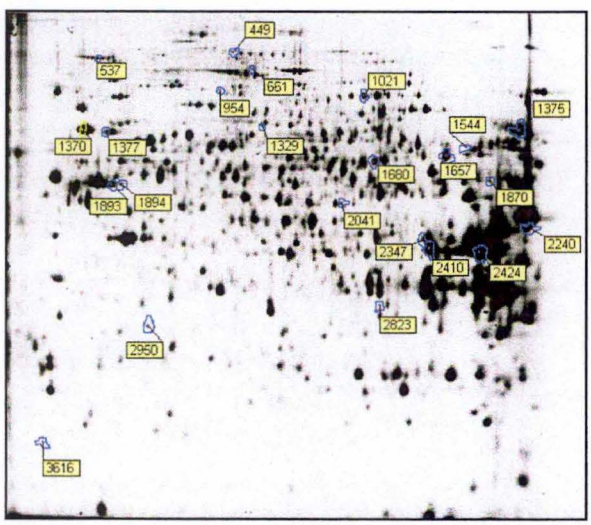
Sur base de ces premiers résultats, il est cependant très difficile de pouvoir conclure que le découplage mitochondrial conduise à des changements de la biogenèse mitochondriale dans des adipocytes 3T3-L1 différenciés. Nous relevons au moins trois difficultés majeures. Premièrement, il existe d'autres facteurs de transcription susceptibles d'être impliqués dans la biogenèse de l'organite pour lesquels nous n'avons, à ce jour, aucune donnée expérimentale dans notre modèle. Il serait par exemple intéressant d'étudier les modifications d'activité et/ou d'abondance de ERRα dans des adipocytes incubés en présence de TNFα ou de FCCP . En effet, outre son rôle majeur dans la différenciation adipocytaire (Ijichi, Ikeda et al. 2007), ce facteur de transcription est également un facteur clé dans l'induction de gènes codant des protéines mitochondriales comme le cytochrome c (Rangwala, Li et al. 2007). Deuxièmement, les différentes protéines mitochondriales sont régulées par de nombreux facteurs différents et il est possible que les modifications dans la biogenèse mitochondriale, si elles étaient observées, passent par des modifications qualitatives dans l'organite. Enfin, le rôle et l'activité des facteurs de transcription impliqués dans ce processus sont encore régulés par des co-activateurs et co-répresseurs, des protéines qui interagissent avec les facteurs de transcription et modifient leur activité (voir introduction point 1.6.2.1.2).



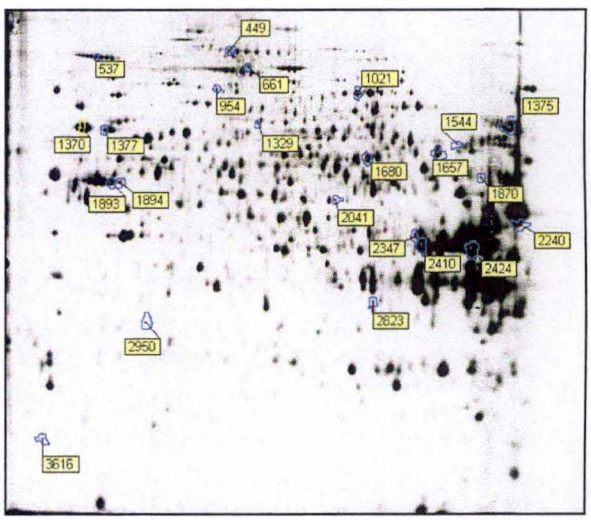
Pré-adipocytes
(gel 50273 - cyanine 3)



Adipocytes
(gel 50271 - cyanine 5)



Adipocytes + TNFα
(gel 50275 - cyanine 3)



Adipocytes + FCCP
(gel 50275 - cyanine 5)

Figure 3.7. Illustration des gels 2D-DIGE réalisés sur des extraits de protéines nucléaires préparés à partir de pré-adipocytes ou d'adipocytes différenciés pendant 10 jours puis incubés pendant 1 jour en présence ou en absence de FCCP (Adipocytes + FCCP) ou de TNFα (Adipocytes + + TNFα). Chacune des conditions expérimentales est illustrée, les protéines étant marquées avec la cyanine 3 ou la cyanine 5. Les spots d'intérêt, présentant des modifications d'abondance entre au moins deux conditions expérimentales quelqu'elles soient, sont annotés sur les gels.

Nous venons de voir que dans nos conditions expérimentales, l'activité et/ou l'abondance de certains facteurs de transcription étaient modifiées dans les adipocytes incubés en présence de FCCP ou de TNFα. Les facteurs de transcription induisent la transcription de leurs gènes cibles en se liant à l'ADN dans leur promoteur et ce, de manière spécifique. Étant donné que le recrutement de la RNA polymérase II est assuré par des régulateurs transcriptionnels (co-activateurs facilitant l'expression génique ou co-répresseurs qui au contraire la réprime) recrutés par les facteurs de transcription (Lin, Handschin et al. 2005), nous nous sommes particulièrement intéressés à PGC-1α. Rappelons que PGC-1α est un co-activateur transcriptionnel qui est susceptible d'interagir avec de nombreux facteurs de transcription comme PPARγ, MEF2c, ERRα impliqués la thermogenèse adaptative, la néoglucogenèse et la différenciation des cellules musculaires (Puigserver and Spiegelman 2003). C'est également un régulateur essentiel du métabolisme énergétique et de la biogenèse mitochondriale. En effet, il induit l'expression des facteurs de transcription NRF-2, NRF-1 et ERR-α (Mootha, Handschin et al. 2004) ainsi que celle de leurs gènes cibles parmis lesquels on trouve des gènes codant pour des sous-unités de la chaîne respiratoire comme la sous-unité β de l'ATP synthase (Patton, Block et al. 2006), la protéine Tfam (Wu, Puigserver et al. 1999), les translocases des membranes interne et externe comme TOM 70 et TOM 20 (Blesa, Prieto-Ruiz et al. 2007) et enfin les protéines impliquées dans les processus de fusion et de fission mitochondriales comme la mitofusine-2 (Cartoni, Leger et al. 2005). Sachant également qu'il a été montré que PGC-1α est surexprimé en réponse à un stress énergétique (Civitarese, Carling et al. 2007), nous avons tenté de mieux caractériser son abondance et les modifications post-traductionnelles majeures susceptibles de changer son action (phosphorylation et acétylation) (voir introduction point 1.6.2.1.2.2.2.2) dans des adipocytes incubés en présence de FCCP ou de TNFα.

Avant d'aborder le chapitre traitant de modifications éventuelles sur le régulateur PGC-1α, nous allons rapidement décrire une approche expérimentale, sans a priori, visant à identifier de nouveaux régulateurs (facteurs de transcription, co-activateurs, ...) de la transcription dans le cadre de modifications d'expression de gènes induits par le découplage mitochondrial. En effet, dans le cadre de ce mémoire, nous avons également contribué à une première analyse protéomique subcellulaire réalisée sur des extraits de protéines nucléaires de pré-adipocytes ou d'adipocytes incubés ou non pendant 1 jour en présence de FCCP ou de TNFα.

3.2 Tentative d'identification de nouveaux effecteurs de la biogenèse mitochondriale dans des adipocytes 3T3-L1 incubés en présence de FCCP ou de TNFα par une approche subprotéomique en 2D-DIGE

Nous avons utilisé la technique du gel 2D-DIGE qui présente certains avantages par rapport aux techniques classiques d'électrophorèse bidimensionnelle telles qu'un marquage pré-électrophorétique des protéines avec des cyanines, la migration simultanée de deux échantillons sur le même gel, et l'utilisation d'un standard interne sur chacun des gels, composé d'un mélange d'une même quantité de protéines provenant de chaque échantillon.

Dans le cadre de ce mémoire, nous avons donc réalisé 6 gels de type 2D-DIGE avec les quatre conditions expérimentales (pré-adipocytes, adipocytes, et adipocytes traités avec le FCCP ou le TNFα) en triple indépendants, soit 12 échantillons. Les cyanines 3 et 5 ont été utilisées pour marquer deux échantillons par gel, la cyanine 2 étant le fluorochrome utilisé pour marquer le standard interne sur chaque gel. Nous avons chargé 25 µg de chaque échantillon, préalablement mis à pH 8.0, sur des gels permettant l'analyse de protéines dans

N° du spot	MW (kDa)	pI	Protéine identifiée
1329	83	6,5	MUT protein
1365	72	5,1	glucose-regulated 78k protein
1370	72	5,1	glucose-regulated 78k protein
1377	65	5,9	ERp72
1657	71	8,9	VLCAD, CrAT
1680	60	6,65	hnRNP L
2950	36	5,4	Annexin A4
3567	20	5,66	Ferritin N subunit 1
449	111	6,01	Procollagen IVα2
537	110	5,2	Collagen IVα1
1021	96	6,4	EF-2
1870	58	8,2	CCT δchain
2410	47	8,1	SCAD

Figure 3.8. Tableau reprenant les numéros des 13 spots identifiés pour lesquels une modification d'abondance significative entre au moins deux conditions expérimentales a été mise en évidence et qui ont conduit à une identification des protéines par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. Le nom de la protéine identifiée, sa masse moléculaire (MW) et son pI sont également indiqués. MUT protein : Methylmalonyl-CoA Mutase ; ERp72 : Endoplasmic Reticulum protein 72k ; VLCAD : Very Long-Chain Acy-CoA Dehydrogenase ; CrAT : Carnitin Acetyltransferase ; hnRNP L : heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein L ; EF-2 : Elongation Factor 2 ; CCT δchain : chaperonin containing TCP-1 δchain ; SCAD : Small Chain Acyl-CoA dehydrogenase.

Protéine identifiée	Diff vs ctl (T-test < 0,005)	TNFα vs Diff (T-test < 0,05)	FCCP vs Diff (T-test < 0,05)
MUT protein	+ 2,55	/	/
glucose-regulated 78k protein	+ 2,26	/	/
ERp72	+ 2,32	/	/
VLCAD, CrAT	+ 6,85	/	/
hnRNP L	+ 6,23	/	/
Annexin A4	/	/	- 1,60
Ferritin N subunit 1	/	/	/
Procollagen IVα2	+ 4,72	+ 1,90	/
Collagen IVα1	+ 73,21	+ 1,91	/
EF-2	+ 1,53	/	/
CCT δchain	/	/	- 1,51
SCAD	+ 14,39	/	/

Figure 3.9. Tableau reprenant pour chacune des protéines identifiées dans les extraits de protéines nucléaires, les valeurs de ratio de l'abondance de chaque protéine dans les adipocytes par rapport aux pré-adipocytes (Diff vs ctl), ou dans les adipocytes incubés 1 jour en présence de TNFα par rapport aux adipocytes (TNFα vs Diff), ou dans les adipocytes incubés 1 jour en présence de FCCP par rapport aux adipocytes (FCCP vs Diff). Le nombre de protéines entre les échantillons provenant d'adipocytes et de préadipocytes étant très élevé, nous avons choisi un test de Student (T-test) plus petit, de 0,005, tandis que dans les conditions TNFα vs Diff 1jour ou FCCP vs Diff 1jour, le T-test est plus grand (0,05). Nous avons convenu d'un seuil d'expression significatif $> +1,5$ ou $< -1,5$.

une zone où le point isoélectrique (pI) s'étend de manière non linéaire de 3 à 11. Afin d'éliminer une variabilité liée au marquage différentiel des échantillons, nous avons alterné le marquage avec les cyanine 3 et 5 au sein de chaque triplicat d'échantillons. Après la première migration des échantillons, le gel contenant les protéines équilibrées à leur pI est déposé sur un gel de type SDS-PAGE. Ainsi, la seconde migration se déroulant en conditions dénaturantes, les protéines migrent uniquement en fonction de leur poids moléculaire. Les gels sont ensuite scannés aux trois longueurs d'ondes correspondant aux 3 cyanines et analysés à l'aide du programme Dcyder 6. L'utilisation du standard interne, présent dans tous les gels, permet d'éliminer les variations de gel à gel en les normalisant par rapport à l'un d'entre eux dit gel « Master ». En fixant l'analyse statistique avec un test de Student supérieur à 0,05, nous avons pu mettre en évidence 28 spots dont les variations d'abondance sont significativement différentes d'une condition expérimentale à l'autre. Une image d'un gel coloré avec l'une des cyanines 3 ou 5 est illustrée à la **figure 3.7**, et ce pour chaque condition expérimentale (préadipocytes, adipocytes, et adipocytes incubés 1 jour en présence de FCCP ou de TNFα).

Cette première analyse protéomique réalisée sur des gels analytiques ne permet pas, en théorie, une identification des spots d'intérêts en raison du peu de matériel chargé sur chacun des gels. Cependant, disposant de 6 gels contenant 75 µg de protéines chacun, nous avons tenté d'identifier les spots d'intérêt en regroupant tous les spots d'un même pI et d'un même poids moléculaire. Pour passer à cette étape d'identification, il est nécessaire de pouvoir visualiser l'ensemble des protéines contenues dans un spot afin de pouvoir découper entièrement le spot. Les cyanines ne marquant que les lysines, en moyenne 3% des protéines, nous avons coloré les gels au Krypton, un fluorochrome marquant spécifiquement les protéines. Après coloration, les gels sont de nouveau scannés et analysés avec le programme Dcyder 6. Les protéines d'intérêt sont ensuite identifiées sur les images des gels colorés au Krypton et une liste des protéines à piquer a été établie. Les spots présentant un pI et un poids moléculaire identiques sont regroupés et les protéines contenues dans ces spots sont digérées avec de la trypsine, les peptides résultant étant analysés en spectrométrie de masse de type MALDI-TOF.

Dans ces conditions, seules 13 protéines ont pu être identifiées parmi les spots présentant des variations d'abondance significative (**figure 3.8**). La grande majorité de ces protéines ne sont *a priori* pas nucléaire. En effet, nous retrouvons des protéines de la matrice extracellulaire, (le collagène de type VI α1 et le procollagène de type VI α2,) ainsi que deux protéines du réticulum endoplasmique, la chaperone grp78 (glucose-regulated protein) et une protéine de la famille disulfide isomérase (ERp72), la chaîne δ de la chaperonne CCT (chaperonin containing TCP-1), et des enzymes impliquées dans le métabolisme des acides gras comme la VLCAD (Very Long Chain Acyl CoA Dehydrogenase), la SCAD (Small Chain Acyl CoA Dehydrogenase), la protéine MUT (Methylmalonyl-CoA Mutase) ainsi que la carnitine acétyltransférase (CrAT). D'autres contaminants potentiels identifiés sont l'Annexin A4, une protéine qui se lie aux phospholipides membranaires de manière dépendante du calcium, la Ferritin L sous-unité 1 et le facteur d'élongation EF-2. Une seule protéine nucléaire a été identifiée de manière significative, la ribonucléoprotéine de type L : une riboprotéine qui réside dans le noyau et qui participe à l'épissage des ARN nucléaires hétérogènes ou ARN pré-messagers. Les différentes protéines identifiées ainsi que le ratio de l'abondance du spot correspondant entre les adipocytes et les pré-adipocytes, ou les adipocytes et les adipocytes incubés en présence de FCCP ou de TNFα pendant 1 jour est illustré à la **figure 3.9**, le seuil d'abondance significative étant convenu comme > +1,5 ou < -1,5.

Le résultat de ces premiers gels peut paraître très décevant car aucune protéine de type « facteur de transcription » ou « régulateur transcriptionnel » n'a pu être identifiée.

Cependant, deux conclusions s'imposent. D'une part, le matériel protéique utilisé sur des gels de type analytique est insuffisant pour analyser et identifier l'ensemble des protéines d'intérêt. Nous ne pouvons donc pas exclure la présence de facteurs de transcription ou de régulateurs transcriptionnels pour lesquels des variations d'abondance ont pu être établies. Seul un gel dit « préparatif », chargé avec approximativement 300 µg de protéines nucléaires provenant des quatre conditions expérimentales permettrait, en théorie, d'identifier l'ensemble des protéines d'intérêt. Mais avant de réaliser un gel « préparatif », il est nécessaire de mettre au point la préparation des échantillons de protéines nucléaires afin de minimiser les contaminants protéiques, par exemple en modifiant la concentration en sels utilisée dans l'extraction saline des protéines nucléaires ou en sédimentant les noyaux après une homogénéisation cellulaire mécanique (utilisation du Dounce) suivi d'une lyse des noyaux. Nous ne pourrons cependant que minimiser la présence de contaminants dans les protéines nucléaires car, biologiquement, l'enveloppe nucléaire est liée physiquement à la membrane du réticulum endoplasmique.

L'utilisation de gels bidimensionnels réalisés sur des extraits de protéines nucléaires présente l'avantage d'une approche sans a priori pour tenter d'identifier de nouveaux régulateurs (facteurs de transcription, co-activateurs, ...) de la transcription dans le cadre de modifications d'expression de gènes induites par le découplage mitochondrial et dont les protéines pourraient être impliquées dans la biogenèse mitochondriale. Ajoutons encore que cette technique présente des limitations puisqu'elle nous renseigne uniquement sur l'abondance protéique. Cependant, l'activité des facteurs de transcription et des régulateurs transcriptionnels peut être modifiée entre deux conditions expérimentales tandis que leur abondance nucléaire reste inchangée. En parallèle de cette première approche sans a priori sur l'abondance de protéines nucléaires, nous pourrions également utiliser un microdamier de type TranSignal (TranSignal™ Protein/DNA Arrays, Panomic, USA) qui permet la liaison simultanée de 400 facteurs de transcription sur des séquences d'ADN consensus et spécifiques. Cette seconde approche sans a priori est limitée du fait que certains facteurs de transcription peuvent être liés à leur séquence consensus sans être ni activateur, ni répresseur. Cependant, un facteur de transcription présentant une modification de son abondance et de son activité de liaison à sa séquence consensus entre les adipocytes et les adipocytes incubés en présence de FCCP ou de TNFα pendant 1 jour constituerait un candidat potentiellement intéressant à étudier dans le cadre de la dédifférenciation des adipocytes au niveau du métabolisme des acides gras et/ou de la biogenèse mitochondriale.

Après cette première partie du travail visant à rechercher l'abondance de facteurs de transcription dans le cadre de la dédifférenciation des adipocytes induite par le découplage mitochondrial, nous allons maintenant poursuivre l'étude des modifications éventuelles de co-régulateurs en réponse à un découplage mitochondrial dans des adipocytes par une étude de la protéine PGC-1α, un co-activateur essentiel de la biogenèse mitochondriale.

3.3 Caractérisation du co-activateur transcriptionnel PGC-1α dans des adipocytes 3T3-L1 incubés en présence de FCCP ou de TNFα

3.3.1 Effet du FCCP et du TNFα sur l'abondance relative du transcrit de PGC-1α

Nous avons débuté la caractérisation du co-activateur PGC-1α par l'étude de l'abondance relative de l'ARNm de PGC-1α dans des adipocytes présentant un découplage mitochondrial

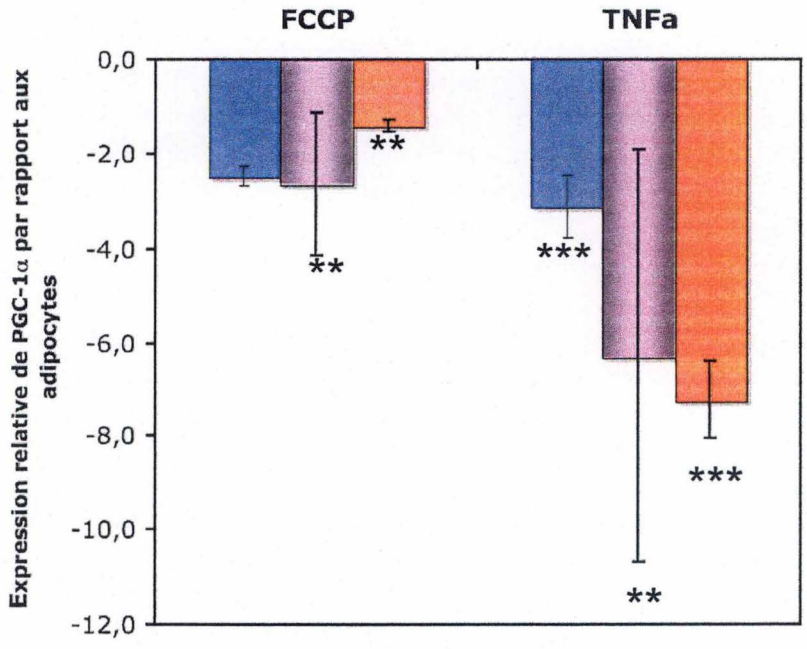


Figure 3.10: Effet du FCCP et du TNFα sur l'abondance relative du transcrit du gène codant la protéine PGC-1α dans des cellules 3T3-L1 déterminée par PCR en temps réel. Les adipocytes 3T3-L1 différenciés pendant 10 jours ont été ensuite incubés pendant 1(bleu), 3 (violet) ou 6 jours (orange) en en absence ou en présence de 0,5 μM de FCCP ou 10 ng/ml de TNFα. Au terme de ces incubations, l'ARN total a été extrait des cellules. Un aliquot d'ADNc obtenue par reverse transcription a été placée dans un thermocycleur pour l'étape de PCR réalisée en présence de SYBR green et d'une quantité optimale d'amorces spécifiques du trancrit de PGC-1α. Après comparaison de l'efficience de PCR en temps réel, les résultats ont été normalisés par rapport au gène codant TFIID utilisé comme gène de référence et exprimés de manière relative en nombre de fois l'abondance du transcrit de PGC-1α dans des adipocytes différenciés maintenu en culture pendant 1, 3 ou 6 jours. Les résultats représentent la moyenne +/- un écart-type (n = 3).**,***: statistiquement significativement différent par rapport aux adipocytes différenciés avec respectivement $P< 0.05$; $P< 0.001$ comme déterminée par une ANOVA II et un test de Holm-Sidak.

ou stimulés par la cytokine pro-inflammatoire. Des adipocytes 3T3-L1 ont donc été incubés en présence ou en absence de 0,5 μM de FCCP ou de 10 ng/ml de TNFα pendant 1,3 ou 6 jours. Au terme de ces incubations, l'ARN total a été extrait des cellules et l'ARNm a été rétrotranscrit en ADNc. Ce dernier a ensuite été amplifié par la technique de PCR en temps réel en utilisant des amorces spécifiques de PGC-1α. Les résultats obtenus ont été normalisés par l'abondance du transcrit de TFIID, un gène codant un facteur de la machinerie basale de transcription utilisé comme gène de référence en raison du fait que son expression n'est pas modifiée dans nos conditions expérimentales. L'abondance relative du transcrit de PGC-1α dans les cellules traitées a ensuite été comparée et exprimée par rapport à l'abondance mesurée dans les adipocytes différenciés constituant nos cellules contrôles dans cette expérience **(Figure 3.10)**. Nous observons que le TNFα induit une diminution significative de l'abondance du transcrit codant la protéine PGC-1α et ce, dès un jour d'incubation. Les effets du TNFα sont d'autant plus marqués que le temps d'incubation augmente. Par contre, dans les cellules incubées en présence de FCCP, l'abondance de l'ARNm codant la protéine PGC-1α, bien que diminuée par rapport aux adipocytes, n'évolue pas au cours du temps de traitement. Ajoutons encore que, bien que les résultats ne soient pas présentés dans le cadre de ce travail, l'abondance du transcrit de PGC-1α est bien plus élevée dans les adipocytes que dans les pré-adipocytes (Aurélia De Pauw, thèse en cours). La régulation et l'augmentation de l'expression de PGC-1α dans les pré-adipocytes en différenciation pourrait contribuer à stimuler la biogenèse de la mitochondrie. Il est en effet bien décrit que la voie de signalisation activée par l'IGF/insuline contribue à activer la transcription de PGC-1α, suite à la phosphorylation activatrice de CREB sur la sérine 133 qui rappelons le est contrôlée par le facteur de transcription CREB phosphorylé.

La diminution de l'abondance du transcrit codant PGC-1α observée dans les cellules adipocytaires incubées en présence de TNFα est en accord avec les données de la littérature. (Valerio et al., 2006). L'effet du TNFα serait médié, du moins en partie, par la diminution de l'abondance de la eNOS qui, comme nous l'avons vu dans l'introduction (voir point 1.6.1.2.2.2.1) joue un rôle clé dans l'expression du gène codant la protéine PGC-1α. Rappelons que l'oxyde nitrique produit par cette enzyme active une guanylate cyclase sensible au NO qui synthétise alors du GMPc. Ce dernier active une PKG, qui en phosphorylant le facteur de transcription CREB, induit l'expression du géne codant le co-activateur PGC-1α (Valerio, Cardile et al. 2006). Il a également été montré que le TNFα induit une diminution de la transcription du gène codant pour PGC-1α dans d'autres types cellulaires comme les hépatocytes (Kim, Park et al. 2007). L'effet observé ne semble donc pas spécifique aux adipocytes. Enfin, signalons encore que dans les cellules musculaires striées squelettiques, la voie de la p38MAPK, une kinase de stress, inhibe la transcription du gène codant la protéine PGC-1α (Crunkhorn, Dearie et al. 2007). Il serait donc intéressant d'étudier ces voies de signalisation dans les adipocytes blancs et de rechercher son implication éventuelle dans la diminution du taux de transcrit de PGC-1α observée dans les cellules présentant un découplage mitochondrial..

En effet, les résultats obtenus dans les adipocytes incubés en présence de FCCP sont plus difficilement interprétables. On sait notamment que la restriction calorique, qui peut être mimée dans une certaine mesure, par un découplage mitochondrial (Silvestri, de Lange et al. 2006) , induit l'expression du co-activateur PGC-1α dans de nombreux types cellulaires dont les adipocytes (Nisoli, Tonello et al. 2005). A priori, nous nous attendions donc à ce que le FCCP, en découplant la phosphorylation oxydative et la respiration ait un effet comparable. Une excellente étude récente de l'équipe de Bruce Spiegelman rapporte que le découplage doux (« mild uncoupling ») induit une diminution transitoire du contenu an ATP dans une cellule. Cette diminution est compensée rapidement par une stimulation de la biogenèse

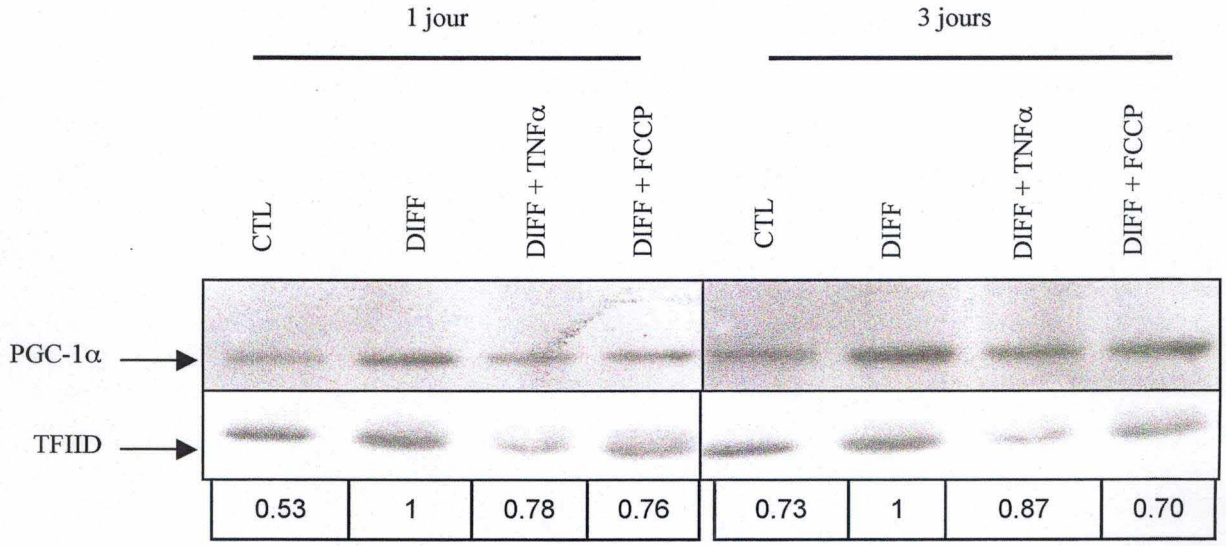


Figure 3.11 : Analyse de l'abondance du co-activateur PGC-1α en Western Blotting dans des pré-adipocytes (CTL) et des adipocytes différenciés (DIFF) pendant 10 jours puis incubés pendant 1 ou 3 jour(s) en présence ou en absence de 0.5 μM de FCCP (DIFF + FCCP) ou 10 ng/ml de TNFα (DIFF + TNFα) . Au terme de ces incubations, les extraits de protéines nucléaires ont été préparés et l'abondance de la protéine PGC-1α a été recherchée en Western Blotting réalisé sur 30 μg de protéines. La détection des protéines d'intérêt a été révélée en chémiluminescense(ECL) sur des films radiographiques qui ont ensuite été séchés et scannés. La charge protéique a été vérifiée par l'immunodétection de la protéine TFIID. La densité optique des bandes correspondant à la protéine PGC-1α et déterminée à l'aide du programme Image Quant, a ensuite été normalisée par la densité optique des bandes corresponds à TFIID dans chacune des pistes. Les ratios ont ensuite été exprimés par rapport aux valeurs obtenues pour les pour les adipocytes (DIFF) portées arbitrairement à 1.

mitochondriale initiée par la surexpression de PGC-1α (Rohas, St-Pierre et al. 2007). L'effet bénéfique du découplage suivi de la réponse adaptative de la cellule serait initiée par une activation de la voie dépendante de l'AMPc initiée par une augmentation de la concentration en calcium dans le cytosol en réponse au découplage (Rohas, St-Pierre et al. 2007. D'autre part, il a déjà été montré que le FCCP conduit à une inhibition de la production d'oxyde nitrique par la mitochondrie. Rappelons que le NO produit par la eNOS est impliqué dans la régulation de l'expression du gène codant ce co-activateur dans les cellules 3T3-L1 {Nisoli, 2005 #403). A ce stade, la deuxième hypothèse semble le plus probable puisque l'abondance du transcrit de PGC-1α est diminuée dans les adipocytes soumis à un découplage léger. L'étude de la voie AMPc-PKA-CREB et le dosage du NO dans nos conditions expérimentales seront caractérisée prochainement.

La technique de la RT-PCR en temps réel nous permet uniquement d'estimer le taux de transcrit du gène codant la protéine PGC-1α à un moment donné. Cependant, il est important de signaler qu'une modification d'abondance d'un ARNm peut être le résultat d'une transcription plus ou moins importante du gène ou/et d'une modification du temps de demi-vie de l'ARNm codant la protéine d'intérêt. De plus, l'analyse de l'expression d'un gène au niveau du transcrit ne donne aucune indication sur le taux de traduction de cet ARN messager en protéines. Étant donné que la technique de RT-PCR en temps réel ne donne aucune indication sur l'abondance de la protéine, sur ses éventuelles modifications post-traductionnelles ou sur la localisation de celle-ci, nous avons donc continué notre travail en recherchant d'éventuelles modifications de l'abondance de la protéine PGC-1α dans des adipocytes incubés en présence de FCCP ou de TNFα.

3.3.2 Effet du FCCP et du TNFα sur l'abondance nucléaire de la protéine PGC-1α par Western Blotting

Afin de rechercher les effets éventuels du FCCP et du TNFα sur l'abondance de la protéine PGC-1α dans le noyau d'adipocytes différenciés pendant 10 jours ont ensuite été incubées en présence ou en absence de 0,5 μM de FCCP ou de 10 ng/ml de TNF-α. Au terme de ces incubations, des extraits nucléaires ont été préparés et l'abondance de la protéine PGC-1α à été recherchée par Western Blotting. Les résultats présentés à la **figure 3.11** mettent tout d'abord en évidence que la protéine est moins abondante dans les pré-adipocytes que dans les adipocytes, un résultat en accord avec une biogenèse augmentée au cours du programme de différenciation adipocytaire (Wilson-Fritch, Burkart et al. 2003). Nous avons cependant été surpris de voir que l'abondance de PGC-1α n'est pas ou peu modifiée dans les cellules incubées en présence de TNFα. Ces résultats ne sont donc pas corrélés à ceux obtenus pour le taux de transcrits par la technique de RT-PCR en temps réel (**Figure 3.10**) qui montrent que l'abondance du transcrit diminue fortement dans les cellules stimulées par le TNFα et ce, dès un jour de traitement. Nous pouvons émettre plusieurs hypothèses pour expliquer ce phénomène. La première est simplement d'ordre technique puisque nous ne contrôlons pas le rendement de l'extraction saline de la protéine PGC-1α des noyaux des cellules dans les différentes conditions expérimentales. Nous devrions donc également rechercher l'abondance de la protéine dans des lysats totaux. Malheureusement, comme nous le verrons au point suivant, la probable très faible abondance de ce co-facteur dans les cellules, ne permet pas de la détecter dans des lysats cellulaires. Ces différences pourraient donc être simplement artéfactuelles. La deuxième explication est plus scientifique, il est en effet possible que dans les adipocytes incubés en présence de TNFα, le taux de traduction, la localisation

subcellulaire et la stabilité de la protéine PGC-1α soient modifiés. En effet, rappelons que la voie de la p38MAPK pourrait être activée dans les adipocytes incubés en présence de cette cytokine. Or il a été montré qu'une phosphorylation du co-activateur PGC-1α sur les résidus Thr262, Ser265 et Thr298 par la p38MAPK, a plusieurs effets sur la protéine. Premièrement, elle induit et favorise la translocation nucléaire du co-activateur (Wright, Han et al. 2007). Deuxièmement elle augmente son temps de demi-vie (Puigserver, et al., 2001) et son activité en inhibant la liaison d'une protéine inhibitrice, $p160^{myb}$ (Wright, Han et al. 2007). Les données les plus intéressantes viennent de l'équipe de Crunkhorn et ses collaborateurs qui ont montré un aspect dual des effets de l'activation de la p38MAPK sur le co-activateur PGC-1α (Crunkhorn, Dearie et al. 2007). En effet, ces auteurs montrent que la voie de la p38MAPK, outre son effet positif sur l'activité de la protéine, inhibe également la transcription du gène. On peut donc comprendre que l'abondance nucléaire de PGC-1α ne soit que peut modifiée dans le noyau de cellules incubées en présence de TNFα. L'étude de l'effet d'inhibiteurs spécifiques de la voie de la p38MAPK comme le SB203580 sur l'abondance de la protéine PGC-1α devrait permettre de mettre en évidence un éventuel effet de cette kinase sur l'abondance de la protéine dans les cellules traitées au TNFα.

Cependant, comme l'a déjà montré Siliva Tejerina au laboratoire (thèse en cours), la voie de la p38MAPK n'est pas activée dans des adipocytes incubés, pendant des temps courts allant jusqu'à 8 heures d'incubation, en présence de FCCP. Bien qu'inconnus, d'autres mécanismes sont donc vraisemblablement impliqués dans le maintien de l'expression de la protéine PGC-1α dans les adipocytes incubés en présence de FCCP. Rappelons également que les différents Western Blotting ont été effectués sur des protéines d'extraits nucléaires. Les résultats ne renseignent donc pas sur l'abondance totale de la protéine qui pourrait changer suite à une incubation en présence de TNFα ou de FCCP. Des analyses utilisant des marquages en immunofluorescence permettraient de déterminer la localisation subcellulaire de PGC-1α

En conclusion, même en l'absence de modifications importantes de l'abondance nucléaire de PGC-1α dans les adipocytes soumis à la dédifférenciation en présence de FCCP ou de TNFα, les modifications post-traductionnelles dont ce facteur est la cible (phosphorylation,acetylation et méthylation) pourraient jouer un rôle important dans sa localisation subcellulaire, son temps de demi-vie, son activité et donc l'expression de ces gènes cibles, notamment dans le cadre de la biogenèse mitochondriale. Comme nous l'avons déjà mentionné dans l'introduction (voir point 1.6.2.1.2.2.2.2), PGC-1α peut être phosphorylé sur les résidus Thr-262, Ser-265 et Thr-298 ce qui l'active et permet la translocation nucléaire du co-activateur. PGC-1α est également la cible de la protéine SIRT-1, qui en le déacétylant, augmente également son activité (Gerhart-Hines, Rodgers et al. 2007).. Dans la suite de ce travail, nous nous sommes donc intéressés aux éventuelles modifications post-traductionnelles que pourraient subir ce co-activateur dans des adipocytes 3T3-L1 incubés en présence de FCCP ou de TNFα.

3.3.3 Effets du FCCP et du TNFα sur les modifications post-traductionnelles (phosphorylation et acétylation) du co-activateur transcriptionnel PGC-1α.

Pour avoir accès aux modifications post-traductionnelles d'une protéine d'intérêt, il faut d'abord pouvoir détecter l'abondance de cette protéine. En raison de la faible abondance du co-activateur PGC-1α dans les adipocytes blancs, malgré plusieurs tentatives, il nous a été impossible de détecter PGC-1α dans des lysats cellulaires par la technique de Western Blotting et ce, même lorsque la charge protéique correspond à 50 µg de protéines de lysats

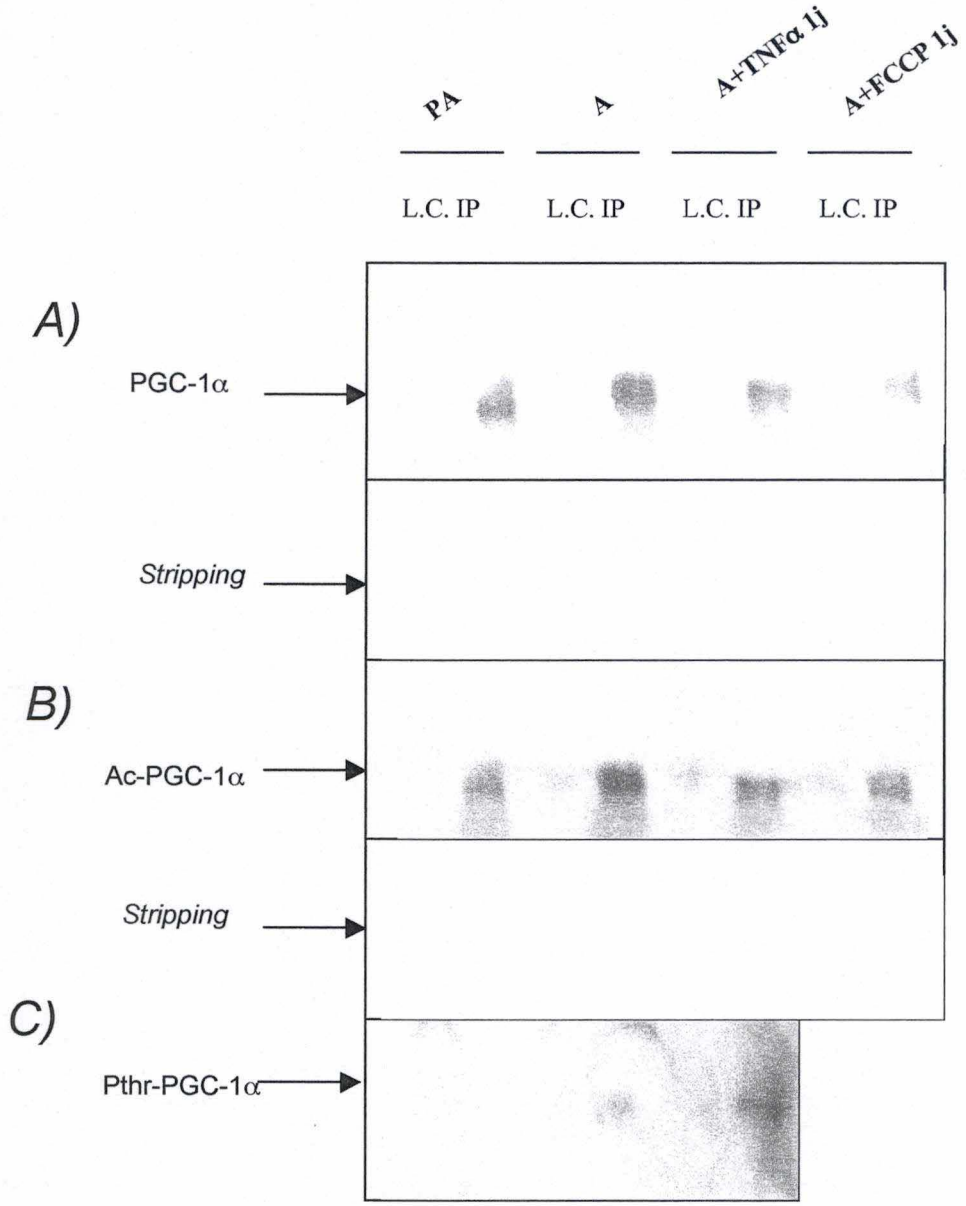


Figure 3.12: Analyse de l'abondance et des modifications post-traductionnelles de la protéine PGC-1α en Western Blotting après immunoprécipitation de la protéine PGC-1α à partir de pré-adipocytes et (PA)et adipocytes différenciés (A) pendant 10 jours puis incubés en présence ou en absence de 0,5 μM de FCCP (A+FCCP) ou 10 ng/ml de TNFα (A+ TNFα Au terme de ces incubations, les cellules on été lysées et la protéine PGC-1α a été immunoprécipitée. L'abondance(A) de la protéine PGC-1α ainsi que son état d'acétylation (B) et de phosphorylation (C) ensuite détectée en Western Blotting. Après révélation en chémiluminescence à l'ECL, les films radiographiques sont séchés et scannés.

clairs (**Figure 3.12**). Nous avons donc mis au point les conditions d'immunoprécipitation de ce co-activateur dans le but immédiat de rechercher les modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation et l'acétylation de la protéine en réponse à un découplage mitochondrial ou un traitement par le TNFα.

Des pré-adipocytes 3T3-L1 ont été différenciés pendant 10 jours puis incubés en absence (DIFF) ou en présence de 0,5 μM de FCCP ou de 10 ng/ml de TNFα pendant 1 jour. Des cellules pré-adipocytaires maintenues en culture pendant le même temps ont également été utilisées. Au terme de ces incubations, les cellules 3T3-L1 ont été lysées et la protéine PGC-1α a été immunoprécipitée à l'aide d'un anticorps monoclonal de lapin dirigé contre les acides aminés 1 à 120 de la protéine. Le produit de l'immunoprécipitation à ensuite été résolu sur un gel SDS-PAGE (15%) et l'abondance de la protéine PGC-1α a été recherchée par Western Blotting **(Figure 3.12)**. On peut tout d'abord constater que l'on ne détecte pas la protéine dans les contrôles négatifs lorsque l'immunoprécipitation est réalisée sans l'anticorps et ce, que ce soit à partir de lysats clairs de pré-adipocytes ou d'adipocytes différenciés. La protéine PGC-1α n'est donc pas une protéine qui s'adsorbe de manière non spécifique aux billes recouvertes de protéines A utilisées pour l'immunoprécipitation. D'autre part, la protéine PGC-1α est également indétectable dans les lysats clairs réalisés et ce quel que soit la condition expérimentale Ce résultat peut probablement s'expliquer par la très faible abondance de ce co-activateur dans les cellules adipeuses 3T3-L1. Par contre, nous observons que la protéine est bien détectée dans les conditions d'immunoprécipitation. À première vue, l'abondance de la protéine semble plus importante dans les adipocytes que dans les adipocytes incubés en présence de FCCP ou de TNFα, ce qui serait en accord avec les données obtenues sur l'abondance relative des transcrits **(Figure 3.10)**. Cependant il est difficile de tirer une conclusion fiable de cette expérience. En effet, comme il est impossible de contrôler l'efficacité de l'immunoprécipitation dans les différentes conditions, des différences (surtout dans le sens d'une diminution) pourraient également être interprétées comme une perte de « matériel » au cours de l'immunoprécipitation. De plus les quantités de protéines de départ avant l'immunoprécipitation n'étaient pas équivalentes. En effet les quantités engagées sont de 1,85 mg, 3,06 mg 2,41 mg et 2,25 mg pour respectivement les pré-adipocytes, les adipocytes, les adipocytes incubés en présence de TNFα et les adipocytes incubés en présence de FCCP. Une moindre récupération de la protéine d'intérêt dans ces conditions expérimentales pourrait donc provenir de la plus petite quantité de protéines engagées dans l'immunoprécipitation. Cette possibilité est actuellement en cours de vérification dans une expérience dans laquelle les quantités de protéines de départ engagées pour l'immunoprécipitation seront comparables.

Nous avons donc ensuite cherché à mettre en évidence une éventuelle modification du degré d'acétylation et de phosphorylation de PGC-1α dans nos différentes conditions expérimentales. En effet, la protéine PGC-1α est la cible de la désacétylase SIRT-1 qui en désacétylant PGC-1α augmente son activité et l'expression de ces gènes dans les cellules musculaires striées squelettiques (Gerhart-Hines, Rodgers et al. 2007) et les hépatocytes. (Rodgers, Lerin et al. 2005). Comme le montre la figure 3.12, il semblerait que le degré d'acétylation de PGC-1α ne soit pas modifié entre les adipocytes et les pré-adipocytes. Nous n'observons pas non plus de différence de l'acétylation de PGC-1α entre des adipocytes soumis à un découplage mitochondrial ou incubés en présence de TNFα. Par contre, alors qu'une éventuelle phosphorylation de PGC-1α est indétectable dans les pré-adipocytes, un signal correspondant à la phosphorylation de PGC-1α est détectable dans les adipocytes. Ce qui est le plus intéressant, c'est qu'il semblerait que la phosphorylation soit plus importante dans des adipocytes incubés pendant 1 jour en présence de TNFα. Malheureusement, un bruit de fond important sur la piste correspondant au FCCP nous empêche de tirer des conclusions.

3.4. Caractérisation de la population mitochondriale

Dans la première partie de ce travail nous avons donc tenté de mettre en évidence des modifications de l'abondance et/ou de l'activité d'un certain nombre de régulateurs transcriptionnels potentiellement impliqués dans la biogenèse mitochondriale. En effet, nous avons montré que l'abondance des facteurs de transcription NRF-1 et NRF-2 diminue dans le noyau d'adipocytes incubés en présence de TNFα mais que cette abondance ne diminue pas dans les cellules incubées en présence de FCCP. Au contraire, l'abondance de NRF-2 semble même augmenter dans ces conditions. Nous avons également montré que l'abondance et l'activité de PPARγ diminuent dans ces deux conditions expérimentales. Enfin alors que l'abondance nucléaire du facteur de transcription YY1 n'est pas modifiée lors d'une incubation des adipocytes en présence de TNFα, elle diminue en présence de FCCP.

Dans la seconde partie de ce travail, nous nous sommes donc intéressés aux éventuelles répercussions que pourraient avoir ces modifications sur la population mitochondriale dans des adipocytes 3T3-L1 incubés en présence de FCCP ou de TNFα .

Rappelons tout d'abord que la biogenèse mitochondriale est un processus extrêmement complexe qui requiert 1) l'importation des lipides composant les membranes interne et externe de l'organite mais également 2) la transcription et la coordination de l'expression de gènes nucléaires et mitochondriaux codant pour des protéines mitochondriales et 3) l'importation des protéines produites dans le cytosol au sein de la mitochondrie. La biogenèse mitochondriale implique également la réplication du génome de l'organite. Nous allons tenter de mieux caractériser l'abondance de la population mitochondriale dans des adipocytes incubés en présence de FCCP ou de TNFα en recherchant l'abondance globale de l'organite à l'aide d'une sonde fluorescente spécifique (Mitotracker Green) et de la cytométrie de flux, en étudiant l'abondance d'un certain nombre de marqueurs protéiques de la mitochondrie comme TOM 40, TOM 20 ou les sous-unités α ou β de la Fo/F1-ATP synthase en Western Blotting et finalement en quantifiant l'abondance relative de l'ADN mitochondrial par la technique de PCR en temps réel.

3.4.1 Etude de l'abondance de la population mitochondriale dans des adipocytes en dédifférenciation : marquage à l'aide de la sonde fluorescente Mitotracker Green et quantification en cytométrie de flux

Afin de caractériser la population mitochondriale dans notre modèle expérimental, nous avons d'abord utilisé la cytométrie de flux permettant l'analyse multi-paramétrique de cellules en suspension et qui donne non seulement des renseignements biologiques sur un ou plusieurs facteurs d'intérêt(s) suite à un marquage spécifique d'une protéine ou d'une structure mais également sur les caractéristiques physiques (granulosité et taille) des cellules étudiées. Outre l'intérêt de la cytométrie de flux dans les aspects quantitatifs, cette approche permet donc d'étudier la modification éventuelle d'un paramètre donné au sein de différentes sous-populations de cellules.

Dans le but de tester les effets éventuels du TNFα ou du FCCP, deux molécules capables d'induire un dysfonctionnement mitochondrial (Bai and Cederbaum 2001; Douette and Sluse 2006), sur l'activation d'une voie rétrograde qui modifierait l'abondance de la

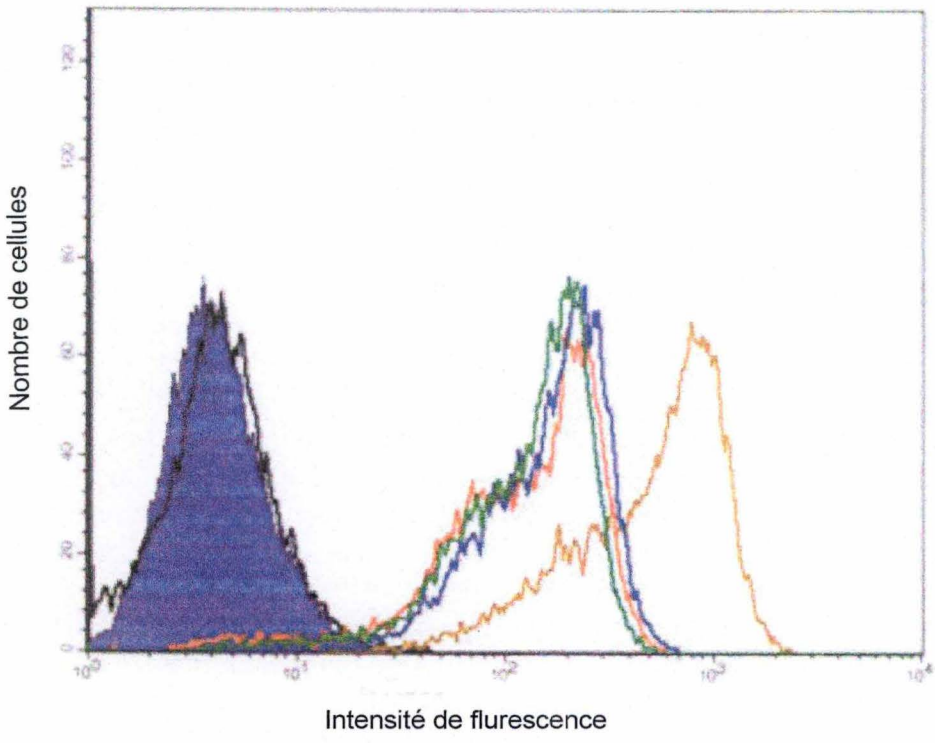


Figure 3.13: Quantification de l'abondance de la population mitochondriale dans des pré-adipocytes (brun), des adipocytes 3T3-L1 différenciés (vert) pendant 10 jours puis incubés pendant 6 jours en présence ou en absence de de 0.5 μM de FCCP (bleu) ou de 10 ng/ml de TNFα (rouge). Au terme de ces incubations, les cellules ont été trypsinisées et centrifugées à 1000 rpm pendant 5 minutes. Elles ont été enfin resuspendues dans du milieu DHG à 37°C sans sérum en présence de la sonde Mitotracker Green (100 nM) pendant 30 minutes. Les cellules ont alors été centrifugées pendant 5 minutes à 1000 rpm et resuspendues dans 2 ml de milieu DHG sans sérum. La fluorescence a eté analysée par cytométrie de flux. Les résultats sont présentés finalement sous forme d'histogrammes reprenant le nombre de cellules en fonction de l'intensité de fluorescence exprimée en logarithme. Des pré-adipocytes (noir) et des adipocytes (bleu plein) n'ont pas été incubés en présence de la sonde et constituent les contrôles négatifs d'autofluorescence. Longueur d'onde d'excitation: 490 nm longueur d'onde d'émission: 516 nm.

population mitochondriale et se manifesterait par une réponse cellulaire adaptative visant à compenser le dysfonctionnement par une augmentation de la biogenèse de l'organite, des pré-adipocytes 3T3-L1 ont été différenciés ou non pendant 10 jours. Les cellules adipocytaires ont ensuite été incubées pendant 6 jours en présence de 0,5 μM de FCCP ou de 10 ng/ml de TNFα. Au terme de ces traitements, les cellules ont été incubées ou non en présence de la sonde MitoTracker green, une sonde fluorescente qui s'accumule spécifiquement dans les mitochondries. La sonde Mitotracker Green présente l'avantage de ne pas fluorescer en solution aqueuse et ne commence à émettre de la lumière de fluorescence sous excitation qu'une fois dans l'environnement lipophile de la mitochondrie. De plus, la fluorescence est directement proportionnelle à la composante lipidique de la mitochondrie et est insensible aux modifications du potentiel de membrane mitochondriale ($\Delta\psi m$) (Strack, Duffy et al. 2001) (Pendergrass, Wolf et al. 2004) (**figure 3.13).** On observe que l'autofluorescence associée à des adipocytes non marqués est comparable à celle des pré-adipocytes non marqué (ces contrôles renseignent sur l'autofluorescence associée aux pré-adipocytes et aux adipocytes). On remarque également que l'intensité de fluorescence augmente lorsque les cellules ont été incubées en présence de la sonde Mitotracker Green, preuve que celle-ci a bien été incorporée par les cellules. Cependant, et à notre grande surprise, nous observons que la fluorescence réémise par les pré-adipocytes est supérieure à celle des cellules différenciées. Ce résultat suggère que l'abondance des mitochondries est plus faible dans les adipocytes différenciés que dans les préadipocytes. Cette donnée est en contradiction totale avec les données de Wislon-Fritch et al. (2003) qui montrent une augmentation de la biogenèse de cet organite au cours de l'adipogenèse (Wilson-Fritch, Burkart et al. 2003). De plus, nous n'observons pas de modification de l'intensité de fluorescence entre des adipocytes différenciés et des adipocytes incubés en présence de 0,5 μM de FCCP ou 10 ng/ml de TNFα pendant 6 jours. Le temps de 6 jours a été choisi sur base de la littérature pour permettre aux éventuels changements de s'installer (Nisoli et al., 2003). Ajoutons encore que l'expérience a été effectuée à deux reprises et que les résultats obtenus étaient comparables. Les seules différences observées entre les deux protocoles expérimentaux résident dans une étape de perméabilisation des cellules à l'aide de la digitonine. Cependant,. l'utilisation d'autres sondes comme le Nonyl Acridine Orange (NAO), la Rhodamine 123 ou encore le Mitotracker Red permettraient sans doute de confirmer ou d'infirmer les résultats obtenus lors de cette expérience.

Des observations en microscopie confocale de cellules adipocytaires dédifférenciées ou non puis marquées avec la sonde fluorescente sont également envisagées afin de visualiser l'accumulation du Mitotracker Green dans les cellules, suivre sa distribution et sa localisation (par double staining). Les résultats attendus de cette expérience devraient également nous renseigner sur l'état de fragmentation éventuelle du réseau mitochondrial dans ces conditions. En effet, une fragmentation de la population mitochondriale résultant d'un déficit de fusion ou d'une augmentation du processus de fragmentation est souvent asscociée au découplage mitochondrial (Lyamzaev, Izyumov et al. 2004).

À la vue de ces résultats et si l'on considère que les incubations en présence de TNFα ou de FCCP ne modifient pas l'incorporation de la sonde Mitotracker Green par les adipocytes, on peut proposer que ni le TNFα, ni le FCCP ne modifient l'abondance de la population mitochondriale dans des adipocytes 3T3-L1 quantifiée sur base de la masse lipidique de l'organite alors que nous observons une modification de l'abondance et/ou de l'activité de plusieurs facteurs de transcription impliqués dans la biogenèse de l'organite.

La technique de cytométrie de flux permet de mettre en évidence d'éventuelles modifications globales et quantitatives de la population mitochondriale. Cependant, cette

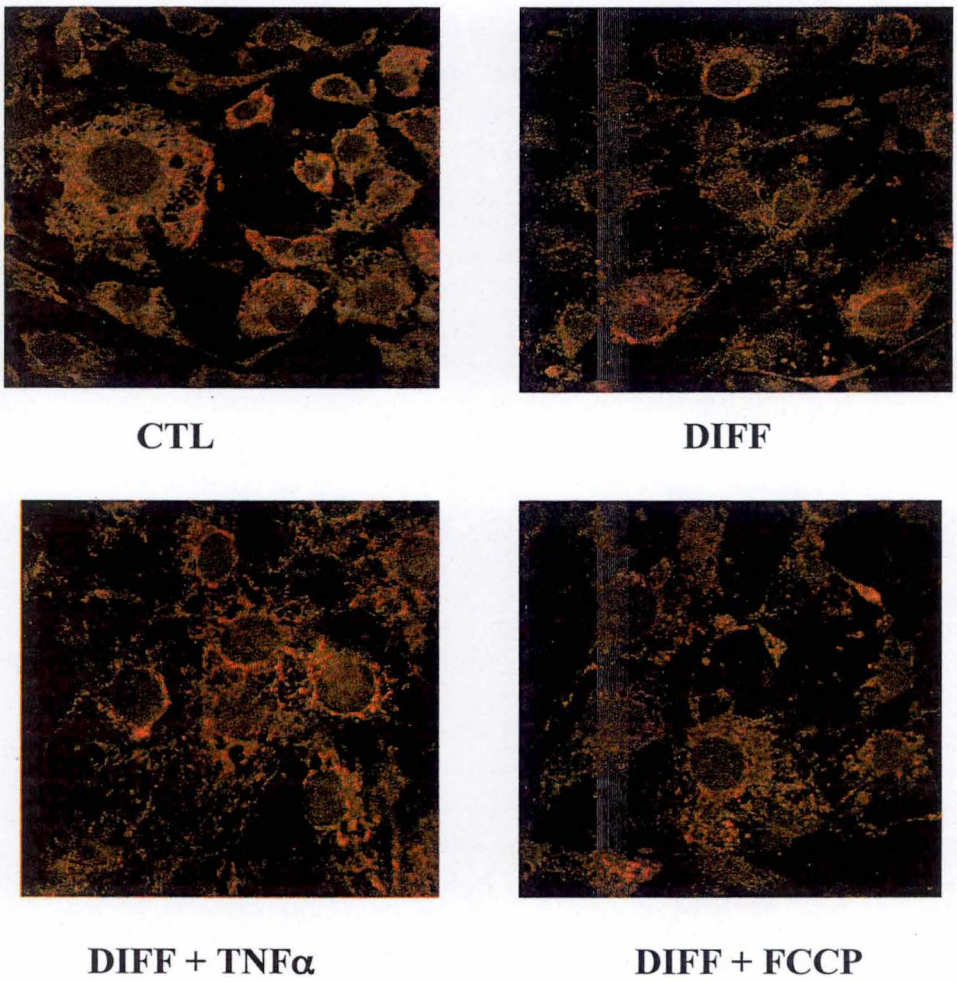


Figure 3.14 : Micrographies prises en microscopie confocale après marquage des mitochondries en fluorescence avec la sonde Mitotracker Red permettant de visualiser l'abondance et la localisation de la population mitochondriale dans des pré-adipocytes (CTL), des adipocytes différenciés (DIFF) pendant 10 jours puis incubés en présence ou en absence de 0.5 μM de FCCP ou 10 ng/ml de TNF-α pendant 3 jours. Au terme de ces traitements, les cellules ont été incubées 15 min en présence de la sonde Mitotracker Red (50nM) avant d'être fixées pendant 10 min avec du PBS +0.5% de Glutaraldéhyde. Après avoir été fixées au Mowiol, les lames sont observée au microscope confocal (longeur d'onde d'excitation: 579 nm, longueur d'onde d'émission: 599 nm).

approche ne renseigne aucunement sur d'éventuelles modifications qualitatives telles que la composition protéique et des modifications du réseau mitochondrial qui, comme on le sait, subit continuellement des événements de fusion et fission, tout particulièrement dans les cellules incubées en présence d'agents découplants (De Vos, Allan et al. 2005). De plus, il est connu que le degré de réticulation du réseau mitochondrial influence fortement l'activité de l'organite (Cartoni, Leger et al. 2005). Nous avons donc voulu visualiser la structure de la population mitochondriale après un marquage de la population mitochondriale d'adipocytes incubés en présence de FCCP ou de TNFα, avec une sonde fluorescente compatible avec la fixation des cellules et l'observation en microscopie confocale.

3.4.2 Effet du FCCP et du TNFα sur la structure de la population mitochondriale d'adipocytes : marquage par le Mitotracker Red et observations en microscopie confocale

Afin d'analyser d'éventuelles modifications de la structure de la population mitochondriale dans des adipocytes en dédifférenciation, des pré-adipocytes 3T3-L1 maintenus en culture ou différenciés pendant 10 jours ont été incubés en présence ou en absence de 0,5 µM de FCCP ou 10 ng/ml de TNFα pendant 3 jours. Au terme de ces incubations, les cellules ont été incubées en présence de la sonde Mitotracker Red (50 nM) avant d'être fixées dans du PBS-glutaraldéhyde (0,5%) puis montées au Mowiol pour l'observation en microscopie confocale. La sonde Mitotracker Red a la propriété de s'accumuler dans la mitochondrie de manière partiellement dépendante de son potentiel et est donc un moins bon indicateur de la masse mitochondriale. Cependant, cette sonde offre l'avantage d'être compatible avec une fixation des cellules, contrairement à la sonde Mitoctracker Green.

La **figure 3.14** reprend les micrographies des observations qui ont été réalisées en microscopie confocale suite au marquage des cellules à l'aide la sonde Mitotracker Red. Il est possible de voir que les mitochondries des pré-adipocytes se situent essentiellement dans la région péri-nucléaire. Dans les cellules différenciées, le marquage semble plus intense et se retrouve dans tout le cytosol. Dans les adipocytes incubés en présence de TNFα ou de FCCP pendant 3 jours, le marquage est beaucoup moins intense que dans les adipocytes et semble également moins intense que le signal obtenu dans les pré-adipocytes.

L'interprétation de ces observations est difficile car une brillance plus élevée dans les adipocytes différenciés pourrait être simplement le résultat d'un regroupement de la population mitochondriale au sein de cellules ayant de moins en moins de place dans le cytosol. Cette « pseudo » augmentation de la fluorescence ne peut donc pas être interprétée avec certitude comme une augmentation de la population mitochondriale. De plus, la diminution observée dans les adipocytes incubés en présence de FCCP ou de TNFα pourrait s'interpréter comme une diminution de la population mitochondriale. Cependant, rappelons que l'accumulation de la sonde Mitotracker Red dans les mitochondries est partiellement dépendante du potentiel de membrane (Pendergrass, Wolf et al. 2004). On comprend donc qu'un traitement des cellules avec un agent découplant comme le FCCP ou le TNFα deux molécules capables de diminuer le potentiel de membrane mitochondrial, peut inhiber l'incorporation de la sonde dans l'organite et donc le marquage de la population mitochondriale dans ces conditions.

En conclusion, ces expériences devront être poursuivies par des études du réseau mitochondrial sur des cellules vivantes marquées à l'aide de la sonde Mitotracker Green. Ces données compléteraient les données quantitatives obtenues en cytométrie de flux et donneraient probablement des indications plus fiables sur l'impact que peut avoir un

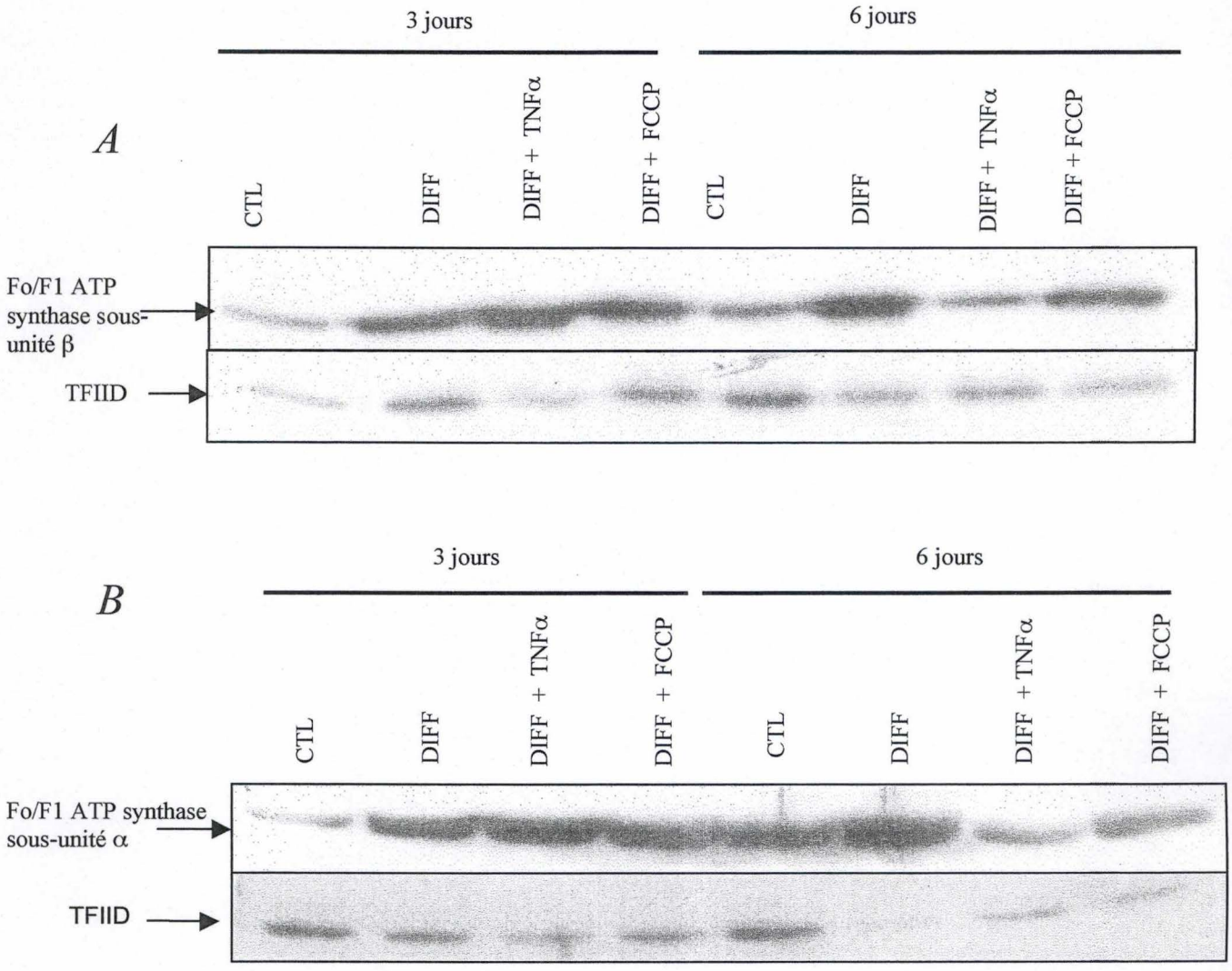


Figure 3.15 : Analyse de l'abondance des sous-unités β (A) et α (B) de la Fo/F1 ATP synthase en Western Blotting dans des pré-adipocytes (CTL) et des adipocytes 3T3-L1 différenciés (DIFF) pendant 10 jours puis incubés pendant 3 ou 6 jours en absence ou en présence de 0.5 μM de FCCP (DIFF + FCCP) ou de 10 ng/ml de TNF-α (DIFF+ TNFα). Au terme de ces incubations, les lysats clairs ont été préparés et l'abondance des sous-unité α et β de l'ATP synthase a été détectée en Western Blotting réalisé sur 10 μg de protéines. La détection des protéines d'intérêt a été révélée en chémiluminescense(ECL) sur des films radiographiques qui ont ensuite été séchés et scannés.

traitement des adipocytes par le FCCP ou le TNFα sur la structure et l'abondance de la population mitochondriale.

En conclusion, nos résultats montrent que l'abondance de la population mitochondriale, étudiée par l'accumulation de sondes fluorescentes spécifiques des mitochondries, ne semble pas modifiée dans les adipocytes incubés en présence de TNFα ou de l'agent découplant mitochondrial. Nous avons donc émis l'hypothèse suivante : bien que quantitativement, la population mitochondriale reste inchangée dans les cellules en réponse au FCCP ou TNFα, la biogenèse de l'organite pourrait se traduire par des modifications qualitatives dans les protéines mitochondriales. Ces différences résulteraient alors d'une expression différentielle de gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales ou seraient la conséquence de modifications dans l'importation des protéines dans l'organite. Nous sommes conscients qu'une approche puissante pour rechercher un maximum de modifications d'abondance de protéines mitochondriales reste l'approche protéomique réalisée sur des fractions cellulaires enrichies en mitochondries purifiées. Pour terminer ce travail, nous nous sommes simplement intéressés à l'abondance de quelques marqueurs protéiques de la population mitochondriale couramment utilisés dans la littérature pour suivre la biogenèse mitochondriale comme les sous-unités de la FoF1-ATP synthase (Lopez-Lluch, Hunt et al. 2006) ou les protéines TOM 20 et TOM 40 et pour lesquels nous avions les outils d'étude au laboratoire.

3.4.3 Etude de l'abondance de certaines protéines mitochondriales utilisées comme marqueurs de l'abondance de la population de l'organite dans des adipocytes incubés en présence de FCCP et de TNFα.

3.4.3.1 Effets du FCCP et du TNFα sur l'abondance de sous-unités protéiques des complexes de la chaîne respiratoire.

3.4.3.1.1 Etude de l'abondance des sous-unités α et β de la FoF1-ATP synthase

La FoF1-ATPsynthase (encore appelée rotor mitochondrial) catalyse la phosphorylation de l'ADP en ATP au cours de la phosphorylation oxydative. Ce complexe multiprotéique (Complexe V) est composé de 8 sous-unités ($\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon\alpha_2\beta_v$) qui se répartissent au sein des deux sous-unités F_0 et F_1 qui composent l'ATPsynthase. La sous-unité F_0, à travers laquelle les protons retournent dans la matrice mitochondriale, est un complexe membranaire. La sous-unité F_1, quant à elle, se situe dans la matrice mitochondriale et est le siège de la phosphorylation de l'ADP en ATP. Celle-ci a lieu dans les 3 sites catalytiques situés à l'interface des sous-unités α et β. C'est l'abondance de ces sous-unités que nous avons recherché par Western Blotting sur des lysats clairs d'adipocytes incubés ou non en présence de FCCP ou de TNFα.

Des pré-adipocytes 3T3-L1 ont donc été différenciés pendant 10 jours et ensuite incubés en présence, ou en absence de 0,5 µM de FCCP ou 10 ng/ml de TNFα pendant 3 ou 6 jours. Au terme de ces incubations, les cellules ont été lysées et l'abondance des sous-unités α et β a été visualisée par Western Blotting. Nous pouvons voir à la **figure 3.15** que l'abondance de la sous-unité β de la FoF1-ATP synthase est beaucoup plus élevée dans les adipocytes que dans les pré-adipocytes. Ce résultat est en accord avec la littérature qui rapporte une biogenèse mitochondriale augmentée au cours de la différenciation adipocytaire (Wilson-Fritch, Burkart et al. 2003). Nous pouvons également voir qu'après 6 jours de traitement en présence de TNFα, l'abondance de la protéine diminue de manière drastique. Les résultats obtenus pour le FCCP sont difficilement interprétables bien qu'il semblerait que l'abondance de la protéine ne soit peu ou pas modifiée après 6 jours de traitement. Il est

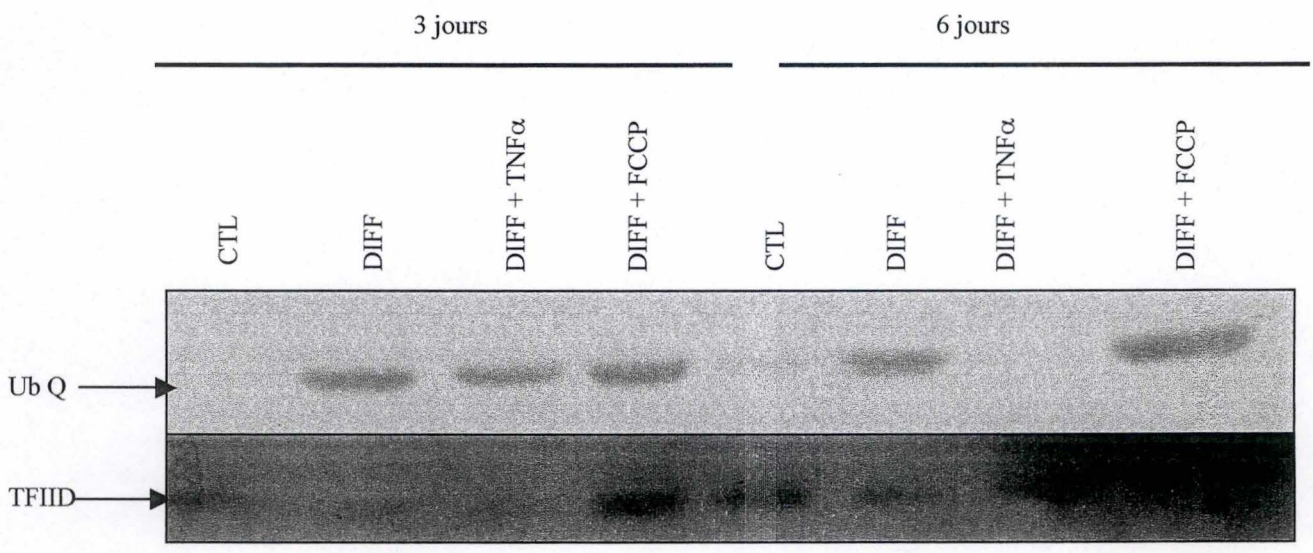


Figure 3.16 : Analyse de l'abondance de l'ubiquitinol coenzyme Q reductase (Ub Q) en Western Blotting dans des pré-adipocytes et des adipocytes 3T3-L1 différenciés (DIFF) pendant 10 jours puis incubés pendant 3 ou 6 jours en présence ou en absence de 0.5 μM de FCCP (DIFF + FCCP) ou de 10 ng/ml de TNFα (DIFF + TNFα). Au terme de ces incubations, les lysats clairs ont été préparés et l'abondance de l'ubiquitinol coenzyme Q reductase a été détectée en Western Blotting réalisé sur 10 μg de protéines. La détection des protéines d'intérêt a été révélée en chémiluminescense(ECL) sur des films radiographiques qui ont ensuite été séchés et scannés. La charge protéique a été vérifiée par l'immunodétection de la protéine TFIID.

important de signaler ici que, dans le tissu adipeux brun, l'expression du gène codant la sous-unité β de la FoF1-ATP synthase est régulée par le facteur de transcription NRF-2 (Villena, Vinas et al. 1998). Rappelons nous que nous avons montré que l'abondance nucléaire de ce facteur diminue dans les adipocytes incubés en présence de TNFα , une diminution non observée dans des adipocytes incubés en présence de FCCP. De plus, un effet comparable du TNFα est observé sur l'abondance de la sous-unité α de la FoF1-ATP synthase. Pour ce marqueur protéique et bien que le Western Blotting soit de mauvaise qualité, il semble également que l'abondance de cette protéine diminue dans des adipocytes incubés pendant 6 jours en présence de FCCP.

Ces effets du FCCP sur l'abondance des deux sous-unités pourraient s'expliquer, du moins en partie, par le fait que l'expression de ces deux sous-unités est régulée par des facteurs de transcription étudiés dans le cadre de ce travail. En effet, comme nous venons de le mentionner, le gène codant la sous-unité β de la FoF1-ATPsynthase est régulé, par le facteur de transcription NRF-2. Par contre, l'expression du gène codant la sous-unité α est sous le contrôle des facteurs de transcription USF2 (Upstream Stimulatory Factor 2) et YY1 (Breen, Vander Zee et al. 1996). Or, nous avons montré que l'abondance nucléaire de ce dernier diminue de manière drastique dans des adipocytes incubés en présence de FCCP. Ces données qui montrent une corrélation entre l'abondance du marqueur et son régulateur, qui devront cependant être confirmées et une éventuelle relation de cause à effet sera à démontrer.

En effet, signalons qu'il nous est impossible de tirer des conclusions quant aux mécanismes responsables des modifications d'abondance des protéines mitochondriales observées dans des adipocytes soumis à un découplage mitochondrial ou incubés en présence de TNFα à l'aide de résultats de Western Blotting. En effet, les diminutions pourraient également être le résultat d'une dégradation différentielle de ces protéines dans nos conditions expérimentales. Sachant que les protéines mitochondriales sont dégradées par les protéases Lon (Bulteau, Szweda et al. 2006) et que l'activité de celles-ci est inhibée par l'ADP et activée par des ROS, on peut imaginer une activité différentielle de ces enzymes dans nos différentes conditions expérimentales (Bulteau, Szweda et al. 2006).

3.4.3.1.2 Etude de l'abondance de l'ubiquinone-coenzyme Q réductase

L'ubiquinone-coenzyme Q réductase est une sous-unité du complexe III de la chaîne respiratoire dont nous avons également analysé l'abondance par la technique de Western Blotting réalisé sur des lysats clairs préparés à partir d'adipocytes incubés pendant 3 ou 6 jours en présence de 0,5 μM de FCCP ou de 10 ng/ml de TNFα (**Figure 3.16**). La seule information que nous pouvons tirer de ce Western Blotting est que l'abondance de l'ubiquinone-coenzyme Q réductase augmente dans les adipocytes par rapport aux pré-adipocytes. Cette donnée est de nouveau en accord avec une biogenèse mitochondriale accrue au cours de l'adipogenèse. Même s'il est difficile de discuter plus en détails les résultats de cette figure pour des raisons évidentes de problèmes de charge, nous pouvons quand même observer que la protéine devient complètement indétectable dans des cellules différenciées incubées en présence de TNFα pendant 6 jours. Ceci correspond à une forte diminution de l'abondance de cette protéine dans ces conditions. Cette diminution est déjà visible après 3 jours de traitement. Par contre, même si la charge pour la piste correspondant à la condition FCCP est plus abondante, il est peu probable que le découplage mitochondrial induise une diminution de l'abondance de cette protéine aussi forte que celle obtenue dans les cellules répondant au TNFα. Nous pouvons donc dire avec certitude que l'abondance de la protéine ubiquitinone-coenzyme Q est différentiellement modifiée dans les cellules incubées en présence de la cytokine pro-inflammatoire ou présentant un découplage mitochondrial

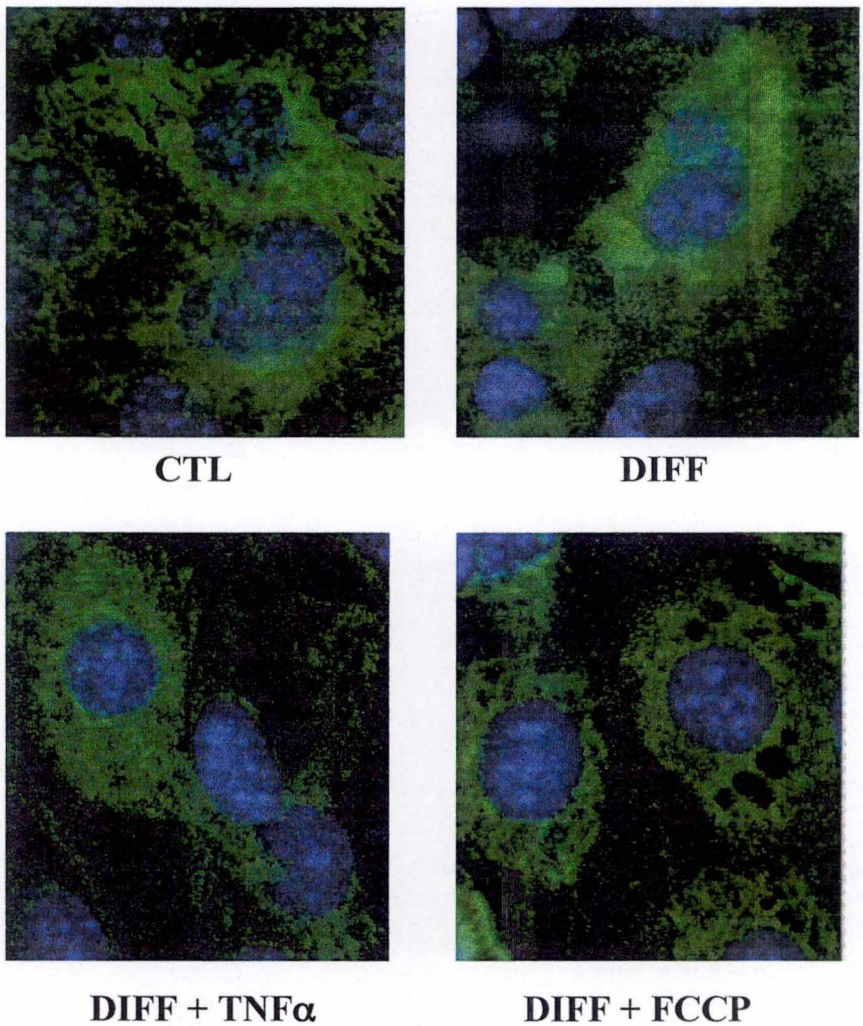


Figure 3.17 : Micrographies prises après marquage en immunofluorescence et observation en microscopie confocale permettant de visualiser l'abondance et la distribution du cytochrome c dans des pré-adipocytes (CTL) et des adipocytes différenciés pendant 10 jours puis incubés en absence ou en présence de 0,5 μM de FCCP (DIFF + FCCP) ou 10 ng/ml de TNFα (DIFF + TNFα) pendant 3 jours. Le marquage a été réalisé sur des cellules perméabilisées avec du Triton X-100, à l'aide d'un anticorps primaire IgG dirigé contre le cytochrome c et de l'anticorps secondaire de type Alexa ant IgG anti-lapin (longueur d'onde d'émission: 488 nm, vert). Le marquage des noyaux a été réalisé à l'aide du TO-PRO3 (longueur d'onde d'émission: 640 nm, Bleu).

3.4.3.1.3 Etude de l'abondance et de la localisation du cytochrome c

Afin d'analyser les éventuelles modifications d'abondance et/ou de localisation du cytochrome c, une protéine mitochondriale située dans l'espace inter-membranaire délocalisable dans le cytosol lors d'une réponse apoptotique (Ekstrand, Falkenberg et al. 2004; Bogacka, Ukropcova et al. 2005; Ikeuchi, Matsusaka et al. 2005), un marquage en immunofluorescence a donc été réalisé sur des pré-adipocytes 3T3-L1, des adipocytes différenciés pendant 10 jours puis incubés pendant 3 jours en présence ou en absence de 0,5 μM de FCCP ou de 10 ng/ml de TNFα . Au terme de ces incubations, un marquage en immunofluorescence a été effectué à l'aide d'un anticorps primaire dirigé contre le cytochrome c et d'un anticorps secondaire de type Alexa anti-IgG de lapin. On remarque à la **figure 3.17** que le marquage du cytochrome c est moins intense et semble plus diffus dans le cytosol dans les adipocytes incubés en présence de FCCP ou de TNFα. La diminution du marquage liée au cytochrome c laisse également supposer qu'il y aurait une diminution de l'abondance du cytochrome c dans les mitochondries d'adipocytes traités par du TNFα ou du FCCP.

Ces effets sur l'abondance du cytochrome c pourraient également être dus à une diminution de l'expression du gène codant le cytochrome c. Comme nous l'avons déjà mentionné également, l'expression du gène codant le cytochrome c est régulé dans certaines conditions par le facteur de transcription NRF-1 ({Scarpulla, 2002 #348. Bien que l'abondance de ce dernier diminue dans des adipocytes incubés en présence de TNFα, ce n'est pas le cas lors d'un découplage mitochondrial. Cependant, le cytochrome c, outre son rôle de transporteur d'électrons au sein de la chaîne respiratoire, est également impliqué dans l'apoptose, processus au cours duquel il est libéré dans le cytosol pour initier l'activation d'Apaf-1 (*Apoptosis protease activating factor*) et l'activation de la caspase-9, une protéase en amont de la voie canonique de l'activation de la caspase-3 {Olson, 2001 #519}. Le marquage plus diffus observé dans les cellules répondant au découplant mitochondrial ou à la cytokine pro-inflammatoire pourrait donc être également le signe d'un début de réponse apoptotique affectant quelques cellules. Le TNFα est en effet décrit comme une cytokine capable d'induire l'apoptose dans les cellules adipocytaires, une réponse surtout observée pour des concentrations de 15-20 ng/ml (Prins, Niesler et al. 1997). Le FCCP peut également induire ce phénomène de manière dose dépendante. En effet, la diminution du potentiel de membrane du au découplage peut induire le larguage des composés pro-apoptotiques dans le cytosol et induire l'apoptose pour des concentrations de 10 à 20 μM (Stoetzer, Pogrebniak et al. 2002)

3.4.3.2 Effets du TNFα et du FCCP sur l'abondance de deux composants du complexe d'importation des protéines mitochondriales (TOM) comme le canal TOM40 et le récepteur TOM20

Le complexe TOM est un complexe de translocation des protéines mitochondriales de la membrane mitochondriale externe qui assure l'importation des protéines mitochondriales, dont la synthèse est cytosolique (Sherman, Taylor et al. 2006). Ce complexe, composé de 7 sous-unités, reconnaît les précurseurs cytosoliques et les transfèrent à travers la membrane externe. La protéine TOM 20 est le principal récepteur des pré-protéines mitochondriales et se

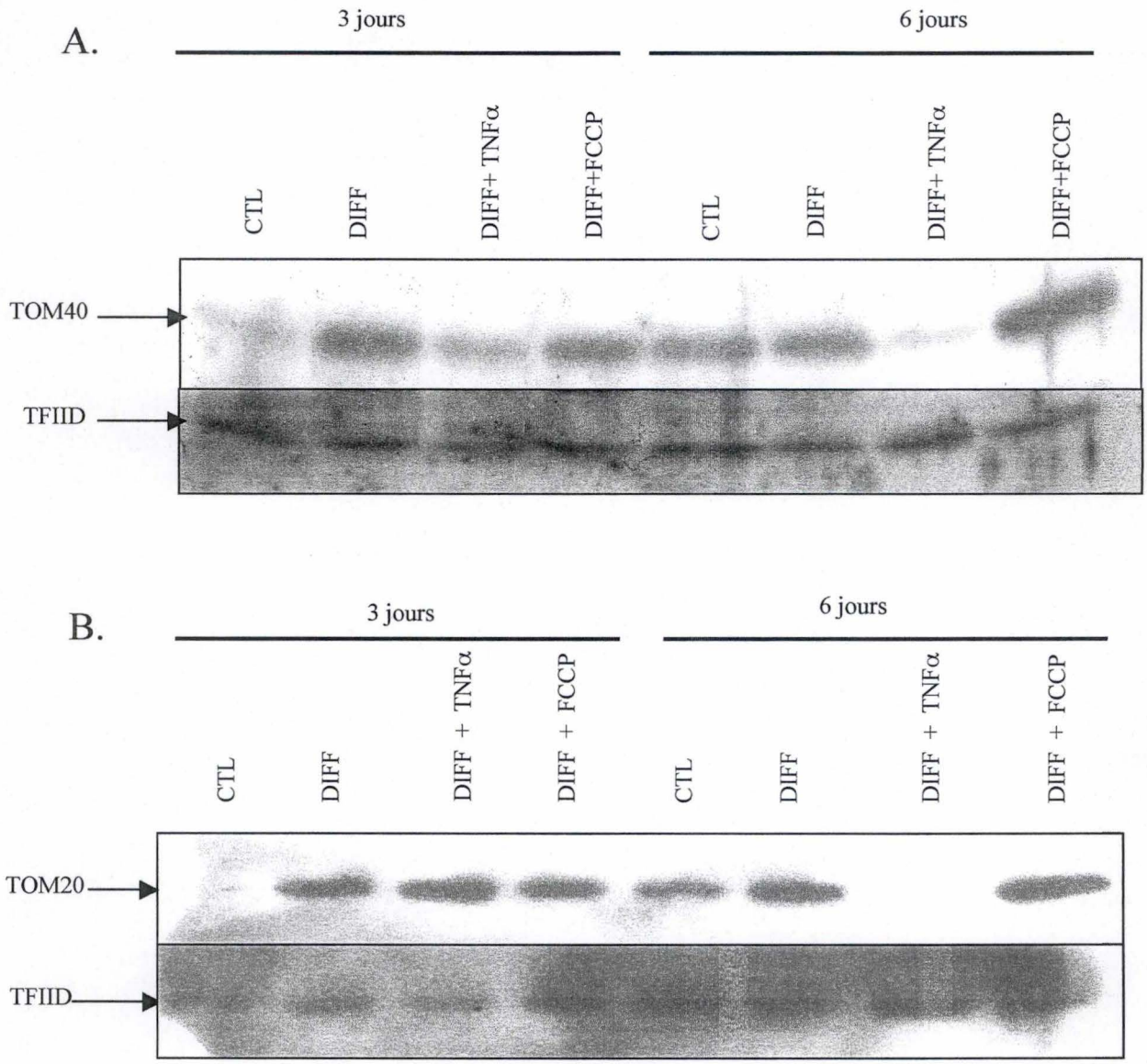


Figure 3.18: Analyse de l'abondance des protéines TOM 40 (A) et TOM 20 (B) en Western Blotting dans des pré-adipocytes (CTL), des adipocytes différenciés pendant 10 jours puis incubé en présence ou en absence de 10 ng/ml de TNFα (DIFF + TNFα), de 0.5 μM de FCCP(DIFF + FCCP). Au terme de ces incubations, les lysats clairs sont préparés et l'abondance des protéines TOM 40 et TOM 20 a détectée en western Blotting réalisé sur 10 μg de protéines. La détection des protéines d'intérêt a été révélée en chémiluminescense(ECL) sur des films radiographiques qui ont ensuite été séchés et scannés. La charge protéique a été vérifiée par l'immunodétection de la protéine TFIID.

situe dans la membrane mitochondriale externe de l'organite (Terada, Kanazawa et al. 1997). La protéine TOM 40 forme un canal hydrophile à travers la membrane externe et permet donc l'importation des précurseurs de protéines mitochondriales que leur localisation soit matricielle ou membranaire (Bohnert, Pfanner et al. 2007).

Afin d'étudier l'effet éventuel du TNFα ou du FCCP sur l'abondance des protéines TOM 20 et TOM 40, nous avons recherché leur abondance en Western Blotting réalisé sur des lysats clairs préparés à partir de pré-adipocytes 3T3-L1 et d'adipocytes différenciés incubés pendant 3 ou 6 jours en présence ou en absence de 0,5 μM de FCCP ou de 10 ng/ml de TNFα. Comme on peut le voir à la figure **figure 3. 18,** après 3 jours d'incubation post-différenciation, l'abondance des protéines TOM 40 et TOM 20 est plus élevée dans les adipocytes différenciés que dans les pré-adipocytes. Remarquons aussi que l'abondance des protéines TOM 40 et TOM 20 semble aussi augmenter au cours du maintien en culture des pré-adipocytes. Nous n'avons pas d'explication rationnelle pour discuter ces changements mais sommes confiants des résultats car ils ont été reproduits par un chercheur indépendant (Silvia Tejerina, thèse en cours). Ces marqueurs protéiques sont donc de bons marqueurs de la biogenèse mitochondriale qui est stimulée au cours de la différenciation des cellules et ces données sont en accord avec les données de la littérature (Wilson-Fritch, Burkart et al. 2003). Nous pouvons également observer que les abondances des protéines TOM 40 et TOM 20 diminuent très fortement dans les adipocytes incubés pendant 6 jours en présence de TNFα. Ces effets ne sont pas observés dans les cellules incubées en présence de FCCP. En effet, l'abondance de TOM 40 et TOM 20 semble même légèrement augmenter dans les adipocytes différenciés traités par l'agent découplant pendant 6 jours.

L'expression du gène codant pour TOM 20 est contrôlée par les facteurs de transcription NRF-1 et NRF-2 (Blesa, Prieto-Ruiz et al. 2007). Or, comme nous l'avons montré précédemment, l'abondance nucléaire de ces 2 facteurs diminue dans les cellules incubées en présence de TNFα et est peu ou pas modifiée voir augmentée pour NRF-2 lors d'un traitement en présence de FCCP. Ces différents résultats suggèrent une possible augmentation de la transcription du gène codant TOM 20, une hypothèse qui sera à vérifier en recherchant l'abondance relative des transcrits de ces gènes par la technique de PCR en temps réel. En plus de la caractérisation de l'état d'activité des facteurs de transcription impliqués dans la biogenèse mitochondriale, nous rechercherons l'abondance relative des transcrits d'un certain nombre de gènes cibles de ces facteurs pour tenter de corréler leur état d'activité et le contrôle de l'expression de gènes cibles endogènes. Les gènes codant les protéines TOM 20 et TOM 40 semblent des candidats intéressants car une modification d'abondance de ces protéines qui contrôlent l'importation pourrait se traduire par des changements importants dans la composition du contenu mitochondrial en protéines.

En conclusion, il apparaît qu'une incubation de 6 jours en présence de TNFα conduit à une diminution dramatique de l'abondance de l'ensemble des protéines mitochondriales étudiées dans le cadre de ce travail c'est-à-dire les sous-unités α et β de la FoF1-ATP synthase, les protéines TOM 40 et TOM 20 et l'ubiquinone Coenzyme Q reductase. Cette cytokine pro-inflammatoire est connue pour induire la dédifférenciation des cellules adipocytaires (Petruschke and Hauner 1993). Rappelons que ce processus est défini comme un processus transformant une cellule adipocytaire spécialisée présentant un phénotype caractérisé par de nombreuses vésicules riches en triglycérides en une cellule possédant un phénotype proche de celui des pré-adipocytes contenant moins de triglycérides. Rappelons qu'il est connu que le TNFα conduit à une diminution de la biogenèse mitochondriale dans les adipocytes blancs. Ce phénomène est accompagné d'une diminution de l'expression de la eNOS (Valerio, Cardile et al. 2006) et pourrait donc résulter, du moins en partie, d'une diminution de l'expression de PGC-1α et de ses gènes cibles (Clementi and Nisoli 2005).

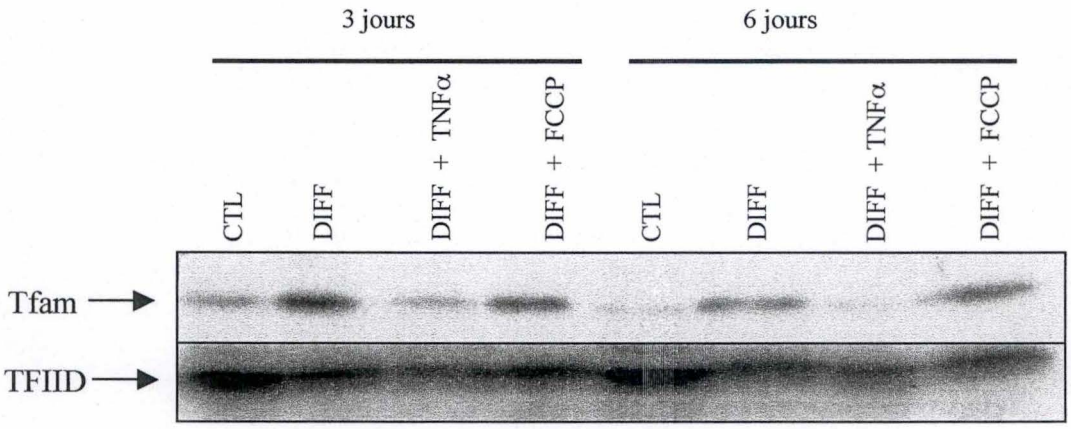


Figure 3.19: Analyse de l'abondance de la protéine Tfam en Western Blotting dans des pré-adipocytes (CTL) et des adipocytes 3T3-L1 différenciés pendant 10 jours puis incubés pendant 3 ou 6 jours en absence ou en présence de 0.5 μM de FCCP (DIFF + FCCP) ou de 10 ng/ml de TNFa (DIFF + TNFa). Au terme de ces incubations, les cellules ont été lysées et l'abondance de la protéine Tfam a été détectée en Western Blotting réalisé sur 30 μg de lysats clairs. La détection des protéines d'intérêt a été révélée en chémiluminescense (ECL) sur des films radiographiques qui ont ensuite été séchés et scannés. La charge protéique a été vérifiée par l'immunodétection de la protéine TFIID.

D'autre part, nous avons également montré qu'une incubation des adipocytes en présence de FCCP conduit à une légère augmentation de l'abondance de protéines mitochondriales telles que TOM40 et TOM20. Par contre, le FCCP n'a que peu d'effets sur l'abondance d'autres protéines comme les sous-unité α et β de la FoF1 ATP-synthase. Il est évident que dans la suite de ce travail nous tenterons de déterminer si les modifications d'abondance observées pour les marqueurs mitochondriaux dans ces conditions sont le résultat de changements au niveau de la transcription, de la traduction ou de la stabilité (dégradation) des protéines. Il semblerait donc, qu'à défaut d'augmenter l'abondance globale des protéines mitochondriales, le découplage mitochondrial pourrait induire des changements conduisant à une modification qualitative de la composition de l'organite, surtout après 6 jours de traitement. Enfin, les modifications d'abondance des protéines TOM20 et TOM40 sont intéressantes, car ces différences pourraient être responsable de changements importants dans la composition des mitochondries de cellules adipocytaires incubées en présence de TNFα ou de FCCP .

Nous avons donc montré que l'abondance des facteurs de transcription NRF-1 et NRF-2, qui sont impliqués dans la régulation de l'expression de nombreux gènes codant pour des protéines mitochondriales, est peu ou pas diminue dans les cellules incubées en présence de FCCP (figures 3.1 et 3.2). Par contre, l'abondance nucléaire de ces facteurs est diminuée dans les adipocytes répondant au TNFα. Pour terminer ce travail, nous avons donc tenté de mieux caractériser l'abondance de l'ADN mitochondrial en recherchant l'abondance de TFAM, un gène cible des facteurs NRF-1 et NRF-2 (Virbasius and Scarpulla 1994) codant pour un facteur de transcription impliqué dans la transcription et la réplication du génome mitochondrial. Finalement, nous avons voulu quantifier directement l'abondance relative du génome mitochondrial dans des adipocytes stimulés par la cytokine pro-inflammatoire ou répondant à un découplage faible mais chronique des mitochondries (données obtenues par Silvia Tejerina sur le $\Delta\psi m$ mesuré sur des adipocytes à l'aide la sonde TMRE et analyse en cytométrie de flux).

3.4.4 Etude de l'abondance de l'ADN mitochondrial et de la protéine Tfam dans des adipocytes incubés en présence de FCCP ou de TNFα

Une caractéristique importante des mitochondries est la présence d'un génome, qui dans les cellules eucaryotes humaines et murines se compose d'une molécule d'ADN double brin et circulaire d'environ 16,6 kb présent en plusieurs copies. Nous avons vu que ce génome mitochondrial n'encode que 37 gènes (22tRNAs et 2 rRNAs (12S et 16S) et 13 codant pour des composants de la chaîne de transport en électrons. Rappelons également que de nombreuses études ont mis en évidence le rôle crucial de la protéine Tfam dans le maintien, la transcription et la réplication de l'ADN mitochondrial (Ekstrand, Falkenberg et al. 2004; Ikeuchi, Matsusaka et al. 2005) (Ekstrand and Larsson 2002). La protéine Tfam appartient à la famille des protéines HMG (High Mobility Group) comprenant également de nombreuses protéines connues pour être impliquées dans les modifications de la structure de l'ADN et facilitant certains processus comme la transcription, la réplication et la recombinaison (Asin-Cayuela and Gustafsson 2007). Elle est extrêmement abondante (près de 1000 protéines par molécule d'ADN mitochondrial) et serait un composant essentiel à la formation des nucléoïdes formée par l'ADN mitochondrial et d'autres protéines. Nous avons donc étudié d'éventuelles modifications de l'abondance de ce facteur de transcription mitochondrial dans des adipocytes 3T3-L1 incubés en présence de FCCP ou de TNFα .

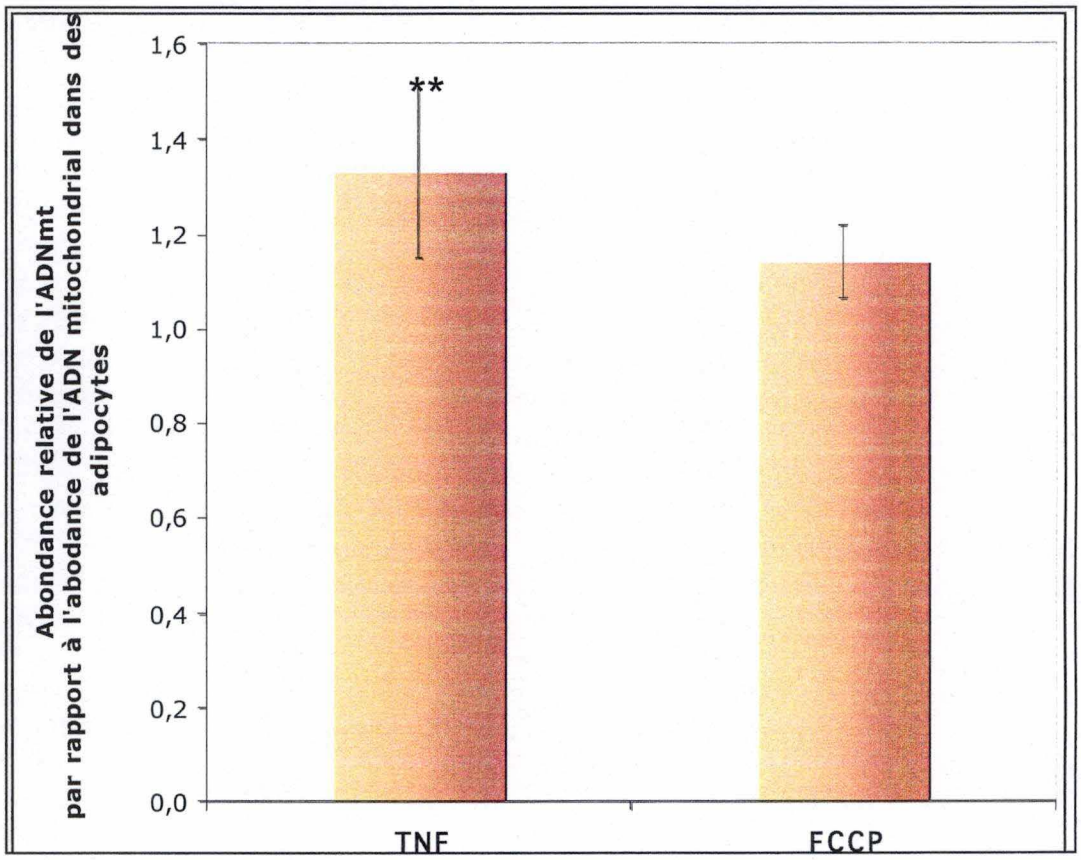


Figure 3.20: Abondance relative de l'ADNmt dans des adipocytes incubés pendant 6 jours en présence de FCCP ou de TNFa par rapport à l'abondance de l'ADNmt dans des adipocytes. Les adipocytes 3T3-L1 différenciés pendant 10 jours ont ensuite été incubés pendant 6 jours en présence ou en absence de 0,5 μM de FCCP (DIFF + FCCP) ou de 10 ng/ml de TNFα (DIFF + TNFα). Au terme de ces incubations, l'ADN total a été extrait des cellules et placé dans un thermocycleur pour l'étape de PCR réalisée en présence de SYBERGreen et d'une quantité optimale d'amorces spécifiques pour la région de déplacement D-Loop de l'ADNmt. Après comparaison de l'efficience de PCR, les résultats ont été normalisés par rapport au gène de TFIID utilisé comme référence par la formule $E = 2^{-DDCt}$ et exprimés de manière relative en nombre de fois de l'abondance de l'ADNmt dans des adipocytes différenciés puis maintenu pendant 6 jours en culture. Les résultats représentent la moyenne +/- un écart-type (n = 3).**: statistiquement significativement différent par rapport aux adipocytes différenciés avec $P< 0.05$ comme déterminé par une ANOVA II et un test de Holm-Sidak.

3.4.4.1 Effets du FCCP et du TNFα sur l'abondance de la protéine Tfam

Des pré-adipocytes 3T3-L1 ont été différenciés pendant 10 jours avant d'être incubés en présence ou en absence de 10 ng/ml de TNFα ou de 0,5 μM de FCCP pendant 3 ou 6 jours. Au terme de ces incubations, les cellules ont été lysées et l'abondance de la protéine Tfam a été recherchée par Western Blotting (**Figure 3.19**). Nous observons que l'abondance de Tfam est plus importante dans les cellules différenciées que dans les pré-adipocytes. Par contre, l'abondance de la protéine semble diminuer dans les adipocytes incubés pendant 3 jours d'incubation en présence de TNFα alors qu'elle ne semble pas ou peu modifiée par un traitement en présence de l'agent découplant. Ce résultat est également intéressant parce qu'il est connu que l'expression du gène codant pourla protéine Tfam est sous le contrôle des facteurs de transcription NRF-1 et NRF-2 (Virbasius and Scarpulla 1994) qui, comme nous l'avons montré, voient leur abondance nucléaire diminuée dans des adipocytes 3T3-L1 incubés en présence de TNFα. Nous avons donc ici une bonne corrélation entre l'abondance des facteurs de biogenèse mitochondriale et le niveau d'abondance d'un gène cible endogène de ces facteurs.

La protéine Tfam est supposée jouer un rôle important dans le contrôle de la réplication du génome mitochondrial et donc dans l'abondance de l'ADN mitochondrial au sein des cellules (Ekstrand, Falkenberg et al. 2004; Ikeuchi, Matsusaka et al. 2005) (Ekstrand and Larsson 2002). Comme nous observons une diminution de l'abondance de la protéine Tfam dans les adipocytes incubés en présence de TNFα et peu ou pas de changement dans les cellules traitées par le FCCP nous avons terminé ce travail en quantifiant l'abondance relative du génome mitochondrial dans des adipocytes 3T3-L1 différenciés incubés en présence ou en absence de FCCP ou de TNFα .

3.4.4.2 Effets du TNFα et du FCCP sur l'abondance de l'ADN mitochondrial dans les adipocytes

Pour étudier une éventuelle modification de l'abondance de l'ADN mitochondrial dans des adipocytes incubés en présence de TNFα ou de FCCP, nous avons adapté un protocole de quantification de l'ADN mitochondrial par PCR en temps réel décrit initialement pour des adipocytes humains (Bogacka, Ukropcova et al. 2005).

Des cellules 3T3-L1 ont été différenciées pendant 10 jours puis incubées en présence de 10 ng/ml de TNFα ou de 0,5 μM de FCCP pendant 6 jours. Au terme de ces incubations, l'ADN total a été extrait des cellules. L'amplification d'un fragment d'ADN d'intérêt a été réalisée par réaction PCR en temps réel avec des amorces spécifiques de la région régulatrice D-Loop. Les résultats obtenus ont ensuite été normalisés par le niveau d'expression de TFIID, un gène codant pour un facteur de la machinerie basale de transcription et utilisé comme gène de référence. Comme on peut le voir à la **figure 3.20** pour trois expériences indépendantes, la quantité d'ADN mitochondrial n'est pas modifiée de manière significative dans les adipocytes incubés pendant 6 jours en présence de FCCP. Par contre, une incubation des cellules en présence de TNFα pendant le même temps conduit à une augmentation significative de la quantité d'ADN mitochondrial dans les mitochondries.

Ces résultats peuvent apparaître, dans un premier temps, comme contradictoires par rapport aux données obtenues précédemment qui montrent que dans les adipocytes incubés en

présence de TNFα, on observe une diminution de l'abondance des facteurs de transcription NRF-1 et NRF-2 et une diminution de l'abondance de la protéine Tfam, un facteur bien décrit pour réguler la transcription, la réplication et la stabilité du génome mitochondrial (Asin-Cayuela and Gustafsson 2007).

Cependant, il a déjà été décrit qu'une augmentation de l'abondance de l'ADN mitochondrial peut s'observer sans modification d'abondance de la protéine Tfam (Noack, Bednarek et al. 2006). En effet, Noack et ses collaborateurs ont montré que, dans des cellules C2C12 exposées à un stress oxydatif léger pendant 3 jours, l'abondance de l'ADNmt augmente sans modification de la variation de l'abondance de la protéine Tfam. Ces auteurs émettent l'hypothèse que d'autres protéines comme les facteurs de transcription TFBM1 et TFBM2 pourraient être impliqués dans ce phénomène (Noack, Bednarek et al. 2006). Cela étant dit, dans les adipocytes incubés en présence de TNFα, l'abondance de la protéine n'est pas maintenue. A ce jour, rien dans la littérature ne nous permet d'expliquer ce phénomène. Cependant la composition protéique des « nucléoïdes » contenant l'ADNmt commence seulement à faire l'objet d'études dans la littérature et il ne serait pas surprenant que parmi les protéines interagissant avec l'ADNmt, certaines d'entre elles puissent être impliquées dans la réplication de l'ADNmt. Wang et son équipe ont récemment mis en évidence l'existence d'une nouvelle hélicase (DHX30) interagissant avec l'ADNmt et qui pourrait jouer ce role (Wang and Bogenhagen 2006).

Conclusion et perspectives

4. Conclusion et perspectives

L'obésité est un état qui se manifeste par l'accumulation excessive de tissu adipeux, essentiellement viscéral. Cette accumulation excessive de graisses peut résulter d'un déséquilibre entre l'apport calorique et les dépenses énergétiques mais trouve bien souvent son origine dans des dérégulations métaboliques qu'elles soient d'origine génétique ou non (Barsh, Farooqi et al. 2000). Bien que n'étant pas une pathologie par elle-même, l'obésité est souvent associée à des pathologies invalidantes comme le diabète de type 2, de l'hypertension, et des maladies cardiovasculaires (Muoio and Newgard 2006). L'obésité, touchant des proportions de plus en plus importantes de la population mondiale (le nombre de sujets atteints d'obésité ou caractérisés par une surcharge pondérale est en augmentation croissante sur TOUS les continents), est devenue la cible d'efforts de recherche visant à mieux comprendre la biologie des adipocytes, de leur différenciation et dédifférenciation. Parmi les approches visant à limiter l'accumulation de triglycérides dans les tissus adipeux, le découplage mitochondrial, qui mime d'ailleurs une fonction physiologique assurée par des protéines endogènes comme les UCPs, est une orientation de recherche importante. C'est en effet la découverte et la compréhension de l'action de la protéine UCP1, une protéine découplant la respiration des phosphorylations oxydatives limitant ainsi la production d'ATP, qui a permis de mettre en évidence le rôle bénéfique potentiel que pourrait avoir le découplage mitochondrial dans la lutte contre l'obésité. Le but de cette approche serait donc d'induire un dysfonctionnement modéré de la mitochondrie et d'utiliser cet organite comme cible d'interventions thérapeutiques visant à limiter la prise de poids.

Le rôle de la mitochondrie dans le métabolisme énergétique est connu depuis longtemps. En effet, cet organite est non seulement le site de la production d'ATP mais, étant donné sa contribution essentielle à la synthèse et à la β-oxydation des acides gras, il joue également un rôle important dans l'accumulation des lipides au sein des adipocytes. Le découplage induit donc un dysfonctionnement mitochondrial et cette altération de l'activité mitochondriale est susceptible d'activer certaines voies de signalisation au sein de la cellule et de conduire ainsi à une modification de l'expression de certains gènes parmi lesquels on retrouve non seulement des gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales mais également des régulateurs impliqués dans la biogenèse mitochondriale comme les facteurs de transcription CREB (Arnould, Vankoningsloo et al. 2002) et NRF-1 (Desquiret, Loiseau et al. 2006). Cette communication moléculaire rétrograde entre la mitochondrie non fonctionnelle et le noyau, que nous étudions au laboratoire depuis plusieurs années, pourrait donc conduire à modifier la biogenèse mitochondriale dans les adipocytes présentant un découplage mitochondrial. Notre hypothèse de travail est soutenue par de nombreuses données de la littérature qui montrent que de nombreuses pathologies mitochondriales sont caractérisées par une accumulation de mitochondries dans les cellules (Wallace 1999).

Nous avons donc travaillé sur des adipocytes blancs matures issus de la lignée cellulaire fibroblastique murine et immortalisée 3T3-L1. Une fois différenciées, ces cellules ont été incubées pendant plusieurs jours en présence de FCCP, pour induire un découplage mitochondrial modéré. Ce découplage mitochondrial est responsable d'une diminution du contenu en triglycérides dans les adipocytes (Silvia Tejerina, thèse en cours). Les mécanismes conduisant à la dédifférenciation des adipocytes en réponse à un découplage étant peu connus dans la littérature, nous comparons les effets obtenus en présence de FCCP à ceux observés en réponse à une stimulation par le TNFα, une cytokine pro-inflammatoire induisant également un dysfonctionnement mitochondrial et bien décrite pour ses effets inhibiteurs de l'adipogenèse (Petruschke and Hauner 1993) et positifs sur la dédifférenciation des adipocytes (Ruan, Hacohen et al. 2002). Les effets de cette cytokine pro-inflammatoire sur la

mitochondrie sont également bien décrits dans la littérature. Nous savons en effet que, dans différents types cellulaires, le TNFα induit la production de ROS par la mitochondrie et peut également inhiber l'activité de la chaîne respiratoire (Houstis, Rosen et al. 2006; Lopez-Armada, Carames et al. 2006).

Rappelons qu'un dysfonctionnement mitochondrial aboutit, *in fine,* à une modification de l'expression et/ou de l'activation de facteurs de transcription dont certains sont susceptibles d'être impliqués dans la biogenèse de l'organite.

Nous avons donc débuté notre travail en recherchant les effets d'une incubation d'adipocytes différenciés en présence de FCCP ou de TNFα sur l'activité et/ou l'abondance de plusieurs facteurs de transcription connus pour réguler l'expression de gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales.

Nous avons montré que dans des adipocytes 3T3-L1, l'abondance nucléaire du facteur de transcription NRF-1 est peu ou pas modifiée lors d'un découplage mitochondrial induit par le FCCP. Par contre, une incubation en présence de TNFα conduit à une diminution importante de l'abondance de ce facteur dans le noyau des adipocytes. Cet effet différentiel entre le FCCP et le TNFα est également observé pour les facteurs NRF-2 et YY1 puisque le FCCP conduit respectivement à une forte augmentation de l'abondance de NRF-2 et à une forte diminution de l'abondance du facteur YY1 dans le noyau des cellules traitées. Cet effet important du FCCP sur la diminution d'abondance de YY1 est très intéressant. En effet, ce facteur est un régulateur de l'expression de plusieurs sous-unités de la chaîne respiratoire comme la sous-unité COXVb (Basu, Lenka et al. 1997). La stimulation des cellules par le TNFα conduit également à réduire la quantité de NRF-2 et n'a que peu ou pas de changement sur l'abondance de YY1. Alors que l'abondance de YY1 augmente dans les noyaux au cours de l'adipogenèse, et qu'une incubation en présence de TNFα ne modifie pas ou très peu l'abondance de ce facteur, nous avons été surpris de voir qu'un découplage mitochondrial induit une diminution dramatique de l'abondance nucléaire de YY1. Dans le futur, nous tenterons donc de mettre en évidence un rôle éventuel de YY1 dans l'adipogenèse et la dédifférenciation adipocytaire. Pour cela, nous mettrons au point la technique d'immunoprécipitation de chromatine, qui nous permettra ainsi d'identifier les promoteurs de gènes potentiellement régulés par YY1 dans nos différentes conditions expérimentales.

D'autre part, nous avons montré que l'abondance nucléaire du facteur de transcription PPARγ diminue dans ces deux conditions expérimentales et que cette diminution est corrélée à une diminution de l'activité de ce facteur. Signalons que ces résultats sont en accord avec la littérature sur le TNFα, puisque la cytokine est bien décrite pour ses effets inhibiteurs sur l'activité de PPARγ (Ruan, Hacohen et al. 2002). Ce facteur, tout comme C/EBPα dont l'activité de liaison à l'ADN est également diminuée dans les adipocytes traités en présence de FCCP ou de TNFα, joue un rôle important dans l'adipogenèse et dans le contrôle de la biogenèse mitochondriale. Ajoutons encore que l'activité transcriptionnelle de ces différents facteurs de transcription pour lesquels nous montrons des changements d'abondance nucléaire sera recherchée par une approche utilisant des gènes rapporteurs (luciférase) dont l'expression est contrôlée par des promoteurs répondant spécifiquement à ces régulateurs. L'obstacle de l'efficacité de transfection qui est faible pour des cellules différenciées vient d'être levé par Aurélia De Pauw qui a mis au point les conditions de transfection par électroporation de ces cellules. Les modifications éventuelles d'expression de gènes cibles de et marqueurs de la biogenèse mitochondriale de ces différents facteurs pourraient également être recherchée (au niveau des transcrits) par des quantifications par PCR en temps réel. Enfin, la caractérisation du facteur de transcription ERRα, un candidat également décrit pour son rôle dans la biogenèse mitochondriale (Rangwala, Li et al. 2007) sera réalisée afin de compléter la liste

des facteurs de transcription étudiés dans le cadre de la biogenèse mitochondriale au sein de cellules adipocytaires répondant à un découplage mitochondrial.

Le co-activateur PGC-1α joue un rôle de coordination essentiel à la biogenèse mitochondriale dans différents types cellulaires. Son mécanisme d'action passe par la régulation de l'activité de nombreux facteurs de transcription (Lin, Handschin et al. 2005). Nous avons donc tenté de caractériser l'abondance et les modifications post-traductionnelles (acétylation et phosphorylation) susceptibles de modifier « l'activité » du co-activateur. Nous avons montré que l'abondance du transcrit de cette protéine diminue lors d'une incubation des adipocytes 3T3-L1 en présence de FCCP et de TNFα mais que cette diminution n'est pas corrélée à l'abondance nucléaire de cette protéine, celle-ci étant peu ou pas diminuée. Sachant que l'activité, la localisation sub-cellulaire de PGC-1α peuvent êtres modifiées suite à des modifications post-traductionnelles comme une phosphorylation ou une acétylation (Puigserver, Rhee et al. 2001; Gerhart-Hines, Rodgers et al. 2007), nous avons donc tenté de caractériser l'état d'acétylation et de phosphorylation de PGC-1α dans des adipocytes incubés en présence de FCCP ou de TNFα. L'abondance de ce facteur étant très faible, nous avons d'abord mis au point les conditions d'immunoprécipitation de ce co-activateur. Des données très préliminaires mais encourageantes nous ont permis de mettre en évidence un degré de phosphorylation plus important dans les adipocytes incubés en présence de TNFα. Cette recherche devra se poursuivre par la confirmation des modifications post-traductionnelles observées, surtout dans les cellules incubées en présence de FCCP. La seule voie connue à ce jour et conduisant à la phosphorylation de PGC-1α est la voie de la p38MAPK (Puigserver, Rhee et al. 2001). L'utilisation d'un inhibiteur de la voie de la p38MAPK comme le SB203580 dans des adipocytes incubés en présence de TNFα ou soumis à un découplage mitochondrial permettra de mettre en évidence le rôle éventuel de cette voie dans la phosphorylation du co-activateur. À plus long terme, les conditions d'immunoprécipitation seront utilisées dans des expériences de co-immunoprécipitation qui viseront à rechercher des partenaires protéiques susceptibles d'interagir de manière différentielle avec ce co-activateur dans les cellules incubées en présence de FCCP ou de TNFα. Nous rechercherons donc une interaction potentielle avec des facteurs connus comme la désacétylase SIRT1, la kinase p38MAPK et les facteurs de transcription NRF-1 et PPARγ (Western blotting). Dans une deuxième étape, nous tenterons surtout d'identifier d'éventuels nouveaux partenaires protéiques susceptibles d'interagir de manière différentielle avec PGC-1α dans nos différentes conditions expérimentales. Nous utiliserons pour cela l'approche de co-immunoprécipitation dans des cellules qui surexpriment le co-activateur PGC-1α. Les candidats co-immunoprécipités avec le co-facteur dans les différentes conditions expérimentales seront ensuite résolus sur gels 1D et identifiés en spectrométrie de masse (nano-LC MS/MS).

La deuxième partie de ce mémoire a été consacrée à la caractérisation de la population mitochondriale dans des adipocytes soumis à un découplage mitochondrial ou incubés en présence de TNFα. Par un marquage à l'aide de la sonde fluorescente Mitotracker Green et des analyses en cytométrie de flux, nous n'avons pas pu mettre en évidence de changements dans l'abondance de la population mitochondriale dans les adipocytes répondant au FCCP ou stimulés par le TNFα. Mentionnons encore que cette approche est basée principalement sur des modifications de l'abondance de la composante lipidique de l'organite. Nous n'observons pas non plus de changements dans l'abondance du génome mitochondrial dans les cellules adipocytaires présentant un découplage mitochondrial. Nous avons donc émis l'hypothèse que si des changements dans la biogenèse mitochondriale étaient provoqués par le découplage mitochondrial, des changements qualitatifs (plutôt que quantitatifs) dans la composition protéique des mitochondries pourraient être mis en évidence. Cette hypothèse est soutenue par

le fait que le découplage mitochondrial induit de nombreux changements dans l'activité et/ou l'abondance de plusieurs facteurs de transcription connus pour contrôler le niveau d'expression de nombreux gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales. Nous avons donc recherché l'abondance de certaines protéines mitochondriales par Western Blotting. Cette approche nous a permis de montrer que si le TNFα induit une diminution systématique de l'abondance de toutes les protéines observées, un découplage mitochondrial induit une augmentation de l'abondance des protéines TOM20 et TOM40. Ces résultats sont intéressants car il mettent en évidence, que si à priori le FCCP n'induit pas la biogenèse mitochondriale, le découplage mitochondrial pourrait conduire à des changements qualitatifs de la composition protéique mitochondriale. Ce phénoméne est déjà décrit dans la littérature pour la différenciation adipocytaire caractérisée par des modifications de l'abondance de plusieurs protéines mitochondriales comme la citrate synthase (Wilson-Fritch, Burkart et al. 2003). Ces changements qualitatifs de la composition de mitochondries d'adipocytes soumis à un découplage mitochondrial seront recherchés, par une approche sans « a priori » utilisant la protéomique subcellulaire (gels 2D-DIGE) réalisée sur des fractions mitochondriales enrichies et hautement purifiées obtenues par centrifugation isopycnique (Aurélia de Pauw, thèse en cours). L'identification des candidats dont l'abondance change dans les mitochondries d'adipocytes incubés en présence de FCCP ou stimulés par le TNFα sera alors réalisée en spectrométrie de masse.

Un dernière perspective intéressante dans ce travail serait de compléter l'approche protéomique subcellulaire réalise sur des extraits de protéines nucléaires visant à enrichir les échantillons en régulateurs transcriptionnels (facteurs de transcription, co-régulateurs). La première approche relativement peu concluante réalisée dans le cadre de ce travail peut s'expliquer par le fait que la faible quantité de matériel disponible à partir de gels analytiques n'a pas permis d'identifier tous les spots présentant un intérêt potentiel. Pour compléter cette recherche visant à identifier de nouveaux facteurs de transcription potentiellement activés dans les adipocytes en réponse à un dysfonctionnement mitochondrial induit par un découplage, nous utiliserons également un damier de type « Panomics », qui permet de faire un « screen » de l'état d'activation (caractérisé par une activité de liasion à l'ADN) de 400 facteurs de transcription.

En conclusion, les résultats de cette étude contribuent à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la biogenèse mitochondriale en réponse à un dysfonctionnement mitochondrial dans les adipocytes différenciés et permettent de mettre en évidence des liens moléculaires entre les acteurs de la dédifférenciation des adipocytes et la biogenèse mitochondriale, deux réponses biologiques importantes de la cellule adipocytaire à un dysfonctionnement mitochondrial.

Bibliographie

Bibliographie

Arany, Z., H. He, et al. (2005). "Transcriptional coactivator PGC-1 alpha controls the energy state and contractile function of cardiac muscle." Cell Metab **1**(4): 259-71.

Arnould, T., S. Vankoningsloo, et al. (2002). "CREB activation induced by mitochondrial dysfunction is a new signaling pathway that impairs cell proliferation." Embo J **21**(1-2): 53-63.

Ashrafi, K., F. Y. Chang, et al. (2003). "Genome-wide RNAi analysis of Caenorhabditis elegans fat regulatory genes." Nature **421**(6920): 268-72.

Asin-Cayuela, J. and C. M. Gustafsson (2007). "Mitochondrial transcription and its regulation in mammalian cells." Trends Biochem Sci **32**(3): 111-7.

Atherton, P. J., J. Babraj, et al. (2005). "Selective activation of AMPK-PGC-1alpha or PKB-TSC2-mTOR signaling can explain specific adaptive responses to endurance or resistance training-like electrical muscle stimulation." Faseb J **19**(7): 786-8.

Bai, J. and A. I. Cederbaum (2001). "Mitochondrial catalase and oxidative injury." Biol Signals Recept **10**(3-4): 189-99.

Barsh, G. S., I. S. Farooqi, et al. (2000). "Genetics of body-weight regulation." Nature **404**(6778): 644-51.

Basu, A., N. Lenka, et al. (1997). "Regulation of murine cytochrome oxidase Vb gene expression in different tissues and during myogenesis. Role of a YY-1 factor-binding negative enhancer." J Biol Chem **272**(9): 5899-908.

Berdanier, C. D. (2001). "Diabetes and nutrition: the mitochondrial part." J Nutr **131**(2): 344S-53S.

Biswas, G., M. Guha, et al. (2005). "Mitochondria-to-nucleus stress signaling in mammalian cells: nature of nuclear gene targets, transcription regulation, and induced resistance to apoptosis." Gene **354**: 132-9.

Blesa, J. R., J. M. Hernandez, et al. (2004). "NRF-2 transcription factor is essential in promoting human Tomm70 gene expression." Mitochondrion **3**(5): 251-9.

Blesa, J. R. and J. Hernandez-Yago (2006). "Distinct functional contributions of 2 GABP-NRF-2 recognition sites within the context of the human TOMM70 promoter." Biochem Cell Biol **84**(5): 813-22.

Blesa, J. R., J. A. Prieto-Ruiz, et al. (2007). "NRF-2 transcription factor is required for human TOMM20 gene expression." Gene **391**(1-2): 198-208.

Bogacka, I., B. Ukropcova, et al. (2005). "Structural and functional consequences of mitochondrial biogenesis in human adipocytes in vitro." J Clin Endocrinol Metab **90**(12): 6650-6.

Bogacka, I., H. Xie, et al. (2005). "Pioglitazone induces mitochondrial biogenesis in human subcutaneous adipose tissue in vivo." Diabetes **54**(5): 1392-9.

Bohnert, M., N. Pfanner, et al. (2007). "A dynamic machinery for import of mitochondrial precursor proteins." FEBS Lett.

Borniquel, S., I. Valle, et al. (2006). "Nitric oxide regulates mitochondrial oxidative stress protection via the transcriptional coactivator PGC-1alpha." Faseb J **20**(11): 1889-91.

Breen, G. A. and E. M. Jordan (1997). "Regulation of the nuclear gene that encodes the alpha-subunit of the mitochondrial F0F1-ATP synthase complex. Activation by upstream stimulatory factor 2." J Biol Chem **272**(16): 10538-42.

Breen, G. A., C. A. Vander Zee, et al. (1996). "Nuclear factor YY1 activates the mammalian F0F1 ATP synthase alpha-subunit gene." Gene Expr **5**(3): 181-91.

Bulteau, A. L., L. I. Szweda, et al. (2006). "Mitochondrial protein oxidation and degradation in response to oxidative stress and aging." Exp Gerontol **41**(7): 653-7.

Bush, T. S., M. St Coeur, et al. (2003). "GA-binding protein (GABP) and Sp1 are required, along with retinoid receptors, to mediate retinoic acid responsiveness of CD18 (beta 2 leukocyte integrin): a novel mechanism of transcriptional regulation in myeloid cells." Blood **101**(1): 311-7.

Cao, W., A. V. Medvedev, et al. (2001). "beta-Adrenergic activation of p38 MAP kinase in adipocytes: cAMP induction of the uncoupling protein 1 (UCP1) gene requires p38 MAP kinase." J Biol Chem **276**(29): 27077-82.

Carmen, G. Y. and S. M. Victor (2006). "Signalling mechanisms regulating lipolysis." Cell Signal **18**(4): 401-8.

Cartoni, R., B. Leger, et al. (2005). "Mitofusins 1/2 and ERRalpha expression are increased in human skeletal muscle after physical exercise." J Physiol **567**(Pt 1): 349-58.

Chae, G. N. and S. J. Kwak (2003). "NF-kappaB is involved in the TNF-alpha induced inhibition of the differentiation of 3T3-L1 cells by reducing PPARgamma expression." Exp Mol Med **35**(5): 431-7.

Chan, D. C. (2006). "Mitochondrial fusion and fission in mammals." Annu Rev Cell Dev Biol **22**: 79-99.

Chiu, C. H., W. D. Lin, et al. (2004). "Effect of a C/EBP gene replacement on mitochondrial biogenesis in fat cells." Genes Dev **18**(16): 1970-5.

Christian, M., E. Kiskinis, et al. (2005). "RIP140-targeted repression of gene expression in adipocytes." Mol Cell Biol **25**(21): 9383-91.

Christian, M., R. White, et al. (2006). "Metabolic regulation by the nuclear receptor corepressor RIP140." Trends Endocrinol Metab **17**(6): 243-50.

Civitarese, A. E., S. Carling, et al. (2007). "Calorie Restriction Increases Muscle Mitochondrial Biogenesis in Healthy Humans." PLoS Med **4**(3): e76.

Clapham, J. C., J. R. Arch, et al. (2000). "Mice overexpressing human uncoupling protein-3 in skeletal muscle are hyperphagic and lean." Nature **406**(6794): 415-8.

Clementi, E. and E. Nisoli (2005). "Nitric oxide and mitochondrial biogenesis: a key to long-term regulation of cellular metabolism." Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol **142**(2): 102-10.

Coppack, S. W. (2001). "Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue." Proc Nutr Soc **60**(3): 349-56.

Criscuolo, F., J. Mozo, et al. (2006). "UCP2, UCP3, avUCP, what do they do when proton transport is not stimulated? Possible relevance to pyruvate and glutamine metabolism." Biochim Biophys Acta **1757**(9-10): 1284-91.

Crunkhorn, S., F. Dearie, et al. (2007). "Peroxisome Proliferator Activator Receptor {gamma} Coactivator-1 Expression Is Reduced in Obesity: POTENTIAL PATHOGENIC ROLE OF SATURATED FATTY ACIDS AND p38 MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE ACTIVATION." J Biol Chem **282**(21): 15439-15450.

Dagon, Y., Y. Avraham, et al. (2006). "AMPK activation regulates apoptosis, adipogenesis, and lipolysis by eIF2alpha in adipocytes." Biochem Biophys Res Commun **340**(1): 43-7.

Daval, M., F. Foufelle, et al. (2006). "Functions of AMP-activated protein kinase in adipose tissue." J Physiol **574**(Pt 1): 55-62.

De Vos, K. J., V. J. Allan, et al. (2005). "Mitochondrial function and actin regulate dynamin-related protein 1-dependent mitochondrial fission." Curr Biol **15**(7): 678-83.

DeSimone, S. M. and K. White (1993). "The Drosophila erect wing gene, which is important for both neuronal and muscle development, encodes a protein which is similar to the sea urchin P3A2 DNA binding protein." Mol Cell Biol **13**(6): 3641-9.

Despres, J. P. and I. Lemieux (2006). "Abdominal obesity and metabolic syndrome." Nature **444**(7121): 881-7.

Desquiret, V., D. Loiseau, et al. (2006). "Dinitrophenol-induced mitochondrial uncoupling in vivo triggers respiratory adaptation in HepG2 cells." Biochim Biophys Acta **1757**(1): 21-30.

Dinardo, M. M., C. Musicco, et al. (2003). "Acetylation and level of mitochondrial transcription factor A in several organs of young and old rats." Biochem Biophys Res Commun **301**(1): 187-91.

Dlaskova, A., T. Spacek, et al. (2006). "Certain aspects of uncoupling due to mitochondrial uncoupling proteins in vitro and in vivo." Biochim Biophys Acta **1757**(5-6): 467-73.

Dolmetsch, R. E., R. S. Lewis, et al. (1997). "Differential activation of transcription factors induced by Ca2+ response amplitude and duration." Nature **386**(6627): 855-8.

Douette, P. and F. E. Sluse (2006). "Mitochondrial uncoupling proteins: new insights from functional and proteomic studies." Free Radic Biol Med **40**(7): 1097-107.

Duchen, M. R. (2004). "Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology." Mol Aspects Med **25**(4): 365-451.

Duchen, M. R. (2004). "Roles of mitochondria in health and disease." Diabetes **53 Suppl 1**: S96-102.

Duval, C., Y. Camara, et al. (2007). "Overexpression of mitochondrial uncoupling protein-3 does not decrease production of the reactive oxygen species, elevated by palmitate in skeletal muscle cells." FEBS Lett **581**(5): 955-61.

Ekstrand, M. and N. G. Larsson (2002). "Breeding and genotyping of Tfam conditional knockout mice." Methods Mol Biol **197**: 391-400.

Ekstrand, M. I., M. Falkenberg, et al. (2004). "Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals." Hum Mol Genet **13**(9): 935-44.

Falkenberg, M., N. G. Larsson, et al. (2007). "DNA Replication and Transcription in Mammalian Mitochondria." Annu Rev Biochem.

Fan, M., J. Rhee, et al. (2004). "Suppression of mitochondrial respiration through recruitment of p160 myb binding protein to PGC-1alpha: modulation by p38 MAPK." Genes Dev **18**(3): 278-89.

Feige, J. N. and J. Auwerx (2007). "Transcriptional coregulators in the control of energy homeostasis." Trends Cell Biol.

Fernandez-Silva, P., J. A. Enriquez, et al. (2003). "Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA." Exp Physiol **88**(1): 41-56.

Fox, K. E., D. M. Fankell, et al. (2006). "Depletion of cAMP-response element-binding protein/ATF1 inhibits adipogenic conversion of 3T3-L1 cells ectopically expressing CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) alpha, C/EBP beta, or PPAR gamma 2." J Biol Chem **281**(52): 40341-53.

Garesse, R. and C. G. Vallejo (2001). "Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes." Gene **263**(1-2): 1-16.

Gerhart-Hines, Z., J. T. Rodgers, et al. (2007). "Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1alpha." Embo J **26**(7): 1913-23.

Gerhold, D. L., F. Liu, et al. (2002). "Gene expression profile of adipocyte differentiation and its regulation by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists." Endocrinology **143**(6): 2106-18.

Goffart, S. and R. J. Wiesner (2003). "Regulation and co-ordination of nuclear gene expression during mitochondrial biogenesis." Exp Physiol **88**(1): 33-40.

Gordon, S., G. Akopyan, et al. (2006). "Transcription factor YY1: structure, function, and therapeutic implications in cancer biology." Oncogene **25**(8): 1125-42.

Granneman, J. G., H. P. Moore, et al. (2007). "Analysis of lipolytic protein trafficking and interactions in adipocytes." J Biol Chem **282**(8): 5726-35.

Gregoire, F. M., C. M. Smas, et al. (1998). "Understanding adipocyte differentiation." Physiol Rev **78**(3): 783-809.

Gugneja, S. and R. C. Scarpulla (1997). "Serine phosphorylation within a concise amino-terminal domain in nuclear respiratory factor 1 enhances DNA binding." J Biol Chem **272**(30): 18732-9.

Gugneja, S., C. M. Virbasius, et al. (1996). "Nuclear respiratory factors 1 and 2 utilize similar glutamine-containing clusters of hydrophobic residues to activate transcription." Mol Cell Biol **16**(10): 5708-16.

Hagen, G., S. Muller, et al. (1992). "Cloning by recognition site screening of two novel GT box binding proteins: a family of Sp1 related genes." Nucleic Acids Res **20**(21): 5519-25.

Hagen, G., S. Muller, et al. (1994). "Sp1-mediated transcriptional activation is repressed by Sp3." Embo J **13**(16): 3843-51.

Hamm, J. K., B. H. Park, et al. (2001). "A role for C/EBPbeta in regulating peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity during adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes." J Biol Chem **276**(21): 18464-71.

Hansen, J. B. and K. Kristiansen (2006). "Regulatory circuits controlling white versus brown adipocyte differentiation." Biochem J **398**(2): 153-68.

Hauser, S., G. Adelmant, et al. (2000). "Degradation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma is linked to ligand-dependent activation." J Biol Chem **275**(24): 18527-33.

Higuchi, M. (2007). "Regulation of mitochondrial DNA content and cancer." Mitochondrion **7**(1-2): 53-7.

Hoffmeyer, A., A. Avots, et al. (1998). "The GABP-responsive element of the interleukin-2 enhancer is regulated by JNK/SAPK-activating pathways in T lymphocytes." J Biol Chem **273**(17): 10112-9.

Hood, D. A., I. Irrcher, et al. (2006). "Coordination of metabolic plasticity in skeletal muscle." J Exp Biol **209**(Pt 12): 2265-75.

Hoogenraad, N. J., L. A. Ward, et al. (2002). "Import and assembly of proteins into mitochondria of mammalian cells." Biochim Biophys Acta **1592**(1): 97-105.

Houseknecht, K. L., C. A. Baile, et al. (1998). "The biology of leptin: a review." J Anim Sci **76**(5): 1405-20.

Houstis, N., E. D. Rosen, et al. (2006). "Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance." Nature **440**(7086): 944-8.

Huerta-Yepez, S., M. Vega, et al. (2006). "Involvement of the TNF-alpha autocrine-paracrine loop, via NF-kappaB and YY1, in the regulation of tumor cell resistance to Fas-induced apoptosis." Clin Immunol **120**(3): 297-309.

Huss, J. M., I. P. Torra, et al. (2004). "Estrogen-related receptor alpha directs peroxisome proliferator-activated receptor alpha signaling in the transcriptional control of energy metabolism in cardiac and skeletal muscle." Mol Cell Biol **24**(20): 9079-91.

Ijichi, N., K. Ikeda, et al. (2007). "Estrogen-related receptor alpha modulates the expression of adipogenesis-related genes during adipocyte differentiation." Biochem Biophys Res Commun.

Ikeuchi, M., H. Matsusaka, et al. (2005). "Overexpression of mitochondrial transcription factor a ameliorates mitochondrial deficiencies and cardiac failure after myocardial infarction." Circulation **112**(5): 683-90.

Kajita, K., T. Mune, et al. (2004). "TNFalpha reduces the expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) via the production of ceramide and activation of atypical PKC." Diabetes Res Clin Pract **66 Suppl 1**: S79-83.

Kang, D. and N. Hamasaki (2005). "Mitochondrial transcription factor A in the maintenance of mitochondrial DNA: overview of its multiple roles." Ann N Y Acad Sci **1042**: 101-8.

Kelly, J. L. and I. R. Lehman (1986). "Yeast mitochondrial RNA polymerase. Purification and properties of the catalytic subunit." J Biol Chem **261**(22): 10340-7.

Kim, H. J., K. G. Park, et al. (2007). "Effects of PGC-1alpha on TNF-alpha-Induced MCP-1 and VCAM-1 Expression and NF-kappaB Activation in Human Aortic Smooth Muscle and Endothelial Cells." Antioxid Redox Signal.

Kim, J. Y., K. Tillison, et al. (2006). "The adipose tissue triglyceride lipase ATGL/PNPLA2 is downregulated by insulin and TNF-alpha in 3T3-L1 adipocytes and is a target for transactivation by PPARgamma." Am J Physiol Endocrinol Metab **291**(1): E115-27.

Komiya, T., M. Sakaguchi, et al. (1996). "Cytoplasmic chaperones determine the targeting pathway of precursor proteins to mitochondria." Embo J **15**(2): 399-407.

Kosti, R. I. and D. B. Panagiotakos (2006). "The epidemic of obesity in children and adolescents in the world." Cent Eur J Public Health **14**(4): 151-9.

Kralisch, S., J. Klein, et al. (2005). "Isoproterenol, TNFalpha, and insulin downregulate adipose triglyceride lipase in 3T3-L1 adipocytes." Mol Cell Endocrinol **240**(1-2): 43-9.

Krauss, S., C. Y. Zhang, et al. (2005). "The mitochondrial uncoupling-protein homologues." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(3): 248-61.

Kuruvilla, S., C. W. Qualls, Jr., et al. (2003). "Effects of minimally toxic levels of carbonyl cyanide P-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP), elucidated through differential gene expression with biochemical and morphological correlations." Toxicol Sci **73**(2): 348-61.

Lee, S., S. Kim, et al. (2007). "Cell cycle-dependent mitochondrial biogenesis and dynamics in mammalian cells." Biochem Biophys Res Commun **357**(1): 111-7.

Lerin, C., J. T. Rodgers, et al. (2006). "GCN5 acetyltransferase complex controls glucose metabolism through transcriptional repression of PGC-1alpha." Cell Metab **3**(6): 429-38.

Lescuyer, P., P. Martinez, et al. (2002). "YY1 and Sp1 activate transcription of the human NDUFS8 gene encoding the mitochondrial complex I TYKY subunit." Biochim Biophys Acta **1574**(2): 164-74.

Li, B., J. O. Holloszy, et al. (1999). "Respiratory uncoupling induces delta-aminolevulinate synthase expression through a nuclear respiratory factor-1-dependent mechanism in HeLa cells." J Biol Chem **274**(25): 17534-40.

Li, R., Z. Hodny, et al. (1996). "Sp1 activates and inhibits transcription from separate elements in the proximal promoter of the human adenine nucleotide translocase 2 (ANT2) gene." J Biol Chem **271**(31): 18925-30.

Liang, H. and W. F. Ward (2006). "PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism." Adv Physiol Educ **30**(4): 145-51.

Lin, J., C. Handschin, et al. (2005). "Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators." Cell Metab **1**(6): 361-70.

Lopez-Armada, M. J., B. Carames, et al. (2006). "Mitochondrial activity is modulated by TNFalpha and IL-1beta in normal human chondrocyte cells." Osteoarthritis Cartilage **14**(10): 1011-22.

Lopez-Lluch, G., N. Hunt, et al. (2006). "Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(6): 1768-73.

Lyamzaev, K. G., D. S. Izyumov, et al. (2004). "Inhibition of mitochondrial bioenergetics: the effects on structure of mitochondria in the cell and on apoptosis." Acta Biochim Pol **51**(2): 553-62.

McBride, H. M., M. Neuspiel, et al. (2006). "Mitochondria: more than just a powerhouse." Curr Biol **16**(14): R551-60.

Medina, E. A., R. R. Afsari, et al. (2005). "Tumor necrosis factor-{alpha} decreases Akt protein levels in 3T3-L1 adipocytes via the caspase-dependent ubiquitination of Akt." Endocrinology **146**(6): 2726-35.

Meng, L., J. Zhou, et al. (2001). "Tumor necrosis factor alpha and interleukin 11 secreted by malignant breast epithelial cells inhibit adipocyte differentiation by selectively down-regulating CCAAT/enhancer binding protein alpha and peroxisome proliferator-activated receptor gamma: mechanism of desmoplastic reaction." Cancer Res **61**(5): 2250-5.

Mercy, L., A. Pauw, et al. (2005). "Mitochondrial biogenesis in mtDNA-depleted cells involves a Ca2+-dependent pathway and a reduced mitochondrial protein import." Febs J **272**(19): 5031-55.

Monsalve, M., Z. Wu, et al. (2000). "Direct coupling of transcription and mRNA processing through the thermogenic coactivator PGC-1." Mol Cell **6**(2): 307-16.

Mootha, V. K., C. Handschin, et al. (2004). "Erralpha and Gabpa/b specify PGC-1alpha-dependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(17): 6570-5.

Mori, T., H. Sakaue, et al. (2005). "Role of Kruppel-like factor 15 (KLF15) in transcriptional regulation of adipogenesis." J Biol Chem **280**(13): 12867-75.

Morton, G. J., D. E. Cummings, et al. (2006). "Central nervous system control of food intake and body weight." Nature **443**(7109): 289-95.

Muoio, D. M. and C. B. Newgard (2006). "Obesity-related derangements in metabolic regulation." Annu Rev Biochem **75**: 367-401.

Muoio, D. M. and C. B. Newgard (2006). "Obesity-Related Derangements in Metabolic Regulation." Annu Rev Biochem.

Neupert, W. and J. M. Herrmann (2007). "Translocation of Proteins into Mitochondria." Annu Rev Biochem.

Nisoli, E., E. Clementi, et al. (2004). "Mitochondrial biogenesis as a cellular signaling framework." Biochem Pharmacol **67**(1): 1-15.

Nisoli, E., C. Tonello, et al. (2005). "Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS." Science **310**(5746): 314-7.

Noack, H., T. Bednarek, et al. (2006). "TFAM-dependent and independent dynamics of mtDNA levels in C2C12 myoblasts caused by redox stress." Biochim Biophys Acta **1760**(2): 141-50.

Oishi, Y., I. Manabe, et al. (2005). "Kruppel-like transcription factor KLF5 is a key regulator of adipocyte differentiation." Cell Metab **1**(1): 27-39.

Ongwijitwat, S., H. L. Liang, et al. (2006). "Nuclear respiratory factor 2 senses changing cellular energy demands and its silencing down-regulates cytochrome oxidase and other target gene mRNAs." Gene **374**: 39-49.

Patel, Y. M. and M. D. Lane (2000). "Mitotic clonal expansion during preadipocyte differentiation: calpain-mediated turnover of p27." J Biol Chem **275**(23): 17653-60.

Patton, J., S. Block, et al. (2006). "Identification of functional elements in the murine Gabp alpha/ATP synthase coupling factor 6 bi-directional promoter." Gene **369**: 35-44.

Pendergrass, W., N. Wolf, et al. (2004). "Efficacy of MitoTracker Green and CMXrosamine to measure changes in mitochondrial membrane potentials in living cells and tissues." Cytometry A **61**(2): 162-9.

Petruschke, T. and H. Hauner (1993). "Tumor necrosis factor-alpha prevents the differentiation of human adipocyte precursor cells and causes delipidation of newly developed fat cells." J Clin Endocrinol Metab **76**(3): 742-7.

Piantadosi, C. A. and H. B. Suliman (2006). "Mitochondrial transcription factor A induction by redox activation of nuclear respiratory factor 1." J Biol Chem **281**(1): 324-33.

Porter, R. K. (2006). "A new look at UCP 1." Biochim Biophys Acta **1757**(5-6): 446-8.

Prins, J. B., C. U. Niesler, et al. (1997). "Tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis of human adipose cells." Diabetes **46**(12): 1939-44.

Psarra, A. M., S. Solakidi, et al. (2006). "The mitochondrion as a primary site of action of steroid and thyroid hormones: presence and action of steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria of animal cells." Mol Cell Endocrinol **246**(1-2): 21-33.

Puigserver, P., G. Adelmant, et al. (1999). "Activation of PPARgamma coactivator-1 through transcription factor docking." Science **286**(5443): 1368-71.

Puigserver, P., J. Rhee, et al. (2003). "Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction." Nature **423**(6939): 550-5.

Puigserver, P., J. Rhee, et al. (2001). "Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1." Mol Cell **8**(5): 971-82.

Puigserver, P. and B. M. Spiegelman (2003). "Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator." Endocr Rev **24**(1): 78-90.

Puigserver, P., Z. Wu, et al. (1998). "A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis." Cell **92**(6): 829-39.

Rangwala, S. M., X. Li, et al. (2007). "Estrogen-related receptor alpha is essential for the expression of antioxidant protection genes and mitochondrial function." Biochem Biophys Res Commun **357**(1): 231-6.

Rodgers, J. T., C. Lerin, et al. (2005). "Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1." Nature **434**(7029): 113-8.

Rodriguez-Pena, A., H. Escriva, et al. (2002). "Thyroid hormone increases transcription of GA-binding protein/nuclear respiratory factor-2 alpha-subunit in rat liver." FEBS Lett **514**(2-3): 309-14.

Roepstorff, C., B. Vistisen, et al. (2004). "Regulation of hormone-sensitive lipase activity and Ser563 and Ser565 phosphorylation in human skeletal muscle during exercise." J Physiol **560**(Pt 2): 551-62.

Rohas, L. M., J. St-Pierre, et al. (2007). "A fundamental system of cellular energy homeostasis regulated by PGC-1alpha." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(19): 7933-8.

Rosen, E. D. and O. A. MacDougald (2006). "Adipocyte differentiation from the inside out." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(12): 885-96.

Rosen, E. D. and B. M. Spiegelman (2000). "Molecular regulation of adipogenesis." Annu Rev Cell Dev Biol **16**: 145-71.

Rosen, E. D. and B. M. Spiegelman (2006). "Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis." Nature **444**(7121): 847-53.

Rosen, E. D., C. J. Walkey, et al. (2000). "Transcriptional regulation of adipogenesis." Genes Dev **14**(11): 1293-307.

Rossmeisl, M., G. Barbatelli, et al. (2002). "Expression of the uncoupling protein 1 from the aP2 gene promoter stimulates mitochondrial biogenesis in unilocular adipocytes in vivo." Eur J Biochem **269**(1): 19-28.

Rousset, S., J. Mozo, et al. (2007). "UCP2 is a mitochondrial transporter with an unusual very short half-life." FEBS Lett **581**(3): 479-82.

Ruan, H., N. Hacohen, et al. (2002). "Tumor necrosis factor-alpha suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes:

nuclear factor-kappaB activation by TNF-alpha is obligatory." Diabetes **51**(5): 1319-36.
Rui, L., V. Aguirre, et al. (2001). "Insulin/IGF-1 and TNF-alpha stimulate phosphorylation of IRS-1 at inhibitory Ser307 via distinct pathways." J Clin Invest **107**(2): 181-9.
Ryan, M. T. and N. J. Hoogenraad (2007). "Mitochondrial-Nuclear Communications." Annu Rev Biochem.
Ryden, M., E. Arvidsson, et al. (2004). "Targets for TNF-alpha-induced lipolysis in human adipocytes." Biochem Biophys Res Commun **318**(1): 168-75.
Ryu, H., J. Lee, et al. (2005). "Antioxidants modulate mitochondrial PKA and increase CREB binding to D-loop DNA of the mitochondrial genome in neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(39): 13915-20.
Scarpulla, R. C. (2002). "Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells." Gene **286**(1): 81-9.
Scarpulla, R. C. (2006). "Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells." J Cell Biochem **97**(4): 673-83.
Sherman, E. L., R. D. Taylor, et al. (2006). "Effect of mutations in Tom40 on stability of the translocase of the outer mitochondrial membrane (TOM) complex, assembly of Tom40, and import of mitochondrial preproteins." J Biol Chem **281**(32): 22554-65.
Si, Y., S. Palani, et al. (2007). "Effects of forced uncoupling protein 1 expression in 3T3-L1 cells on mitochondrial function and lipid metabolism." J Lipid Res **48**(4): 826-36.
Silvestri, E., P. de Lange, et al. (2006). "Fenofibrate activates the biochemical pathways and the de novo expression of genes related to lipid handling and uncoupling protein-3 functions in liver of normal rats." Biochim Biophys Acta **1757**(5-6): 486-95.
Sluse, F. E., W. Jarmuszkiewicz, et al. (2006). "Mitochondrial UCPs: new insights into regulation and impact." Biochim Biophys Acta **1757**(5-6): 480-5.
Song, H. Y., M. R. Kim, et al. (2007). "Oncostatin M decreases adiponectin expression and induces dedifferentiation of adipocytes by JAK3- and MEK-dependent pathways." Int J Biochem Cell Biol **39**(2): 439-49.
Spiegel, A. M. and B. M. Alving (2005). "Executive summary of the Strategic Plan for National Institutes of Health Obesity Research." Am J Clin Nutr **82**(1 Suppl): 211S-214S.
Spiegelman, B. M. and R. Heinrich (2004). "Biological control through regulated transcriptional coactivators." Cell **119**(2): 157-67.
Stephens, J. M., J. Lee, et al. (1997). "Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction." J Biol Chem **272**(2): 971-6.
Stoetzer, O. J., A. Pogrebniak, et al. (2002). "Modulation of apoptosis by mitochondrial uncouplers: apoptosis-delaying features despite intrinsic cytotoxicity." Biochem Pharmacol **63**(3): 471-83.
Strack, A., C. F. Duffy, et al. (2001). "Individual mitochondrion characterization: a comparison of classical assays to capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection." Anal Biochem **294**(2): 141-7.
Student, A. K., R. Y. Hsu, et al. (1980). "Induction of fatty acid synthetase synthesis in differentiating 3T3-L1 preadipocytes." J Biol Chem **255**(10): 4745-50.
Su, C. L., C. Sztalryd, et al. (2003). "Mutational analysis of the hormone-sensitive lipase translocation reaction in adipocytes." J Biol Chem **278**(44): 43615-9.
Tang, X., A. Guilherme, et al. (2006). "An RNA interference-based screen identifies MAP4K4/NIK as a negative regulator of PPARgamma, adipogenesis, and insulin-responsive hexose transport." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(7): 2087-92.

Terada, H. (1990). "Uncouplers of oxidative phosphorylation." Environ Health Perspect **87**: 213-8.

Terada, K., M. Kanazawa, et al. (1997). "Participation of the import receptor Tom20 in protein import into mammalian mitochondria: analyses in vitro and in cultured cells." FEBS Lett **403**(3): 309-12.

Tesz, G. J., A. Guilherme, et al. (2007). "TNFalpha stimulates Map4k4 expression through TNFalpha receptor 1 signaling to cJUN and ATF2." J Biol Chem.

Teyssier, C., H. Ma, et al. (2005). "Activation of nuclear receptor coactivator PGC-1alpha by arginine methylation." Genes Dev **19**(12): 1466-73.

Timchenko, N. A., M. Wilde, et al. (1996). "CCAAT/enhancer-binding protein alpha (C/EBP alpha) inhibits cell proliferation through the p21 (WAF-1/CIP-1/SDI-1) protein." Genes Dev **10**(7): 804-15.

Valerio, A., A. Cardile, et al. (2006). "TNF-alpha downregulates eNOS expression and mitochondrial biogenesis in fat and muscle of obese rodents." J Clin Invest **116**(10): 2791-8.

Van Gaal, L. F., I. L. Mertens, et al. (2006). "Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease." Nature **444**(7121): 875-80.

Villena, J. A., O. Vinas, et al. (1998). "Regulation of mitochondrial biogenesis in brown adipose tissue: nuclear respiratory factor-2/GA-binding protein is responsible for the transcriptional regulation of the gene for the mitochondrial ATP synthase beta subunit." Biochem J **331 (Pt 1)**: 121-7.

Virbasius, J. V. and R. C. Scarpulla (1994). "Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(4): 1309-13.

Wallace, D. C. (1999). "Mitochondrial diseases in man and mouse." Science **283**(5407): 1482-8.

Wallberg, A. E., S. Yamamura, et al. (2003). "Coordination of p300-mediated chromatin remodeling and TRAP/mediator function through coactivator PGC-1alpha." Mol Cell **12**(5): 1137-49.

Walowitz, J. L., M. E. Bradley, et al. (1998). "Proteolytic regulation of the zinc finger transcription factor YY1, a repressor of muscle-restricted gene expression." J Biol Chem **273**(12): 6656-61.

Wang, C., Z. Li, et al. (2006). "Cyclin D1 repression of nuclear respiratory factor 1 integrates nuclear DNA synthesis and mitochondrial function." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(31): 11567-72.

Wang, H., E. Hertlein, et al. (2007). "NF-{kappa}B Regulation of YY1 Inhibits Skeletal Myogenesis through Transcriptional Silencing of Myofibrillar Genes." Mol Cell Biol **27**(12): 4374-87.

Wang, Y. and D. F. Bogenhagen (2006). "Human mitochondrial DNA nucleoids are linked to protein folding machinery and metabolic enzymes at the mitochondrial inner membrane." J Biol Chem **281**(35): 25791-802.

Weindruch, R., P. H. Naylor, et al. (1988). "Influences of aging and dietary restriction on serum thymosin alpha 1 levels in mice." J Gerontol **43**(2): B40-2.

Wilson-Fritch, L., A. Burkart, et al. (2003). "Mitochondrial biogenesis and remodeling during adipogenesis and in response to the insulin sensitizer rosiglitazone." Mol Cell Biol **23**(3): 1085-94.

Wright, D. C., D. H. Han, et al. (2007). "Exercise-induced mitochondrial biogenesis begins before the increase in muscle PGC-1alpha expression." J Biol Chem **282**(1): 194-9.

Wu, Z., P. Puigserver, et al. (1999). "Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1." Cell **98**(1): 115-24.

Xu, H., G. T. Barnes, et al. (2003). "Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance." J Clin Invest **112**(12): 1821-30.

Yach, D., D. Stuckler, et al. (2006). "Epidemiologic and economic consequences of the global epidemics of obesity and diabetes." Nat Med **12**(1): 62-6.

Yajima, Y., M. Sato, et al. (2006). "Calpain system regulates the differentiation of adult primitive mesenchymal ST-13 adipocytes." Endocrinology **147**(10): 4811-9.

Yang, J. Y., M. A. Della-Fera, et al. (2007). "Enhancement of ajoene-induced apoptosis by conjugated linoleic acid in 3T3-L1 adipocytes." Apoptosis.

Zaid, A., R. Li, et al. (1999). "On the role of the general transcription factor Sp1 in the activation and repression of diverse mammalian oxidative phosphorylation genes." J Bioenerg Biomembr **31**(2): 129-35.

Zhang, B., J. Berger, et al. (1996). "Insulin- and mitogen-activated protein kinase-mediated phosphorylation and activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma." J Biol Chem **271**(50): 31771-4.

Zhang, F., B. E. Lavan, et al. (2007). "Selective Modulators of PPAR-gamma Activity: Molecular Aspects Related to Obesity and Side-Effects." PPAR Res **2007**: 32696.

Zong, H., J. M. Ren, et al. (2002). "AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(25): 15983-7.