

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Caractérisation du rôle de la Sirtuine 3 dans l'adipogenèse des préadipocytes 3T3-L1 et étude des effets de la surexpression sur l'obésité induite chez la souris

STORDER, Julie

Award date:
2016

Awarding institution:
Universite de Namur

[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.



UNIVERSITE DE NAMUR

Faculté des Sciences

**CARACTERISATION DU ROLE DE LA SIRTUINE 3 DANS L'ADIPOGENESE DES
PREADIPOCYTES 3T3-L1 ET ETUDE DES EFFETS DE SA SUREXPRESSION
SUR L'OBESITE INDUITE CHEZ LA SOURIS**

Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Julie STORDER

Janvier 2016

CARACTERISATION DU ROLE DE LA SIRTUINE 3 DANS L'ADIPOGENESE DES PREADIPOCYTES 3T3-L1 ET ETUDE DES EFFETS DE SA SUREXPRESSION SUR L'OBESITE INDUITE CHEZ LA SOURIS

STORDER Julie

Résumé

Les problèmes de santé publique engendrés par le surpoids, l'obésité, et leurs désordres associés, comme le diabète de type 2 et les défaillances cardiaques, regroupés sous le terme de « syndrome métabolique », nécessitent le développement de nombreux efforts de recherches visant à comprendre et à combattre ces pathologies. Parmi les différents paradigmes d'investigation de ce désordre multifactoriel, notre laboratoire s'est positionné par rapport à l'étude des dérégulations métaboliques liées à la biologie de la mitochondrie dans l'adipocyte et les tissus adipeux blancs. Depuis un peu plus d'une décennie, une enzyme essentielle au contrôle du métabolisme oxydatif et à la protection contre les stress oxydants a été identifiée : la Sirtuine 3 (Sirt3). Si la diminution de l'activité de cette désacétylase mitochondriale dépendante du NAD⁺ au cours du développement de l'obésité est bien décrite, son rôle dans l'adipogenèse et les effets de sa surexpression dans les tissus adipeux sur l'obésité sont peu ou pas étudiés.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés au niveau d'expression et au rôle éventuel de la Sirt3 au cours de l'adipogenèse des 3T3-L1 *in vitro*. Nous avons observé une augmentation de l'expression endogène de *Sirt3* au cours de la différenciation des 3T3-L1 et montrons que l'abondance de l'enzyme est encore plus élevée dans les adipocytes exposés à un stress mitochondrial induit par le découplage des phosphorylations oxydatives ou par une stimulation par le TNF α . Si la surexpression ectopique de l'enzyme dans les 3T3-L1 n'affecte pas l'efficacité de la différenciation, une réduction de son expression, même très partielle, semble en faveur de l'accumulation des triglycérides dans les cellules. Enfin, *in vivo*, le rôle éventuel de l'enzyme dans l'obésité a été étudié dans des souris transgéniques qui surexpriment une copie du gène spécifiquement dans les tissus adipeux de souris C57BL/6J (système CRE-lox). Si aucune modification de l'évolution de la masse corporelle et de la glycémie des animaux transgéniques n'a pu être montrée, par rapport aux souris contrôles, en réponse à une obésité induite par un régime riche en graisses de 16 semaines, la surexpression de l'enzyme semble diminuer l'abondance des tissus adipeux blancs et préserver leur morphologie. Cependant, les mécanismes moléculaires sont encore à rechercher, pour comprendre les effets phénotypiques liés à la surexpression de la Sirt3 dans les tissus adipeux de souris obèses.

Mémoire de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2016

Promoteur: T. Arnould

REMERCIEMENTS

Les progrès réalisés autour du projet « Sirt3 », décrits dans ce travail, sont le résultat d'une interaction et d'une aide précieuse apportée par des personnes diverses au sein de l'UNamur.

Les premières personnes que je voudrais remercier sont les membres de mon équipe d'encadrement : Thierry Arnould (promoteur), Stéphane Demine (encadrant), Nagabushana Reddy (encadrant), ainsi que les membres de l'équipe « DYSO » (Dysfonctionnement des Organites), URBC (Unité de Recherche en Biologie Cellulaire) : Patsy Renard, Elodie Lobet, Morgane Canonne, Anaïs Wanet, Mélanie Planque et Silvia Tejerina pour leurs conseils apportés au fil des réunions. D'autres membres du laboratoire ont également participé à la réalisation du projet, à travers le partage de leur expérience, de leur aide et leurs conseils (Antoine Fattaccioli, Maude Fransolet, Guy Van Steenbrugge et Anaïs Wanet). Je voudrais également remercier l'ensemble des membres de l'URBC, techniciens, doctorants, assistants, professeurs, gens de passage, ... pour leur aide quotidienne, les pauses improvisées, les sorties de labo, ... qui ont nous fait découvrir la vie et l'animation en labo. C'est un plaisir et une chance d'avoir fait partie de l'équipe durant ces 10 mois !

Quelques personnes extérieures au laboratoire ont également beaucoup aidé à la réalisation du projet : les membres du laboratoire de génétique (URPHYM, UNamur) (Coraline Leirens et Dominique Desnoeck) et du laboratoire cellules et tissus (LabCeTi, UNamur) (Benoit Balau et Daniel Van Vlaender).

Enfin, je voudrais faire un clin d'œil à mes « coéquipières » de mémoires, Lysianne Ernst, Estelle Descamps et Lisa Frau avec qui j'ai vécu cette aventure, et les remercier pour leur soutien !

Un tout grand MERCI à vous !

TABLE DES MATIERES

Résumé	1
Remerciements	3
Table des Matières	5
I. INTRODUCTION	11
I.I AVANT PROPOS	13
I.II OBESITE ET SYNDROME METABOLIQUE	15
1.2.1 Epidémiologie de l'obésité	15
1.2.2 Etiologie de l'obésité	15
I.III LES TISSUS ADIPEUX	17
1.3.1 Généralités	17
1.3.1.1 Types de tissus adipeux blancs	17
1.3.1.2 Répartition des tissus adipeux blancs	19
1.3.1.3 Phénomènes d'adaptation des tissus adipeux	19
1.3.2 Histologie des tissus adipeux	21
1.3.3 Origine embryonnaire et différenciation des adipocytes	21
1.3.3.1 Développement des tissus adipeux	21
1.3.3.2 Différenciation des tissus adipeux	23
1.3.4 Tissus adipeux et métabolisme lipidique	27
1.3.5 Les tissus adipeux et leur(s) sécrétome(s)	27
1.3.5.1 L'adiponectine	29
1.3.5.2 La leptine	29
1.3.6 Physiopathologie des tissus adipeux dans le développement de l'obésité	29
1.3.6.1 Adaptation et conséquences de l'obésité sur les tissus adipeux blancs	29
1.3.6.2 Adaptation et conséquences de l'obésité sur les tissus non adipeux	31
I.IV LE RESEAU MITOCHONDRIAL OU « MITOCHONDRION »	33
I.V SIRTUINE 3	33
1.5.1 Généralités	35
1.5.2 Structure de la Sirt3	35
1.5.3 Génétique	37
1.5.4 Localisations cellulaires de la Sirt3	37
1.5.5 Réaction catalysée et fonctions de la Sirt3	39
1.5.5.1 Réaction de désacétylation catalysée par la Sir3	39
1.5.5.2 Régulations de l'expression et de l'activité de la Sirt3	41
1.5.5.3 La Sirt3 : une enzyme active sur de nombreux substrats et contrôlant de nombreux processus biologiques	41
1.5.6 Effets de la Sirt3 sur le métabolisme	41

1.5.7 La Sirt3 : une cible thérapeutique pour contrer l'obésité et le SM ?	43
I.VI OBJECTIFS DU MEMOIRE	49
II. MATERIEL & METHODES	51
2.1 Culture et différenciation cellulaires	55
2.2 Modulations de l'expression de la Sirtuine 3 par transduction lentivirale	55
2.2.1 Production des plasmides d'intérêt	55
2.2.2 Préparation des particules virales	57
2.2.3 Transduction des adipocytes	57
2.3 Observation des cellules au microscope à contraste de phase	57
2.4 Analyse d'expression de gènes par PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR)	59
2.4.1 Extraction de l'ARN Total	59
2.4.2 Reverse Transcription	59
2.4.3 PCR quantitative en temps réel	59
2.5 Analyse d'abondances protéiques par Western blotting	61
2.5.1 Préparation de lysats cellulaires totaux	61
2.5.2 Dosage protéique	61
2.5.3 Western blotting	63
2.6 Estimation du contenu en triglycérides (TG)	63
2.6.1 Coloration des lipides neutres à l'Oil Red O (ORO)	63
2.6.2 Marquage de l'ADN à l'iodure de propidium (IP)	63
2.7 Modèle murin transgénique pour la Sirtuine 3, spécifiquement surexprimée dans les tissus adipeux blancs	67
2.7.1 Elevage des souris et protocole expérimental visant à induire l'obésité des souris	67
2.7.2 Génotypes	67
2.7.2.1 Extractions d'ADN	69
2.7.2.2 PCR	69
2.8 Sacrifice des animaux et prélèvements tissulaires	69
2.9 Histologie : coloration des tissus à l'Hémalun-Erythrosine-Safran (HES)	69
2.9.1 Fixation, enrobage, dégrossissement et montage des coupes	69
2.9.2 Coloration HES	71
2.10 Analyse d'expression de gènes dans les tissus adipeux blancs	71
2.11 Analyses statistiques	71
III.RESULTATS	73
III.I Etude du Rôle de la Sirtuine 3 dans l'Adipogenèse (<i>In Vitro</i>)	77
3.1.1 Caractérisation du rôle éventuel de la Sirt3 dans l'adipogenèse des cellules 3T3-L1.....	77
3.1.2 Recherche de l'abondance et d'un marqueur d'activité de la Sirt3 au cours de l'adipogenèse des cellules 3T3-L1	77
3.1.2.1 Abondance des transcrits de Sirt3 au cours de l'adipogenèse	77

3.1.2.2 Mise en évidence de l'activité de la Sirt3 à travers la désacétylation de la SOD2	77
3.1.3 Recherche du rôle de la Sirt3 dans l'adipogenèse	81
3.1.3.1 Etude de l'effet de la surexpression de la Sirt3 sur l'adipogenèse	81
3.1.3.2 Effet de la répression par silençage de l'expression de la Sirt3 sur l'adipogenèse	87
III.II Caractérisation de l'abondance de la Sirtuine 3 dans les adipocytes 3T3-L1 soumis au découplage mitochondrial ou stimulés par le TNF α	89
3.2.1 Analyse de l'abondance de Sirt3 en réponse à un découplage induit par le FCCP ou une stimulation par le TNFα	89
3.2.1.1 Abondance des transcrits de Sirt3 au cours des traitements FCCP/TNF α	91
3.2.1.2 Abondance protéique de la Sirt3 au cours des traitements FCCP/TNF α	91
III.III Etude de l'effet d'une surexpression conditionnelle de la Sirtuine 3 dans les tissus adipeux de la souris sur le développement de l'obésité induite par un régime riche en graisses	93
3.3.1 Présentation et caractérisation du modèle murin	93
3.3.2 Evolution des masses corporelles et adipeuses des souris transgéniques pour <i>Sirt3</i> en réponse à un traitement riche en graisses pendant 4 mois	95
3.3.3 Mesure de la glycémie des souris mises à jeun au terme du traitement riche en graisse	
3.3.4 Mesure de la masse des tissus adipeux sous-cutanés et viscéraux des souris exposées au traitement riche en graisses	97
3.3.5 Histologie des tissus adipeux blancs des souris soumises à un traitement riche en graisses pendant 16 semaines	99
3.3.6 Pool d'expression adipocytaire au terme du traitement de 16 semaines	99
IV. DISCUSSION, CONCLUSIONS & PERSPECTIVES	103
IV.I Discussion et perspectives	105
4.1.1 Discussion des données obtenues <i>In Vitro</i>	105
4.1.2 Discussion des données obtenues <i>In Vivo</i>	113
IV.2 Conclusions	119
BIBLIOGRAPHIE	121
Annexe	133
Abréviations	139

I. INTRODUCTION

I.I AVANT-PROPOS

Dans nos pays industrialisés, les maladies liées au vieillissement de la population (phénomènes cancéreux et désordres neurodégénératifs) et les désordres métaboliques découlant de l'augmentation du nombre d'individus en surpoids ou présentant un phénotype « obèse », représentent les principales pathologies qui affectent nos populations. L'obésité est un état caractérisé par un BMI/IMC (Body Mass Index/Indice de Masse Corporelle : indice donné par le rapport entre la masse (kg) et la taille au carré (m²)) supérieur ou égal à 30 (Basdevant et al., 2006). L'obésité est initialement et essentiellement une réponse physiologique d'un organisme à un déséquilibre entre les apports et dépenses d'énergie (Ailhaud et al., 2000). Le constat actuel est extrêmement inquiétant. En effet, les données épidémiologiques disponibles depuis près d'un demi-siècle (Basdevant et al., 2006) décrivent l'aspect exponentiel de l'évolution des courbes de BMI de la population (y compris chez les enfants et les adolescents) et ce, également dans les régions moins favorisées du monde (Basdevant et al., 2006). Le développement de l'obésité conduit à des désordres complexes et variés qui font intervenir des dérégulations métaboliques systémiques responsables de la morbidité et de la mortalité associée à l'obésité. La recherche des mécanismes moléculaires perturbés au sein des tissus et la compréhension des interactions entre les différents organes représentent un challenge important dans les recherches sur les désordres métaboliques. Pour espérer pouvoir un jour s'attaquer de façon multidisciplinaire à ces maladies, il est nécessaire, dans un premier temps, d'en étudier individuellement les composantes. Il existe divers paradigmes d'investigation de l'obésité, depuis l'étude des facteurs psychologiques jusqu'à celle de l'influence du microbiome intestinal en passant par la relation avec le cycle circadien, les régulations épigénétiques et prédispositions génétiques des perturbations métaboliques conduisant à l'obésité (McAllister et al., 2009). C'est dans ce contexte de perturbation métabolique que l'équipe « Dyso » (Dysfonctionnement des Organites) de l'Unité de Recherche en Biologie Cellulaire (URBC)-NARILIS (Namur Research Institute for Life Sciences), s'intéresse, entre autres, à la biologie de l'adipocyte et aux changements observés en réponse à un dysfonctionnement mitochondrial (Vankoningsloo et al., 200 ; 2006 ; Tejerina et al., 2009 ; Michel et al., 2012). Dans le cadre de notre travail, nous allons étendre cette recherche en : (1) caractérisant l'expression et le rôle de la sirtuine 3, une désacétylase mitochondriale dépendante du NAD⁺, au cours de l'adipogenèse des cellules 3T3-L1 (murines) et (2) en étudiant le rôle éventuel de la surexpression du gène dans le cadre de l'obésité induite par un régime alimentaire riche en graisses chez des souris transgéniques surexprimant le gène codant pour l'enzyme, spécifiquement dans les tissus adipeux (TA). L'intérêt de l'étude du rôle de la mitochondrie dans les adipocytes est justifié par le fait que les tissus adipeux sont les premiers tissus impactés, par une forte augmentation de leur abondance et l'installation d'une réaction inflammatoire, lors de la prise de poids. De plus, ces tissus ont longtemps été considérés comme de simples lieux de stockage et de réserve d'énergie. Il apparaît pourtant clairement aujourd'hui que les TA présentent une organisation complexe, de nombreuses répartitions anatomiques et assurent de multiples fonctions dans l'organisme. En effet, les tissus adipeux blancs sont maintenant considérés comme un organe doté d'une fonction endocrine large, puisque plus de 600 molécules, désignées sous le terme d'adipokines, ont maintenant été identifiées comme sécrétées spécifiquement par ces tissus (par les adipocytes et autres cellules du tissu). Il est maintenant admis que les adipokines assurent de nombreuses régulations systémiques dont les altérations accélèrent de l'obésité et les maladies métaboliques qui y sont associées, aboutissant finalement à l'apparition du syndrome métabolique.

I.II OBESITE ET SYNDROME METABOLIQUE

1.2.1 Epidémiologie de l'obésité

L'obésité est une accumulation lipidique excessive au sein des tissus adipeux d'un organisme. Elle est établie par le Body Mass Index (**BMI**), indice de mesure corrélant la taille et le poids d'un individu¹. Les BMI supérieurs à 25 kg/m² ou 30kg/m², définissent respectivement le surpoids et l'obésité (Tchernof and Després, 2013). En seulement quelques décennies, l'obésité, à travers des pathologies associées, est devenue la 5^{ème} cause de décès annuels. Les prédictions épidémiologiques de 2015 révèlent que près d'un tiers de la population mondiale (31.5 %) est en surpoids, dont 9,6 % présentent une obésité, marquant une nette augmentation de leur prévalence depuis 2005 (18,5 % d'individus en surpoids et 6.1 % d'individus obèses). Ces données ont été calculées sur base des chiffres présentés par l'OMS - pour le surpoids et l'obésité, et d'un rapport daté de 2012, du département des affaires économiques et sociales du gouvernement américain - pour les populations mondiale totale et adulte - pour l'année 2005 et des prédictions correspondantes pour 2015) et ne tiennent compte que de l'obésité adulte et omettent donc les obésités infantile et des adolescents, qui suivent la même augmentation alarmante (Pulgaron and Delamater, 2014).

1.2.2 Etiologie de l'obésité

L'étiologie de l'obésité est multifactorielle car l'augmentation de la masse d'un organisme implique des prédispositions génétiques et des facteurs environnementaux (précoces – in utéro, épigénétiques, alimentaires, microbiotiques/microbiologiques, socio-économiques, psychologiques, pharmacologiques, climatiques...) (McAllister et al., 2009). En général, une combinaison de ces facteurs induit un déséquilibre entre le stockage et l'utilisation de l'énergie, conduisant à son accumulation sous forme de graisses et, à plus long terme, à des dysfonctionnements métaboliques systémiques regroupés sous le vocable de syndrome métabolique (**MS**) (Kaur, 2014). Les caractéristiques du syndrome métabolique sont, entre autres, une dyslipidémie et une hyperglycémie, conduisant au développement progressif d'une Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (**NAFLD**) (stéatose hépatique), d'une insulino-résistance, d'une inflammation « de bas grade » généralisée, ... et conduisent en un panel d'associations au pronostic négatif tel qu'un diabète de type 2 et des maladies cardiovasculaires (Kaur, 2014). Etant donné l'aspect systémique du syndrome métabolique, une prédisposition génétique, s'exerce probablement à de nombreux niveaux. Elle a notamment déjà été décrite dans le cadre d'une modulation de la sécrétion des adipokines, pour la leptine, une hormone centrale dans la régulation de la satiété (Klok et al., 2007). Dix formes monogéniques ont déjà été découvertes chez des patients au phénotype sévère (Pérusse and Bouchard, 2003) ainsi qu'une soixantaine de gènes susceptibles d'influencer le développement de l'obésité (Choquet and Meyre, 2011). Cependant, ces gènes n'expliqueraient qu'une petite partie (environ 4 %) du phénotype obèse chez l'homme. Récemment, une variation du nombre de copies du gène *AMY1* (codant pour une amylase salivaire) au sein de la population (1-20), a également été corrélée à un facteur élevé de risque d'obésité (Falchi et al., 2014). L'importance du rôle et de la composition du microbiome intestinal dans le développement de l'obésité est également apparue suite à la découverte de la résistance de souris axéniques au développement des troubles métaboliques lorsqu'elles sont nourries avec des régimes hypercaloriques (Roy et al., 2012). Il avait déjà été remarqué qu'une forte abondance intestinale en *Staphylococcus aureus*

¹ Le BMI est un indicateur pondéral épidémiologique. En clinique, le ratio tours de taille - hanches est préféré, car il présente une meilleure corrélation avec les risques de développer un diabète de type 2 et des complications cardio-vasculaires. (Ailhaud et al., 2000)

et une faible présence des bifidobactéries chez les enfants sont associées à un risque plus élevé de développer une obésité (Kalliomaki et al., 2008). A l'heure actuelle, cette problématique constitue un autre grand axe de recherche et d'espoir thérapeutique, car une partie des désordres développés au cours de l'obésité et prédisposant au MS ont pu être, en partie, imputée à la composition du microbiote. En effet, un impact négatif sur le développement de l'inflammation généralisée, et sur les dysfonctionnements de la barrière intestinale a pu être relié à la composition de la flore intestinale. Ces perturbations seraient générées, par exemple, à travers la communication endocrine du tractus digestif via une régulation des éléments du système endocannabinoïde (**eCB**), mais également à l'apparition d'une endotoxémie métabolique, caractérisée par la présence endocrine de composants microbiens tels que le LPS (Everard and Cani., 2013). Le régime alimentaire, particulièrement riche en graisses, influence également le développement de l'obésité, en augmentant la perméabilité intestinale (Lee., 2015).

Enfin, le niveau de contrôle épigénétique est évidemment maintenant bien reconnu comme un facteur déterminant du poids d'un individu. En effet, il a été montré que l'exposition *in utero* de l'enfant à naître à de fortes concentrations en acides gras circulant (Free Fatty Acids - **FFA**) accroît sa sensibilité métabolique aux lipides par un remodelage chromatinien, affectant l'expression de nombreux gènes (Smith et al., 2015) (Heerwagen et al., 2010). Ces modifications surviennent chez le fœtus au cours de la gestation en réponse aux régimes alimentaires inappropriés de femmes obèses (McAllister et al., 2009). L'expérience alimentaire précoce jouerait donc un rôle très important dans le devenir pondéral de l'enfant et l'apparition du MS à l'âge adulte (Ailhaud et al., 2000).

Il est cependant évident que quelque soit l'origine et la/les cause(s) de l'obésité, les premiers tissus à être les plus affectés sont les tissus adipeux blancs que nous allons décrire ci-dessous.

I.III LES TISSUS ADIPEUX

1.3.1 Généralités

Le terme « tissu adipeux » fait communément référence aux tissus capables d'accumuler la graisse emmagasinée par l'organisme comme réserve énergétique, essentiellement sous forme de triglycérides/triglycérides (**TG**). La composition et les différentes localisations anatomiques DES tissus adipeux blancs sont présentées à la **Figure 1.1**. La conception initiale d'un « vulgaire » site de stockage a fortement évolué ces dernières décennies, grâce à la découverte des nombreuses fonctions régulatrices de cet organe endocrine sur d'autres tissus comme le cerveau, le foie et les muscles. Les tissus adipeux communiquent avec ces organes et tissus de façon systémique à travers la sécrétion d'un large panel d'adipokines. On peut maintenant distinguer 3 types de tissus adipeux : les tissus adipeux blancs, bruns et beige (ou brite pour « brown in white ») que nous allons décrire rapidement ci-après.

1.3.1.1 Types de tissus adipeux

Les tissus adipeux blancs (White Adipose Tissue - **WAT/TABl**) assurent le stockage d'énergie tandis que les tissus adipeux bruns (Brown Adipose Tissue – **BAT/TABr**), en raison de la présence de nombreuses mitochondries et de l'expression de l'Uncoupling protein-1 (**UCP-1**) sont spécialisés dans la dissipation de l'énergie sous forme de chaleur, un phénomène impliqué dans la « thermogenèse adaptative » (Lo and Sun, 2013). Le TABr est abondamment retrouvé chez les mammifères hibernant, mais persiste également, en faible proportion, chez d'autres mammifères tels que chez l'homme (**Figure 1.1**) et les rongeurs

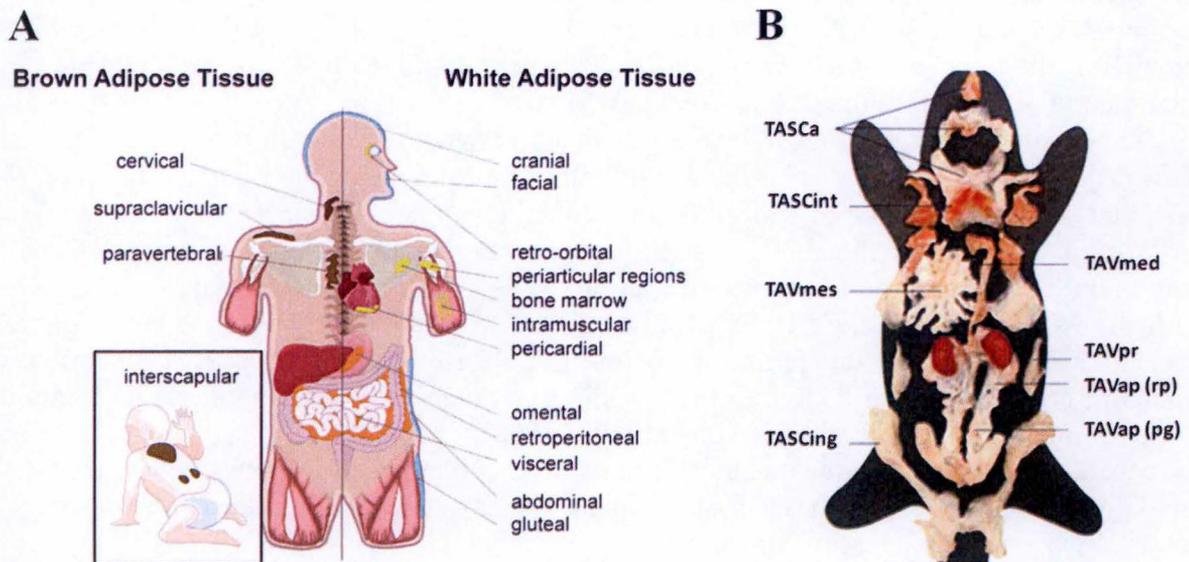


Figure 1.1 : Localisation anatomique des dépôts de tissus adipeux chez l'homme et la souris. (Adapté de Gesta et al., 2007 (A) et Tran and Khan, 2010 (B))

TASCa : tissus adipeux sous-cutanés antérieurs ; TASCint : tissus adipeux sous-cutanés interscapulaires ; TAVmes : tissus adipeux viscéraux mésentériques ; TASCing : tissus adipeux sous-cutanés inguinaux ; TAVmed ; tissus adipeux viscéraux médiastinaux ; TAVpr : tissus adipeux viscéraux périrénaux ; TAVap (rp) : tissus adipeux viscéraux abdominopelviens (zone rétropéritonéale) ; TAVap (pg) : tissus adipeux viscéraux abdominopelviens (zone périgonadiques).

(Bartelt et al., 2013). La barrière séparant les phénotypes « blanc » et « brun » est largement étudiée car elle représente une opportunité thérapeutique intéressante pour tenter de réduire l'obésité et ses conséquences métaboliques. En effet, la différenciation d'adipocytes blancs, stock d'acides gras sous forme de TG, en adipocytes bruns dissipateurs d'énergie sous forme de chaleur, permettrait de réduire la surcharge graisseuse et ainsi de prévenir l'apparition des désordres associés (Lo and Sun., 2013). A l'heure actuelle, les observations ou tentatives visant à favoriser la différenciation en adipocytes bruns et la « transdifférenciation » d'adipocytes blancs en adipocytes bruns, médiée par une exposition au froid, à l'exercice physique ou à des inducteurs, sont reprises sous l'appellation de « **browning** » (voir **Figure 1.6** et **Annexe**) et aboutissent à des phénotypes intermédiaires « beiges ».

1.3.1.2 Répartition des tissus adipeux

Chez la souris, le TABr est un élément anatomique qui décrit la forme d'un papillon brunâtre enchâssé entre les muscles dorsaux inter-scapulaires. C'est donc le TABl qui prédomine, et ses nombreuses localisations anatomiques ont donné lieu à une terminologie spécifique (**Figure 1.1**). On trouve ainsi les TA sous-cutanés (**TASC**) et viscéraux (**TAV**), selon qu'ils se trouvent sous la peau ou à l'intérieur de la cavité abdominale, délimitée par le péritoine. Les TABl qui entrent dans ces deux catégories présentent également de nombreuses disparités et, dans ce travail, on discriminerait au moins un second niveau de discrimination anatomique : au sein des TASC, nous distinguons les TASC inter-scapulaire (**TASCint**) recouvrant le TABr et les omoplates, et inguinal (**TASCing**), qui enveloppe bilatéralement la cavité abdominale et descend jusque dans la région pelvienne profonde. Au sein des TAV, on discriminerait la graisse abdomino-pelvienne (**TAVap**), qui évolue le long de la paroi interne du péritoine pour entretenir une connexion étroite avec les organes génitaux, et la graisse péri-rénale (**TAVpr**) qui, comme son nom l'indique, enveloppe les reins et les glandes surrénales. Les types et niveaux de classification des TABl sont conservés chez les mammifères bien que les différentes situations anatomiques soient assez variables d'un individu à l'autre et plus facilement appréciables chez les individus obèses. Chez ces individus, le TA s'accumule également de façon inappropriée tel que dans la région omentale (TASC, antérieur à l'estomac) et à l'intérieur de la cavité cardiaque (TAV) (Gesta et al., 2007).

1.3.1.3 Phénomènes d'adaptation des tissus adipeux

Il est nécessaire de réaliser qu'au-delà d'une fonction de stockage et d'isolation thermique, les TABl constituent un organe majeur d'adaptation à l'environnement. Les TASCing et TAVap sont les plus sujets à l'accumulation des TG, mais le dépôt de TASCing voit non seulement son abondance diminuée en réponse à une déprivation ou à une limitation de l'apport énergétique (restriction calorique), à l'exercice physique (Wallberg-Henriksson and Zierath., 2015), mais présente également un browning considérable (en regard des autres TABl) en réponse au froid, et diminueraient ainsi les phénomènes pathologiques liés à l'obésité (Wallberg-Henriksson and Zierath., 2015) (Reilly et al, 2015), tel que la tolérance au glucose (Tran et al, 2008). Au contraire, le TAVap présente une prolifération adipocytaire importante (Jeffery et al, 2015) et est associé à un pronostic négatif de la progression de l'obésité vers le MS car il est la source la plus importante de sécrétion d'adipokines pro-inflammatoires. En effet, un autre facteur assez variable d'un TABl à l'autre est la nature et l'abondance des adipokines synthétisées et sécrétées. Les tissus adipeux péricardiaque et péri-rénaux sont eux aussi associés à une évolution négative vers le MS, à travers leur rôle dans l'exacerbation de l'hypertension et du développement de plaques athéromateuses. Enfin, le développement d'un TABl dérivant des tissus musculaires squelettiques, auxquels il est soudé, est directement relié

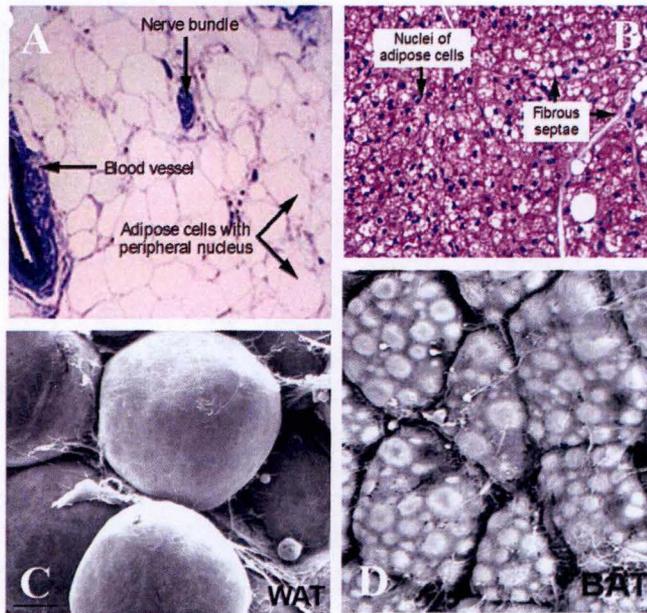


Figure 1.2 : Micrographies présentant l'aspect des adipocytes blancs (gauche) et bruns (droite) en microscopie optique (dessus) et électronique (dessous). (Adapté de Yacoub et al., et Cinti, 2009).

(A, C) L'adipocyte blanc est une cellule ronde ou polyédrique renfermant une gouttelette lipidique unique repoussant le noyau et le cytoplasme à la périphérie. Echelle : 40µm (C) (B, D) L'adipocyte brun est une petite cellule polygonale présentant de multiples gouttelettes lipidiques, un grand nombre de mitochondries et un noyau central. Echelle : 25µm (D).

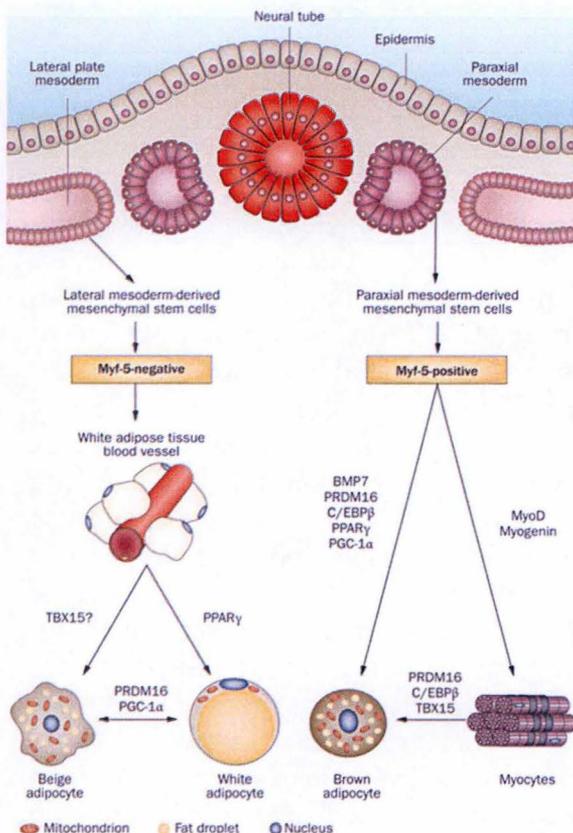


Figure 1.3 : Origine embryonnaire des adipocytes blanc, brun et des cellules musculaires (Hassan et al., 2012)

Les adipocytes blancs et bruns présentent des origines embryonnaires distinctes. Les adipocytes blancs sont formés à partir de précurseurs mésodermiques latéraux et sont, à un stade précoce, négatifs pour le marqueur Myf5. A l'état adulte, les précurseurs mésenchymateux se trouvent dans le stroma vasculaire. Les adipocytes bruns, ainsi que les myocytes, dérivent quant à eux du mésoderme paraxial, et sont positifs pour le marqueur précoce Myf5. La différenciation des adipocytes blancs et myocytes en adipocytes beiges, un type cellulaire intermédiaire à l'adipocyte brun, est un phénomène appelé « browning ».

BMP7 : bone morphogenetic protein 7 ; **C/EBPβ** : CCAAT/enhancer-binding protein β ; **MyoD** : myoblast determination protein 1 ; **Myf-5** : myogenic factor 5 ; **PGC-1α** : peroxisome proliferator-activated receptor γ co-activator 1α ; **PPARγ** : peroxisome proliferator-activated receptor γ ; **PRDM16** : PR domain zinc finger protein 16 ; **TBX15** : T-box transcription factor TBX15.

au développement de la résistance à l'insuline, à travers la sécrétion de cytokines proinflammatoires telles que le TNF α , le MCP-1 et l'IL6 (Daniele et al., 2014). Ces spécificités dans la composition, la localisation, la biochimie et les patterns d'expression génique des différents dépôts de TA illustrent la grande diversité des fonctions et régulations auxquelles ils prennent part.

1.3.2 Histologie des tissus adipeux

Les TA sont composés d'un parenchyme cellulaire composé principalement d'adipocytes mais également de cellules supportant la matrice extracellulaire (fibroblastes) et la structure vasculaire (cellules endothéliales), et de cellules de l'immunité innée ou acquise (macrophages, lymphocytes), constituant le stroma tissulaire. Le TABI représente environ 15 à 25 % de la masse corporelle d'un individu mais équivaut à plus de 35 % chez les individus obèses. Il est faiblement irrigué, en comparaison du TABr. L'adipocyte du TABr est une petite cellule (30 μ m de diamètre) polygonale à l'aspect brunâtre (en raison de sa teneur élevée en mitochondries riches en cytochrome C) alors que l'adipocyte du TABI sain adulte est une cellule polyédrique, dont la quasi-totalité du cytoplasme est occupée par une gouttelette lipidique unique (**Figure 1.2**). Le noyau, lorsqu'il est visible, est refoulé à la périphérie par cette énorme structure lipidique, dont la taille oscille entre 100 et 150 μ m de diamètre (**Figure 1.2**). Au cours de l'accumulation excessive de TG, l'expansion des TABI est le résultat d'une hypertrophie des adipocytes, à l'âge adulte (Guilherme et al., 2008), ou d'une hyperplasie, au cours de l'enfance, de cellules précurseurs vasculaires qui se différencient à leur tour pour permettre la continuité d'accumulation des graisses (Ailhaud et al., 2001). Une hyperplasie est cependant aussi observée chez les individus présentant une obésité sévère, et est donc le témoin d'un état avancé de perturbations. Ce second processus est irréversible et c'est donc le contenu lipidique (et non le nombre de cellules) qui doit être modulé pour favoriser une perte de poids. Il y a néanmoins un renouvellement physiologique (turnover) annuel d'environ 10 % des adipocytes dans les tissus (Spalding et al., 2008).

1.3.3 Origine embryonnaire et différenciation des adipocytes

1.3.3.1 Développement des tissus adipeux

Le développement des tissus adipeux est conduit en réponse à l'exposition et à la prise en charge autonome croissante des nutriments par le fœtus. Elle a donc lieu au cours des 3 derniers mois de la gestation chez l'homme (Cristancho et al., 2011), et se poursuit essentiellement au cours des premiers mois de la vie. Comme nous venons de le voir, le développement hyperplasique caractéristique est normalement restreint à l'enfance, car c'est un développement hypertrophique qui caractérise le développement du TABI adulte, permettant le stockage des graisses excédentaires (Ailhaud et al., 2000). Le développement de la graisse brune adopte un comportement distinct selon les espèces. Chez l'homme et les primates, le TABr est relativement bien développé (2-5% du poids corporel) à la naissance mais son abondance diminue par la suite, alors que chez les rongeurs, il se développe rapidement après la naissance (11-12% du poids corporel) pour régresser partiellement chez l'adulte (Casteilla et al., 2008). On a longtemps pensé qu'au cours du développement embryonnaire, les adipocytes blancs et bruns, ainsi que les myocytes, les ostéocytes, les chondrocytes et les cellules endothéliales, dérivent d'une cellule mésenchymateuse commune. Bien que l'on trouve, chez l'adulte, des marqueurs de différenciation communs entre ces différents types cellulaires, il semble que la déviation de ces différentes lignées se produise malgré tout à un stade très précoce (Hassan et al., 2012). En effet, la distinction entre la lignée

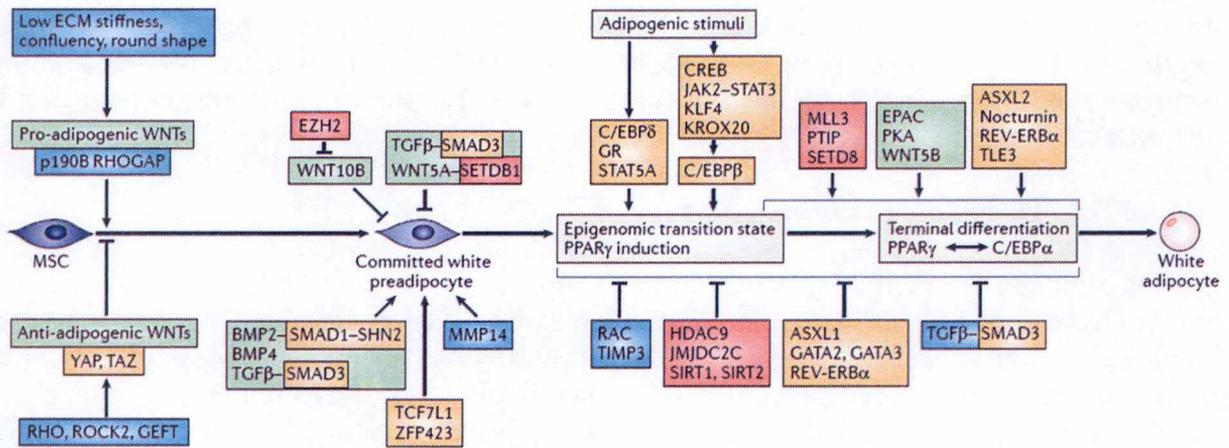


Figure 1.4 : Mécanismes sous-jacents au déclenchement et à la progression de la différenciation des adipocytes blancs (Cristancho and Lazar, 2011).

La différenciation adipocytaire implique la détermination d'une cellule souche mésenchymateuse (MSC) en un adipoblaste qui, suite à une modulation de son environnement immédiat, entre en différenciation. Il est d'abord « engagé » en pré-adipocyte et, en réponse à une combinaison de stimuli adipogéniques, entre dans une phase transitoire (épigénomique transition state) de la différenciation, qui s'achève (différenciation terminale), à travers l'expression et l'activité du facteur de transcription PPAR γ et aboutit un adipocyte blanc mature. Des cascades de signalisation, séquentiellement activées, sous-tendent la progression de la différenciation, à travers un switch des facteurs de transcription exprimés par la cellule et résultant en un remodelage épigénomique.

BMP : bone morphogenetic protein ; **C/EBP** : CCAAT/enhancer-binding protein ; **EPAC** : exchange proteins directly activated by cAMP ; **EZH2** : Enhancer of zeste homologue 2 ; **GATA** : GATA-binding ; **GEFT** : guanine nucleotide exchange factor T ; **GR** : glucocorticoid receptor ; **HDAC9** : histone deacetylase 9 ; **JMJD2C** : jumonji domain-containing 2C ; **KLF4** : Krüppel-like factor 4 ; **MLL3** : myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukaemia 3 ; **MMP14** : matrix metalloproteinase 14 ; **p190 RHO GTPase-activating protein** ; **PKA** : protein kinase A ; **PPAR γ** : peroxisome proliferator-activated receptor- γ ; **PTIP** : PAX transactivation domain-interacting protein ; **ROCK2** : RHO-associated kinase 2 ; **SETD8** : SET domain-containing 8 ; **SETDB1** : SET domain bifurcated 1 ; **SHN2** : Schnurri 2 ; **SIRT** : sirtuin ; **STAT5A** : signal transducer and activator of transcription 5A ; **TAZ** : transcriptional co-activator with PDZ-binding motif ; **TCF7L1** : T cell-specific transcription factor 7-like 1 ; **TGF β** : transforming growth factor- β ; **TIMP3** : tissue inhibitor of MMPs 3 ; **TLE3** : transducin-like enhancer 3 ; **YAP** : Yes-associated protein ; **ZFP423** : zinc-finger protein 423.

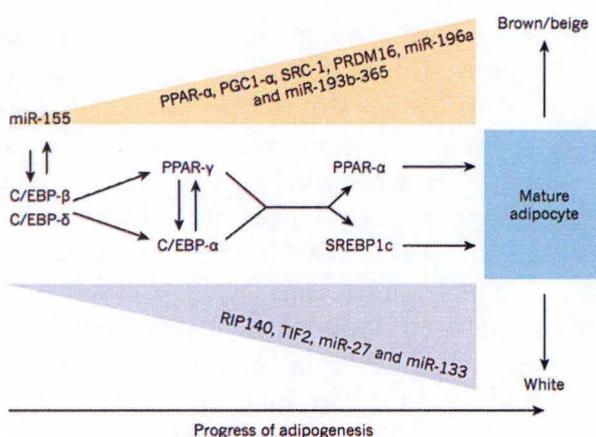


Figure 1.5 : Comparaison des séquences d'activation en cascade de facteurs de transcription, des co-régulateurs et des miARN contrôlant la différenciation des adipocytes blancs et des adipocytes bruns (Peirce et al., 2014).

Quatre facteurs de transcription sont essentiels dans la génération et au maintien d'un statut adipogénique (blanc ou brun) : C/EBP- δ , C/EBP- β , C/EBP- α , PPAR- γ . Ils sont exprimés dans les deux types cellulaires en différenciation. La détermination d'un type blanc ou brun provient d'une modulation de leur activité par d'autres facteurs de transcription, co-activateurs et microARN. Un type cellulaire intermédiaire, provenant de précurseurs spécifiques ou d'un browning d'adipocytes blancs, a également été récemment identifié.

adipocytaire blanche et les lignées adipocytaire brune et musculaire semble provenir d'une localisation mésodermique différentielle très tôt dans l'embryogenèse (**Figure 1.3**). En effet, on peut distinguer ces deux lignées très précocement sur base de la détection de l'expression du Myogenic Factor 5 (**Myf5**) trouvé exclusivement au sein du précurseur commun entre les adipocytes bruns et cellules musculaires. Ainsi, les deux types cellulaires seraient plus proches d'un point de vue embryonnaire que les adipocytes blancs et bruns entre eux. Les TAB1 prennent donc forme à partir de cellules souches mésenchymateuses multipotentes n'exprimant pas le facteur Myf5 (Myf5⁻) (**Figure 1.3**). Une fois différenciés, les adipocytes blancs et bruns sont distingués par l'expression de marqueurs tardifs et spécifiques tels que le gène *ob* codant pour la leptine et le gène *Ucp-1* codant pour la protéine de découplage UCP-1, respectivement.

1.3.3.2 Différenciation des adipocytes blancs

Sous l'action d'une modification de son environnement immédiat, une cellule souche mésenchymateuse (**MSC**) subit une **détermination** pour la lignée des adipocytes blancs et un **engagement** en **préadipocyte**. Si cette cellule reçoit ensuite d'autres stimuli adipogéniques, elle entre dans une phase de **différenciation transitoire**, caractérisée par un remodelage drastique de son paysage chromatinien et de l'expression de facteurs de transcription, puis mature au cours d'une phase de **différenciation terminale** pour devenir un adipocyte blanc (Cristancho et al., 2011). De nombreux facteurs et voies de signalisation, repris dans la **Figure 1.4**, ont pu être identifiés comme contrôlant le processus d'adipogenèse. Des éléments tels que la morphologie des cellules, la confluence et le remodelage de la matrice extracellulaire environnante, ont été associés au déclenchement de l'engagement de la MSC en préadipocyte. Celui-ci ne se différenciera en adipocyte mature qu'en réponse à un ensemble de stimuli, comme une exposition à des glucocorticoïdes, à de l'insuline et à d'importantes concentrations en AMPc, qui induisent premièrement une phase d'expansion mitotique clonale. Cette réponse s'organise comme une cascade d'événements se produisant simultanément ou séquentiellement, et aboutissant notamment à des modifications épigénomiques et des changements d'expression de gènes. En effet, au cours de la différenciation du préadipocyte en adipocyte, la phase transitoire consiste à déclencher l'expression du Peroxysome Proliferator-Activated Receptor γ (**PPAR γ**), LE facteur de transcription essentiel au type adipeux. Une fois exprimé, ce facteur exerce une régulation globale positive de l'expression des gènes adipeux, codant pour des régulateurs, des effecteurs ou des marqueurs de l'adipogenèse, du métabolisme lipidique et de l'homéostasie du glucose dans les adipocytes (Ahmadian., 2013). L'expression du PPAR γ est contrôlée en amont par l'activation d'un autre facteur de transcription, le CCAAT/Enhancer Binding Protein β (**C/EBP β**), avec lequel il interagit une fois traduit, pour activer une première vague d'expression de gènes adipeux, dont le **C/EBP α** , qui prendra la place de son homologue aux côtés du PPAR γ , pour lequel il présente une grande affinité. Cette interaction correspond au switch vers la différenciation terminale, car le PPAR γ est ainsi capable d'auto-entretenir son expression, et celle des gènes adipogéniques, au sein de l'adipocyte mature. Le PPAR γ est l'acteur global, nécessaire et suffisant dans le maintien le phénotype adipeux et est aussi largement exploité et exprimé dans le cadre de la différenciation et du métabolisme des adipocytes bruns (**Figure 1.5**). Sa surexpression, ou l'utilisation d'agonistes comme la Rosiglitazone, favorisent l'activation du facteur par son hétérodimérisation avec le facteur Retinoid X receptor (**RXR**) (Chandra et al., 2008) et permet une transdifférenciation des adipocytes blancs en adipocytes beiges (Lo and Sun., 2013) (**Figure 1.6**). Parmi les nombreux gènes différentiellement exprimés au cours de l'adipogenèse, quatre marqueurs sont généralement associés et souvent étudié pour caractériser la différenciation terminale

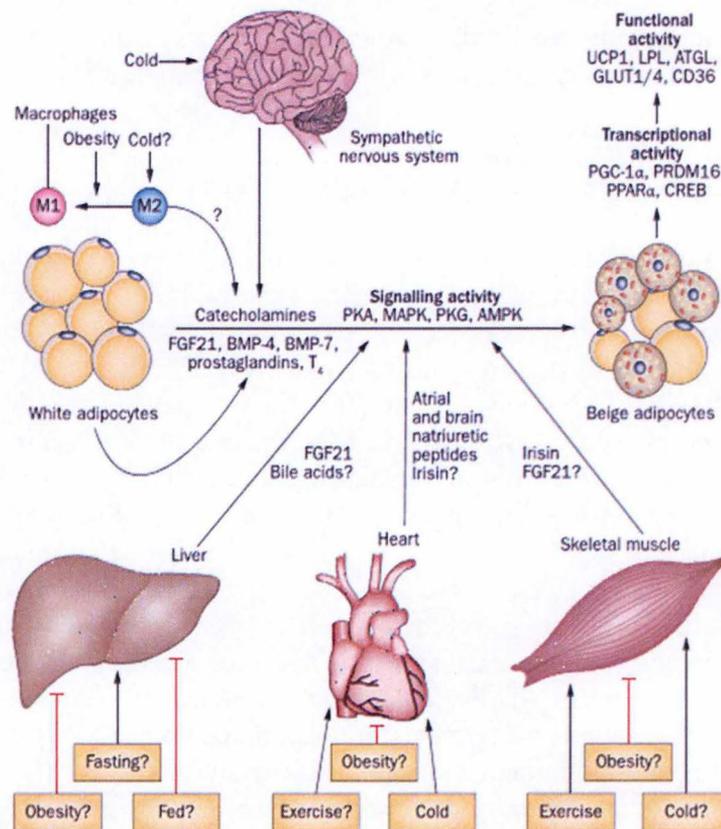


Figure 1.6 : Tenants et aboutissant du phénomène de browning (Bartelt et al., 2013).

Le browning est un phénomène naturel de transformation des adipocytes blancs en un type cellulaire intermédiaire à celui des adipocytes bruns. Ce phénomène est activé grâce à l'exercice physique, au froid, à une restriction calorique et à une stimulation adrénergique. Il est inhibé par une stimulation lipidique importante telle que développée au cours de l'obésité. Ces stimulations déclenchent des régulations hormonales qui favorisent l'expression d'acteurs métaboliques propres aux adipocytes bruns comme la protéine découplante mitochondriale UCP-1.

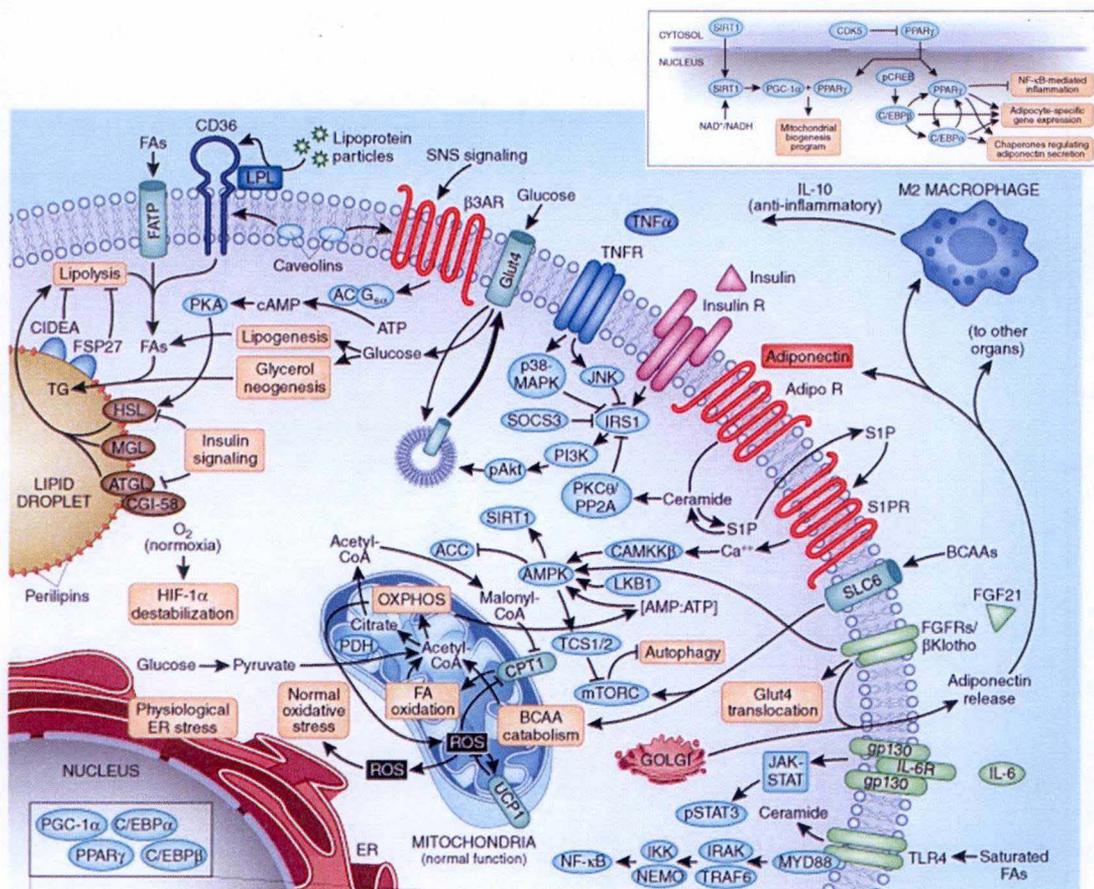


Figure 1.7 : Vue d'ensemble des mécanismes homéostatiques du métabolisme d'un adipocyte blanc (Scherer, Nature Website, consulté le 18 décembre 2015).

Intégration des acteurs métaboliques dans l'homéostasie d'un adipocyte. Cette figure regroupe bon nombre des acteurs qui seront discutés dans ce travail. Dans le noyau, le facteur de transcription PPAR γ , en synergie avec les facteurs C/EBP α/β et le co-activateur PGC-1 α , maintiennent le statut différencié et les fonctions propres de l'adipocyte. L'adipocyte blanc est une cellule spécialisée dans l'absorption et le stockage des lipides. Il dispose à sa surface de lipoprotéines lipases (LPL) qui permettent d'appréhender les acides gras (Fatty acids – FA) circulant dans le sang et de les convertir en triglycérides (TG) au sein d'une structure lipidique unique. Ceux-ci pourront être mobilisés en fonction des besoins de l'organisme. L'adipocyte blanc répond également à une stimulation par l'insuline, en faveur d'une accumulation des TG, grâce à l'inhibition des lipases Hormone Sensitive Lipase (HSL), Mono-Acyl-Glycerol Lipase (MGL) and Adipose Triglyceride Lipase (ATGL). Cette stimulation conduit également à l'augmentation de l'expression des transporteurs du glucose GLUT-4, permettant une prise en charge du nutriment et son stockage sous forme de TG. Tout comme dans de nombreux types cellulaires, nous retrouvons également, en conditions de normoxie, une déstabilisation du facteur HIF-1 α ainsi qu'un stress physiologique des compartiments cellulaires tels que les réticulum endoplasmique (RE) et mitochondries. Au sein du réseau mitochondrial, ce stress physiologique provient de la production d'espèces réactives de l'oxygènes (ROS), générées en parallèle des processus cataboliques qui s'y déroulent : l'oxydation des acides gras, le catabolisme des acides aminés ramifiés et la chaîne de phosphorylation oxydative. Des macrophages 2 sont également présents au sein des tissus adipeux, en conditions physiologiques, et exercent des propriétés anti-inflammatoires, notamment à travers la sécrétion de l'interleukine-10 (IL-10). Au contraire, l'interleukine-6, sécrétée par les macrophages 1 des individus obèses, présente des propriétés pro-inflammatoires. Le TNF α est également une cytokine d'une grande importance, particulièrement dans un contexte d'obésité, au cours duquel il est abondamment sécrété par les macrophages 1. Il exerce des effets paradoxaux qui en ont fait l'un de nos de nos sujets d'étude.

TNFR : tumor necrosis factor alpha receptor ; IL-10 : interleukin 10 ; IL-6R : interleukin 6 receptor ; STAT : signal transducers and activators of transcription ; JAK : janus kinase ; NF- κ B : nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells ; NEMO : NF- κ B essential modulator ; IKK : I κ B kinase ; TRAF6 : TNF receptor associated factor 6 ; IRAK : IL-1 receptor-associated kinase ; MYD88 : myeloid differentiation primary response gene (88) ; gp130 : glycoprotein 130 ; SLC6 : sodium- et chloride-dependent neurotransmitter transporter ; AdipoR : adiponectin receptor ; β 3AR : beta 3 adrenergic receptor ; CGI-58 : comparative gene identification-58 ; p38 MAPK : p38 mitogen activated protein kinase ; JNK : jun kinase ; SOCS3 : suppressor of cytokine signaling 3 ; PI3K : phosphoinositide 3-kinase ; pAkt : phosphorylated Akt ; PDH : pyruvate dehydrogenase ; Acetyl-CoA : acetyl-coenzyme A ; PKC θ : protein kinase C theta ; PP2A : protein phosphatase 2A ; TCS1/2 : tuberous sclerosis proteins 1/2 ; ROS : reactive oxygen species ; SIRT1 : sirtuin 1 ; OXPHOS : oxidative phosphorylation ; AMP : adenosine monophosphate ; ATP : adenosine-5'-triphosphate.

d'un adipocyte blanc : *FABP4* ou *aP2* (Fatty Acid Binding Protein 4), *GLUT4* (Glucose Transporter 4), *AdipoQ* (adiponectine), et *ob*, le gène codant pour la leptine (l'adiponectine et leptine seront décrites au point 1.3.5).

Si une prise de poids accrue est causée par la prolifération et la différenciation des précurseurs adipocytaires, d'autres types cellulaires comme les péricytes (des cellules localisées au niveau de la lame basale de l'endothélium des capillaires qu'elles entourent par de longs prolongements circonférentiels et cytoplasmiques, et qui assurent une fonction contractile et un rôle métabolique) sont aussi capables de se différencier en adipocytes (Crisan et al., 2008). C'est également le cas de précurseurs myocytaires et des adipocytes bruns, qui peuvent générer/augmenter leur capacité d'accumulation des lipides en cas d'obésité.

1.3.4 Tissus adipeux et métabolisme lipidique (Figure 1.7)

Chaque type cellulaire s'adonne à 2 types de fonctions : les premières sont les fonctions « basales », partagées par presque tous les types cellulaires, assurant la maintenance de la structure et du métabolisme de base de la cellule, nécessaires à la « vie ». Les autres fonctions sont spécifiques à un type cellulaire particulier et orientent la contribution de la cellule au sein d'un organisme en fonction de sa différenciation et spécialisation. La fonction première du TABI est la **gestion des réserves énergétiques et de leur disponibilité**, constituent une forme essentielle de réserve énergétique, les lipides constituent une forme essentielle de réserve énergétique de la cellule : le stockage d'énergie est réalisé en période « d'abondance » et sa mobilisation est effectuée lors des périodes moins favorables (Ghanta et al, 2013). Chez les mammifères, les acides gras libres sont entreposés sous forme de TG (**lipogenèse**) jusqu'à ce qu'un signal réclame leur utilisation (**lipolyse**). Ce processus est sous contrôle de différentes hormones telles que l'insuline, dont la concentration reflète la glycémie de l'individu, normalement comprise entre 5 et 10 mM de glucose. La lipolyse est un processus constitutivement actif, médié par 3 enzymes, les Hormone Sensitive Lipase (**HSL**) (Arner and Langin., 2015), Adipose Triglycerides Lipase (**ATGL**) (Zimmerman et al., 2004) et Monoglycerides Lipase (**MGL**), (Fredrikson et al., 1986) mais environ $\frac{3}{4}$ des acides gras sont ré-estérifiés par la cellule pour éviter que ceux-ci ne représentent un stress pour l'adipocyte (Edens et al., 1990). Ce principe permet à la cellule d'être prête en permanence pour assurer un approvisionnement énergétique périphérique, et peut être positivement régulé en cas de demande plus importante.

1.3.5 Les tissus adipeux et leur(s) sécrétome(s)

Les TA sont aujourd'hui clairement décrits comme des organes endocrines, régulateurs essentiels, à travers leur sécrétome extrêmement varié. Les adipokines synthétisées et sécrétées par les différents éléments cellulaires des TA (regroupant un ensemble de protéines, de peptides, de chémokines, de cytokines et d'hormones,...) génèrent une communication avec les différents tissus et organes comme le tissu endothélial, l'intestin, le foie, le pancréas, les muscles, et le cerveau et les reins (Maury and Brichard., 2010). Les TABI modulent donc les réponses périphériques et ces réponses seront impactées par une modification du sécrétome exprimé au sein des TA obèses. Les adipokines les plus importantes et mieux décrites, ainsi que leur champ d'action sont décrits dans la **Figure 1.8**. Deux adipokines d'intérêt, essentielles dans la physiologie et la pathologie de l'obésité des TA, et présentant un intérêt dans ce travail, sont décrites ci-après.

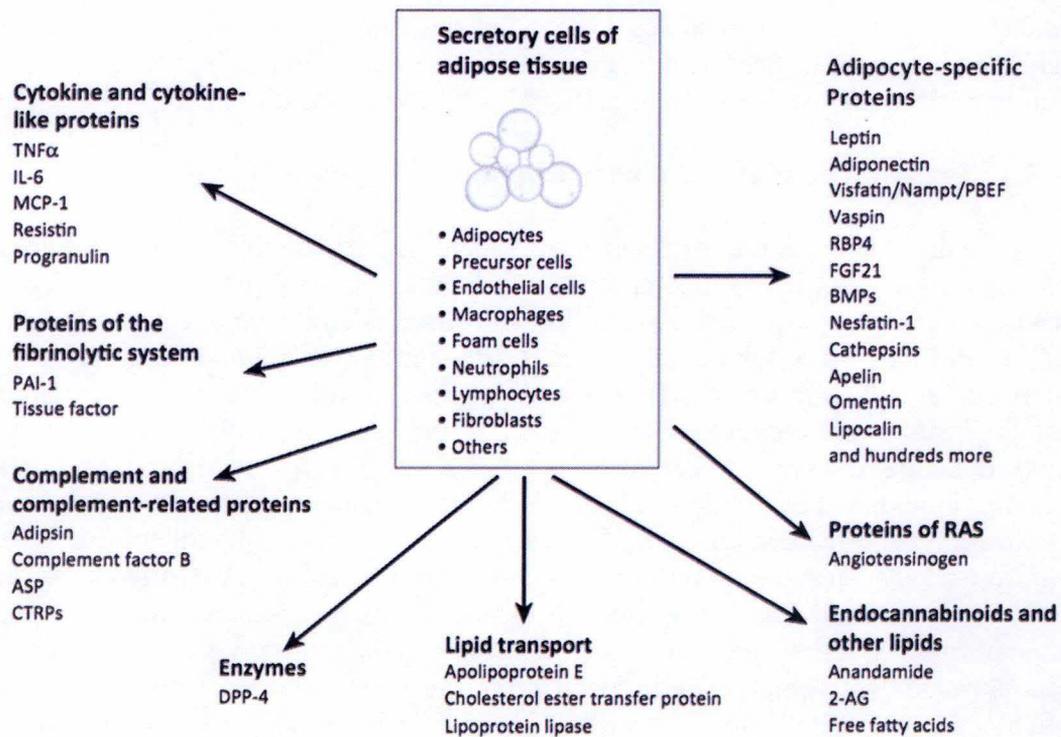


Figure 1.8 : Composition cellulaire des tissus adipeux blancs et leurs secrétomes.
(Fasshauer and Bluher, 2015)

Les adipokines sont des molécules spécifiquement libérées par les tissus adipeux. Plus de 600 adipokines ont été actuellement pu être identifiées. Ces molécules, des peptides, protéines, lipides, ... produites et sécrétées par les différents types cellulaires, représentent des signaux variés intervenant dans la communication inter-organes. Sur cette figure, on trouve notamment la leptine et l'adiponectine, 2 adipokines produites par les adipocytes, aux propriétés antagonistes et qui seront traitées plus loin dans ce travail. Le TNF α , une cytokine pro-inflammatoire, sera également un acteur important de ce travail car sa libération par les macrophages est augmentée avec l'obésité et est un facteur de risque dans le développement du syndrome métabolique.

2-AG : 2-Arachidonoylglycerol ; **ASP** : acylating simulation protein ; **BMPs** : bone morphogenetic proteins ; **CTRPs** : C1q/TNF-related proteins ; **FGF21** : fibroblast growth factor 21 ; **MCP-1** : monocyte chemotactic protein-1 ; **PAI-1** : plasminogen activator inhibitor-1 ; **RAS** : reninangiotensinsystem ; **RBP4** : retinol binding protein4.

1.3.5.1 L'Adiponectine (AdipoQ)

L'Adiponectine est une hormone spécifique des TA (Wang et al., 2010), codée au niveau du gène *ADIPOQ*, et représente l'adipokine la plus abondamment exprimée par les TA (Hotta et al., 2001). Son action passe par son interaction avec les récepteurs AdipoR1, ubiquiste, et AdipoR2, hépatique, qui provoque la phosphorylation de l'AMPK, résultant, en aval, à l'inactivation d'enzymes lipogéniques. Elle favorise ainsi la β -oxydation des acides gras, ainsi que l'activité du PPAR γ qui agit à son tour sur des enzymes de l'oxydation lipidiques telle que la Long Chain AcylCoA Déshydrogénase (**LCAD**) (You et al., 2005). Elle favorise également, au niveau du pancréas, la survie cellulaire et la production d'insuline (Wijesekara et al., 2010). Elle favorise la biogenèse mitochondriale, par l'activation, en aval de son récepteur, du co-activateur PGC-1 α , dépendante de la phosphorylation de l'AMPK. Elle a également une action anti-inflammatoire, à travers l'IL-10 dont elle favorise la production au niveau des macrophages et diminue celle du TNF α . Son expression est inhibée par les TNF α et IL-6 et voit donc son abondance diminuée avec l'obésité (Li et al., 2009).

1.3.5.2 La Leptine

La Leptine est une hormone spécifique des tissus adipeux blancs, codée au niveau du gène *Ob/LEP*, et dont l'expression et la libération dans le sang sont proportionnelles à la masse adipeuse de l'individu et de la concentration plasmatique en insuline (Frederich et al., 1995). Elle agit sur le cerveau au niveau de l'hypothalamus pour induire la sensation de satiété et diminuer l'appétit. Elle présente également une activité pro-inflammatoire puisque elle favorise la synthèse du TNF α et de l'IL-6 par les macrophages (Gainsford et al., 1996) et sa sécrétion est augmentée avec l'obésité.

1.3.6 **Physiopathologie des tissus adipeux blancs dans le développement de l'obésité (Figure 1.9)**

L'excès d'apport calorique et/ou l'insuffisance de la dépense d'énergie conduit à son accumulation sous forme de TG dans les différents dépôts anatomiques de TABI mais essentiellement dans le TAV (Tchernof and Despres., 2013). De plus, les dysfonctionnements systémiques qui sont encouragés par l'obésité sont souvent la conséquence directe ou indirecte des modifications survenant dans ces tissus (essentiellement médiées par des changements de profil d'expression des adipokines et l'installation d'une inflammation chronique de « bas grade ») (Guilherme et al., 2008) (Tilg and Moschen., 2006) et, à un stade plus avancé, de l'accumulation de lipides dans les tissus non adipeux comme les tissus hépatique et musculaires (Carr and Ahima., 2015) (Bosma., 2015), provoquant une lipogluco-toxicité progressive (Cnop., 2008).

1.3.6.1 Adaptation et conséquences de l'obésité sur les tissus adipeux blancs

La stimulation lipidique au sein de l'adipocyte conduit à une hypertrophie de la cellule qui se gorge de TG. Lorsque la capacité maximale d'expansion de l'adipocyte est atteinte, des précurseurs non différenciés sont recrutés pour augmenter la capacité de stockage du tissu (Jeffery et al., 2015). L'obésité devient alors à la fois hypertrophique et hyperlasique. En parallèle à ces changements structurels, la biologie de certains organites tels que la mitochondrie et le réticulum endoplasmique (RE) sont profondément modifiés (voir point 1.4). De plus, l'expression et la sécrétion du pool d'adipokines se voient modifiées, bouleversant la communication entre le TABI et d'autres organes tel que le **cerveau**,

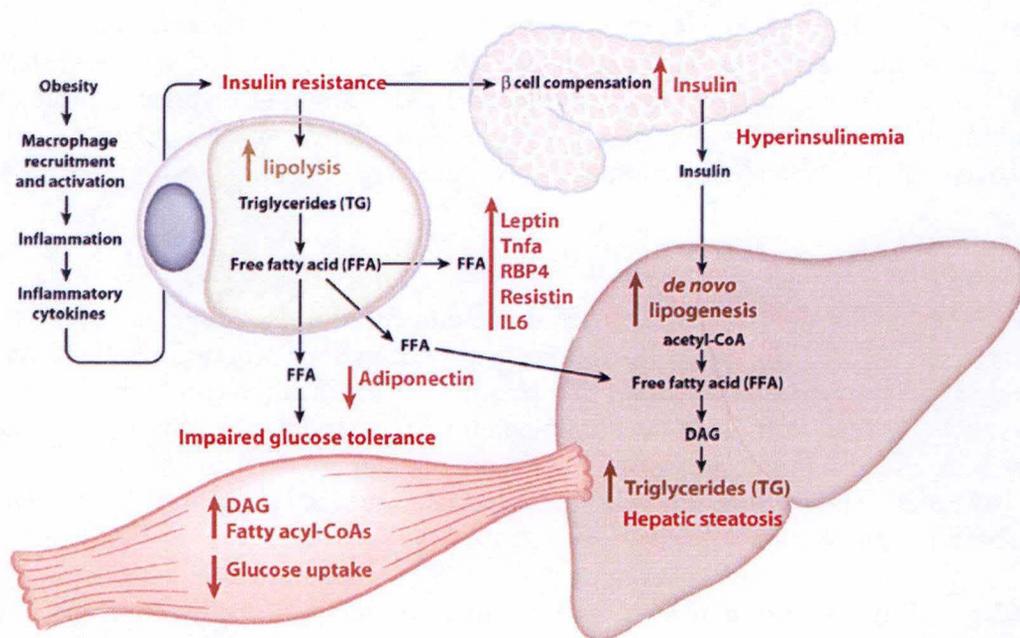


Figure 1.9 : Processus pathologiques induits par l'obésité et influençant le développement du syndrome métabolique (Attie and Scherer, 2009).

L'accumulation de la masse adipeuse et la sécrétion de chémokines attirent progressivement des macrophages au sein des tissus adipeux blancs, où s'installe une réaction inflammatoire chronique de bas grade. Parallèlement, s'installent une dyslipidémie, causée par l'accumulation des FFA dans le sang, et une hyperglycémie résultant d'une altération de la réponse au glucose des organes périphériques. Une insulino-résistance s'installe donc au niveau de ces organes, et est favorisée par l'action des cytokines pro-inflammatoires libérées au cours de l'invasion des macrophages. Il en découle une tentative de compensation par le pancréas, qui libère plus d'insuline dans le sang. L'ensemble de ces perturbations conduit finalement à l'installation d'une stéatose hépatique.

comportant le centre hypothalamique de la régulation faim-satiété (contrôlée, entre autres, par la concentration en leptine) (Fassahuer et al., 2015). De plus, la diminution de la sécrétion d'adiponectine et l'augmentation de la libération du Rétinol Binding Protein-4 (RBP-4) (Yang et al., 2005) sont responsables, en grande partie, d'une diminution de la sensibilité des hépatocytes et des cellules musculaires à l'insuline, installant progressivement l'état diabétique de type 2. Une expression et une libération croissante de TNF α est à l'origine de l'apparition d'une inflammation chronique qui, combinée à l'accumulation des graisses, laisse apparaître une fibrose des tissus, qui amplifie à son tour les dysfonctionnements mentionnés ci-dessus.

Les 1^{ères} complications de l'obésité sont directement causées par l'augmentation de la masse adipeuse de l'individu. En effet, l'augmentation du poids supporté par la cage thoracique d'un individu obèse en décubitus dorsal l'expose à des apnées du sommeil (Zammit et al., 2010). La capacité pulmonaire diminuée est aussi souvent à l'origine d'asthme (Zammit et al., 2010). Enfin deux autres conséquences néfastes liées à l'accumulation de la masse adipeuse dans l'obésité sont la dépression et les symptômes psychiatriques (agressivité, ...) (McAllister et al., 2009) et le développement de cancers tels que les cancers du sein. Ceux-ci sont d'autant plus graves chez les patients obèses car la modification du secrétome adipocytaire augmente la libération de molécules pro-inflammatoires telles que l'IL-6 qui favorisent les métastases (Park et al., 2014).

1.3.6.2 Adaptation et conséquences de l'obésité sur les tissus non adipeux

Lorsque la capacité maximale d'extension des TABI est atteinte, les FFA ne sont désormais plus pris en charge et stockés par les adipocytes et s'accumulent donc dans la circulation sanguine (**dyslipidémie**). Une partie de ces FFA est alors prise en charge par des organes périphériques tels que le foie et les muscles jusqu'à leur propre saturation. Ce phénomène d'accumulation de TG dans des organes non prédisposés est appelé **stéatose** et constitue un stress pour le type cellulaire inapproprié. Brièvement, ce stress favorise le développement d'une **inflammation** de bas grade, associée à une perte de la sensibilité à l'insuline de ces tissus périphériques. **L'hyperglycémie** résultante de ce phénomène systémique, affectant principalement le foie (NAFLD), les muscles squelettiques et les parois des vaisseaux sanguins, correspond à une accumulation du glucose non pris en charge, dans le sang, et constitue lui aussi une source de stress endiguant **l'insulino-résistance**. Cette cascade d'altérations des réponses cellulaires est communément désignée comme un axe de « **lipo-gluco-toxicité** » caractéristique du MS (Roseman et al., 2005). Finalement, ces différents facteurs de risque conduisent, en plus des maladies inhérentes à l'accumulation de la masse graisseuse (vue ci-avant), à l'apparition de multiples troubles à l'origine de la morbidité importante liée à l'obésité. L'insulino-résistance, encore exacerbée par le dysfonctionnement des cellules pancréatiques et de leur production d'insuline conduit à l'apparition d'un diabète de type 2, et à ses nombreuses complications (fatigue, cécité...). L'apparition d'une **hypertension**, de développement **athéromateux**, de **défaillance métabolique et de fibrose cardiaques** représentent un risque accru de **maladies cardiovasculaires** (infarctus du myocarde, accident vasculaire cérébral, ...) (Tchernof and Despres., 2013). La modification du pool des adipokines sécrétées et des cytokines pro-inflammatoires favorise également le développement de cancers (cancer du colon, du sein) et les métastases.

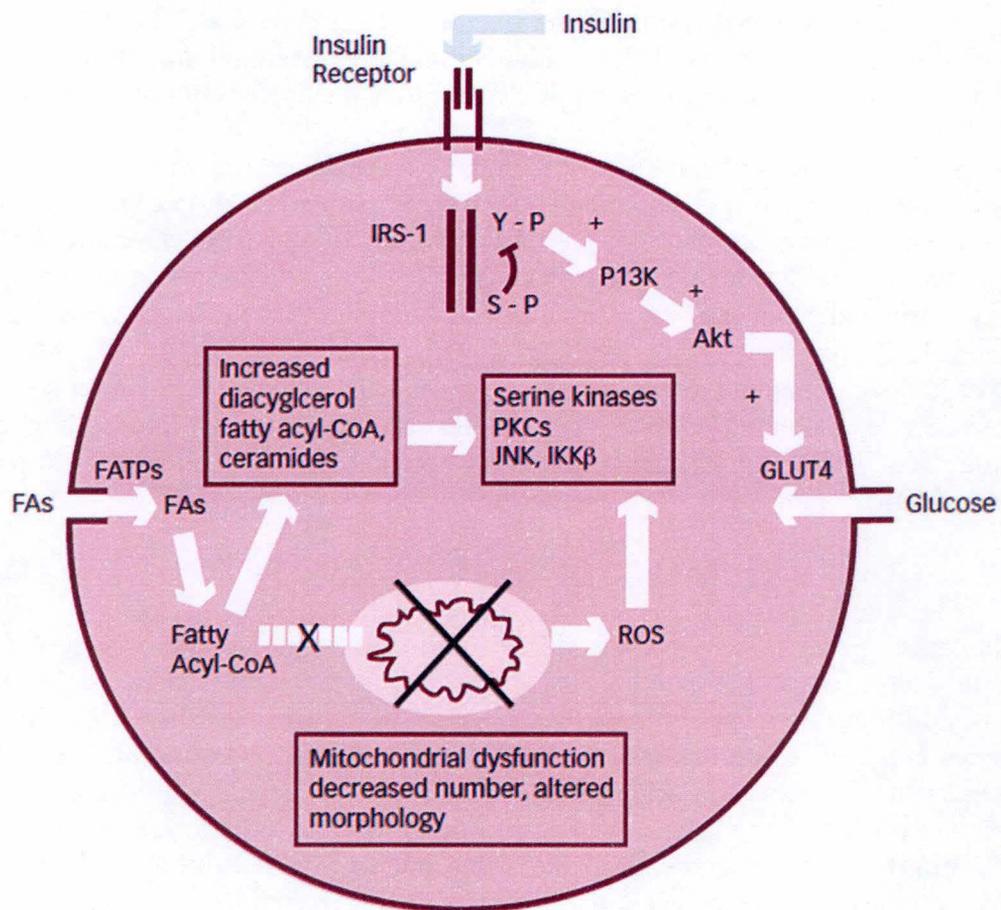


Figure 1.10 : Implication des dysfonctionnements du réticulum endoplasmique et du réseau mitochondrial des adipocytes et macrophages en condition d'obésité (Arruda and Hotamisligil., 2015).

Le dysfonctionnement mitochondrial résulte de l'accumulation lipidique excédentaire liée à l'obésité et aboutit sur une inhibition de l'oxydation des acides gras et sur une production importante de ROS qui, tous deux, débouchent sur une activation des sérines kinases, et par conséquent, sur une phosphorylation des sérines du récepteur Insulin Receptor Substrates (**IRS-1**), sur des résidus lysines, empêchant la transduction de signal de réponse à un stimulus insulinique.

I.IV RESEAU MITOCHONDRIAL ou « MITOCHONDRION »

Les mitochondries sont aujourd'hui désignées sous le terme « **mitochondrion** » car, malgré leur aspect individuel visible en microscopie électronique, elles forment un véritable réseau interagissant avec de nombreux autres compartiments cellulaires comme le réticulum endoplasmique et le noyau. La mitochondrie est organite dynamique dont la morphologie et la mobilité sont contrôlées par de nombreux acteurs moléculaires (Archer, 2013). Cet organite est spécialisé dans la production d'ATP résultant de l'oxydation complète de nombreux nutriments. Cette production de l'énergie est médiée par deux processus centraux : le cycle de Krebs ou « cycle des acides tricarboxyliques (TCAC) dans la matrice mitochondriale, génère des équivalents réducteurs comme le NADH et le FADH₂ qui, en présence d'oxygène, alimentent la chaîne de transport des électrons et la production d'ATP, dans un processus appelé la phosphorylation oxydative (**OXPHOS**) (Mitchell., 1961). La mitochondrie participe également à de très nombreux processus biologiques comme la synthèse des clusters fer-soufre (Fe/S), le métabolisme des lipides, la biosynthèse des pyrimidines, de l'hème, de l'urée, des hormones stéroïdiennes, du métabolisme des acides aminés, le maintien de l'homéostasie du Ca²⁺, de l'intégration des signaux de survie ou de mort cellulaire par apoptose, et du maintien de l'état rédox de la cellule par le contrôle de la production d'espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species – **ROS**). Ces fonctions permettent l'adaptation cellulaire aux modifications de l'environnement et sont donc impactées dans un désordre métabolique tel que l'obésité. En effet, il a été montré que l'obésité pouvait impacter l'intégrité mitochondriale, en termes de biogenèse, nombre, morphologie, affectant la dynamique de fusion-fission. Au niveau des adipocytes, des perturbations de la respiration, du nombre, de la morphologie, du potentiel de membrane et de l'oxydation des acides gras, ont pu être montrées, ainsi qu'une dérégulation du co-activateur PGC1- α (Sivitz, 2010). Le dysfonctionnement mitochondrial résulte de l'accumulation lipidique liée à l'obésité et aboutit sur une inhibition de l'oxydation des acides gras et sur une production importante de ROS qui, tous deux, débouchent sur une activation des sérines kinases, et par conséquent, sur une phosphorylation des sérines du récepteur Insulin Receptor Substrates (**IRS-1**), sur des résidus lysines, empêchant la transduction de signal de réponse à un stimulus insulinique (**Figure 1.10**).

La mitochondrie est donc le siège de l'adaptation métabolique. Dans ce cadre, une enzyme comme la Sirtuine 3, une désacétylase mitochondriale dépendante du NAD⁺, joue un rôle essentiel. En effet, l'acétylation et la désacétylation de résidus lysines de protéines et d'enzymes est un mécanisme général de régulation de nombreuses fonctions mitochondriales qui a été récemment mis à jour (Anderson et al., 2012). L'origine de cette acétylation mitochondriale (Ac-CoA) est encore incertaine. Dans le cytoplasme, l'acétylation des protéines est assurée par des acétyl-transférases (Sadoul et al., 2010) mais aucune acétyl-transférase spécifique des mitochondries n'a encore été identifiée. De plus, il est peu probable que les protéines mitochondriales acétylées soient importées au sein de l'organite après leur acétylation cytosolique. Enfin, l'hypothèse la plus probable pour conduire à l'acétylation des très nombreuses cibles mitochondriales réside dans la modification **chimique** de résidus lysines particuliers, situés dans des régions peptidiques « fragiles » et caractérisées par un pKa <10.4. Ces lysines subirait ainsi une acétylation lorsque la concentration en acétyl-CoA augmente dans la mitochondrie (Ghanta et al., 2013)(Weinert, 2015). L'effet de l'acétylation sur les protéines/enzymes étant souvent négatif/inhibiteur de leur fonction/activité, un mécanisme de régulation s'opposant à ces acétylations spontanées, et spécifiquement adapté au réseau mitochondrial doit donc exister. Ce mécanisme reposerait, exclusivement, sur une réaction de désacétylation, catalysée par la Sirtuine 3. Cette enzyme ciblerait environ 50 % des protéines mitochondriales et jouerait donc un rôle clé dans le contrôle du mitoacétylome.

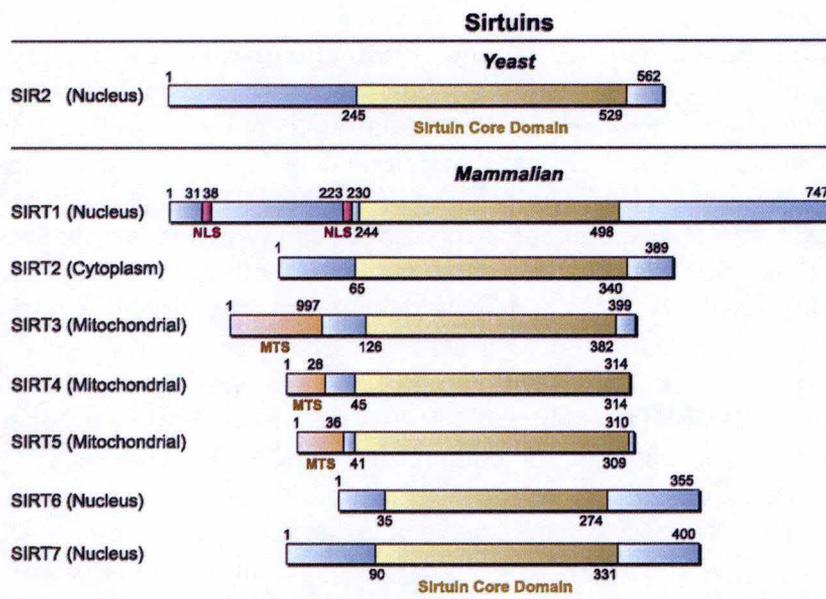


Figure 1.11 : Homologie des séquences partagées entre les différents membres de la famille des sirtuines (Guarente et al., 2013).

Les sirtuines ont été découvertes sur base de l'homologie de leur séquence avec celle de la désacétylase histone-dépendante Sir2, présente chez la levure. La séquence codant pour le site catalytique des enzymes est extrêmement conservé. Les sirtuines 3, 4, 5 disposent d'une séquence d'adressage aux mitochondries (MTS) tandis que la sirtuine 1 présente une séquence d'adressage au noyau.

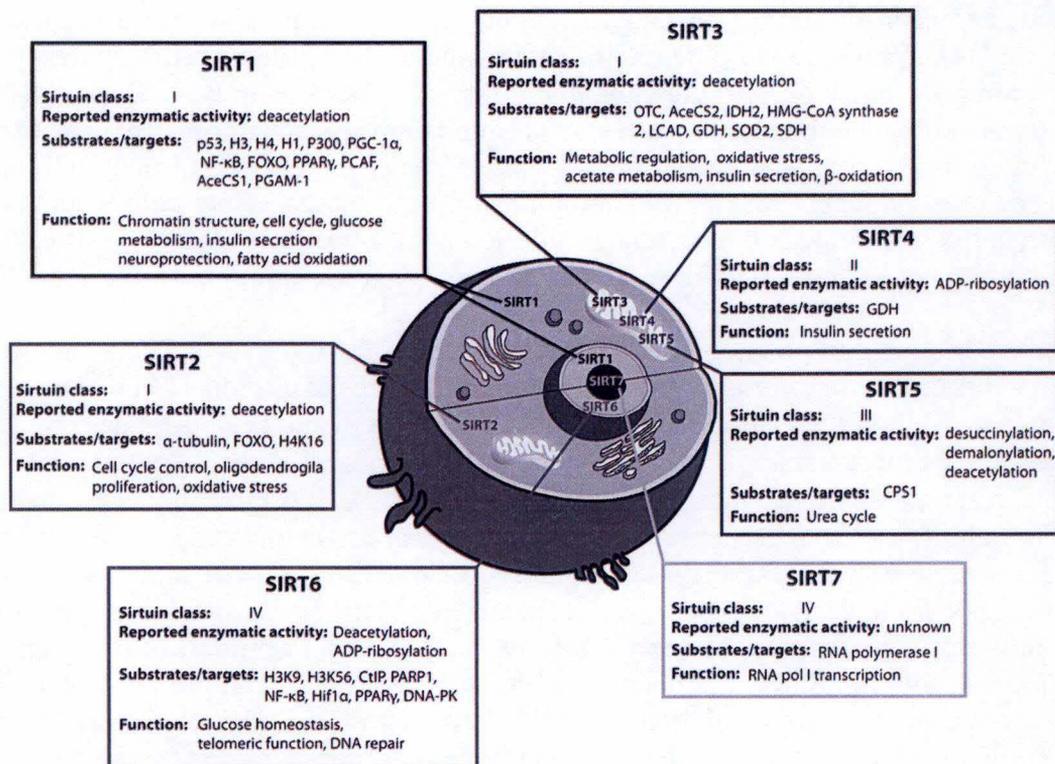


Figure 1.12 : Classification et disparités des membres de la famille des sirtuines (Feldman et al., 2012).

Sept sirtuines sont identifiées chez les mammifères. Elles sont numérotées de 1 à 7, classées selon leur activité, la plupart étant répertoriées comme des désacétylases (classe I) et ADP-rybosyltransférases (classe II). Ces enzymes couvrent la régulation d'un large panel de processus cellulaires, à travers une régulation de nombreux substrats.

I.V SIRTUINE 3

1.5.1 Généralités

La Sirtuine 3 (**Sirt3**) est une enzyme à activité désacétylase dépendante du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD^+) appartenant à la famille des sirtuines. Les sirtuines (dont le nom provient du gène *Sir2*, Silent mating type Information Regulator 2, identifié chez la levure *S. Cerevisiae*) (Shore et al., 1984 ; Frye et al., 1998) sont présentes dans presque tout le règne vivant, et le nombre de représentants de cette famille trouvé chez un organisme dépend de la complexité de celui-ci (Sauve et al., 2010 ; Martinez-Redondo and Vaquero., 2013). Le produit de *Sir2* est une désacétylase qui module la structure chromatinienne et donc l'expression/le silençage de gènes, en ôtant les groupements acétyl (en faveur d'une décompaction de la chromatine) fixés sur certains résidus lysines des protéines histones (Shore et al., 1984). En 1998, sur base de l'homologie de sa séquence, plusieurs orthologues humains ont été identifiés (Frye et al., 1998) (**Figure 1.11**). On en dénombre aujourd'hui 7 chez les mammifères (**Figure 1.12**). En raison de la dépendance de leur activité enzymatique au NAD^+ , ces enzymes représentent des senseurs de l'état énergétique de la cellule.

Ces enzymes, bien étudiées dans le cadre de leur rôle dans la longévité de nombreux organismes (Kincaid., 2013) comme la levure (Shore et al., 1984), *C. elegans*, *D. melanogaster*, la souris (Martinez-Redondo & Vaquero) et l'être humain (Bellizzi et al., 2003), permettent, par leur activité catalytique, d'adapter les réponses de l'organisme aux stress et changements environnementaux. Ensemble, et par l'intermédiaire de très nombreux substrats, ces enzymes participent au maintien de la stabilité du génome, à la réparation et à la transcription de l'ADN, à la traduction des ARNm, au contrôle du métabolisme oxydatif, à la protection des stress oxydatifs, ... Initialement identifiée pour leurs réactions sur les histones (Frye et al., 1998), les sirtuines ont été classées comme des Histones Deacetylases de classe III (HDAC III), bien que toutes ne présentent pas une activité déacétylase. Par exemple, la sirtuine 4 présente une activité mono-ADP-ribosyl-transférase (Martinez-Redondo Vaquero, 2013). Les premières études consacrées à la Sirt3 datent de 2002 et ont rapidement déterminé la dépendance de l'activité de l'enzyme au cofacteur NAD^+ ainsi que les mécanismes sous-jacents à sa translocation mitochondriale, grâce à la présence d'un motif d'adressage aux mitochondries MTS (Mitochondrial Targeting Sequence) et au processing nécessaire à son activation (Onyango et al., 2002 ; Schwer et al., 2002). C'est cependant seulement à partir de 2008 que la recherche sur la biologie et les fonctions de cette enzyme a réellement pris de l'ampleur. La Sirt3 est aujourd'hui bien connue pour ses actions sur les mitochondries (Lombard et al., 2008 ; Ahn et al., 2008), modulant principalement le métabolisme (Hirshey et al., 2011) et les stress oxydatifs, et son impact bénéfique sur le vieillissement, contre le cancer (Finley et al., 2011 ; Bell et al., 2011).

1.5.2 Structure de la Sirt3

Quelle que soit l'espèce (humaine ou murine), la Sirt3 s'organise en 2 domaines bien distincts (**Figure 1.13**) : le « gros domaine » comporte à la fois les régions N- et C-terminales. A l'extrémité N-terminale, les acides aminés s'organisent en « Pli de Rossmann ». Ce motif constitue le site de liaison du NAD^+ . Le second domaine, le « petit domaine », rendu flexible grâce à la souplesse des hélices qui le composent, peut accueillir un ion Zn^{2+} qui agirait ici, non pas sur la réaction, mais sur l'interaction avec le substrat. En effet, chez les sirtuines, au contraire des HDAC classiques, le domaine de liaison au zinc jouerait un rôle structural mais non fonctionnel, en favorisant l'interaction entre protéines, grâce à sa conformation semblable

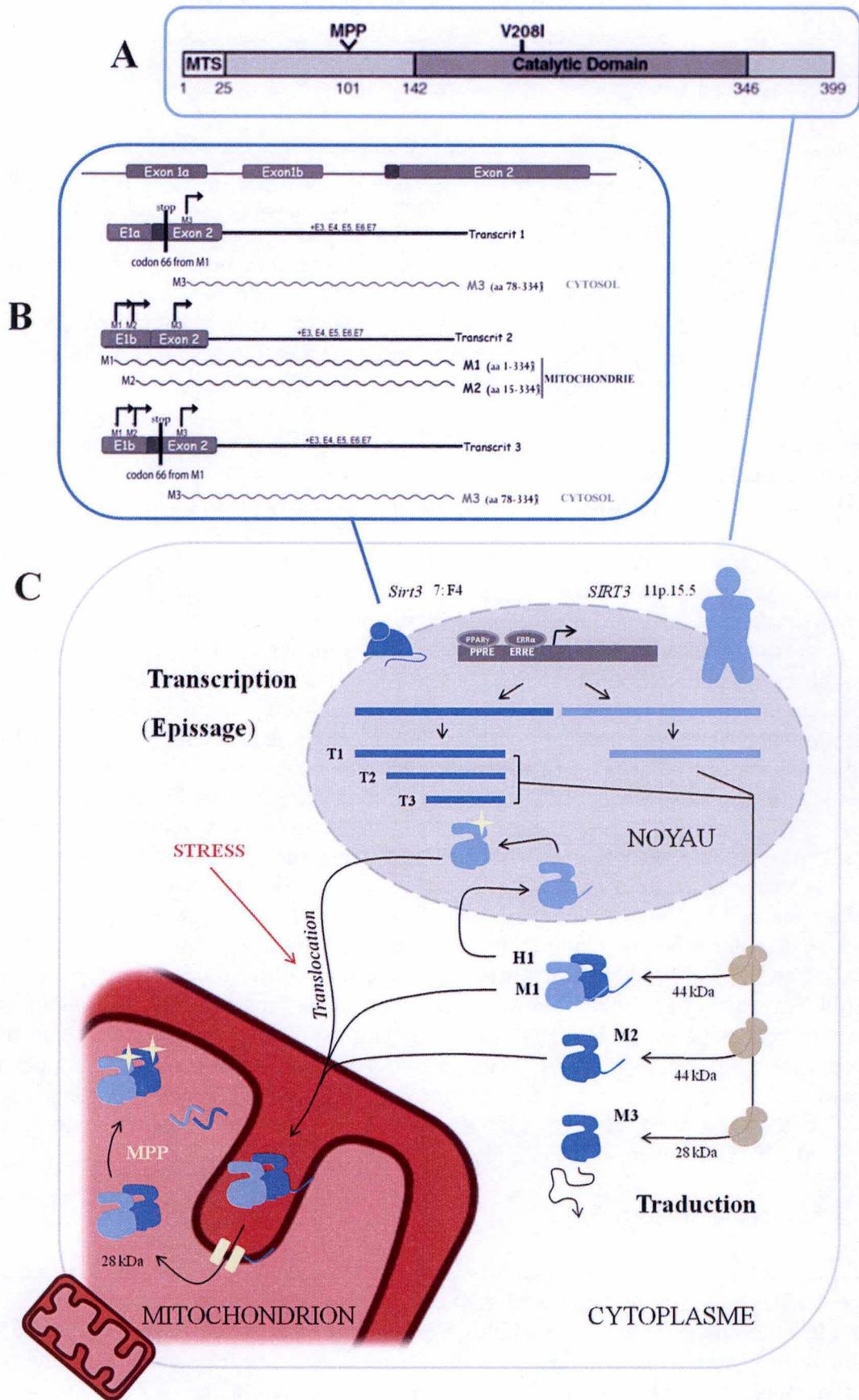


Figure 1.14 (commentaire à la page suivante)

aux motifs « RING fingers » (Martinez-Redondo and Vaquero., 2013). L'intersection des deux domaines forme le site catalytique de l'enzyme. Cette région de 275 aa est très conservée entre les différentes sirtuines en comparaison des régions d'interaction avec la protéine cible qui ont divergé, permettant probablement une régulation spécifique des cibles de Sirt3 (Sanders et al., 2010). Un autre site important de la protéine est celui formé par les acides aminés 101 et 102, dont la liaison peptidique est rompue par la MPP lorsque l'enzyme transloque au sein du réseau mitochondrial, après avoir libéré le signal d'adressage. Ce clivage, assurant la pleine maturation de l'enzyme, serait nécessaire à l'exercice des fonctions mitochondriales de Sirt3 (Schwer et al., 2002). Cependant, nous avons vu que cette hypothèse est encore controversée dans la littérature, certains auteurs rapportant une activité nucléaire de la Sirt3 sans clivage de la séquence MTS (Scher et al., 2007).

Ajoutons encore que les différentes isoformes de la Sirt3 sont différenciellement exprimées au sein des tissus (Scher et al., 2007). De plus, tant chez l'homme que chez la souris, l'expression de la Sirt3 mitochondriale est très importante dans le rein, le cerveau, le cœur et le foie alors que l'enzyme est peu abondante dans les muscles squelettiques, les testicules, les poumons et les tissus adipeux blancs (T. Arnould, données non publiées).

1.5.3 Génétique (Figure 1.14)

Sirt3 est encodée au niveau d'un gène unique *SIRT3* chez l'homme et *Sirt3* chez les rongeurs, dont le locus se trouve sur le chromosome 11 (p15.5) (Frye et al., 1998) 7 (F4) (Voelter-Mahlknecht et al., 2011) chez la souris. La transcription du gène est essentiellement contrôlée par les facteurs de transcription *ERRα* (Kong et al., 2010) et *PPARγ* (Giralt and Villarroya., 2012) et le co-activateur *PGC-1α* (Mahlknecht and Voelter-Mahlknecht., 2010), bien que d'autres facteurs de transcription comme *AP-1*, *GATA1/2*, *NFκB*, *SP-1*, *ZF5* et *STAT* soient également été décrits (Giralt and Villarroya., 2012). La transcription de ce gène donne naissance à un ARNm unique chez l'homme et à 3 ARNms chez la souris, résultant d'un épissage alternatif. Les trois transcrits murins, désignés T1 (long), T2 (moyen) et T3 (court) engendrent les isoformes M3 (court : aa 78-334) pour T1, M1 (long : aa 1-334) et M2 (moyen : aa 15-334) pour T2 et de nouveau M3 pour T3. L'épissage alternatif de T3 conserve l'exon 1b, ce qui autorise l'expression des deux formes plus longues M1 et M2, intégrant E1b. Cet épissage déterminera la possibilité de localisation de la protéine car c'est la séquence d'E1b qui dispose du motif MTS de 25 aa.

Trois polymorphismes de la séquence génique de la Sirt3 humaine est trouvée au sein de la population et est associée à une efficacité parfois très variable de l'activité enzymatique. La première est une transversion G-T qui semble être associée à un effet bénéfique sur la longévité de l'individu (Rose et al., 2003). La seconde consiste en la variation du nombre de répétitions de nucléotides en tandem VNTR (Variable Nucleotide Tandem Repeat) qui favoriserait une régulation positive de sa transcription, en augmentant le pool de facteurs de transcription capables de s'hybrider à la séquence promotrice du gène (Bellizzi et al., 2009). Le dernier polymorphisme identifié est une mutation ponctuelle de l'acide aminé 208 (V208I) qui diminue l'activité de la Sirt3 et augmente le risque de développer les complications du Syndrome Métabolique (Hirschey et al., 2011).

1.5.4 Localisations intracellulaires de la Sirt3 (Figure 1.14)

Au cours des premières tentatives de caractérisation de la Sirt3, l'enzyme est apparue au sein du réseau mitochondrial (Onyango et al., 2002). On a ainsi découvert que les isoformes longues de la protéine (~43 kDa) étaient capables de transloquer vers le réseau mitochondrial

Figure 1.14 (page suivante) : Spécificité des aspects génétiques et transcriptionnels de la Sirt3 chez la souris (A) (Yang et al, 2010) et l'homme (B) (Hirshey et al., 2011). Localisations de la Sirt3 au sein de la cellule (C).

La Sirt3 est encodée par le gène *Sirt3* unique, chez la souris et chez l'homme. Il est transcrit en un ARNm unique chez l'homme tandis qu'il produit, par un épissage alternatif, 3 transcrits chez la souris. Chaque ARNm est traduit en une protéine dont la localisation fait l'objet d'un à débat. Les isoformes longues murines transloqueraient vers les mitochondries où elles sont internalisées grâce à une séquence MTS, tandis que l'isoforme courte resterait dans le cytoplasme. Une fois dans la mitochondrie, l'enzyme, pour être active, doit être processée par une MPP. Le destin de la Sirt3 humaine est semblable mais il a été proposé une étape intermédiaire dans le noyau, où l'enzyme est également active. Elle pourrait déjà y subir un processing, conditionnant sa translocation vers les mitochondries.

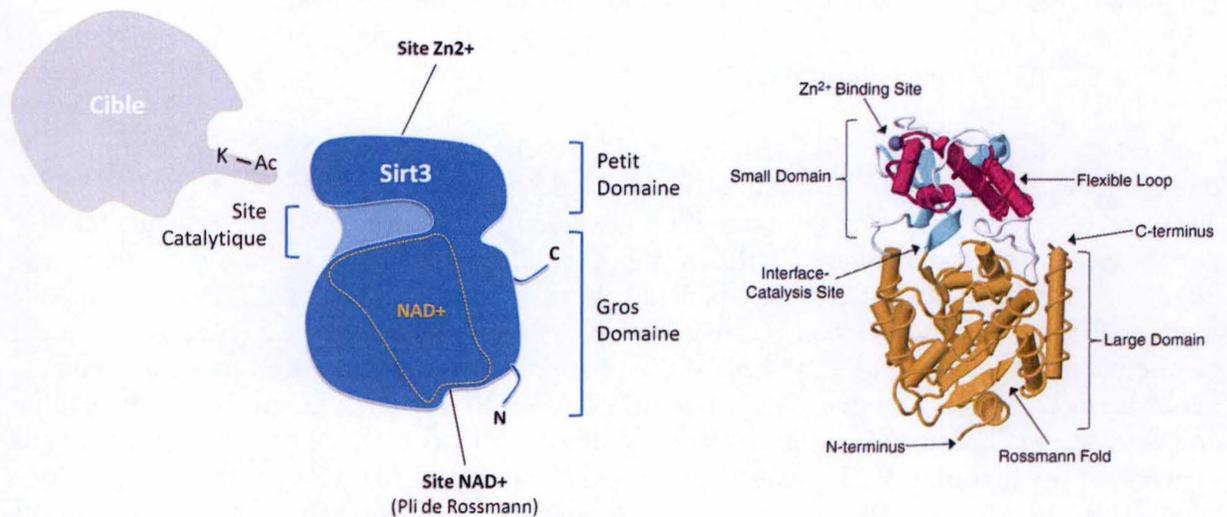


Figure 1.13 : Représentation schématique de la structure de la Sirt3 et de son interaction avec une protéine cible (Nogueiras et al., 2011).

La Sirt3 comporte un gros domaine, un petit domaine modulant l'interaction de l'enzyme avec son substrat, un domaine de liaison à son co-facteur (NAD⁺) et un site de liaison pour le zinc, modulant lui aussi l'interaction enzyme-substrat. Le site catalytique de l'enzyme est délimité par les gros et petit domaines et constitue un canal « accepteur » de la lysine acétylée au niveau de la protéine substrat.

grâce à leur motif MTS, et que leur action catalytique nécessitait un clivage préalable par une MPP (Matrix Protein Peptidase) entre les aa 100 et 101 (Schwer et al., 2002) conduisant à une forme processée d'environ 28 kDa. Puis, l'identification des différentes isoformes transcriptionnelles a provoqué une divergence d'opinions concernant les localisations particulières de chacune d'elles. Une alternative à un adressage direct à la mitochondrie (Cooper and Spelbrink., 2008) après la traduction, consisterait en un adressage primaire et systématique des formes longues et courtes de la Sirt3 vers le noyau, au sein duquel pourrait également se produire un clivage nécessaire à la translocation terminale des protéines vers les mitochondries, en réponse à un stress cellulaire (Scher et al., 2007). On ne sait malheureusement pas par quel mécanisme l'enzyme pénétrerait dans le noyau, puisque aucune séquence d'adressage nucléaire NLS (Nuclear Localization Site) connue n'a été détectée. Elle pourrait cependant interagir avec des partenaires protéiques et profiter d'un co-transport à travers l'aide de ces protéines disposant de séquences de translocation nucléaires, mais ceci n'est pas complètement établi. Cette théorie est cohérente avec les observations témoignant : d'une localisation nucléaire de la Sirt3 (Nakamura et al., 2007), de son rôle dans les réponses au stress, et notamment de sa capacité d'induire une réponse au stress nucléaire (Iwahara et al., 2012) car celle-ci présente également des substrats nucléaires tels que les histones H3 et H4 et d'autres molécules de modulation chromatinienne telle que p300 (Martinez-Redondo and Vaquero., 2010). Il a également été montré un axe de coordination dans la réponse au stress entre le noyau et les mitochondries, impliquant la Sirt3 (Liu et al., 2015). La localisation de la forme courte est elle aussi très controversée puisque Scher et al. ont pu montrer la présence et une activité des formes longues et courtes de l'enzyme (humaine) au sein du noyau. Ils suggèrent donc un clivage de la forme longue dans ce compartiment, préalable à sa translocation mitochondriale, précédé d'un processus d'export nucléaire qui pourrait être dirigé par l'intermédiaire de la protéine spécialisée CRM1 (Chromosomal Region Maintenance 1) (Scher et al., 2007). Ils suggèrent qu'un processus semblable pourrait exister pour les isoformes murines de la Sirt3, bien que certains auteurs affirment qu'elle serait piégée et (donc strictement trouvée) dans le cytoplasme (Kincaid et al., 2013).

1.5.5 Réaction catalysée et fonctions de la Sirt3

1.5.5.1 Réaction de désacétylation catalysée par la Sirt3 (Figure 1.15)

Sirt3 est une sirtuine de classe I (ne pas confondre avec la classe III des HDAC), c'est-à-dire, une enzyme à activité strictement désacétylase (Martinez-Redondo and Varequo., 2013). La réaction de désacétylation fait intervenir le résidu lysine acétylé de la protéine cible, une molécule d'eau et une molécule de NAD^+ . Sirt3 interagit d'abord avec sa cible à travers son petit domaine, flexible, comportant l'atome de Zn^{2+} et favorisant l'insertion de la lysine acétylée à l'intérieur du domaine catalytique. A son tour, le NAD^+ vient s'arc-bouter entre le Pli de Rossmann et le site catalytique, où il est clivé pour générer un ion oxocarbénium qui subit à son tour l'attaque nucléophile du groupement acétyle et forme ainsi un second intermédiaire, l'alkylamidate. L'environnement alcalin assuré par une histidine située à proximité déloge un proton de l'intermédiaire (2^{ème} carbone du ribose) aboutissant alors à un acyldioxyane. La molécule d'eau intervient enfin, permettant la libération des différents produits : la protéine cible désacétylée, un nicotinamide (inhibiteur de la Sirt3) et un 2'-O-acétyl-ADP-ribose (Sauve et al., 2010). La spécificité de la réaction de la Sirt3 est déterminée par les caractéristiques physicochimiques des acides aminés situés à proximité directe du renforcement du site catalytique (Smith et al., 2011). Nous avons déjà vu qu'environ 50 % des protéines et enzymes mitochondriales (estimées à plus de 1000 (Schmidt et al., 2010)) pourraient être désacétylées par l'enzyme.

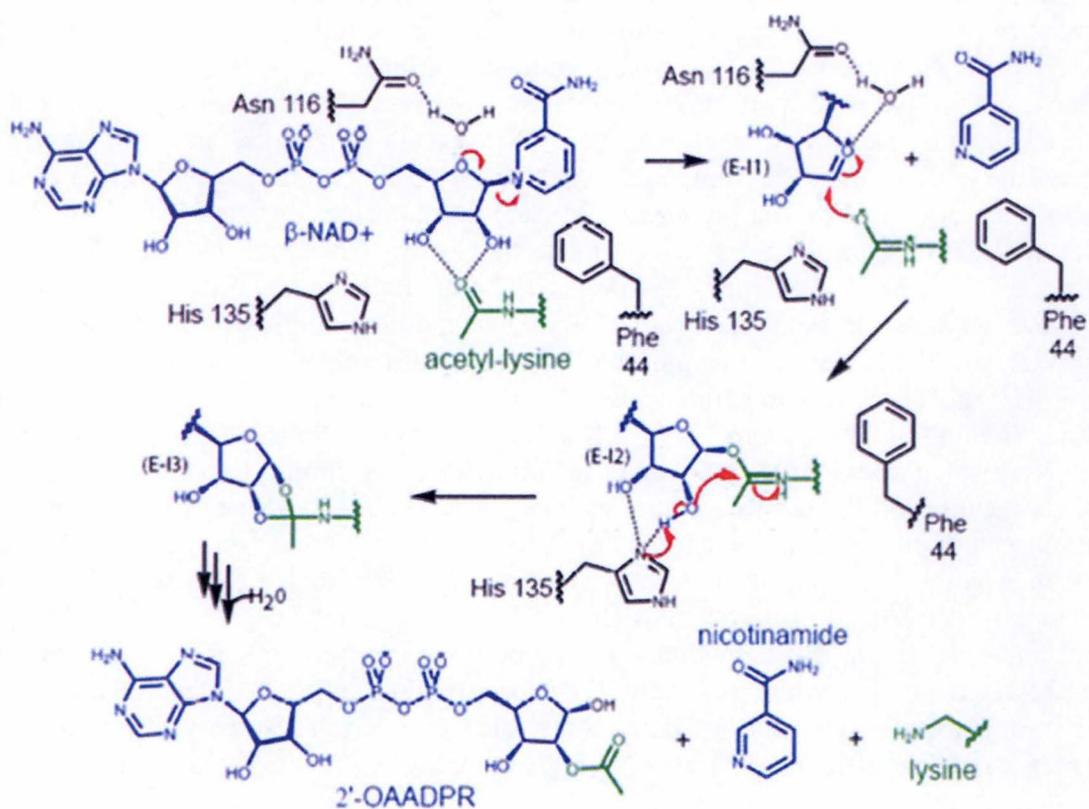


Figure 1.15 : Détail de la réaction de désacétylation catalysée par la Sirt3 (Sauve, 2010).

Sirt3 interagit avec sa cible à travers le petit domaine, flexible, comportant l'atome de Zn^{2+} et favorisant l'insertion de la lysine acétylée à l'intérieur du domaine catalytique. A son tour, le NAD^+ vient s'associer au Pli de Rossmann et interagit avec le site catalytique, où il est clivé pour générer un ion oxocarbenium qui subit à son tour l'attaque nucléophile du groupement acétyle et forme ainsi un second intermédiaire, l'alkylamidate. L'environnement alcalin assuré par une histidine située à proximité déloge un proton de l'intermédiaire (2^{ème} carbone du ribose) aboutissant alors à un acyldioxylane. La molécule d'eau intervient enfin, permettant la libération des différents produits : la protéine cible désacétylée, un nicotinamide (inhibiteur de la Sirt3) et un 2'-O-acétyl-ADP-ribose.

1.5.5.2. Régulations de l'expression et de l'activité de la Sirt3

Le gène codant la protéine Sirt3 se trouve en aval de séquences d'ADN régulatrices liant des facteurs de transcription tels que les PPAR γ , LXR et ERR α (Giralt et al., 2011) qui, en synergie avec le co-activateur PGC1 α , favorisent la transcription de *SIRT3/Sirt3*. Il a été clairement montré dans la littérature que l'expression de Sirt3 est augmentée par le jeûne, la restriction calorique (Qiu et al., 2010 ; Hebert et al., 2012), l'exercice physique et le froid (Palacios et al., 2009), et que l'expression du gène est diminuée en réponse à une alimentation riche en graisses (Hirschey et al., 2011).

La régulation de l'expression de l'enzyme s'explique, en partie, par la régulation positive de la fonction de PGC1 α suite à sa phosphorylation par l'AMPK, l'activité de ce senseur énergétique étant elle-même augmentée par un ratio [AMP]/[ATP] élevé. D'autres facteurs de transcription tels que GATA1/2, AP-1 et SP1, NF κ B, ZF5 et STAT soient aient également été décrits (Giralt and Villarroya, 2012) essentiellement proposés suite à des analyses *in silico* pourraient également influencer l'expression de Sirt3 (Mahlknecht & Voelter-Mahlknecht, 2011). La régulation de l'activité de Sirt3 passe dans un premier temps par la disponibilité en NAD⁺. Celui-ci peut provenir de l'oxydation du NADH qui a lieu au niveau de la chaîne d'électrons mitochondriale mais le pool de NAD⁺ est également (et surtout) contrôlé par les voies métaboliques de synthèse du co-facteur, qui compte une voie de synthèse de novo et une voie de sauvetage/récupération (Herman et al., 2008). L'activité de la Sirt3 est également régulée par la concentration en nicotinamide, un puissant inhibiteur compétitif de l'enzyme (Guan et al., 2014).

1.5.5.3 La Sirt3 : une enzyme active sur de nombreux substrats et contrôlant de nombreux processus biologiques

Les substrats de la Sirt3 sont très nombreux et variés (**Figure 1.16**) comprenant des enzymes, des facteurs de transcription, des histones, des molécules de signalisation... qui sont régulées par la désacétylation d'un ou de plusieurs résidus lysine. Par son activité exercée sur ces nombreux substrats mitochondriaux, la Sirt3 est maintenant considérée comme un régulateur essentiel du métabolisme énergétique (Ahn et al., 2008 ; Kim et al., 2009) et de l'état rédox de la cellule (Qiu et al., 2010 ; Someya et al., 2010 ; Hirschey et al., 2011). Ajoutons encore qu'en général (mais pas toujours, nous venons de voir que ce n'est pas le cas de la MDH2), la désacétylation permet l'activation ou une augmentation de l'activation de l'enzyme ciblée. La première cible de la Sirt3 à avoir été identifiée est l'Acétyl-Coenzyme A Synthétase 2 (**ACS2**) (Hallows et al., 2006 ; Schwer et al., 2006), une enzyme alimentant le cycle de l'acide citrique (**TCAc**) en acétylCoA et participant ainsi à l'oxydation de fuel énergétique. Sa découverte fut rapidement suivie de celles de la Glutamate Déshydrogénase (**GDH**) (Lombard et al., 2007) et de l'Isocitrate Déshydrogénase (**IDH2**) (Schlicker et al., 2008), qui conduisent, respectivement, la conversion du glutamate en α -cétoglutarate (et vice versa) et de l'isocitrate en α -cétoglutarate, afin d'alimenter le TCAc. De même, les sous-unités des Complexes I (Ahn et al., 2008), III et V (FoF1 ATP synthase) (Law et al., 2008) des phosphorylations oxydatives (**OXPHOS**), qui favorisent la respiration mitochondriale et la production d'ATP, ont été à plusieurs reprises identifiées comme des cibles de Sirt3. La Long Chain AcylCoA Dehydrogenase (LCAD) a également été identifiée comme désacétylée de façon puissante par l'enzyme (Hirschey et al., 2011). Plus récemment, la grande majorité des substrats de la Sirt3 a été identifiée par des approches protéomiques. En effet, la caractérisation des « mitoacétylomes » basées sur l'immuno-précipitation différentielle de protéines acétylées identifiées et quantifiées par spectrométrie de masse à partir de fibroblastes embryonnaires

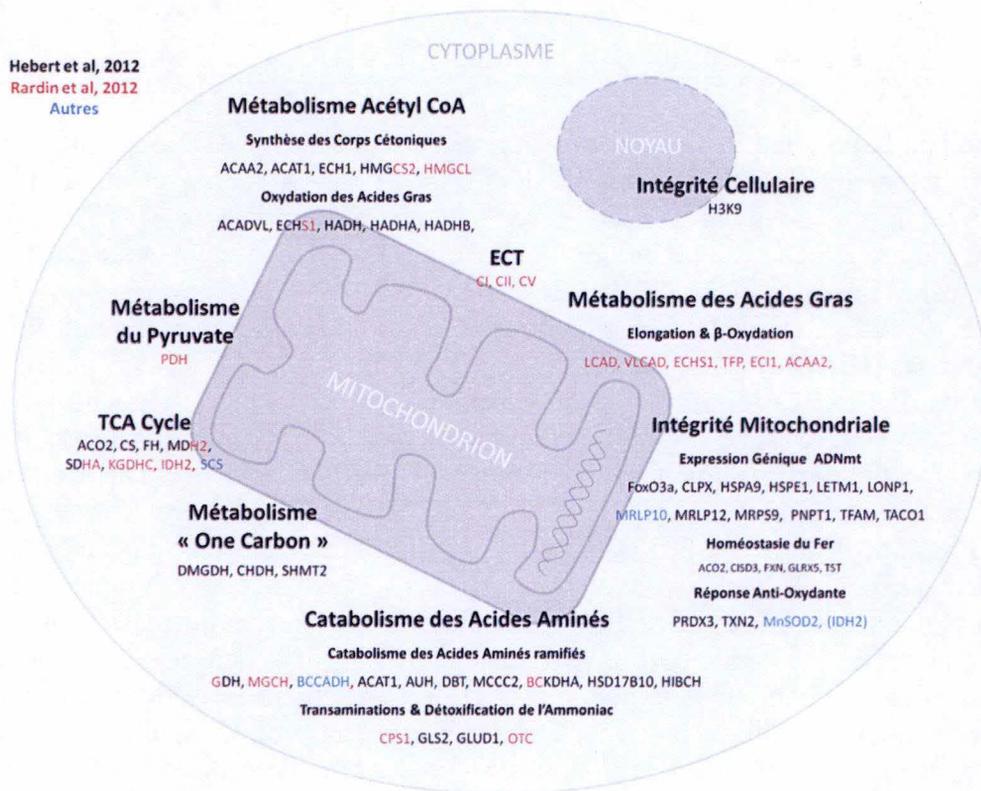


Figure 1.16 : Liste des principales cibles de la Sirt3 clairement identifiées et des nombreux processus cellulaires régulés par l'enzyme.

Réalisé d'après les références disponibles dans le **Tableau Annexe 3**. Les cibles de la Sirt3 identifiées grâce aux deux études protéomiques phares, sont indiquées en couleur selon l'auteur de l'étude (Hebert et al., 2012) (Rardin et al., 2012).

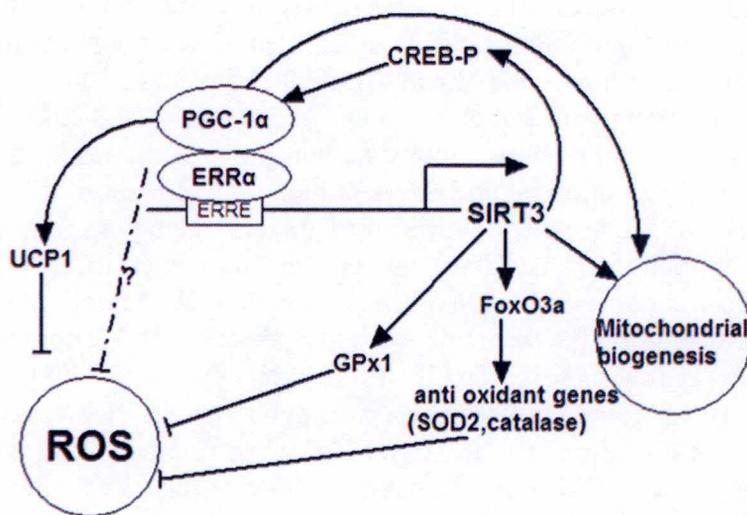


Figure 1.17 : Implication de la Sirt3 dans la protection contre les espèces oxydantes (Kong et al., 2010).

La Sirt3 exerce un effet de protection contre les espèces oxydantes, directement, à travers la régulation de nombreuses cibles, telle que SOD2, et indirectement, grâce à l'activation de facteurs de transcription mitochondriaux tel que FoxO3, responsable de la transcription d'acteurs mitochondriaux, dont certains sont impliqués de la protection oxydante.

murins (MEF) exprimant ou non la Sirt3 (Sol et al., 2012), ou d'hépatocytes murins provenant de souris invalidées ou non pour le gène codant la Sirt3 (Rardin et al., 2013), a notamment permis de suggérer que la moitié du mitoprotéome serait régulée par une désacétylation médiée par la Sirt3. Ces substrats de la Sirt3 sont impliqués dans un vaste panel de processus biologiques sous-jacents à la survie et à l'homéostasie générale de la cellule, en assurant une adaptation aux stress éventuels (oxydatif, énergétique, ...). On trouve ainsi des cibles impliquées dans la régulation de l'expression des gènes nucléaires par son action désacétylante des lysines 9 et 16 des histones **H3** (H3K9) et **H4** (H4K16) et, pour les formes mitochondriales, des facteurs de transcription mitochondriaux (**TFAM**, **FoxO3a**) régulant notamment la biogenèse mitochondriale et l'intégrité mitochondriale. La Sirt3 contrôle également le métabolisme du pyruvate par son activité sur la Pyruvate Déshydrogénase (**PDH**), la β -oxydation des acides gras par sa réaction de désacétylation de la LCAD (Hirschev et al., 2010 ; 2011), l'activité du cycle de Krebs (l'enzyme ciblant l'IDH2, et la MDH2) (Yu et al., 2012 ; Zhao et al., 2010), l'efficacité de la chaîne de transport des électrons mitochondrial et la production d'ATP par son action sur des sous-unités des complexes I, II, III et V, et assure la régulation des défenses anti-oxydantes mitochondriales (**Figure 1.17**) en contrôlant son activité par le degré de désacétylation de la Superoxydes Dismutase 2 (MnSOD ou **SOD2**) sur les lysines 68 (K68) et 122 (K122) (la forme désacétylée étant la forme active de la SOD2) et son expression, par l'intermédiaire de la protéine FoxO3a (Jacobs et al., 2008 ; Tseng et al., 2013). La Sirt3 est donc une enzyme clé dans le contrôle du métabolisme cellulaire et les défenses anti-oxydantes mitochondriales et leur adaptation aux conditions de stress.

1.6. Effets de la Sirt3 sur le métabolisme énergétique

Un point important de la régulation de l'activité enzymatique des cibles métaboliques contrôlée par des désacétylations catalysées par la Sirt3 est que, de manière coordonnée, ces désacétylations favorisent l'oxydation des fuels énergétiques (Ghanta et al., 2011). La désacétylation de ses substrats par la Sirt3 favorise donc généralement l'activation des cibles et le catabolisme énergétique. En effet, parmi les multiples cibles métaboliques de la Sirt3 identifiées à ce jour, une seule semble faire exception à la règle : la malate déshydrogénase 2 (**MDH2**), qui catalyse l'oxydation du malate en oxaloacétate, et semble plus active sous sa forme hyperacétylée (Zhao et al., 2010).

1.7. La Sirt3 : une cible thérapeutique pour contrer l'obésité et le syndrome métabolique ?

C'est tout d'abord contre le vieillissement, au cours duquel la concentration en NAD^+ diminue, limitant ainsi l'activité de nombreuses sirtuines, que la Sirt3 a été envisagée comme cible d'intérêt thérapeutique. En effet, si la Sirt3, ainsi que d'autres homologues de *Sir2* sont reliés à la survie cellulaire, à la longévité de plusieurs espèces telle que le rat (Zeng et al., 2014) et la souris (Kwon et al., 2015) et à la protection de plusieurs maladies associées au vieillissement (Someya et al., 2010 ; Finley et al., 2011 ; Liu et al., 2014), Sirt3 semble être la seule enzyme dont l'activité soit corrélée à une augmentation globale de l'espérance de vie en bonne santé chez l'homme (Bellizzi et al., 2004, 2006 ; Law et al., 2009 ; Sadoshima et al., 2011 ; Albani et al., 2013 ; Kincaid & Bossy-Wetzl., 2013 ; Tao et al., 2014). Cette observation résulte de l'analyse d'un polymorphisme situé au niveau d'une séquence enhancer du promoteur de *SIRT3* (Bellizzi et al., 2005). La corrélation positive entre l'activité de la Sirt3 et l'espérance de vie en bonne santé n'est pas surprenante dès lors que le promoteur (bidirectionnel) de *SIRT3* partage une partie de son locus avec celui du gène *PSMD13* (26S

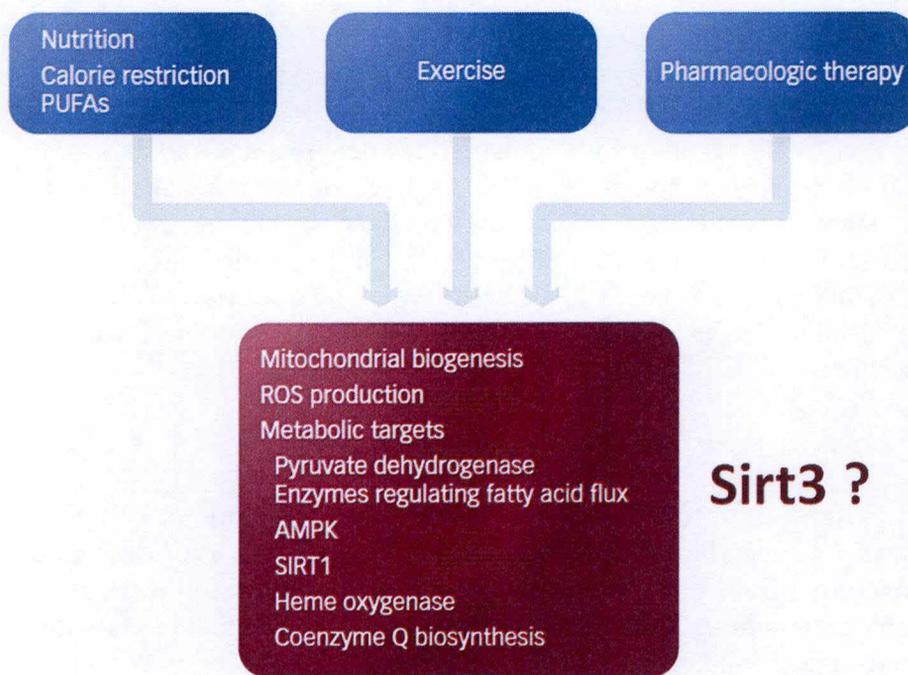


Figure 1.18 : Illustration de la recherche multidisciplinaire en vue d'une prise en charge appropriée de l'obésité et acteurs métaboliques qui pourraient être utilisés comme cibles thérapeutiques (un rôle pour la Sirt3 ?) (Sivitz., 2010).

Proteasome non-ATPase Regulatory Subunit 13), dont le produit est une sous-unité régulatrice du protéasome, un complexe de dégradation protéique (Bellizzi et al., 2006). L'accumulation de nombreux arguments en faveur d'un impact bénéfique de la Sirt3 sur le fonctionnement métabolique de la cellule permet probablement d'expliquer l'effet bénéfique et positif de l'enzyme sur la longévité (Law et al., 2009), observée également chez le rat (Zeng et al., 2014), la souris (Kwon et al., 2015). L'enzyme permet notamment de retarder la perte de l'audition liée à l'âge chez l'animal (Someya et al., 2010) (Zeng et al., 2014). Le mécanisme protecteur serait expliqué par l'action anti-oxydante de la Sirt3 qui passerait par un axe [IDH2 (activée par désacétylation) – NADPH – GSH – ROS], connectant directement le métabolisme énergétique à la protection contre le stress oxydatif (Someya et al., 2010). A travers la régulation de l'ouverture du Mitochondrial Permeability Transition Pore (**mPTP**), la Sirt3 réduirait la libération de molécules pro-apoptotiques, depuis les mitochondries, et la déplétion en ATP consécutive à l'ouverture de ce canal (Sadoshima et al., 2011). Cette action sur la mitochondrie et le contrôle de l'ouverture du mPTP pourrait expliquer la protection du cœur des déficiences liées à l'apoptose et à la nécrose des cardiomyocytes observées au cours du vieillissement (Sadoshima et al., 2011) ainsi que la protection du cerveau des processus neurodégénératifs (Kincaid et al., 2013). De même, une activité de la Sirt3 neuronale, diminuée en réponse à un stress oxydatif occasionné par des troubles du sommeil, pourrait favoriser le développement de processus neurodégénératifs (Fifel et al., 2014). Cette hypothèse est intéressante car il connecte d'une façon atypique l'activité de la Sirt3 au développement de l'obésité dont un facteur de risque maintenant clairement démontré est la privation de sommeil (Schmid et al., 2014). Une autre étude a démontré une forte expression de Sirt3 dans des zones précises du cerveau murin et son augmentation corrélée à l'âge, particulièrement au sein des astrocytes, suggérant un potentiel effet protecteur naturel de la Sirt3 dans certains types cellulaires du cerveau (Sidorova et al., 2011). Il n'est pas non plus surprenant que la Sirt3 exerce également un effet anti-tumoral, à travers son action anti-oxydante et la déstabilisation du facteur HIF1 (Finley et al., 2011 ; Bell et al., 2011). De plus, il a été montré que l'expression de la Sirt3 est diminuée dans les cancers du sein, que la délétion de l'enzyme favorise la transformation cancéreuse de MEF et induit des tumeurs mammaires chez la souris (Kim et al., 2009).

Son action bénéfique sur le métabolisme a rapidement créé la connexion entre la Sirt3 et le métabolisme cellulaire (Ahn et al., 2008). En effet, son effet bénéfique en cas de restriction calorique et/ou d'exercice physique a été démontré (Palacios et al., 2009). Plusieurs équipes ont ensuite pu montrer la participation et les conséquences néfastes de l'inactivation de la Sirt3 en réponse à l'obésité (Green and Hirschey., 2012). En effet, Bao et ses collaborateurs furent les premiers à mettre en évidence une diminution d'expression de la Sirt3 hépatocytaire chez des rongeurs présentant une obésité induite par un régime riche en graisses (Bao et al., 2010). Ces auteurs ont également confirmé *in vitro* l'effet négatif d'une diminution de l'activité de l'enzyme sur la susceptibilité des hépatocytes envers un stress lipidique déclenché par l'ajout d'acide palmitique dans le milieu de culture (Bao et al., 2010). Ces observations ont ensuite été confirmées pour d'autres types cellulaires comme les cellules β -pancréatiques chez l'homme et la souris (Caton et al., 2013) (Lee et al., 2013).

De nombreux autres arguments de l'impact de l'obésité sur la diminution de l'expression et de l'activité de la Sirt3 ont ensuite été rapportés dans la littérature. Par exemple, l'obésité maternelle chez le rat (Borengasser et al., 2011) et dans l'espèce humaine (Boyle et al., 2013) provoque une diminution de l'expression de Sirt3 (chez la mère, liée à l'obésité) chez la descendance (prédisposition). Hirschey et ses collaborateurs mirent également en évidence l'évolution accélérée de l'obésité et ses troubles associés (stéatose hépatique et résistance à l'insuline) chez des souris invalidées pour la Sirt3 traitées avec un HFD (Hirschey et al.,

2011) (Winnik et al., 2014). La sensibilité à l'insuline des cellules musculaires chez les individus obèses est également dépendante de l'activité de la Sirt3 (Jing et al., 2011). Ces données furent également confirmées chez le chat soumis à un régime HFD (Ishikawa et al., 2013).

Ces différentes études ont suggéré un attrait thérapeutique pour cet acteur de la protection cellulaire globale. En effet, il a été précédemment montré qu'une perte de poids chez les patients gravement obèses réactivait l'expression du gène codant la Sirt3 au sein du tissu adipeux et du foie (Moschen et al., 2013). De même, la Berberine, une molécule extraite d'une plante chinoise utilisée en médecine traditionnelle, présente des vertus endiguant l'insulino-résistance en rétablissant le fonctionnement mitochondrial hépatique par un mécanisme dépendant d'une activation de la Sirt3 (Teodoro et al., 2013). Enfin, très récemment, il a été montré que la surexpression de la Sirt3 dans des cellules NT1 (une lignée dérivée de cellules β des îlots de Langerhans pancréatiques), soumises à un stress au palmitate, permet la récupération de la capacité de production de l'insuline (Kim et al., 2015). En résumé, à la vue de ces nombreux effets bénéfiques, la Sirt3 pourrait donc être un marqueur et/ou une cible thérapeutique d'un grand intérêt dans les traitements de patients à des stades avancés du syndrome métabolique (Yu et al., 2015).

Nous avons vu qu'il existe une littérature abondante sur les effets bénéfiques de l'activation de la Sirt3 sur le métabolisme, sur la protection contre les stress oxydatifs, dans une action anti-tumorale, et les effets délétères de sa dérégulation au cours du développement de l'obésité et ce, dans de nombreux modèles animaux et types cellulaires. Cependant, malgré les nombreuses données physiopathologiques obtenues sur la biologie de la Sirt3, on a peu de données disponibles sur la caractérisation du rôle éventuel de l'enzyme au cours de l'adipogenèse. De plus, pas mal de données de la littérature ont été obtenues à partir de modèles d'invalidation de souris. A l'heure actuelle, il n'y a pas non plus de données disponibles sur l'action de la Sirt3 dans des modèles de souris transgéniques permettant la surexpression systémique de la désacétylase ou surexpression conditionnelle dans un tissu donné comme les tissus adipeux. C'est donc pour tenter d'apporter des éléments expérimentaux sur le rôle de la Sirt3 dans l'adipogenèse *in vitro* et pour tester les effets éventuels d'une surexpression du gène codant pour la désacétylase que nous avons entrepris ce travail (**Figure 1.18**).

I.VI OBJECTIFS DU MEMOIRE

Sur base de résultats préliminaires indiquant un probable effet du transgène conditionnel *Sirt3* sur la limitation du développement de l'obésité chez la souris exposée à un régime riche en graisses, nous nous sommes interrogés sur les mécanismes potentiellement sous-jacents à cet effet. La littérature nous a récemment indiqué un rôle potentiel de *Sirt3* dans la différenciation des myoblastes en myocytes (Khalek et al, 2014). Le premier objectif de ce travail consistait à caractériser l'expression du gène codant pour les isoformes de la *Sirt3* au cours de l'adipogenèse des préadipocytes 3T3-L1 (**PARTIE I**).

Le laboratoire d'accueil travaille depuis plusieurs années sur la biologie de l'adipocyte blanc murin soumis au découplage mitochondrial ou stimulé par le $TNF\alpha$, une cytokine pro-inflammatoire abondamment retrouvée dans les tissus adipeux des individus obèses. Ces deux conditions sont connues pour provoquer un dysfonctionnement mitochondrial dans la cellule adipeuse. L'abondance de la *Sirt3* étant diminuée en réponse à un stress mitochondrial, le deuxième objectif de ce travail consistait à rechercher, *in vitro*, les effets du FCCP, un découplant mitochondrial, et du $TNF\alpha$ sur le niveau d'expression de la *Sirt3* dans les adipocytes (**PARTIE II**).

Enfin, le dernier objectif de ce projet consistait à confirmer ou à infirmer l'effet positif de la surexpression de la *Sirt3* dans les tissus adipeux sur l'accumulation de masse des animaux nourris avec un régime riche en graisses. Le modèle utilisé est une colonie de souris transgéniques C57Bl/6J établie par le Dr Eric Bell et caractérisée par T. Arnould au sein du laboratoire du Prof. Leonard Guarente (*Department of Biology, The Paul F. Glenn Center for the Science of Aging, Koch Institute for Integrative Cancer Research, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts, USA*). Notre modèle d'étude est un modèle murin surexprimant conditionnellement la *Sirt3* au sein des tissus adipeux blancs (système Cre-lox). (**PARTIE III**).

II. MATERIEL et METHODES

	Plasmide	Séquence d'intérêt	Vecteur
Plasmides d'intérêt	Plasmides utilisés pour étudier la répression de l'expression de la Sirt3 sur la différenciation des 3T3-L1		
	Ctrl	5' – GGGTGAACCTCACGTCAGAA – 3'	Ctrl siRNA Lentivirus Vector [ABM, # LV015-G, CANADA]
	61	5' – GGCCTCTACAGCAACCTTCAGCAGTATGA – 3'	pLenti-siRNA-GFP [ABM, # i043924, CANADA]
	245	5' – GGCTCTATACACAGAACAT – 3'	
	370	5' – AGACATATGGGCTGATGTGATGGCGGACA – 3'	
	500	5' – TCGCTTTGGCAGATCTGCTACTCATTCTT – 3'	
	Plasmide utilisé pour étudier la surexpression de la Sirt3 chez les 3T3-L1		
	Sirt3	pSLIK-Hygro Tetracycline inducible (Tet-On) Lentivirus Vector [ADDGENE, USA]	
LV	Core		pMD2.G
	Eneveloppe		pPAX

Tableau 2.1 : Description des vecteurs de transfection utilisés pour la production de lentivirus

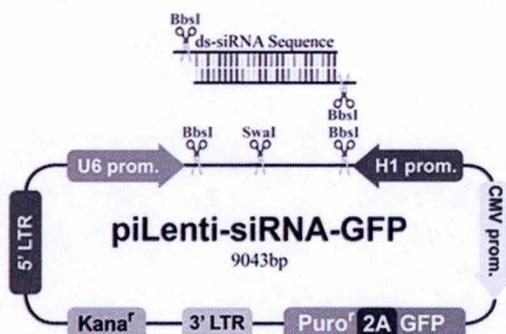


Figure 2.2 : Description du vecteur utilisé pour induire l'expression des siARN au sein des 3T3-L1

L'expression de l'ARN interférant (siARN), dont le fragment d'ADN est intégré au vecteur grâce aux sites de restriction BbsI, est conduite grâce au promoteur U6. Deux gènes de résistance à la kanamycine et à la puromycine sont présents dans le vecteur afin de sélectionner les bactéries transformées pour amplifier plasmide et les 3T3-L1 transduits, respectivement. Le gène de la GFP, dont l'expression est conduite par le promoteur fort du CMV y est également intégré pour servir de contrôle final de la transduction.

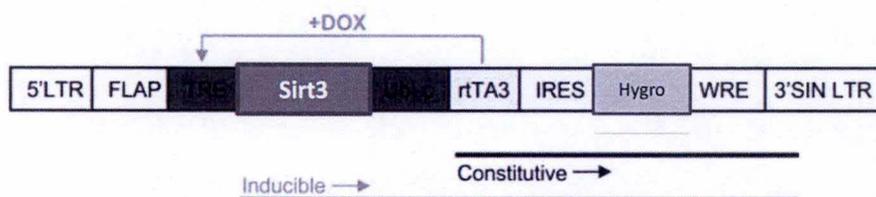


Figure 2.3 : Description du vecteur utilisé pour induire la surexpression de Sirt3 au sein des 3T3-L1

La surexpression de la Sirt3, dont la séquence d'ADN est intégrée au vecteur pSLIK-Hygro Tetracycline inducible (Tet-On) grâce à des sites de restriction AtrI (non présenté), est rendue inducible par une exposition au dérivé de la tétracycline (doxycycline). Un gène de résistance à l'hygromycine est présent dans le vecteur afin de sélectionner les 3T3-L1 transduits (*Adapté de Shin et al., 2006*).

Manipulations In Vitro

2.1 Culture et différenciation cellulaires

Les adipoblastes murins 3T3-L1 (3T3-L1) sont achetés à l'American Type Culture Collection [ATCC, #CL-173, USA] et maintenus dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle's with High Glucose (4,5 g/L) (DMEM-HG) supplémenté d'1,5 g/l de NaHCO₃ (DHG-L1) et de 10 % de Sérum Bovin Fœtal (FBS) [GIBCO – Life technologies, USA] (DHG-L1+10 % FBS) dans une atmosphère humide à 37 °C conditionnée à 5 % de CO₂. Les cellules sont repiquées à sous-confluence (70 %), dans des boîtes de culture de 25 cm² (T25) ou des plaques de culture à 6 puits [CORNING, USA] puis maintenues jusqu'à confluence (jour 0, J0), un état nécessaire à la différenciation. Les repiquages sont effectués en passant les cellules à une dilution de 1/2 tous les 2-3 jours.

La différenciation cellulaire des préadipocytes en adipocytes est induite lorsque les cellules ont atteint la confluence, après 3 jours post-repiquage, et sont ensuite incubées pendant 48 h en présence de milieu DHG-L1+10 % FBS contenant un cocktail hormonal de différenciation consistant en du dibutyryl-AMP cyclique à 300 µM (db-AMPC) [SIGMA, USA], de dexaméthasone à 1 µM [SIGMA, USA] et de 5 µg/ml d'insuline [SIGMA, USA]. Le milieu de culture est rafraîchi tous les 2 jours avec du DHG-L1 contenant 10 % de FBS et d'insuline à 5 µg/ml, pendant les 10 jours suivants de la différenciation. Les préadipocytes sont maintenus simultanément dans le milieu DHG-L1 contenant 10 % de FBS. Selon l'objectif de l'expérience, les cellules différenciées sont ensuite incubées pendant 3 ou 6 jours supplémentaires en présence ou non de carbonyl cyanide - 4 - (trifluorométhoxy) phenylhydrazone (FCCP) à 0,5 µM [SIGMA, USA] ou de TNFα à 10 ng/ml [R&D SYSTEM, USA] dilués dans du DHG-L1+10 % FBS. Les milieux de culture sont renouvelés toutes les 24 h et les adipocytes non traités sont quant à eux maintenus dans le milieu minimal DHG-L1 +10 % FBS, également renouvelé tous les 3 jours.

2.2 Modulations de l'expression de la Sirtuine 3 par transduction lentivirale

2.2.1 Production des plasmides d'intérêt

Les plasmides, porteur du gène de résistance à l'ampicilline ou à la kanamycine sont amplifiés par transformation de bactéries DH10B CaCl₂ compétentes (Ausubel et al., 1994) par choc thermique (Ausubel et al., 1995). 50 ng d'ADN exogène sont mélangés à 100 µl de bactéries compétentes, placés 10 min à 4 °C, 2 min à 42 °C, puis 300 µl de milieu Luria Bertani (LB Broth) [MILLER, USA] 2 % dilués dans de l'eau et autoclavés sont ajoutés et placés 30 min à 37 °C. Au terme de l'incubation, le contenu est étalé sur un milieu LB Broth solide préparé avec de l'agar 2 % [DIFCO, USA] et l'antibiotique à 100 µg/ml, et laissé 16 h à 37 °C. Le lendemain, quelques clones sont prélevés, dilués dans 2 ml de milieu LB Broth + 100 µg/ml d'antibiotique, et incubés 6 h à 37 °C sous agitation permanente. Ils sont ensuite mélangés dans 130 ml du milieu LB + antibiotique et incubés 16 h à 37 °C sous agitation, pour assurer la prolifération bactérienne et l'amplification des plasmides. Les plasmides sont ensuite purifiés à l'aide du kit Plasmid Plus Maxi Kit [QIAGEN, Allemagne], selon les recommandations du fournisseur et l'absorbance des acides nucléiques de l'échantillon est enfin lue au NanoDrop-1000 Spectrophotometer [THERMO SCIENTIFIC, USA]. Le détail des plasmides utilisés est disponible dans le **Tableau 2.1** ainsi qu'aux **Figures 2.2** et **2.3**.

2.2.2 Préparation des particules virales

Des cellules HEK (Human Embryonic Kidney) 293T (transformées par le virus SV40) [ATCC, USA] sontensemencées à raison de 2.10^6 cellules dans des boîtes de culture de 75 cm^2 (T75) dans du milieu DMEM-HG contenant du L-Glutamate (2 mM) [THERMO SCIENTIFIC, USA] et 10 % FBS. Un « Mix de Transfection » composé d'un mélange de 4 vecteurs (le vecteur d'intérêt et 3 vecteurs de construction lentivirale) ($4 \mu\text{g}$ de chaque vecteur/ T75) est ajouté à $16 \mu\text{l}$ de Lipofectamine 2000 Reagent [INVITROGEN – Life Technologies, USA] par T75 dilués dans $240 \mu\text{l}$ d'Opti-MEM I Reduced Serum Medium [THERMO SCIENTIFIC, #31985, USA]. La formation des complexes de transfection est réalisée par une incubation de 30 min à température ambiante. Le milieu des cellules d'empaquetage HEK293T est remplacé par 15 ml de milieu frais lorsque les cellules atteignent 50 % de confluence. Elles sont ensuite transfectées à l'aide du mélange ADN-Lipofectamine pendant 24 h. Le lendemain, le milieu DMEM-HG contenant 10 % FBS est collecté et centrifugés 5 min à 200 g avant d'être conservé à $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Une partie des particules lentivirales sont enfin titrées à l'aide du kit Lentivirus qPCR Titer Kit [ABM, #LV900, Canada] tandis que le reste du milieu est aliquoté et stocké à $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ jusqu'à son utilisation pour la transduction des adipocytes.

2.2.3 Transduction des adipocytes

Des préadipocytes 3T3-L1, à passage 7, sontensemencés à raison de 100 000 cellules en boîtes de culture de 75 cm^2 (T75). Le milieu contenant les lentivirus a été ajouté pour qu'une MOI (multiplicity of infection) de 10 soit atteinte, et à cette fin, a été complété de milieu DHG-L1+10 % FBS pour atteindre 15 ml / boîte. Après 24 h, ce milieu a été remplacé par du milieu frais supplémenté de 850 ng/ml d'hygromycine ou $2 \mu\text{g/ml}$ de puromycine, selon le vecteur d'intérêt (voir **Figures 2.2** et **2.3**), afin de sélectionner les cellules ayant intégré le plasmide de façon stable dans leur génome. L'incubation est prolongée pendant 3 jours, jusqu'à ce que toutes les cellules contrôles (non transduites) meurent. Le milieu est alors remplacé à son tour par du milieu classique DHG-L1+10 % FBS jusqu'à ce que les cellules sélectionnées atteignent $\sim 90 \%$ de confluence. Les cellules sont ensuite décrochées et soit congelées à $-70 \text{ }^\circ\text{C}$, soit utilisées directement pour tester l'impact du plasmide sur la différenciation des 3T3-L1. Dans ce but, les cellules sontensemencées en plaques de culture à 6 puits, jusqu'à confluence, et différenciées ou non selon le protocole détaillé dans le point 2.1. L'étude de l'effet d'une surexpression de Sirt3 exploite un plasmide dont l'expression est dépendante de l'inducteur doxycycline. Dans ce cas, le milieu de culture DHG-L1 a été supplémenté de 10 % de sérum dépourvu de tétracycline [CLONTECH, USA] afin d'éviter une éventuelle induction « naturelle » par le sérum et également enrichi, ou non, de doxycycline à $1 \mu\text{g/ml}$ durant les 6 premiers jours de la différenciation.

2.3. **Observation des cellules au microscope à contraste de phase**

Les micrographies de cellules présentées dans ce travail ont été acquises à l'aide d'un microscope à contraste de phase Labovert FS [LEITZ, Allemagne] et d'une caméra numérique FireWire [LEICA, #DGC290, Allemagne] combinée au logiciel Leica FireCam.

<i>ARNm d'Intérêt</i>	<i>Séquence des Amorces Forward</i>	<i>Séquence des Amorces Reverse</i>
Sirtuine 3 – isoforme 1	5'-GGTCCTCTGAAACCGGATGG-3'	5'-CCACACAGAGGGATATGGGC-3'
Sirtuine 3 – isoforme 2	5'-GATTCGGATGGCGCTTGACC-3'	5'-CACCTGTAACACTCCCGGAC-3'
Sirtuine 3 – isoforme 1, 2, 3	5'-CATCCCGGACTTCAGATCCC-3'	5'-AAGATGGCTTCAGGGTACGG-3'
Leptine	5'-GATCCACGTGCCACAGTCT-3'	5'-GGAACAAGCCATAGTGAAGGT-3'
Adiponectine	5'-TGGCTTTCTTCTCTACCATGATACC-3'	5'-TAAGCTGAAAGTGTGTCTGACTGTTC-3'
TFIID / TBP	5'-CACAAGGCCTTCCAGCCTTA-3'	5'-CAGAGGAGCCAAGAGTGAAGA-3'

Tableau 2.2 : Séquences des amorces utilisées en RT-qPCR

<i>Composants</i>	<i>Concentrations</i>	<i>Volumes</i>
Eau Milli-Q	-	2,5 µl
Amorce Forward	3 µM	2,5 µl
Amorce Reverse	3 µM	2,5 µl
SYBR® Select Master Mix avec l'AmpliTaQ® DNA Polymerase	2X	12,5 µl
20 ng d'ADNc dilués dans de l'eau Milli-Q	10X	5,0 µl
TOTAL	-	25,0 µl

Tableau 2.3 : Composition de la mixture réactionnelle utilisée en RT-qPCR

Description	Holding		Cycling Stage			
	ACTIVATION	AMPLIFICATION (40 Cycles)			MELT CURVE	
	Dénaturation	Dénaturation	Elongation	Dénaturation	Elongation	Melting
T°	95°C	95°C	60°C	95°C	60°C	95°C
Durée	10 min	15 s	1 min	15 s	15 s	15 s

Tableau 2.4 : Paramètres de la RT-qPCR

2.4. Analyse d'expression de gènes par PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR)

2.4.1 Extraction de l'ARN Total

Les tapis de cellules 3T3-L1 (quelques soit la condition : différenciée ou non, traitée ou non, en T25 ou P6P) sont rincés 2 X au PBS (Phosphate Buffer Saline) stérile à 4 °C [LONZA, Suisse] et sont lysés dans 1 ml de QIAzol Lysis Reagent [QIAGEN, Allemagne]. Le lysat cellulaire est homogénéisé dans un microtube RNase-free [EPPENDORF, Allemagne]. Après 5 min d'incubation à température ambiante, 200 µl de Chloroforme [MERCK MILLIPORE, USA] sont ajoutés à l'échantillon qui est ensuite vortexé 30 s, puis incubé pendant 3 min à température ambiante avant d'être centrifugé pendant 15 min à 12000 g (4°C). Un volume de 600 µl de la phase supérieure est transféré dans un tube Safe-Lock Micro Test Tube de 2 ml [EPPENDORF, Allemagne]. L'ARN total est ensuite purifié grâce au système automatisé QIAcube [QIAGEN, Allemagne] selon le protocole [ID3368] joint au kit RNeasy Mini Kit [QIAGEN, Allemagne], puis collecté dans un microtube et conservé à -70 °C.

2.4.2 Reverse Transcription

La concentration en ARN de l'échantillon est quantifiée à l'aide du NanoDrop-1000 Spectrophotometer. Un volume correspondant à une quantité de 2 µg d'ARN total est dilué dans 12 µl d'eau RNase-free provenant du kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit [ROCHE, Suisse] utilisé pour effectuer la rétro-transcription selon le protocole recommandé par la firme. Les échantillons d'ARN dilués sont supplémentés d'1 µl d'OligodT et placés 10 min à 65 °. 7 µl de cDNA Master Mix [ROCHE, Suisse], contenant, par condition, 4 µl de tampon de RT 5 X concentré, 2 µl de dNTPs 10 nM, 0,5 µl d'inhibiteurs des RNAses et 0,5 µl de Reverse Transcriptase, sont ajoutés aux 13 µl des échantillons pour atteindre un volume final de 20 µl, qui sont placés successivement à 55 °C pendant 30 min et à 85 °C pendant 5 min afin d'autoriser la polymérisation puis l'inhibition de l'activité de la polymérase, respectivement. Les ADNc sont ensuite stockés à -20 °C.

2.4.3 PCR quantitative en temps réel

Les échantillons d'ADNc sont dilués 10 X dans de l'eau Milli-Q et un volume de 5 µl est utilisé comme template pour la quantification. Les amorces d'intérêt [INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES] (**Tableau 2.2**), stockées à une concentration de 27 µM, sont également diluées dans de l'eau Milli-Q pour atteindre une concentration intermédiaire de 3 µM, dont 2,5 µl sont ensuite ajoutés à la mixture réactionnelle atteignant une concentration finale de 0,3 µM (**Tableau 2.3**). La composition de la mixture réactionnelle est détaillée dans le **Tableau 2.6**. Les échantillons sont chargés sur une plaque MicroAmp Fast 96 Well Reaction Plate [LIFE TECHNOLOGIES, USA] et insérés dans un StepOnePlus RT-PCR System Thermal Cycling Block [LIFE TECHNOLOGIES, USA] dont le protocole est détaillé dans le **Tableau 2.4**. Les résultats sont calculés sur base de la méthode des $\Delta\Delta C_t$ obtenus, normalisés pour le housekeeping gene codant pour le Transcription Factor II D/TATA-Box Binding Protein (TFIID/TBP) (Livak and Schmittgen, 2001). Les résultats sont exprimés en proportion (pourcentage ou fold d'induction) de la condition contrôle.

	Préadipocytes	Adipocytes Différenciés
T25 (25 cm ²)	150 µl	300 µl
6WP (10 cm ²)	75 µl	150 µl

Tableau 2.5 : Ajustement du volume de tampon de lyse à la quantité de cellules

2.5 Analyse d'abondances protéiques par Western blotting

2.5.1 Préparation de lysats cellulaires totaux

Les cellules sont ensemencées et différenciées en boîtes de cultures de 25 cm² (T25) ou en plaques à 6 puits (10 cm²) (P6P) qui, au terme des incubations sont rincées deux fois avec 5 ml ou de 2 ml PBS (Phosphate Buffer Saline) (KH₂PO₄ 100 mM, K₂HPO₄ 0,4 M, NaCl 150 mM) à 4 °C. Deux types d'extraction ont été réalisées (précisées pour chaque résultat) à l'aide (a) d'un tampon de lyse « classique » (Tris-HCl 20 mM; pH 7,4, KCl 150 mM, EDTA 1 mM) contenant 1% de Triton X-100 [SIGMA, USA], un cocktail inhibiteur de protéases à 4 % [ROCHE, Suisse] et un tampon inhibiteur de phosphatases (PIB) (4% d'une solution contenant : Na₃VO₄ 25 mM [SIGMA, USA], 4-nitrophényl-phosphate-di(tris)-salt 250 mM [SIGMA, USA], β-glycérophosphate 250 mM [VWR, USA], NaF 125 mM [MERCK MILLIPORE, USA]) ou (b) d'un puissant tampon de lyse « DLA-Mito » (urée 7 M [MERCK MILLIPORE, USA], thiourée 2 M [SIGMA, USA], CHAPS 1 % [SIGMA, USA], ASB14 1 % [SIGMA, USA], Tris 30 mM ; SDS [MP BIOMEDICALS, USA] ; pH 8,5). Ce 2nd tampon a été utilisé pour extraire efficacement les protéines contenues au sein des organites cellulaires et pouvoir ainsi tenter de rechercher l'activité de la Sirt3 à travers l'acétylation de substrats mitochondriaux. Les étapes du protocole exploitant un lysat classique sont réalisées à 4 °C tandis que celles au DLA-Mito sont réalisées à 12 °C, car certains composés du 2nd tampon, le SDS et de l'urée, respectivement, risquent la précipitation en dessous de 10 °C ou au-delà de 25 °C. Les cellules sont lysées pendant 30 min (en maintenant une agitation rotative sur roue à 4 °C ou sur Thermocycler à 12 °C) dans un volume de tampon de lyse adapté au contenant et aux conditions PA et DIFF (**Tableau 2.5**). Les lysats sont ensuite centrifugés pendant 15 min à 13000 rpm [EPPENDORF, Centrifuge 5415R, Allemagne] pour culoter le matériel insoluble au tampon de lyse. La phase comprise entre le matériel insoluble et la phase lipidique est ensuite prélevée, aliquotée et stockée à -70 °C. Certaines étapes des protocoles qui vont suivre sont propres à une extraction au tampon de lyse classique ou au tampon DLA-Mito et seront discriminées en (a) et (b), respectivement.

2.5.2 Dosage Protéique

La concentration en protéines des échantillons est quantifiée (a) avec le Pierce BCA Protein Assay Kit [PIERCE – THERMO SCIENTIFIC, #23227, USA] ou (b) avec le Pierce Protein Assay Kit [PIERCE - THERMO SCIENTIFIC, #22660, USA] et l'Ionic Detergent Compatibility Reagent for Pierce [THERMO SCIENTIFIC, #22663, USA]. Un volume de (a) 25 µl ou (b) 10 µl d'une dilution (a) 10 X dans le tampon de lyse ou (b) 4 fois dans de l'eau Milli-Q et disposés sur une plaque à 96 puits [GREINER, Allemagne]. Chaque échantillon est dosé en duplicat. Un blanc, complètement composé (a) de tampon de lyse ou (b) d'eau Milli-Q est également préparé en duplicat. Un volume de (a) 200 µl ou (b) de 150 µl du réactif Pierce approprié est ensuite ajouté et laissé à incuber pendant (a) 30 min et (b) 5 min à l'obscurité. Au terme de l'incubation, l'absorbance est mesurée à (a) 570 nm ou (b) à 660 nm, au spectrophotmètre (xMark Microplate Absorbance Spectrophotometer) [BIORAD, USA]. La concentration est déterminée à l'aide d'une droite d'étalonnage établie à partir de concentrations connues (0-2 mg/ml) d'un étalon constitué d'albumine sérique bovine (BSA) [PIERCE - THERMO SCIENTIFIC, #23210, USA].

	<i>Nom Complet de la Protéine</i>	<i>Abréviation</i>	<i>PM</i>	<i>Espèce d'Origine</i>	<i>Type d'Anticorps</i>	<i>Référence</i>
Protéines d'intérêt	Sirtuine 3	Sirt3	28 kDa	Lapin	IgG Monoclonal	[CELL SIGNALING, USA]
	Super Oxyde Dismutase 2 – Forme Totale	SOD2T	24 kDa	Lapin	IgG Polyclonal	[MERCK MILLIPORE, USA]
	Super Oxyde Dismutase 2 – Forme Acétylée	SOD2-K68	25 kDa	Lapin	IgG Monoclonal	[ABCAM, ROYAUME-UNIS]
CTL	Tubuline α	Tub- α	55 kDa	Souris	IgG Monoclonal	[SIGMA, USA]

Tableau 2.6 : Listing des anticorps utilisés en Western Blot

2.5.3 Western blotting

Un volume de chaque échantillon correspondant à 10-25 µg, spécifié pour chaque résultat dans les légendes des figures, est dilué dans un volume total de 30 µl ou 15 µl de (a) tampon de lyse ou (b) d'eau Milli-Q, contenant du bleu de charge dilué 5 fois (Tris-HCl 0,143 M, pH 8,0; SDS 0,2 M ; β-mercaptoéthanol 2 M ; glycérol 25 % ; bleu de bromophénol 0,75 mM). Les échantillons sont chauffés 5 min à 100 °C pour dénaturer les protéines et centrifugés 2 min à 13,00 rpm [EPPENDORF, MiniSpin, Allemagne]. Un volume de 5 µl du marqueur de poids moléculaire SeeBlue Plus2 Pre-Stained Protein Standard [INVITROGEN - Life Technologies, USA] et 30 µl ou 15 µl des échantillons sont chargés dans les puits d'un gel Polyacrylamide Precast Gel 4-15 % ou 12 % [BIORAD, USA] fixé dans une cuve d'électrophorèse remplie de tampon d'électrophorèse (Tris-HCl 0,25 M, pH 8,5 ; glycine 1,92 M, SDS 35 mM). La migration des échantillons est réalisée à 150 V pendant 45 min. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de PVDF (Immobilon-FL) 0,45 µm [MERCK MILLIPORE, USA] préalablement incubée pendant 1 min dans du méthanol 100 % puis pendant 10 min dans un tampon de transfert (Bicine 25 mM [SIGMA, USA], Bis-Tris 25 mM [SIGMA, USA] ; pH 7,4, EDTA 1,025 mM [MERCK MILLIPORE, USA], 4-chloro-1-butanol 0,05 mM [SIGMA, USA], méthanol 10 % [ACROS ORGANICS, USA]). Au terme de la résolution électrophorétique, le gel est plongé pendant 10 min dans ce tampon de transfert. Un montage de transfert est assemblé selon le schéma suivant (de bas en haut) : [Eponge – 2 Papiers Whatman [MACHEREY-NAGEL, #742111, Allemagne] – Membrane – Gel – 2 Papiers Whatman – Eponge] humidifié avec du tampon de transfert. Un transfert semi-sec des protéines du gel sur la membrane est réalisé à 1 mA/cm² pendant 2 h. La membrane est ensuite bloquée pendant 1 h à température ambiante dans le tampon Odyssey Blocking Buffer [LICOR, USA], dilué 2 fois dans du PBS, et incubée pendant 16 h à 4 °C ou pendant 1 h à température ambiante avec un anticorps primaire (**Tableau 2.6**) IgG anti-protéine murine d'intérêt, dilué (1000 X pour l'immuno-détection des protéines d'intérêt et 10 000 X pour l'immuno-détection des protéines utilisées pour le contrôle de charge) dans le tampon Odyssey Blocking Buffer contenant 0,1 % de Tween-20 [BIORAD, USA]. La membrane est rincée 4 fois 5 min dans du PBS contenant 0,1% de Tween-20 (PBS-Tween), et mise en présence des anticorps secondaires conjugués à un fluorochrome pendant 1 h à température ambiante [LICOR, IR-DYE 800 et 680nm, USA] (**Tableau 2.6**). Ces anticorps secondaires sont dilués 10 000 X dans le tampon Odyssey Blocking Buffer contenant 0,1 % de Tween-20. La membrane est finalement rincée 4 fois 5 min dans du PBS-Tween et 3 fois 5 min avec du PBS avant d'être séchée pendant 30 min à 37 °C et scannée à l'aide d'un scanner LICOR [LICOR, USA] pour révéler l'abondance des protéines. Les intensités de fluorescence des signaux correspondant aux protéines d'intérêt sont ensuite normalisées par l'intensité des signaux de fluorescence obtenus pour l'immuno-détection d'un contrôle de charge.

2.6 Estimation du contenu en triglycérides (TG)

2.6.1 Coloration des lipides neutres à l'Oil Red O (ORO)

Les monocouches de préadipocytes, différenciés ou non dans des plaques de culture à 6 puits (CORNING, USA), sont rincées dans 2 ml de PBS à 37 °C. Les cellules sont ensuite fixées pendant 15 min avec 800 µl de PBS contenant du paraformaldéhyde 4 % (PFA 4%) [MERCK MILLIPORE, USA]. Elles sont alors rincées 2 fois avec 2 ml de PBS et incubées pendant 30 min en présence de 800 µl d'une solution de colorant ORO composée de 3/5 d'Oil Red O 0,2 % [SIGMA, USA] dilué dans l'isopropanol [MERCK MILLIPORE, USA] et de 2/5 de dextrine d'amidon de maïs 1 % [SIGMA, #31410, USA] diluée dans de l'eau MilliQ. Au

terme de l'incubation la solution ORO est décantée, les cellules sont rincées 3 fois avec 2 ml de PBS et des micrographies des tapis cellulaires sont prises au microscope à contraste de phase (voir point 3). Le colorant fixé par les lipides est alors solubilisé pendant 30 min dans 800 μ l d'éthanol 100 % et l'absorbance est mesurée à 490 nm sur des aliquots de 250 μ l de solution distribuées dans une plaque à 96 puits [GREINER BIO-ONE, Autriche] au spectrophotomètre (xMark Microplate). Un blanc est constitué de 3 puits vides qui subissent également toutes les étapes de ce protocole et dont la moyenne est soustraite aux valeurs obtenues pour les échantillons.

2.6.2 Marquage de l'ADN à l'iodure de propidium (IP)

Afin de normaliser le contenu lipidique par la quantité de cellules présentes dans les puits, les cellules sont ensuite rincées au PBS puis incubées pendant 30 min (à l'obscurité) dans 1 ml d'une solution d'iodure de propidium à 10 ng/ml [SIGMA, USA] diluée dans du PBS. La fluorescence émise par cet agent intercalant de l'ADN est mesurée à 612 nm (émission) après excitation des tapis cellulaires à 518 nm grâce à un Fluoroskan Ascent Microplate Fluorometer [THERMO SCIENTIFIC, USA]. Les 3 puits vides constituant le blanc et réalisés lors de la coloration ORO subissent également toutes les étapes de ce protocole et leur moyenne est soustraite aux valeurs obtenues pour les échantillons.

Type de PCR	Amorce	Séquence
Cre Recombinase	Forward	5' - CGATGCAACGAGTGATGAGGTTTC - 3'
	Reverse	5' - GCACGTTCCACGGCATCAAC - 3'

Tableau 2.7 : Séquences des amorces utilisées pour effectuer les génotypages « CRE »

	AdipoSirt3 (40 cycles)		
	Hybridation	Elongation	Dénaturation
T°	94 °C	55 °C	72 °C
Durée	30 s	30 s	45 s

Tableau 2.8 : Paramètres PCR pour les Génotypages AdipoSirt3

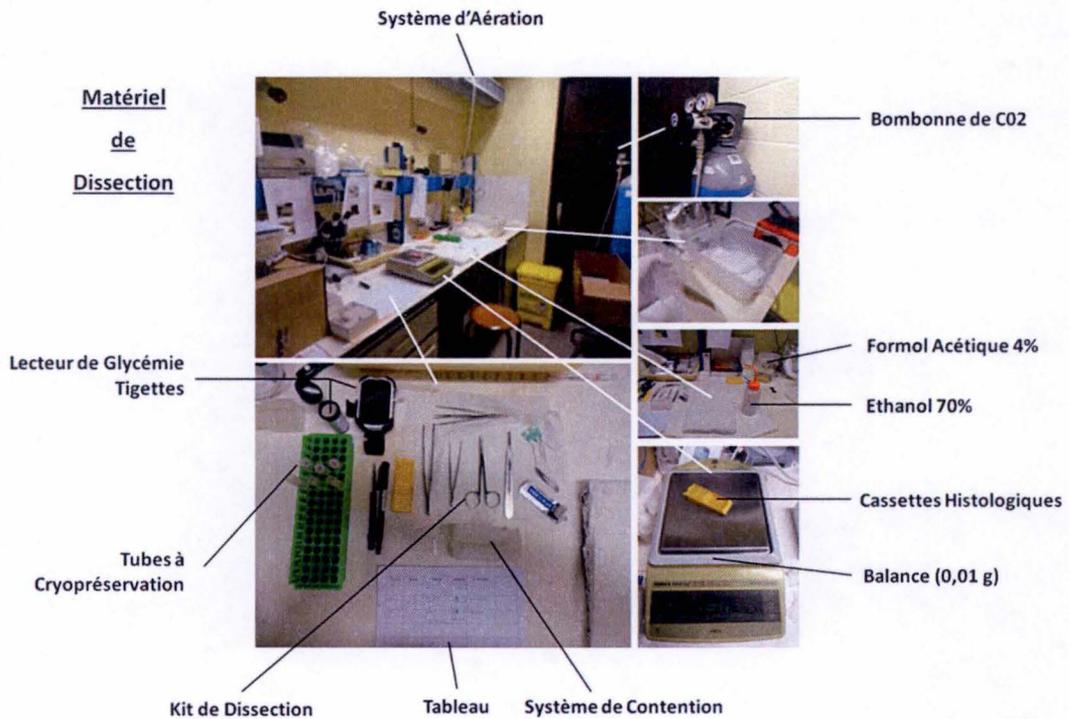


Figure 2.3 : Matériel de dissection

Manipulations In et Ex Vivo

2.7 Modèle murin transgénique pour la Sirtuine 3, spécifiquement surexprimée dans les tissus adipeux

L'élevage et la production des animaux du protocole expérimental visant à exposer les souris à un régime riche en graisse (60 %) ont été réalisés à partir de 8 souris C57Bl/6J transgéniques générées par le Dr. Eric Bell (MIT) et caractérisées par le Pr Thierry Arnould au cours d'un travail préliminaire (2013-2014) au sein du laboratoire du Pr L. Guarente, (Directeur du Glenn Lab for the Science of Aging, dépendant du Koch Institute for Integrative Cancer Research, MIT, Cambridge, USA).

2.7.1 Elevage des souris et protocole expérimental visant à induire l'obésité des souris

Les animaux sont amplifiés en suffisance pour perpétuer l'élevage et produire les animaux de protocoles. Généralement, un couple mâle-femelle est laissé pour accouplement 2 semaines, et ensuite séparé en attendant la mise bas. Les petits sont sevrés à l'âge de 4 semaines (adapté à la taille de la portée), taggés et un morceau d'oreille est prélevé pour génotyper l'animal. Les animaux sont nourris ad libitum : ceux d'élevage avec un régime classique pauvre en graisses [RESEARCH DIETS, #D12450J, USA] tandis que ceux engagés dans le protocole à l'âge de 5 semaines sont nourris, dès le sevrage, avec un régime High Fat Diet (HFD) [RESEARCH DIETS, # D12492, USA] et suivis pendant 16 semaines. Une quantité de 40 g d'aliments HFD par souris est disposée de façon hebdomadaire afin que les animaux soient nourris ad libitum.

2.7.2 Génotypages

2.7.2.1 Extractions d'ADN - Un morceau d'oreille est récolté pour chaque animal au moment du sevrage (4 semaines) et de la queue après sacrifice (21 semaines). Deux protocoles d'extraction d'ADN ont été suivis au cours de ce projet. **(a)** Une extraction d'ADN a été réalisée en lysant l'échantillon d'oreille dans 30 µl de tampon de lyse alcalin (NaOH 25 mM, EDTA 0,5M [MERCK MILLIPORE, USA]) pendant 40 min à 95 °C. Le pH est ensuite neutralisé en ajoutant 30 µl de tampon de neutralisation (Tris-HCl 40 mM ; pH 8). Les échantillons sont stockés à -20 °C après avoir été rapidement vortexés et spinnés. **(b)** Pour chaque animal, une extraction d'ADN à partir d'échantillons de queue a ensuite été entreprise pour vérifier le génotypage. Les échantillons de queue sont plongés dans 200 µl de tampon de Lyse (Tris-HCl 10 mM ; pH8,0, KCl 50 mM, Tween-20 1 %) et chauffés pendant 5 min à 95 °C puis incubés pendant 16 h à 55 °C avec 10 µl de Protéinase K [SIGMA, #P6556, USA]. Le lendemain, la Protéinase K est inhibée à 95 °C pendant 5 min et les échantillons sont centrifugés pendant 10 min à 18000 g. Ils sont enfin stockés à -20 °C.

2.7.2.2 PCR - Les séquences des amorces utilisées pour l'amplification PCR sont répertoriées dans le **Tableau 2.7**. La composition de la mixture réactionnelle PCR, reprise ci-dessous, indique les volumes des composants pour un échantillon préparé dans un tube EU 0,2 ml Thin-Wall 8-Tubes Strip [BIOPLASTICS, Pays-Bas] : 16,65 µl d'eau RNase-free [QIAGEN, Allemagne] (pour 2 amorces), 2,5 µl de tampon de réaction PCR 10 X [INVITROGEN – Life technologies, USA], 1,25 µl de chaque amorce (0.5 µM), 0,75 µl de MgCl₂ 50 mM [INVITROGEN – Life technologies, USA], 0,5 µl d'un Mix de dNTP 10 mM [PROMEGA, USA] et 0,1 µl de Taq DNA Polymerase Recombinant à 5U/µl [INVITROGEN – Life

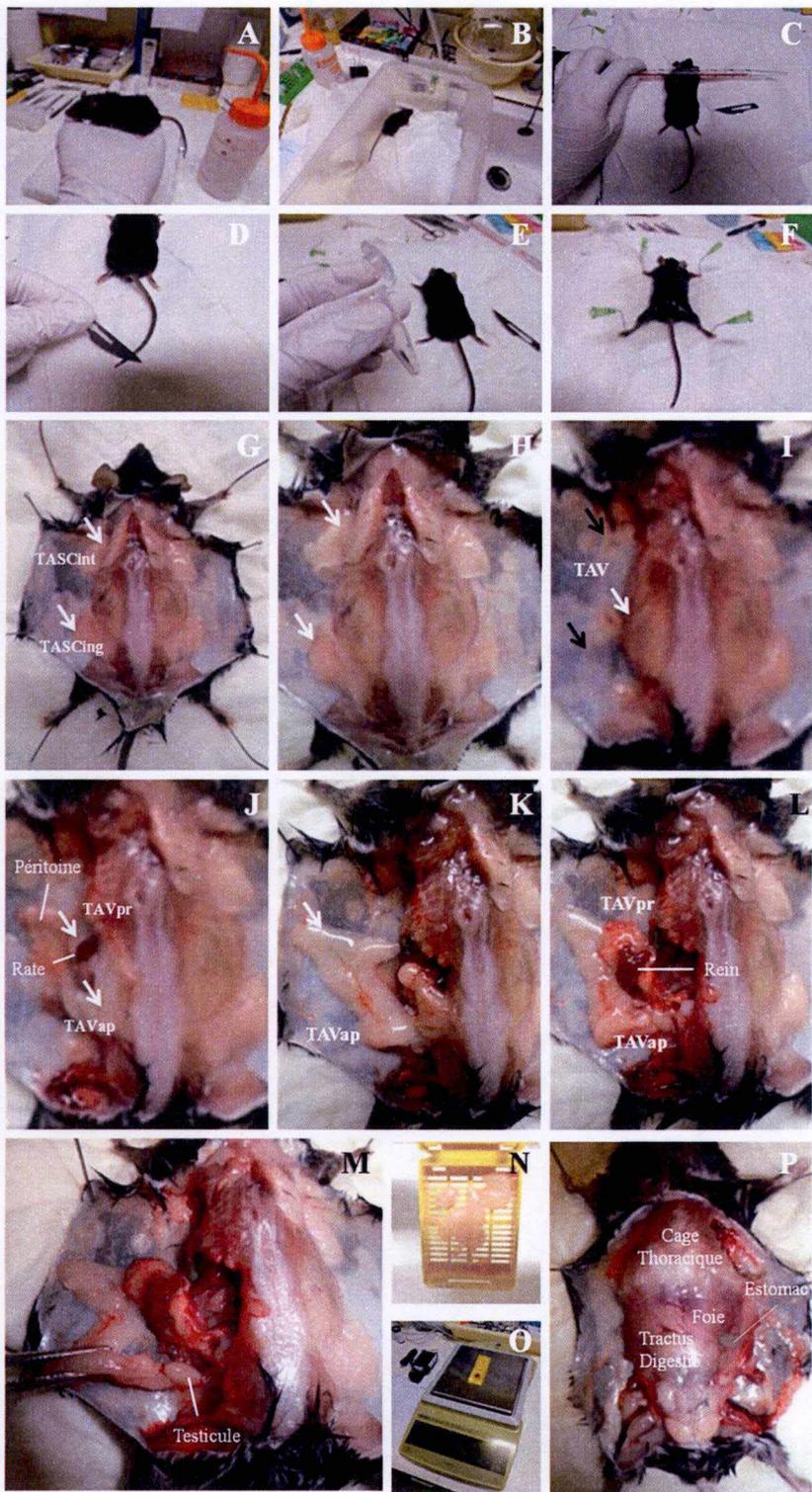


Figure 2.4 : Illustrations des étapes du protocole de dissection.

Présentation du protocole de dissection des animaux attribués au projet « Sirt3 ». Après un sevrage de 12 h, l'animal est pesé, photographié et une goutte de sang est prélevée par une légère incision au niveau de l'extrémité de la queue, afin de mesurer sa glycémie à l'aide d'un lecteur de glycémie One Touch Verio. Il est ensuite euthanasié par intoxication au CO₂ (B) et la mort est confirmée par dislocation cervicale (C). Un morceau d'environ 0,5 cm de la queue est prélevé afin de pouvoir répéter un génotypage ultérieurement (D et E). L'animal est ensuite fixé sur une plaque de liège en décubitus ventral (F), aspergé d'éthanol 70 % et ouvert le long du dos pour apercevoir l'ensemble des structures anatomiques. Chez l'animal obèse, particulièrement chez les mâles, on aperçoit directement les masses adipeuses sous-cutanées interscapulaires (TASCint), recouvrant les omoplates, inguinales (TASCing), situées entre l'abdomen et les muscles fémoraux (G et H), et on devine l'ensemble de la masse adipeuse viscérale (TAV), contenue par le péritoine (I). Les masses adipeuses sous-cutanées sont délicatement excisées (I), individuellement pesées (O) et un dépôt de chaque tissu est soit plongé dans une cassette histologique (N) puis dans du formol acétique 4 % pour des analyses histologiques ultérieures, soit dans de l'azote liquide pour une congélation rapide et une conservation optimale du tissu. Une incision du péritoine est ensuite réalisée (J) et le lobe graisseux viscéral abdomino-pelvien (TAVap), périphérique est « déployé » (K) et extrait en étirant et en élaguant la masse adipeuse inférieure

environnant les organes génitaux (photo : mâles, testicule gauche) (M). L'extraction de la graisse péri-rénale (TAVpr), plus critique étant donné son intime association au rein, est à son tour délicatement élaguée, afin d'éviter les saignements (L). Les dépôts de graisse viscérale sont également fixés dans le formol acétique 4 % pour la moitié des échantillons, tandis que l'autre est plongée dans l'azote liquide puis conservée à -70 °C. Quelques autres organes tels que le foie, les muscles fémoraux, le pancréas et le cœur ont également été prélevés dans l'intention de réaliser des analyses biochimiques. L'animal a alors été transféré en décubitus dorsal pour faciliter le prélèvement de ces organes (P).

technologies, USA] pour atteindre un volume final de 23 μ l. Un volume de 2 μ l d'ADN est ajouté dans chaque tube qui est placé dans un Thermocycler [EPPENDORF, Allemagne] dont le protocole est précisé dans le **Tableau 2.8**. Au terme de la réaction, 5 μ l de colorant de charge Blue/Orange 6 X [PROMEGA, USA] sont ajoutés aux échantillons et 25 μ l de chaque échantillon sont disposés dans les puits d'un gel d'agarose 2 %. Un volume de 10 μ l d'un marqueur de poids moléculaire BenchTop 100 bp DNA Ladder [PROMEGA, USA] est utilisé pour estimer la taille des amplicons et un contrôle positif et un blanc sont réalisés à partir de 2 μ l d'ADN de génotype connu ou d'eau, respectivement. La migration électrophorétique est réalisée à 100V pendant 60 min. Les produits de PCR sont enfin visualisés sur un banc UV et des photographies des gels sont prises.

2.8 Sacrifice des animaux et prélèvements tissulaires

Le matériel de dissection est présenté à la **Figure 2.3**. Après avoir été nourris pendant 16 semaines avec un régime riche en graisses et pesés chaque semaine pour permettre le suivi de la masse corporelle, l'animal est sevré pendant 12 h, pesé et photographié. Sa glycémie est mesurée grâce à un Système de surveillance de la glycémie OneTouch Verio [LIFESCAN, France] et l'animal est sacrifié à l'aide d'un système d'intoxication au CO₂. La mort est confirmée par dislocation cervicale et un bout de la queue est prélevé pour confirmer le génotype. L'animal est ensuite fixé en décubitus ventral, ouvert le long du dos et les tissus adipeux blancs sous-cutanés (inguinaux et inter-scapulaires) et viscéraux (abdomino-pelviens et péri-rénaux) sont prélevés et pesés. Pour chaque tissu adipeux, la moitié du matériel subit une congélation immédiate (« snapfreeze ») dans l'azote liquide et est ensuite conservé à -70 °C, tandis que l'autre moitié est fixée pour une analyse histologique (voir point suivant, 10). D'autres organes (foie, pancréas, cœur, muscle) ont été prélevés sur quelques animaux pour servir de tissus contrôles. Pour ce faire, l'animal est placé en décubitus dorsal et ouvert le long de l'abdomen pour atteindre la cavité péritonéale. La procédure est visualisée sur les photographies présentées à la **Figure 2.4**.

2.9 Histologie : coloration des tissus à l'Hémalun-Erythrosine-Safran (HES)

2.9.1 Fixation, enrobage, dégrossissement et montage des coupes

Les tissus adipeux blancs sont prélevés, pesés, placés dans une cassette histologique [VWR, USA] et immédiatement plongés dans une solution de formol (4 %)-acide acétique (1 %) (formaldéhyde 37% [MERCK MILLIPORE, USA], acide acétique glacial [THERMO SCIENTIFIC, USA]) pour une fixation stable préservant au maximum la qualité et la morphologie des tissus. Ils sont ensuite déshydratés, puis enrobés dans de la paraffine ParaPlast Plus [LEICA, Allemagne]. Cette étape est réalisée par le système automatisé Tissue Tek VIP [SAKURA, Pays Bas] dont le protocole est décrit dans le **Tableau 2.9**. L'échantillon est conservé dans la paraffine à 60 °C grâce à un Histocentre (THERMO SCIENTIFIC, USA) où se déroulent les étapes suivantes : le tissu est placé et orienté au fond d'une cuvette en aluminium chaude remplie de paraffine à 60 °C. La cuvette est transférée à 4 °C pour permettre la solidification de la paraffine et est recouverte par la cassette en plastique d'identification, saisie simultanément dans le montage en paraffine et qui est enfin placée sur une plaque réfrigérante à -20 °C. Une fois solidifiée, la cuvette métallique est démoulée et les moules de paraffine sont dégrossis au Microtome RM2245 [LEICA, USA]. Le lendemain, les blocs sont placés pendant 4 h dans du Mollifex [VWR, USA], puis 1 min dans de l'eau à 4 °C et des coupes de 6 μ m d'épaisseur sont produites à l'aide du même microtome et collées, grâce à une goutte d'eau MilliQ, sur une lame porte-objet Menzel-Gläser Superfrost Plus

	<i>Types de Bain</i>	<i>Durée</i>	<i>Température</i>	<i>Nombre de Bains</i>
Déshydratation	Méthanol 100 %	60min	35°C	4X
Pré-Inclusion	Toluène	60min	35°C	4X
Inclusion	Paraffine	60min	60°C	4X

Tableau 2.9 : Protocole d'enrobage en paraffine du système automatisé tissue Tek VIP.

<i>Etapas</i>	<i>Réactifs (imprégnation sous agitation permanente)</i>	<i>3 min</i>
Déparaffinage	Toluène	2X
Rinçage et Réhydratation	Méthanol 100 % et 70 %	3X
Blanchissement	Eau de ville	3X
Coloration des Noyaux	Hémalun (Hématéine 0,29% [SIGMA, USA], alun de potassium Saturé 98 %, acide acétique glacial 0,02% [THERMO SCIENTIFIC, USA])	3X
Bleuissement	Eau de ville (pH légèrement alcalin)	1X
Différenciation	Ethanol-HCl (Ethanol 100 %, HCl 0,4 %)	1X
Rinçage	Eau de ville	2X
Coloration des Cytoplasmes	Erythrosine (Erythrosine 0,2 % [MERK MILLIPORE, USA], 10 gouttes de Formaldéhyde 37 % [MERCK MILLIPORE, USA], eau de ville)	2X
Différenciation	Ethanol 70%	1X
Déshydratation	Isopropanol	3X
Coloration des Fibres Conjonctives	Safran (Safran du Gâtinais 0,25 % [WALDECK, Allemagne], Ethanol 100%)	2X
Rinçage	Isopropanol	2X
Rinçage	Toluène	2X

Microscope Slides [THERMO SCIENTIFIC, USA]. La lame est posée pendant ± 1 min sur une plaque chauffante à 53 °C pour défroisser le coupon et est ensuite inclinée pour évacuer l'excédent d'eau de la lame. Celle-ci est laissée à l'air libre plusieurs heures pour sécher et placée dans une étuve avec soufflerie à 48 °C 1 h avant le début de la coloration.

2.9.2 Coloration HES

La coloration topographique Hémalun-Erythrosine-Safran (HES) est réalisée par le système automatisé Tissue Stainer COT 20 [MEDITE, Allemagne] dont les paramètres sont présentés dans le **Tableau 2.10**. Immédiatement après le dernier run dans le Toluol, la lame est protégée par un couvre-objet fixé au Dibutylphthalate Polystyrène Xylène (DPX) [VWR, USA], laissée 24 h sous un poids pour assurer un séchage et une évacuation des bulles, et sont enfin observées au Microscope Leica DM500 [LEICA, USA]. Les micrographies sont prises à l'aide du logiciel Leica Application Suite, version 4.2.

2.10 **Analyse d'expression de gènes dans les tissus adipeux blancs**

Un fragment d'environ 0,5 cm³ d'un morceau de tissu adipeux blanc, ayant été congelé rapidement dans l'azote liquide puis conservé à -70 °C après sacrifice de l'animal, est prélevé, plongé dans 800 µl de Trizol [THERMO SCIENTIFIC, USA], découpé en morceaux de ~3-4 mm et broyé à l'aide du broyeur Ultra turrax [SIGMA, USA]. Après 5 min d'incubation à température ambiante, 160 µl de Chloroforme [MERCK MILLIPORE, USA] sont ajoutés à l'échantillon qui est ensuite vortexé 30 s, puis incubé pendant 3 min à température ambiante avant d'être centrifugé pendant 15 min à 12000 g (4°C). Un volume de 300 µl de la phase supérieure est transféré dans un tube Safe-Lock Micro Test Tube de 2 ml [EPPENDORF, Allemagne]. L'ARN total est ensuite purifié grâce au système automatisé QIAcube [QIAGEN, Allemagne] selon le protocole [ID3368] joint au kit RNeasy Mini Kit [QIAGEN, Allemagne], puis collecté dans un microtube et conservé à -70 °C.

Pour le détail des protocoles de rétro-transcription et de RT-qPCR, se référer au point 2.4, car les étapes ultérieures sont réalisées à l'identique.

2.11 **Analyses statistiques**

Les résultats sont exprimés en moyennes ± 1 écart-type. Le nombre de réplicats biologiques indépendants est indiqué dans la légende de chaque figure. Quand elle permise et possible, la signification statistique des différences entre groupes est déterminée après une ANOVA1, par un test de Newman-Keuls. Des P-values <0,05, <0,01, <0,001 sont considérées comme des différences statistiquement significatives (*), hautement significatives (**), ou très hautement significatives (***), respectivement. Ces analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel statistique SigmaPlot, version 12.5.

III. RESULTATS

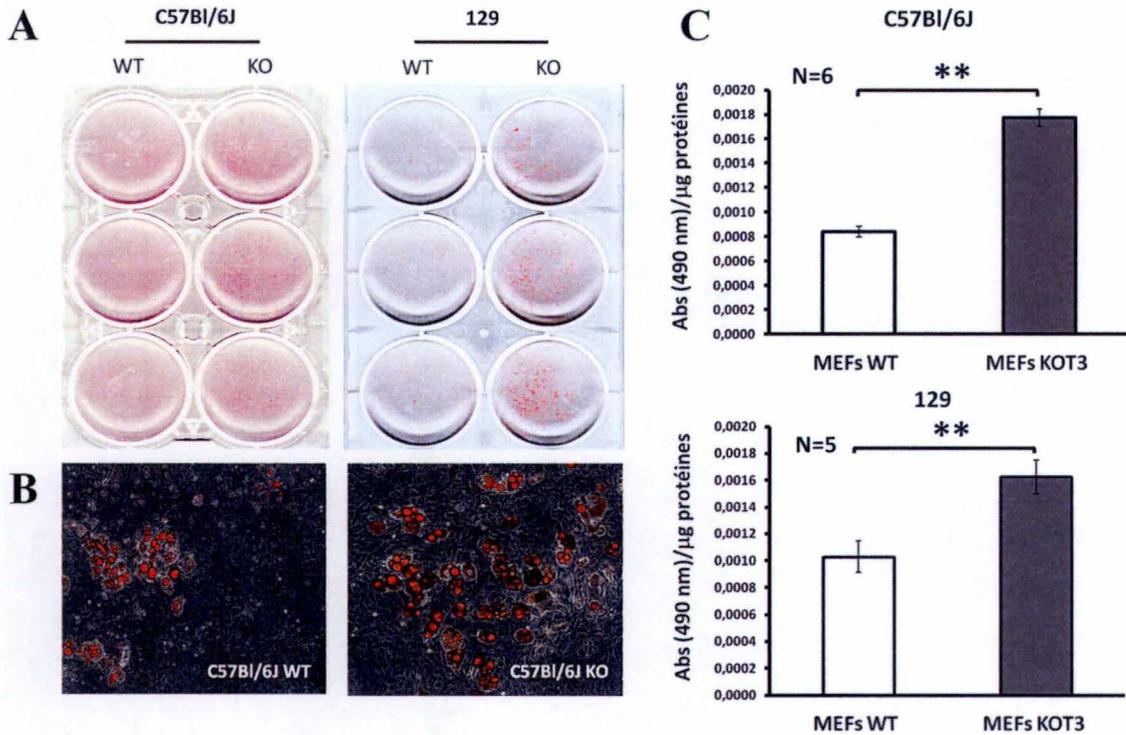


Figure 3.1 : Efficacité de la différenciation de MEF sauvages (WT) ou KO pour la Sirt3.

Des fibroblastes embryonnaires murins (MEF) transformés suite à la surexpression d'un dominant négatif de p53 (R175H) isolés de souris C57Bl/6J ou des MEF primaires isolés de souris 129 sauvages (WT) ou invalidées pour la Sirt3 ont été différenciés en adipocytes, en présence de milieu DMEM contenant 10 % de FBS et un cocktail hormonal pro-adipogénique composé de dexaméthasone (1 mM), d'IBMX (0,5 mM), de db-cAMP (300 nM), de rosiglitazone (0,5 mM) et d'insuline 5 µg/ml pendant 48 h. Les cellules ont ensuite été incubées en présence de DMEM + 10 % de FBS contenant uniquement de l'insuline 5µg/ml pendant 6 jours supplémentaires. Le contenu en TG a été révélé par une coloration à l'ORO (macroscan des puits (A) et micrographies (B)). Le colorant retenu par les TG a ensuite été solubilisé dans l'éthanol et l'absorbance quantifiée au spectrophotomètre (490 nm) (C). Les résultats ont été normalisés par rapport au contenu protéique et sont exprimés comme la moyenne \pm 1 écart-type, pour 6 ou 5 expériences indépendantes (N=6 ou N=5). Les différences entre moyennes ont été analysées par un test statistique T de Student. **: différence significative avec $P < 0,01$. (T. Arnould, données non publiées)

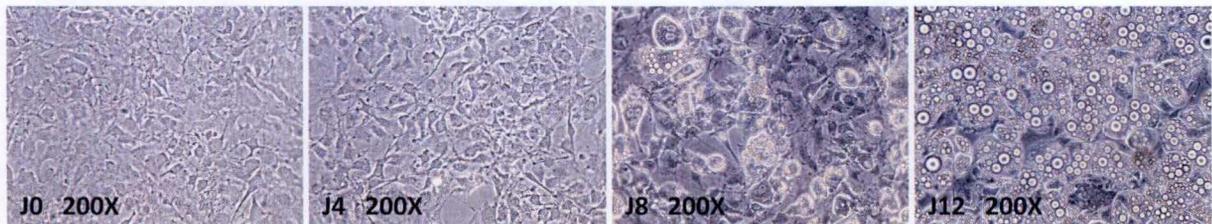


Figure 3.2 : Changements morphologiques et accumulation de TG dans les cellules 3T3-L1 au cours de la différenciation cellulaire.

Visualisation des modifications morphologiques et de l'accumulation des TG dans les cellules 3T3-L1 au cours de la différenciation cellulaire aux jours 0 (J0), 4 (J4), 8 (J8) et 12 (J12). Les pré-adipocytes ont été incubés pendant 48 h dans un milieu de culture minimal (DHG-L1+10 % FBS) enrichi d'un cocktail de différenciation hormonal composé de db-AMP cyclique (300 µM), de dexaméthasone (1 µM) et d'insuline à 5 µg/ml. Le milieu de culture a ensuite été renouvelé tous les deux jours pendant 10 jours avec du milieu de culture minimal contenant uniquement de l'insuline (5 µg/ml). Les micrographies ont été prises à l'aide d'un microscope à contraste de phase (Grossissement : 200 X).

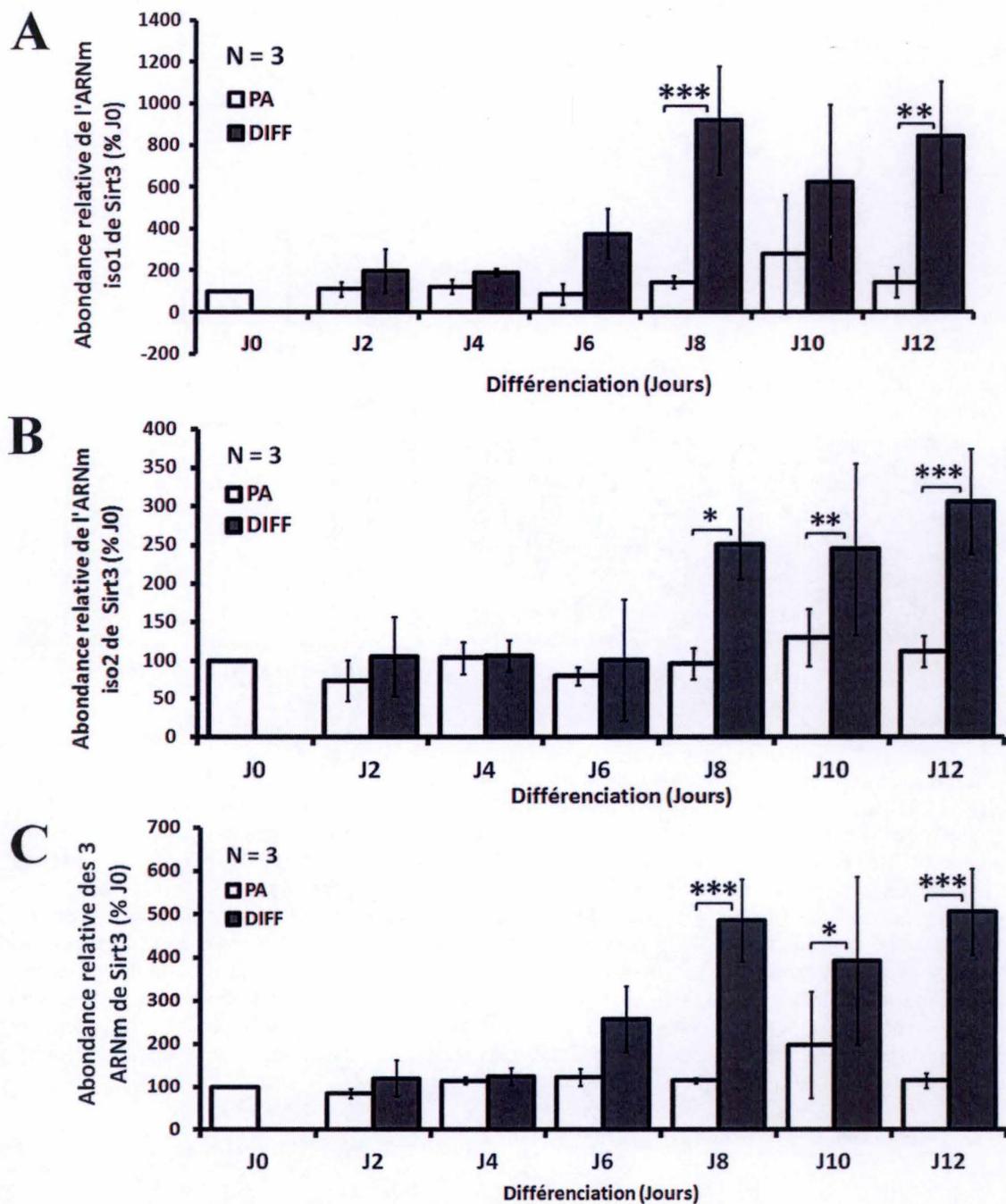


Figure 3.3 : Abondance relative des transcrits murins de *Sirt3* au cours de la différenciation des 3T3-L1.

Les pré-adipocytes 3T3-L1 ont été différenciés (DIFF) ou non (PA) durant 12 jours selon le protocole décrit dans la section "matériel et méthodes". L'ARN total a été extrait aux jours 0 (J0), 2 (J2), 4 (J4), 6 (J6), 8 (J8), 10 (J10) et 12 (J12) de la différenciation. Une quantité de 2 µg d'ARN a été utilisée pour la rétro-transcription en ADNc et un aliquot dilué 10 X a été utilisé pour quantifier l'abondance relative des isoformes 1 (A), 2 (B) et des 3 isoformes simultanément (C) des transcrits de *Sirt3* par RT-qPCR. Les résultats sont calculés sur base des $\Delta\Delta Ct$ obtenus et les valeurs normalisées par rapport au transcrite du facteur de transcription TFIID utilisé comme gène de référence et exprimés en pourcentages des valeurs obtenues pour l'abondance des isoformes dans les pré-adipocytes à jour 0 (J0). Les résultats représentent la moyenne \pm 1 écart-type pour 3 échantillons indépendants (N=3). Les différences entre moyennes ont été calculées par une ANOVA I suivie d'un test Newman-Keuls (* : $P < 0.05$; ** : $P < 0,01$ et *** ; $P < 0,001$).

PARTIE III.I

Etude du Rôle de la Sirtuine 3 dans l'Adipogenèse (*In Vitro*)

3.1.1 Caractérisation du rôle éventuel de la Sirtuine 3 dans l'adipogenèse des cellules 3T3-L1

Des données préliminaires obtenues dans le cadre de l'initiation du projet suggèrent un rôle potentiel de la Sirt3 dans la différenciation adipocytaire. En effet, l'efficacité de la différenciation de fibroblastes embryonnaires murins (MEF) isolés à partir de souris C57Bl/6J et 129, invalidées pour le gène *Sirt3*, semble plus élevée que pour des MEF de souris exprimant l'enzyme. Cette observation est faite tant pour des MEF de souris C57Bl/6J immortalisés suite à l'expression d'un dominant négatif du facteur p53 (R175H) que pour des MEF isolés de souris 129 en cultures primaires (**Figure 3.1** : T. Arnould, données non publiées). Sur cette figure, nous voyons que l'absence d'expression de la Sirt3 s'accompagne d'une plus grande quantité de TG associés aux cellules différenciées (**Figure 3.1 C**). Au cours de sa mission scientifique en 2013-2014, T. Arnould a obtenu des données préliminaires montrant que non seulement le pourcentage de fibroblastes embryonnaires qui se différencient est plus élevé en absence de la Sirt3, mais aussi que la taille des vésicules de TG est plus importante dans les cellules qui n'expriment pas la désacétylase mitochondriale. La perte de la Sirt3 et de son activité régulatrice semble donc avoir des conséquences favorisant la réponse aux stimuli adipogéniques et la différenciation des MEF en adipocytes. Ces données, qui permettent de penser que la Sirt3 pourrait jouer un rôle dans la différenciation des préadipocytes, sont à la base de la première partie de ce travail. Une hypothèse intéressante tient dans le fait que l'absence de la Sirt3 pourrait conduire à une augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) connues pour leur effet pro-adipogénique. En effet, des molécules anti-oxydantes comme le 7,8-dihydroxyflavone sont capables d'inhiber la différenciation des 3T3-L1, suggérant que les ROS contribuent à la différenciation des adipocytes (Choi et al., 2015) tout comme le MitoCP, qui bloque la différenciation de cellules souches mésenchymateuses humaines en adipocytes (Tormos et al., 2011). Cependant, les MEF ne représentent pas un modèle idéal puisque le taux de cellules différenciées ne dépasse pas, dans les meilleures conditions, les 20 à 30 %. (Rosen and MacDougald, 2006) Pour approfondir, *in vitro*, l'étude du rôle éventuel de la Sirt3 dans l'adipogenèse, nous avons choisi de travailler sur la cellule 3T3-L1 dont l'efficacité de différenciation est largement supérieure à celle des MEF puisqu'elle peut aboutir à 90-95% de cellules différenciées (**Figure 3.2**) (Wabitsch et al., 2001).

3.1.2 Recherche de l'abondance et d'un marqueur d'activité de la Sirt3 au cours de l'adipogenèse des cellules 3T3-L1

3.1.2.1 Abondance des transcrits de Sirt3 au cours de l'adipogenèse

Nous avons vu dans l'introduction (point V.2) que différents transcrits étaient produits par épissage alternatif à partir du gène unique de *Sirt3* chez la souris (Bao et al., 2010) (Yang et al., 2011). Dans un premier temps, nous avons caractérisé l'abondance des formes longues des transcrits de la Sirt3 (T1 et T2) et de toutes les formes de transcrits simultanément (T1, T2 et T3). En effet, le transcrit T3, dont la séquence est commune et partagée avec les transcrits T1 et T2 ne peut donc pas être distingué par le design de primers spécifiques. Nous avons

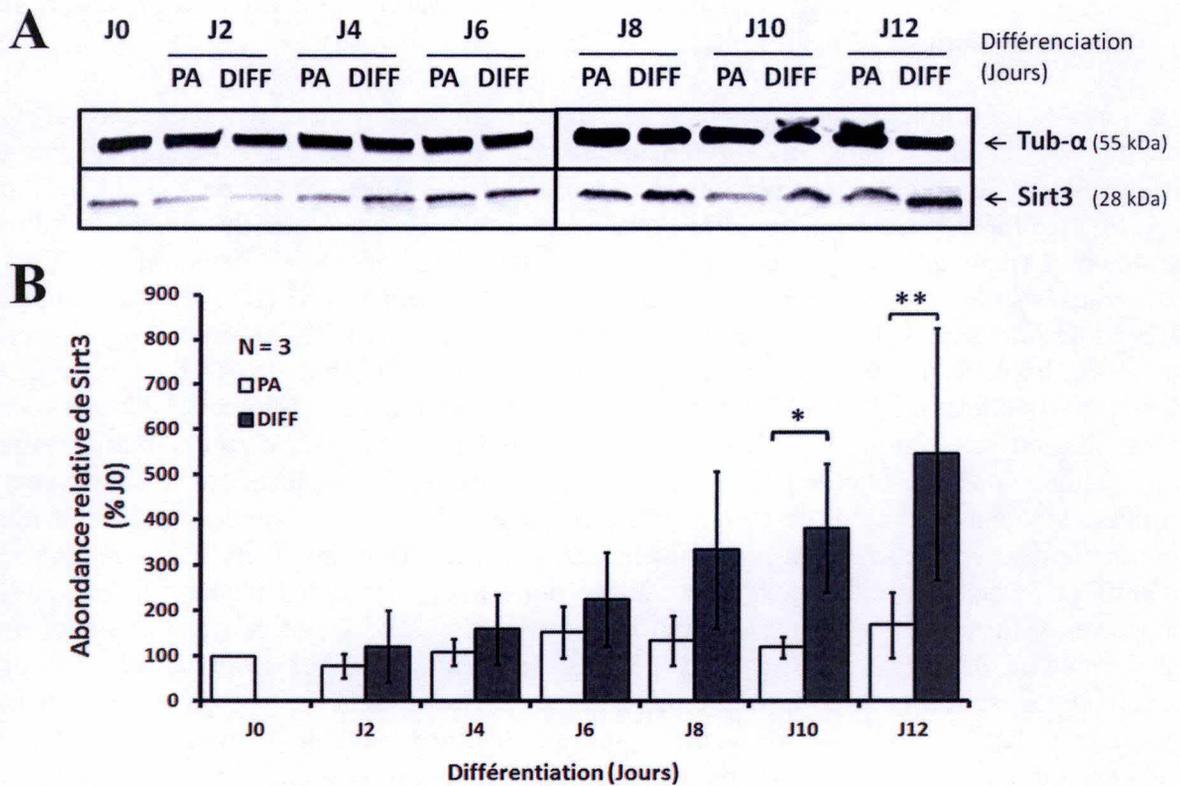


Figure 3.4 : Abondance protéique de la forme courte de la Sirt3 au cours de la différenciation des 3T3-L1.

Les pré-adipocytes 3T3-L1 ont été différenciés (DIFF) ou non (PA) durant 12 jours selon le protocole décrit dans la section « matériel et méthodes ». Des lysats cellulaires totaux ont été préparés avec le tampon de lyse classique aux jours 0 (J0), 2 (J2), 4 (J4), 6 (J6), 8 (J8), 10 (J10) et 12 (J12) et l'abondance de la Sirt3 a été analysée par Western blot en fluorescence (Gel 4-15 %). **(A)** Immuno-blot réalisé à l'aide d'un anticorps anti-Sirt3 et d'un anticorps anti-Tubuline- α . L'immuno-détection de la Tubuline- α a été utilisée comme contrôle de charge. **(B)** L'abondance de la Sirt3 a été quantifiée grâce au logiciel Odyssey et normalisée pour l'abondance de la Tubuline- α du même échantillon. Les résultats sont présentés en abondance relative de la Sirt3 et exprimés en pourcentages de l'abondance détectée pour les pré-adipocytes à jour 0 (J0). Les résultats représentent la moyenne \pm 1 écart-type pour 3 expériences indépendantes (N=3). Les différences entre moyennes ont été analysées par une ANOVA 1 suivie d'un test de Newman-Keuls (* : $P < 0,5$; ** : $P < 0,01$).

donc quantifié les abondances relatives des ARNm de *Sirt3* par RT-qPCR et ce, pour différents temps de différenciation des préadipocytes 3T3-L1 (**Figure 3.3**). Les résultats indiquent clairement une augmentation de l'abondance des différents transcrits au cours de l'adipogenèse. Cette augmentation, que nous supposons être une augmentation d'expression (mais il faudrait vérifier que ce n'est pas une stabilisation des transcrits) débute globalement au jour 6 de la différenciation (**Figure 3.3C**). Les augmentations d'abondance des transcrits de *Sirt3* sont statistiquement significatives au jour 8 de la différenciation cellulaire. Il est intéressant de noter que l'augmentation de l'abondance des transcrits du gène est corrélée à l'accumulation des TG dans les adipocytes survenant entre les jours 4 et 6 du programme de différenciation. Ajoutons encore que les changements d'abondance ne sont pas identiques pour toutes les formes des transcrits, T1 étant le transcrit pour lequel l'augmentation d'abondance est la plus importante (**Figure 3.3A et B**).

3.1.2.2 Abondance protéique de Sirt3 au cours de l'adipogenèse

Nous avons ensuite voulu savoir si l'augmentation de l'abondance des transcrits de *Sirt3*, observée au cours de la différenciation des cellules 3T3-L1, est bien reflétée au niveau de la protéine. Pour cela, nous avons quantifié par Western blot l'abondance protéique de la Sirt3 (isoforme mitochondriale) dans les lysats de cellules 3T3-L1 du même batch que celles utilisées pour l'analyse des transcrits et différenciées simultanément (**Figure 3.4**). Sur les lysats de ces cellules présentant le même programme de différenciation, nous observons que l'abondance de l'enzyme augmente également au cours de la différenciation des préadipocytes en adipocytes même si la différence n'est significative, dans les conditions expérimentales testées, qu'au terme de la différenciation. Ces résultats confirment l'augmentation d'abondance des transcrits, nous permettant de conclure que la désacétylase est plus abondante dans les adipocytes que dans les préadipocytes, et que cette abondance semble corrélée à l'accumulation simultanée des TG au sein des adipocytes. Nous devons encore cependant vérifier que cette augmentation d'abondance est corrélée à une plus grande activité de l'enzyme. Pour tenter de répondre à cette question et, en l'absence d'un kit de dosage spécifique de cette enzyme, nous avons recherché le niveau d'acétylation de la SOD2 sur la lysine 68 (K68), un substrat de l'enzyme bien décrit dans la littérature (Qiu et al., 2010) (Tao et al., 2010) (Chen et al., 2011) (Zhu et al., 2012) (Lu et al., 2015).

3.1.2.3 Mise en évidence de l'activité de la Sirt3 à travers la désacétylation de la SOD2

Nous avons ensuite recherché l'effet de l'augmentation d'expression de la Sirt3 au cours de l'adipogenèse sur la désacétylation d'un substrat reconnu. A défaut de pouvoir trouver un test de dosage de l'activité de l'enzyme *in vitro* qui soit spécifique de l'enzyme (manque de spécificité des substrats utilisés dans les kits commerciaux), nous avons tenté de mettre son activité en évidence à travers la désacétylation de la superoxyde dismutase 2 (SOD2), une enzyme anti-oxydante catalysant la transformation des radicaux anioniques superoxydes mitochondriaux ($O_2^{\cdot-}$) en H_2O_2 . La SOD2 est l'un des substrats de la Sirt3 les mieux décrits dans la littérature et sa désacétylation se produit au niveau des lysines acétylées 68 (K68) et 122 (K122) (Qiu et al., 2010) (Tao et al., 2010) (Ozden et al., 2011) (Chen et al., 2011) (Zhu et al., 2012). Nous avons donc étudié, par Western Blot, les changements d'abondance de la Sirt3 et des formes totale et acétylée de la SOD2 sur la lysine 68 qui est le résidu pour lequel le degré d'acétylation a le plus d'effet sur le contrôle de l'activité de l'enzyme) (Lu et al., 2015) (**Figure 3.5**). Nous avons évalué le ratio de la forme acétylée de la SOD2 et de la forme totale au cours de l'adipogenèse (**Figure 3.5C**). Nous montrons que l'acétylation de la

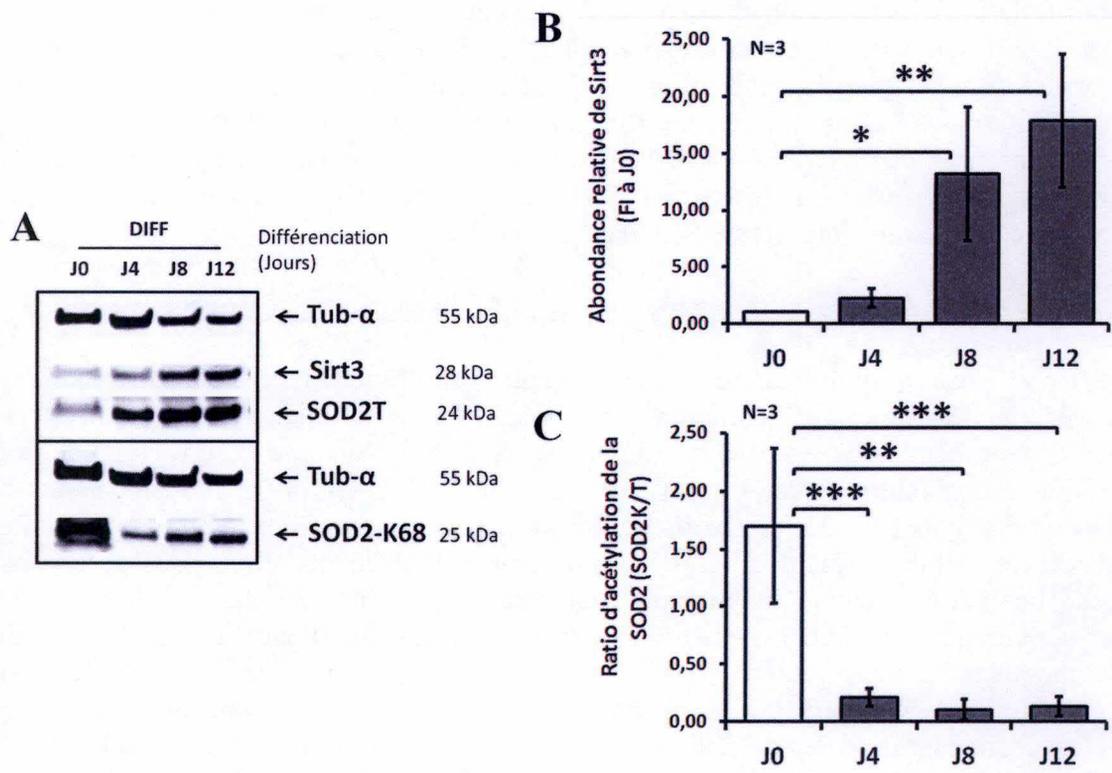


Figure 3.5 : Abondance de la Sirt3 et acétylation de la SOD2 au cours de la différenciation des 3T3-L1.

Les pré-adipocytes 3T3-L1 ont été différenciés (DIFF) ou non (PA) durant 12 jours selon le protocole décrit dans la section « matériel et méthodes ». Des lysats cellulaires totaux ont été préparés avec du tampon DLA-Mito aux jours 0 (J0), 4 (J4), 8 (J8), et 12 (J12) et les abondances de la Sirt3 et des formes totale et acétylée de la SOD2 (respectivement, SOD2T et SOD2K68) ont été analysées par Western blot en fluorescence (Gel 4-15 %). (A) Immuno-blots réalisés grâce aux anticorps anti-Sirt3, anti-SOD2T, anti-SOD2K68 et anti-Tubuline- α . L'immuno-détection de la Tubuline- α a été utilisée comme contrôle de charge. (B et C) Les abondances protéiques ont été quantifiées grâce au logiciel Odyssey et normalisées pour l'abondance de la Tubuline- α du même échantillon. Les résultats sont présentés en abondance relative de la Sirt3 comme « fold d'induction » (FI) par rapport à l'abondance de l'enzyme dans les pré-adipocytes à jour 0 (J0) (B) et comme les ratios d'acétylation obtenus pour le rapport entre les formes acétylées (SOD2K68) et totale de la SOD2 (SOD2T) (C). Les résultats sont exprimés comme la moyenne \pm 1 écart-type 3 expériences indépendantes (N=3). Les différences entre moyennes ont été analysées par une ANOVA I suivie d'un test de Newman-Keuls (* : P<0,05; ** : P<0,01 et *** ; P<0,001).

SOD2 sur la lysine 68 est très abondante dans les préadipocytes qui expriment peu la Sirt3 alors que l'augmentation progressive de l'abondance de la Sirt3 au cours de la différenciation des cellules (**Figure 3.5.B**) s'accompagne également d'une augmentation de l'abondance de la SOD2 (**Figure 3.5.A**). A la figure 3.5C, nous voyons bien que malgré l'augmentation de la forme totale de la SOD2 au cours de la différenciation des cellules, le rapport des signaux de fluorescence correspondant à la forme acétylée sur les signaux de fluorescence obtenus pour la forme totale de l'enzyme est bien plus faible que le rapport obtenu pour les préadipocytes et ce, dès 4 jours de différenciation. Cette diminution de l'acétylation de la SOD2, corrélée à l'augmentation d'abondance de la Sirt3, nous permet de suggérer que l'augmentation de la production des ROS dans la différenciation adipocytaire (Atashi et al., 2015) qui pourrait résulter de la biogenèse mitochondriale qui accompagne l'adipogenèse (Wilson-Fritch., 2003) à travers une activation de la SOD2 assurée par une augmentation de l'expression de la Sirt3 dans ces conditions.

3.1.3 Recherche du rôle de la Sirt3 dans l'adipogenèse

3.1.3.1 Etude de l'effet de la surexpression de la Sirt3 sur l'adipogenèse

Nous pouvons maintenant nous demander si l'augmentation d'expression de la Sirt3 au cours de l'adipogenèse n'est qu'un marqueur moléculaire qui accompagne la différenciation cellulaire (au même titre que de nombreux autres gènes, dont l'expression est modifiée en cours de différenciation ou si la désacétylase contribue à l'adipogenèse en tant qu'effecteur moléculaire. Pour tenter de répondre à cette question, nous avons utilisé une première approche classique visant à augmenter le niveau d'expression de la Sirt3 et à rechercher l'effet de cette augmentation sur le contenu en TG dans les cellules, comme un marqueur « intégratif » de l'efficacité de différenciation.

Pour ce faire, nous avons utilisé un système de transduction lentivirale contenant le transgène codant pour l'isoforme mitochondriale de la Sirt3 dont l'expression est conditionnée par l'exposition à un inducteur tel que la doxycycline (Liu et al., 2012). Le choix d'un système d'intégration des transgènes par une approche utilisant les lentivirus pour les études d'effets sur la différenciation des 3T3-L1 n'est pas anodin. En effet, l'optimisation de la surexpression de la Sirt3 dans les cellules 3T3-L1 est compliquée par la limite des modèles de transfection disponibles pour ce type cellulaire et particulièrement pour les cellules différenciées. En effet, les adipocytes sont des cellules naturellement responsables du stockage des graisses et ne sont donc pas sensibles aux systèmes de transfection basés sur l'exploitation des liposomes ou autres substances lipidiques (Orlicky and Schaack., 2001). L'électroporation est une alternative efficace mais n'autorise qu'une utilisation transitoire du transgène, ce qui est problématique dans l'étude de la différenciation adipocytaire, caractérisée par une phase précoce d'expansion clonale et qui nécessite donc une intégration stable des transgène pour assurer une plus grande efficacité du silençage au sein de la population cellulaire. De plus, bien que des kits d'électroporation adaptés aux 3T3-L1 existent depuis peu de temps (Amaya), cette méthode est source de stress et perturbe la biologie de la cellule adipocytaire (Winterbourne et al., 1988), notamment en changeant la méthylation de cytosines au sein de l'ADN (Pierre Sacré, Mémoire 2015, URBC). L'établissement de lignées stables est aussi difficile car l'efficacité de la différenciation est fonction du nombre de passages en culture pour ces cellules (Zebisch et al., 2012). Nous les utilisons au maximum jusqu'au 15^{ème} passage, au-delà duquel le taux de prolifération des cellules augmente et l'efficacité de la différenciation diminue rapidement et fortement (Sébastien Vankoningsloo, données non publiées). Il est donc peu aisé de générer une lignée stable pour un transgène d'intérêt avec ces cellules et c'est la raison pour laquelle nous nous sommes dirigés vers une approche

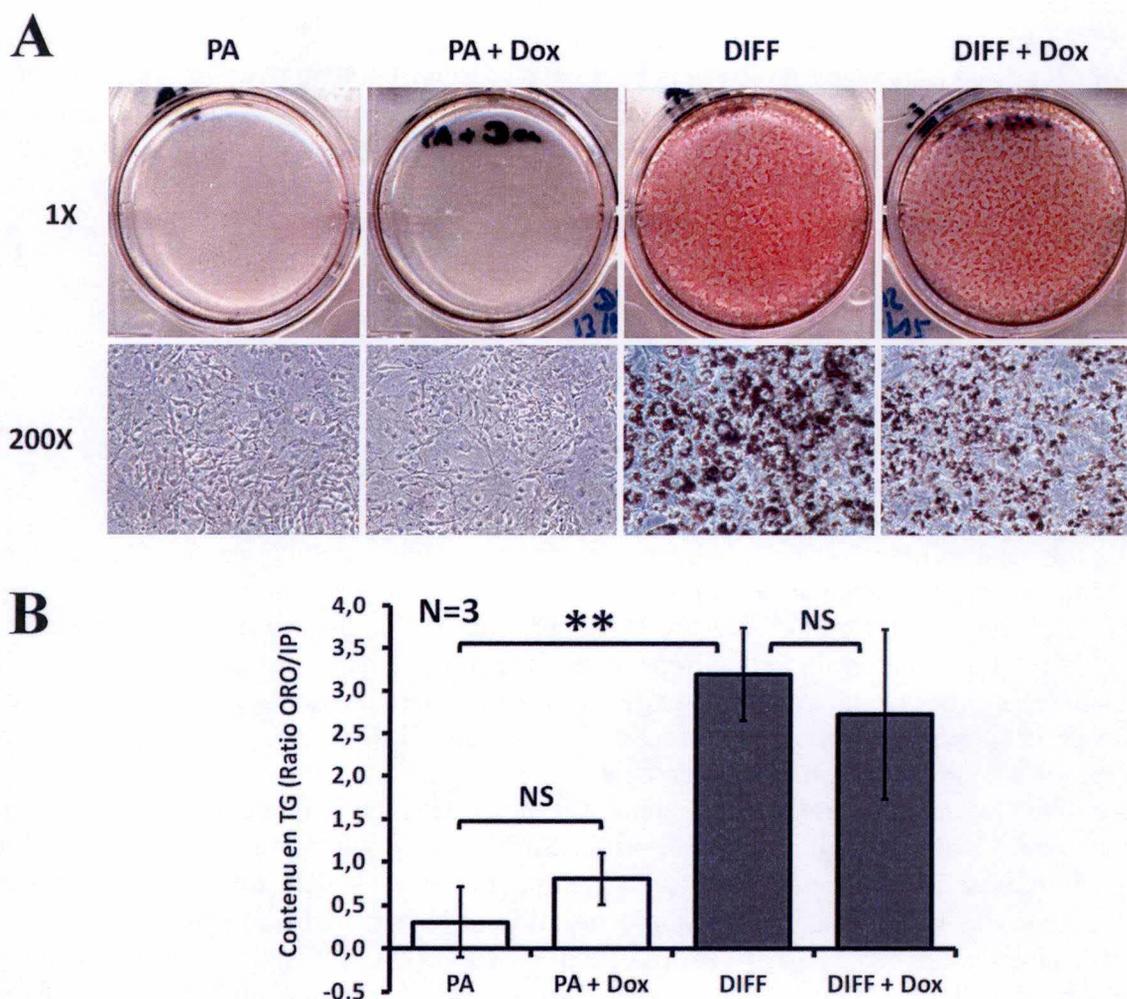


Figure 3.6 : Effet de la doxycycline sur l'efficacité de différenciation des 3T3-L1.

Les pré-adipocytes 3T3-L1 ont été ensemencés en plaques 6 puits et différenciés (DIFF) ou non (PA) durant 12 jours selon le protocole décrit dans la section « matériel et méthodes » en présence (PA+Dox, DIFF+Dox) ou en absence (PA, DIFF) de doxycycline. (A) Macroscan et micrographies du contenu des cellules en TG rendus visibles par une coloration à l'ORO après 12 jours de différenciation. (B) L'ORO colorant les lipides neutres contenus dans les cellules est ensuite solubilisé dans l'éthanol et l'absorbance est mesurée sur un aliquot de 250 μ l au spectrophotomètre (490 nm). Les valeurs obtenues sont ensuite normalisées pour le nombre de cellules estimé par un marquage de l'ADN à l'iodure de propidium. Les résultats sont présentés comme les rapports entre les valeurs d'absorbance (ORO) et les intensités de fluorescence obtenues pour le marquage d'ADN et représentent la moyenne \pm 1 écart-type, pour 3 expériences indépendantes (N=3). Les différences entre moyennes ont été analysées par une analyse ANOVA I suivie d'un test de Newman-Keuls (NS : $P > 0,05$; ** : $P < 0,01$).

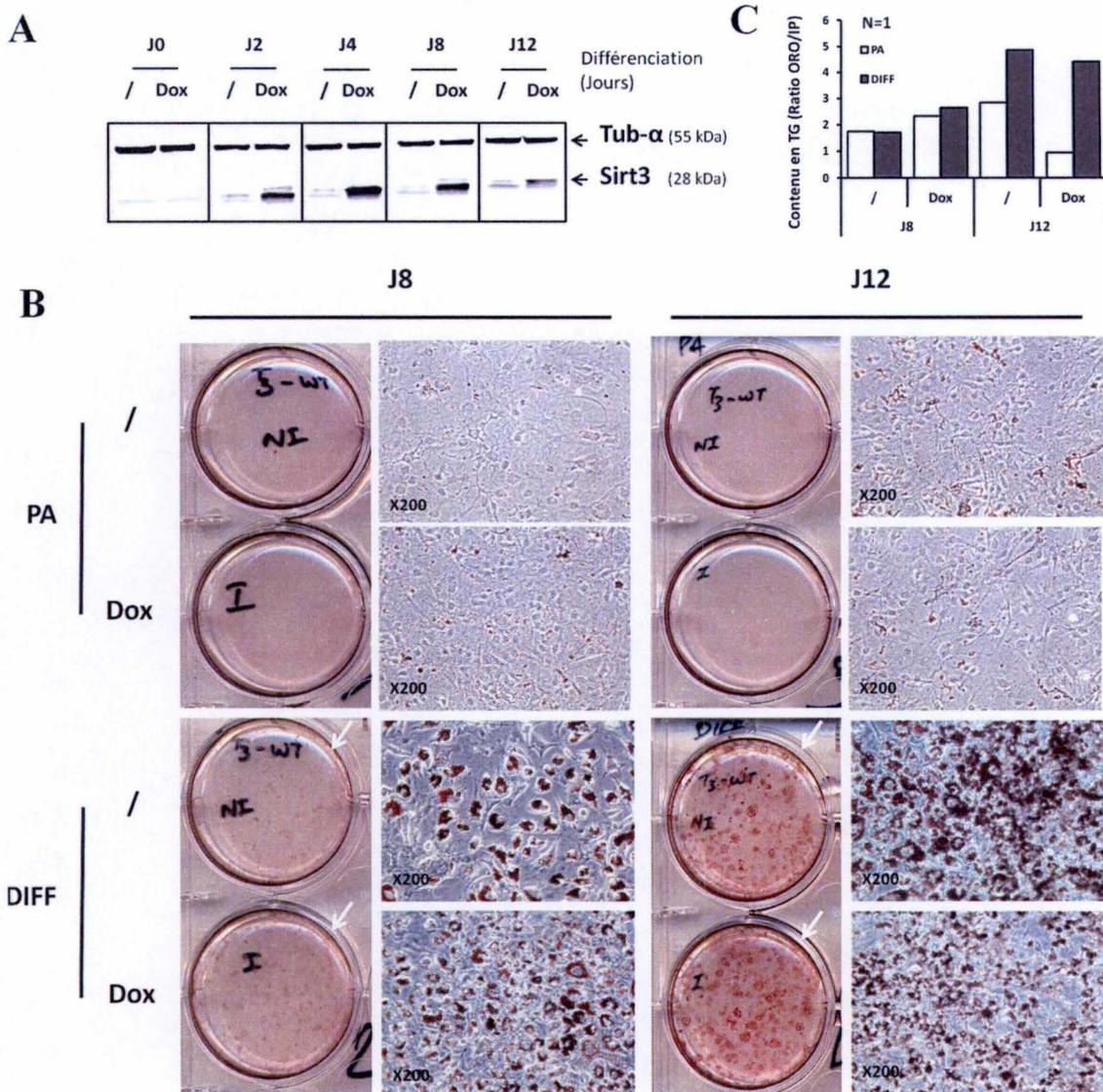


Figure 3.7 : Caractérisation de la surexpression de la Sirt3 dans les cellules 3T3-L1 en différenciation.

Les pré-adipocytes 3T3-L1 ont été transduits en boîtes de culture de 75 cm² avec des lentivirus renfermant le vecteur de transfert pSLIK-Hygro codant pour la Sirt3 (adressée à la mitochondrie) dont l'expression est inducible par la doxycycline. Les cellules transduites ont ensuite été sélectionnées pendant 3 jours en présence d'hygromycine 450 ng/ml diluée dans le milieu de culture minimal puis ensemencées dans des plaques de culture à 6 puits. Le lendemain, les cellules ont été incubées ou non (/) pendant 24 h avec 1 μ g/ml de doxycycline et différenciées pendant 2, 4, 8 et 12 jours selon le protocole décrit dans la section « matériel et méthodes » avec une induction de l'expression de la Sirt3 par la doxycycline maintenue jusqu'au jour 6. (A) Des lysats cellulaires ont ensuite été préparés avec du DLA-Mito aux jours 0 (J0), 2 (J2), 4 (J4), 8 (J8) et 12 (J12) et l'abondance de la Sirt3 a été analysée par Western blot en fluorescence (Gel 4-15 %). L'immunoblot a été réalisé grâce à un anticorps anti-Sirt3 et un anti-Tubuline- α . L'immuno-détection de la Tubuline- α a été utilisée comme contrôle de charge. (B) Macroscan et micrographies des cellules pré-adipocytaires (PA) ou différenciées (DIFF) après 8 (J8) ou 12 (J12) jours en présence (Dox) ou en absence (/) de doxycycline. (C) Une coloration des TG à l'ORO a ensuite été réalisée. L'ORO colorant les lipides neutres contenus dans les cellules est ensuite solubilisé dans l'éthanol et l'absorbance est mesurée sur un aliquot de 250 μ l au spectrophotomètre (490 nm). Les valeurs obtenues sont ensuite normalisées pour le nombre de cellules estimé par un marquage de l'ADN à l'iodure de propidium. Les résultats sont présentés comme les rapports entre les valeurs d'absorbance (ORO) et les intensités de fluorescence obtenues pour le marquage d'ADN et représentent une seule valeur (N=1).

utilisant l'induction lentivirale. Les constructions nous ont été généreusement données par le Dr Eric Bell (Laboratoire de L. Guarente, MIT, USA).

Nous avons d'abord entrepris de vérifier que la surexpression de la Sirt3 pouvait être observée dans ces conditions (**Figure 3.6**). Des cellules HEK293T ont été transfectées afin d'assurer une production de particules virales, qui ont ensuite été transduites dans des préadipocytes 3T3-L1 avant d'être incubés dans un milieu de culture de sélection contenant 850 ng/ml d'hygromycine pendant 3 jours afin de ne conserver que les cellules qui surexpriment le transgène. Les cellules ont ensuite été différenciées ou non pendant 2, 4, 8 ou 12 jours dans un milieu de différenciation contenant de la doxycycline à une concentration de 1 µg/ml. La molécule utilisée pour permettre l'induction de l'expression du transgène est ajoutée seulement pendant les 6 premiers jours de la différenciation (**Figure 3.7A**). Ce temps de 6 jours a été choisi car il permet d'obtenir une bonne induction de l'expression de l'enzyme pendant la période critique pour l'accumulation des TG dans les cellules en différenciation tout en limitant le temps d'exposition des cellules à l'antibiotique. Dans ces conditions, on observe bien une augmentation de l'expression de la Sirt3 en réponse à l'induction par la doxycycline et ce dès 2 jours de différenciation. Par contre, il faut noter que l'abondance de Sirt3 endogène (dans les cellules soumises au protocole de différenciation mais non incubées en présence de doxycycline) reste peut ou pas modifiée sauf en fin de programme après 12 jours de différenciation. Bien que les cellules continuent à présenter un certain degré de différenciation une observation comparable a également été faite sur les changements d'abondance de la SOD2 et l'accumulation de TG, qui sont plus faibles que dans les cellules non transduites par les lentivirus (données non présentées), ce qui suggère que la transduction lentivirale des préadipocytes (et la période de sélection de 3 jours en présence d'hygromycine) ne sont pas neutres sur la biologie de la cellule et pourraient altérer leur potentiel de différenciation.

De plus, un deuxième élément dont il faut tenir compte est que les cellules dans lesquelles la surexpression de la Sirt3 est induite ont non seulement subi une transduction lentivirale et une sélection en présence d'hygromycine pendant plusieurs jours mais sont également exposées à la doxycycline. Avant de poursuivre nos expériences, nous avons donc voulu tester l'effet éventuel de la doxycycline sur l'efficacité de la différenciation cellulaire et ce, sur des préadipocytes non transduits soumis à la différenciation pendant 12 jours (**Figure 3.7**). Dans ces conditions, nous observons que la présence de doxycycline provoque une légère augmentation de l'accumulation de TG spontanée dans les préadipocytes alors que la molécule semble diminuer l'accumulation de TG dans les cellules différenciées, bien que ces différences ne soient pas statistiquement significatives dans nos conditions expérimentales.

Conscients du fait que la transduction des adipoblastes 3T3-L1 affecte leur potentiel de différenciation et que la présence de doxycycline modifie également légèrement le contenu en TG des cellules au terme des traitements, nous avons tout de même tenté de tester l'effet d'une induction de l'expression de la Sirt3 dans des préadipocytes sur l'efficacité de différenciation des cellules en recherchant l'effet de la surexpression de la désacétylase mitochondriale sur le contenu en TG des cellules.

Pour cela des préadipocytes ont été transduits avec des lentivirus, sélectionnés avec 850 ng/ml d'hygromycine pendant 3 jours puis différenciés ou non pendant 8 ou 12 jours en présence ou en absence de doxycycline à 1 µg/ml pendant les 6 premiers jours de la différenciation. A la **Figure 3.8**, bien que nous n'ayons réalisé cette expérience qu'une seule fois, on constate que l'induction de l'expression de la Sirt3 précocement au cours de l'adipogenèse ne modifie pas ou peu les contenus en TG (déterminé par une coloration à l'ORO et sa quantification au spectrophotomètre) obtenus au terme de 8 ou de 12 jours de différenciation. La période de l'accumulation des TG (généralement observées entre les jours 4 et 6 du programme de

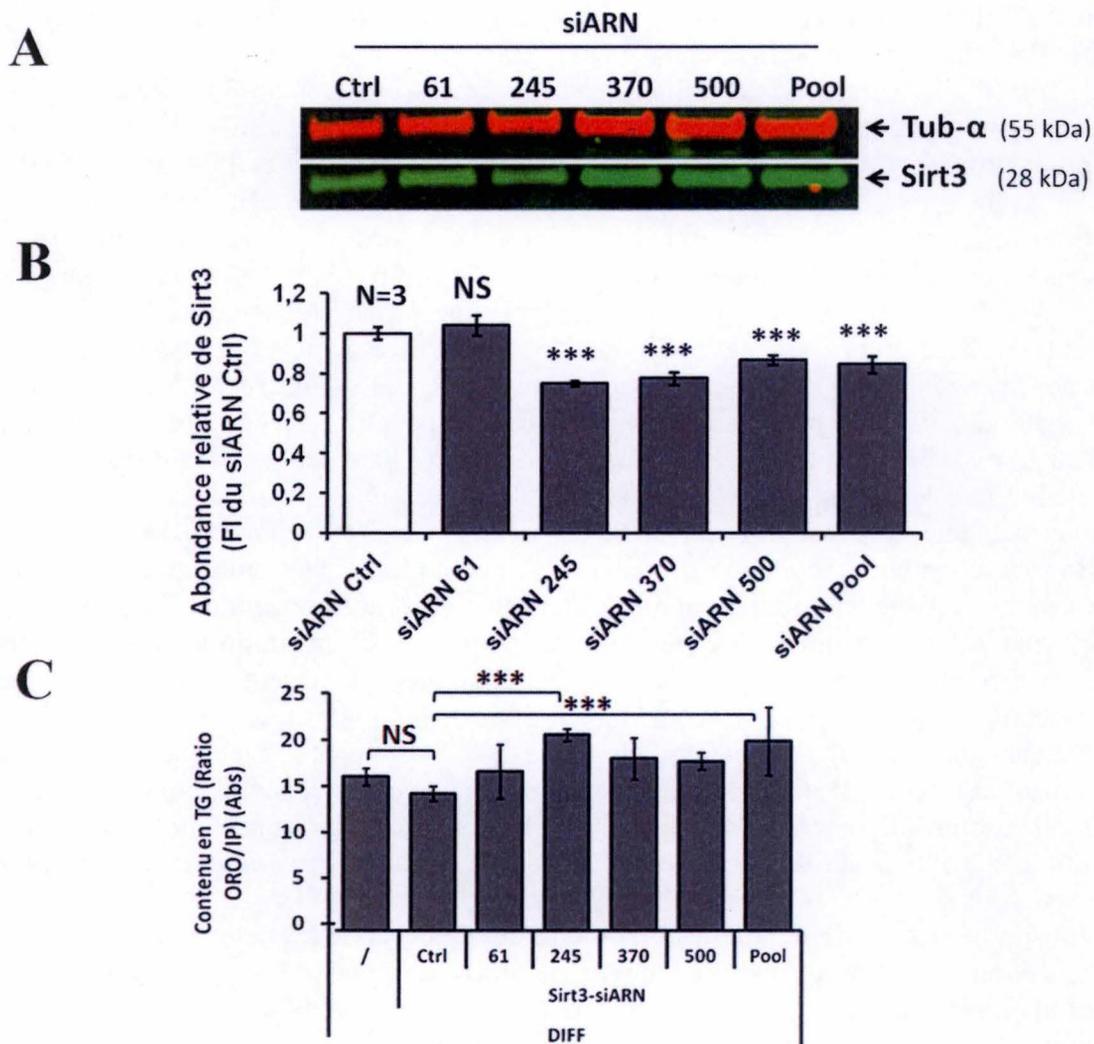


Figure 3.8 : Caractérisation de la répression de l'expression de la Sirt3 dans les cellules 3T3-L1 en différenciation

Les pré-adipocytes 3T3-L1 ont été transduits en boîtes de culture de 75 cm² avec des lentivirus renfermant le vecteur de transfert pLenti-siRNA-GFP (ou contrôle) codant pour les différents siARN théoriquement capables d'inhiber la traduction de la Sirt3. Les cellules transduites ont ensuite été sélectionnées pendant 3 jours en présence de puromycine 2 µg/ml diluée dans le milieu de culture minimal, ensemencées dans des plaques de culture à 6 puits et différenciées pendant 12 jours selon le protocole décrit dans la section « matériel et méthodes ». (A) Des lysats cellulaires ont ensuite été préparés avec du DLA-Mito et l'abondance de la Sirt3 a été analysée par Western blot en fluorescence (Gel 4-15 %). L'immuno-blot a été réalisé grâce à un anticorps anti-Sirt3 et un anti-Tubuline-α. L'immuno-détection de la Tubuline-α a été utilisée comme contrôle de charge. (B) Les abondances protéiques ont été quantifiées grâce au logiciel Odyssey et normalisées pour l'abondance de la Tubuline-α du même échantillon. Les résultats sont présentés en abondance relative de la Sirt3 comme « fold d'induction » (FI) par rapport à l'abondance de l'enzyme dans la condition contrôle (siARN Ctrl). (C) Macroscan des cellules pré-adipocytaires (PA) ou différenciées (DIFF) (jour 12). (D) Une coloration des TG à l'ORO a ensuite été réalisée. L'ORO colorant les lipides neutres contenus dans les cellules est ensuite solubilisé dans l'éthanol et l'absorbance est mesurée sur un aliquot de 250 µl au spectrophotomètre (490 nm). Les valeurs obtenues sont ensuite normalisées pour le nombre de cellules estimé par un marquage de l'ADN à l'iodure de propidium. Les résultats sont présentés comme les rapports entre les valeurs d'absorbance (ORO) et les intensités de fluorescence obtenues pour le marquage d'ADN et sont exprimés en moyennes ± 1 écart-type pour 3 expériences indépendantes (N=3). Les différences entre moyennes ont été analysées par une ANOVA I suivie d'un test de Newman-Keuls (***) ; P<0,001).

différenciation) dans les cellules en différenciation ne semble pas non plus modifiée par une surexpression de la Sirt3.

En conclusion, l'augmentation de l'expression de la Sirt3 ne semble pas, à elle seule, être un inducteur de la différenciation des préadipocytes ni avoir un effet « enhancer » ou « inhibiteur » sur l'efficacité de la différenciation induite par le milieu pro-adipogénique. Toutefois, ceci ne constitue qu'une expérience préliminaire et les résultats devront être confirmés.

3.1.3.2 Effet de la répression par silençage de l'expression de la Sirt3 sur l'adipogenèse

L'absence d'effet d'une surexpression du gène codant la désacétylase mitochondriale sur le contenu en TG dans les préadipocytes ou les cellules en différenciation ne signifie pas qu'elle n'a pas de rôle à jouer dans l'adipogenèse. En effet, rappelons que l'expression du gène codant pour la Sirtuine 3 est augmentée au cours de la différenciation des préadipocytes en adipocytes. Pour rechercher un rôle éventuel de la Sirt3 dans une modulation de l'adipogenèse, nous avons ensuite analysé les effets de la répression de son expression dans les cellules en différenciation sur le contenu en TG dans les 3T3-L1. Pour atteindre cet objectif, nous avons, pour les raisons présentées dans le point précédent, exploité un système de transduction lentivirale pour permettre le silençage des transcrits de Sirt3 à l'aide d'ARN interférents (siARN). Quatre séquences spécifiques et potentiellement capables d'inhiber l'expression de Sirt3 (# : 61, 245, 370 ou 500) ont été choisies (voir point 2.2 du matériel et méthodes), ainsi qu'un siARN servant de contrôle négatif. Les siARNs ont été délivrés individuellement ou simultanément (Pool) grâce à la transduction lentivirale dans les cellules 3T3-L1 qui ont ensuite été sélectionnées par la puromycine à 2 µg/ml pendant 3 jours puis différenciées.

Dans un premier temps, nous avons premièrement analysé l'efficacité de l'invalidation de l'expression de la Sirt3 pour chacune des conditions en quantifiant l'abondance de l'enzyme par Western Blot (**Figure 3.8A**). On observe sur cette figure que les siRNA 245 et 370 sont les plus efficaces sur la diminution de l'expression de la Sirt3 mais que la diminution obtenue ne dépasse pas les 25-30 % dans 3 expériences indépendantes (**Figure 3.8A et B**). L'efficacité de la diminution de l'expression de Sirt3 semble également corrélée à la modification du contenu en TG (quantifié par une coloration des tapis cellulaires à l'Oil Red O et une mesure de l'absorbance au spectrophotomètre du colorant solubilisé dans l'éthanol) dans les cellules différenciées (**Figure 3.8C**). Il semble donc que les cellules transduites avec un siARN conduisant à une petite diminution de l'expression de la Sirt3 contiennent également légèrement plus de TG.

Le siARN 245 semble le plus efficace des 4 testés pour diminuer l'expression de la Sirt3. Cette observation va dans le même sens que les données préliminaires obtenues pour la différenciation de MEF C57Bl/6J et 129 provenant de souris invalidées pour l'expression du gène *Sirt3*. En effet, la différenciation de ces cellules, estimée par la quantification du contenu global en TG, semble plus importante que la différenciation des MEF de souris sauvages. Bien que l'efficacité du silençage de l'expression ne soit pas très forte, ce résultat nous laisse penser que la Sirt3 pourrait constituer un acteur nécessaire au bon déroulement des processus cellulaires impliqués dans l'adipogenèse. Nous sommes cependant bien conscients que ces données sont préliminaires et que les conditions expérimentales visant à augmenter l'efficacité du silençage de l'expression du gène codant la désacétylase devront être optimisées. Si ces effets sont amplifiés et confirmés, les mécanismes potentiellement affectés et régulés par la Sirtuine 3 dans le contrôle de la différenciation adipocytaire devront ensuite être recherchés/identifiés.

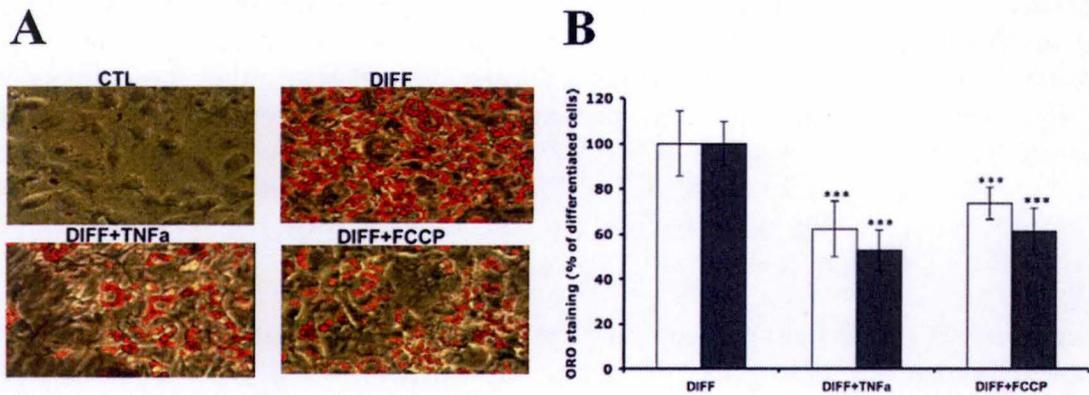


Figure 3.9 : Effets du FCCP et du TNF α sur le contenu en TG des 3T3-L1 (Tejerina et al., 2009)

(A) Micrographies (prises au microscope à contraste de phase) de pré-adipocytes 3T3-L1 (CTL) ou différenciés et incubés ou non (DIFF) en présence de FCCP 0,5 μ M ou de 10 ng/ml de TNF α pendant 6 jours. Grossissement : 250 X. (B) Quantification du contenu en TG des cellules incubées en présence de FCCP ou de TNF α pendant 3 (colonnes blanches) ou 6 jours (colonnes grises).

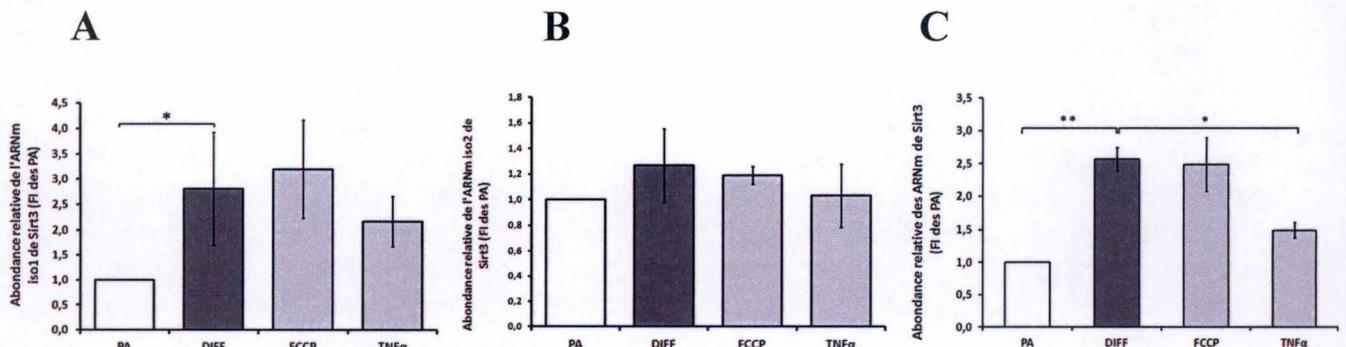


Figure 3.10 : Effets des traitements FCCP and TNF α sur l'abondance relative des transcrits de la Sirt3

Les préadipocytes 3T3-L1 ont été différenciés (DIFF) ou non (PA) durant 12 jours puis traités avec du FCCP 0.5 μ M ou du TNF α 10ng/ml pendant 72h selon la description disponible dans la section « matériel et méthodes ». L'ARN total a été extrait après les 72h et une quantité de 2 μ g d'ARN a été utilisée pour la rétro-transcription en ADNc, et un aliquot dilué 10 X a été utilisé pour quantifier l'abondance relative des isoformes 1 (A), 2 (B) et des 3 isoformes simultanément (C) des transcrits de *Sirt3* par RT-qPCR. Les résultats ont été calculés sur base des $\Delta\Delta$ Ct obtenus, normalisés pour le facteur de transcription TFIID utilisé comme gène de référence et exprimés en fold d'induction (FI) des valeurs déterminées pour les préadipocytes, en moyennes \pm 1 écart type, pour N=3 expériences indépendantes. Les différences entre moyennes ont été calculées par une ANOVA suivie d'un test de Newman-Keuls (P<0.05 : * ; P<0,01 : **).

PARTIE III.II

Caractérisation de l'abondance de la Sirtuine 3 dans les adipocytes 3T3-L1 soumis au découplage mitochondrial ou stimulés par le TNF α

Nous avons vu dans l'introduction que le développement d'un phénotype obèse est associé à une perturbation de la fonction mitochondriale adipocytaire même si la question de savoir si le dysfonctionnement mitochondrial est une cause ou une conséquence des changements observés dans les tissus adipeux blancs d'individus obèses est encore débattue dans la littérature. En réponse aux changements d'expression des gènes des adipocytes, qui voient l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que la leptine, le TNF α , l'IL-6 (Conoppack et al., 2001) et de chémokines comme CCL2 et CCL5 (Tourniaire et al., 2013) augmenter, les TABI deviennent alors le siège d'un foyer inflammatoire non infectieux de faible intensité, dans lequel les macrophages (et plus particulièrement les macrophages polarisés M1-pro-inflammatoires) (Weisberg et al., 2003) s'infiltrent et s'activent, libérant dans l'environnement immédiat des adipocytes, des molécules pro-inflammatoires telles que le TNF α (Guilherme et al., 2008) (Tilg and Moschen., 2006). Les effets de cette cytokine pro-inflammatoire sur le TA sont nombreux et notre laboratoire a contribué à caractériser ses effets sur l'adipocyte murin en montrant que cette molécule provoquait, dans une certaine mesure, une dédifférenciation des adipocytes 3T3-L1, caractérisée par une diminution du contenu en TG (Tejerina et al., 2009) (**Figure 3.9**). Si l'implication d'une diminution de l'expression et/ou de l'activité du facteur de transcription PPAR γ a pu être montrée dans ce processus, le TNF α est connu pour induire un stress oxydatif au sein des mitochondries (Goossens et al., 1999) et diminue également l'expression de la protéine de découplage UCP-2 dans les adipocytes 3T3-F442A par un mécanisme dépendant de l'oxyde d'azote (NO) (Merial et al., 2000). Le TNF α conduisant donc à un stress mitochondrial, nous avons étudié les changements d'abondance de la Sirt3 dans des adipocytes incubés en présence de la cytokine pro-inflammatoire et les avons comparés aux effets provoqués par un découplage mitochondrial induit par le FCCP (carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxy-phenylhydrazone), un protonophore autorisant le retour matriciel des protons à partir de l'espace inter-membranaire mitochondrial (To et al., 2010). En effet, un grand intérêt est né de ces molécules capables d'induire un découplage mitochondrial, de par leur effet positif sur le contenu en TG des adipocytes (Tejerina et al., 2009) et la stimulation de l'oxydation de fuels énergétiques sans contribuer à la production d'ATP, puisqu'ils dissipent l'énergie sous forme de chaleur. Cependant, ces molécules découplantes provoquent également un stress pour les mitochondries et leur utilisation à de fortes concentrations induit la mort par apoptose dans de nombreux types cellulaires (Dispersyn et al., 1999).

3.2.1 Analyse de l'abondance de Sirt3 en réponse à un découplage induit par le FCCP ou une stimulation par le TNF α

Dans le but de rechercher des changements éventuels d'abondance de Sirt3 en réponse à ces deux types de traitements, des adipoblastes 3T3-L1 ont été ensemencés dans des boîtes de culture de 25 cm² et différenciés pendant 12 jours selon le protocole disponible dans la section « matériel et méthodes ». Les adipocytes ont ensuite été incubés pendant 3 jours avec du FCCP à 0,5 μ M ou du TNF α à 10 ng/ml.

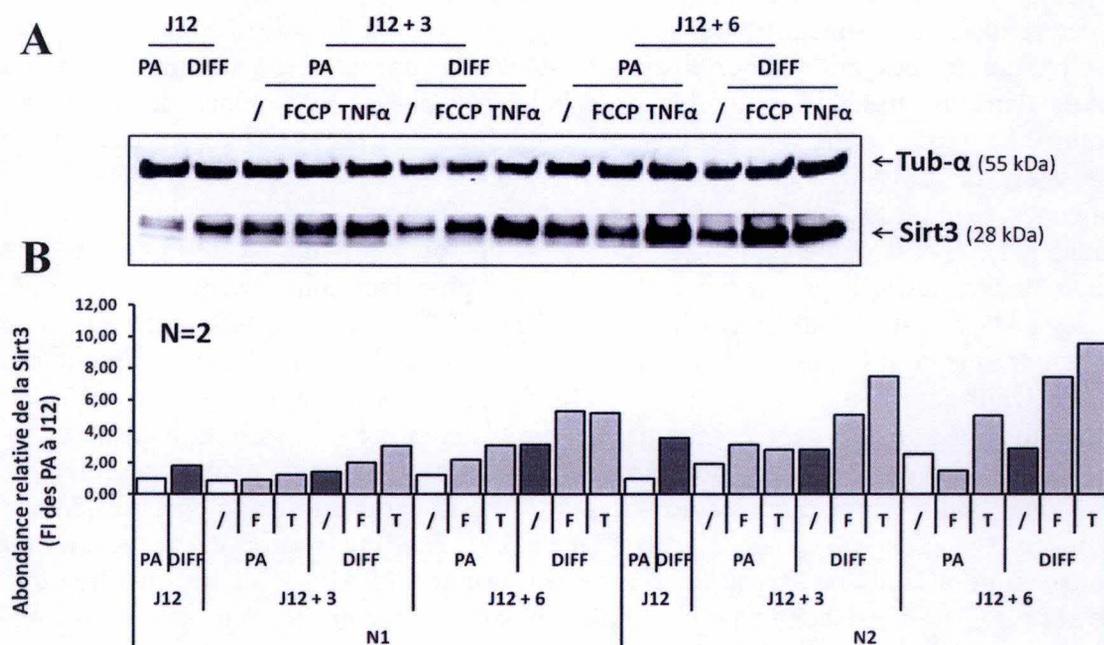


Figure 3.11 : Effet des traitements FCCP et TNF α sur l'abondance protéique de la Sirt3

Les préadipocytes 3T3-L1 ont été différenciés (DIFF) ou non (PA) durant 12 jours puis traités avec du FCCP 0.5 μ M ou du TNF α 10ng/ml pendant 72h ou 144h selon la description disponible dans la section « matériel et méthodes ». Les lysats cellulaires totaux ont été préparés avec du DLA-Mito aux jours 12 (J12), 15 (J12+3) et 18 (J12+6) et l'abondance de la Sirt3 a été analysée par Western Blot en fluorescence (Gel 12 %). (A) Immuno-blot réalisé grâce à un anticorps anti-Sirt3 ou anti-Tubuline- α . L'immunodétection de la Tubuline- α a été utilisée comme contrôle de charge. (B) L'abondance de la Sirt3 a été quantifiée grâce au logiciel Odyssey et normalisée pour l'abondance de la Tubuline- α du même échantillon. Les résultats de chaque expérience sont présentés individuellement en abondance relative (fold d'induction) de la Sirt3 par rapport aux préadipocytes extraits à jour 12 (J12, PA), pour N=2 expériences indépendantes.

3.2.1.1 Abondance des transcrits de Sirt3 au cours des traitements FCCP/TNF α

La 1^{ère} étape de la caractérisation de l'abondance de la Sirt3 au cours de l'adipogenèse a consisté en une analyse de l'abondance relative des différentes isoformes de transcrits de *Sirt3* par RT-qPCR. Rappelons l'existence de 3 isoformes du transcrit murin de *Sirt3*, T1, T2 (les formes longues) discriminables sur base de la différence de leurs séquences, et T3, l'isoforme la plus courte, non discriminables puisque l'entièreté de sa séquence est partagée avec les isoformes longues. Nous avons donc étudié les abondances relatives des deux 1^{ère} isoformes (T1 et T2) et de toutes les isoformes simultanément, englobant ainsi T3 (T1, T2 et T3), bien que nous ayons vu auparavant que l'abondance de cette 3^{ème} isoforme est bien inférieure à celles de T1 et T2 (Yang et al., 2011). On observe une augmentation statistiquement significative de l'abondance relative de l'isoforme T1 et de l'ensemble des 3 isoformes dans cellules 3T3-L1 différenciées par rapport à l'abondance retrouvée dans les préadipocytes. Ce résultat confirme bien les données obtenues précédemment (**Figure 3.10**). Bien que nous n'observions aucune différence d'abondance des ARNm de *Sirt3* dans les cellules incubées en présence de 0,5 μ M de FCCP pendant 3 jours, le TNF α semble induire une diminution l'abondance globale des différentes isoformes de *Sirt3*. La diminution (bien que non significative) est essentiellement observée pour l'isoforme 1 et est confirmée (différence significative) pour la diminution d'abondance des 3 isoformes analysées simultanément.

3.2.1.2 Abondance protéique de la Sirt3 au cours des traitements FCCP/TNF α

Afin de rechercher si les effets observés au niveau des ARNm de la Sirt3 sont reflétés au niveau protéique, nous avons ensuite analysé l'abondance de la Sirt3 en Western blotting en fluorescence à partir de lysats totaux provenant de cellules différenciées ou non puis incubées en présence ou en absence (contrôles) de FCCP à 0,5 μ M ou de TNF α à 10 ng/ml pendant 3 ou 6 jours (**Figure 3.11A**). Nous voyons que l'abondance de la Sirt3 est bien augmentée dans les cellules différenciées pendant 12 jours par rapport à l'abondance de la protéine retrouvée dans préadipocytes maintenus en culture pendant la même période. Une information étonnante est qu'il semble que l'abondance de la désacétylase soit plus élevée dans les adipocytes incubés en présence de FCCP ou de TNF α . Cette observation est particulièrement visible après 6 jours de traitement (**Figure 3.11B**). Pour un temps de 6 jours, il apparaît que l'abondance de Sirt3 est également augmentée dans les préadipocytes, ce qui n'est pas observé pour les fibroblastes incubés en présence de FCCP. Cependant, ces observations sont à considérer avec prudence car elles sont seulement le résultat de deux expériences indépendantes présentant une certaine variabilité. Aucune analyse statistique n'a donc été effectuée et nous ne pouvons que discuter de tendances. Rappelons qu'en Western blot, nous analysons l'abondance de la forme courte de l'enzyme (28 kDa). Cette augmentation d'abondance dans les cellules exposées au FCCP ou au TNF α pourrait donc suggérer qu'un contrôle positif s'exerce sur la traduction de l'ARNm codant pour l'enzyme ou que des modifications post-traductionnelles (ou un autre mécanisme) s'exercent pour modifier la dégradation de la protéine et augmenter sa stabilité en conditions de stress. Ces mécanismes permettraient de réconcilier les différences observées entre l'abondance des transcrits et de la protéine pour les effets du FCCP ou du TNF α dans les adipocytes 3T3-L1. La régulation des isoformes de la Sirtuine 3 a été étudiée par le groupe de Tong, qui montre que les isoformes de la désacétylase murine sont dégradées par le protéasome, présentent des temps de $\frac{1}{2}$ vie très variables et que l'isoforme M3 de Sirt3 est rapidement dégradée alors que les protéines M1 et M2, mitochondriales, sont stabilisées par une interaction avec l'Hsp60 (Heat Shock Protein 60 kDa) (Yang et al., 2011).

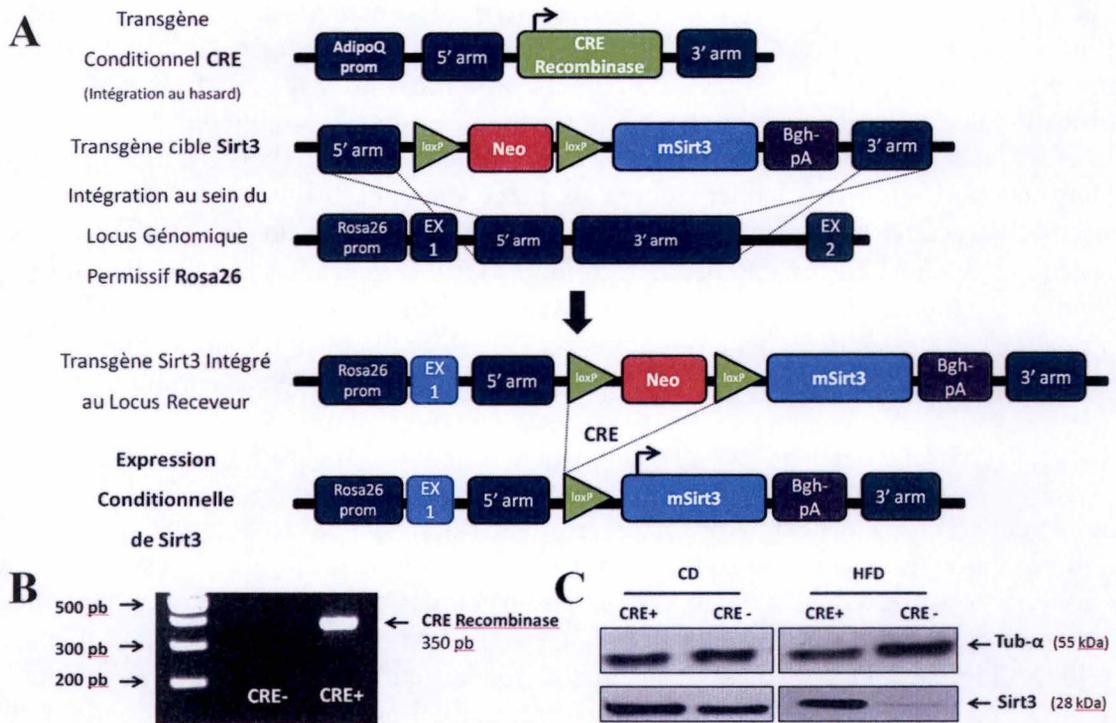


Figure 3.12 : Schématisation des constructions génétiques, génotypage et abondance de Sirt3 chez des souris qui surexpriment conditionnellement la Sirt3 au sein des tissus adipeux.

(A) Représentation schématique de la construction génétique pour le modèle murin de surexpression conditionnelle de la Sirt3 mitochondriale dans les tissus adipeux. L'expression du transgène est autorisée par la Cre recombinase dont l'expression est contrôlée par le promoteur de l'adiponectine et spécifiquement exprimée dans les adipocytes des tissus adipeux bruns et blancs. (B) Exemples de résultats de génotypage obtenus pour des animaux du groupe AdipoSirt3. Seule la présence de l'expression du transgène CRE (à l'état hétérozygote) est visualisée par PCR, donnant lieu à un amplicon d'environ 350 pb dès qu'une copie du transgène est présente dans le génome de l'animal. (C) Western Blot confirmant la surexpression conditionnelle de Sirt3 par le tissu adipeux blanc viscéral d'individus mâles. Classical Diet ; HFD : High Fat Diet. (T.Arnould, données non publiées)

PARTIE III.III

Etude de l'effet d'une surexpression conditionnelle de la Sirtuine 3 dans les tissus adipeux de la souris sur le développement de l'obésité induite par un régime riche en graisses

3.3.1 Présentation et caractérisation du modèle murin

Nous avons précédemment montré (voir introduction point V.7) la nécessité d'étudier l'effet d'une surexpression de la Sirt3, *in vivo*, suite à sa dérégulation (diminution d'expression et d'activité) survenant en réponse au développement d'une obésité. Si les recherches d'intérêt physio(patho)logiques portant sur la Sirt3 ont souvent privilégié les modèles d'inactivation du gène codant pour la désacétylase mitochondriale, l'étude de modèles transgéniques est encore à l'heure actuelle peu développée car jusqu'il y a peu, il n'y avait pas de modèle murin pour étudier la surexpression de Sirt3.

Deux modèles murins avec des fonds génétiques différents ont été développés en 2013-2014 par le Dr Eric Bell dans le laboratoire du Prof. L. Guarente (Department of Biology, The Paul F. Glenn Center for the Science of Aging, Massachusetts Institute of Technology) et utilisés dans le cadre de ce travail. Le premier modèle permet d'étudier spécifiquement l'effet d'une surexpression du gène codant la désacétylase dans les tissus adipeux, à la recherche des effets autonomes de ce tissu. Le premier background génétique est constitué de souris homozygotes pour un transgène « *Sirt3* », une version endogène du gène *Sirt3* délimitée par deux sites loxP et insérée au sein du locus permissif *Rosa26*, communément utilisé pour générer des lignées knock in (**Figure 3.12A**). Une cassette de sélection *Néo* sépare cependant le promoteur du transgène, inhibant ainsi son expression. Ces souris comportent également (ou non) une copie unique (hétérozygotie) d'une séquence codant pour la Cre recombinase, dont l'expression est contrôlée par le promoteur de l'adiponectine, une adipokine dont l'expression est spécifique des tissus adipeux. L'expression du transgène de la Sirt3 est ainsi spécifiquement exprimée au sein des tissus adipeux. La Cre recombinase sera donc capable d'enlever la cassette inhibitrice *Néo* et autorisera la surexpression du transgène *Sirt3* spécifiquement dans les tissus adipeux. Ajoutons encore que le transcrite du transgène possède une queue polyA mais pas de séquence 3' UTR, ce qui rend son expression, en théorie, indépendante d'une régulation par les microARN (**miARN**). Plusieurs miARN comme les miR-195 et miR-28-5p ont en effet été identifiés pour réguler le niveau d'expression de la désacétylase mitochondriale au niveau post-transcriptionnel (Zhang et al., 2015) (Poulsen et al., 2014).

Le niveau d'expression du transgène dans différents tissus adipeux blancs et bruns a été analysé en RT-qPCR lors de l'étape de caractérisation de la souris transgénique réalisée au MIT par T. Arnould (données non présentées). Si une augmentation de l'abondance relative du transcrite de la Sirt3 est apparue, comme attendu, dans les tissus adipeux blancs sous-cutané, viscéral et dans le tissu adipeux brun, son abondance n'était pas ou peu modifiée dans le rein et le foie. Par contre au niveau protéique, dans des conditions normales et en présence d'un régime alimentaire normal, il est difficile de mettre en évidence une abondance augmentée de l'expression du gène codant pour l'enzyme dans les tissus adipeux des souris transgéniques. Pour visualiser cette différence d'abondance entre les souris CRE⁺ et les souris CRE⁻ dans le tissu viscéral, nous avons tiré parti du fait que l'exposition des animaux à un régime riche en graisses provoque une diminution de l'expression de la Sirt3 (Lu et al., 2013).

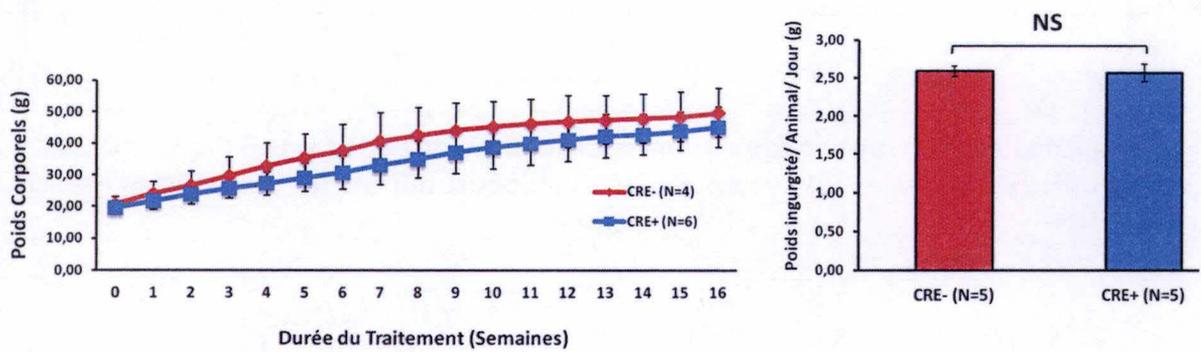


Figure 3.13 : (Résultats préliminaires) Evolution de la masse corporelle et comparaison de la consommation alimentaire de souris transgéniques qui surexpriment ou non la Sirt3 au sein des tissus adipeux.

Effet d'un régime riche en graisses (60 % de l'apport calorique apportés par des graisses) de 16 semaines sur l'évolution de la masse corporelle et le comportement phagique de souris transgéniques surexprimant de manière conditionnelle (CRE+) ou non (CRE-) la Sirt3 dans les adipocytes des tissus adipeux bruns et blancs. (A) Les souris mâles ont été enrôlées dans le protocole expérimental à l'âge de 5 semaines, nourries ad libidum avec un régime riche en graisse (60 %) et pesées tous les 7 jours. (B) La quantité quotidienne de nourriture ingérée par animal pendant ces 16 semaines est également indiquée. CRE+, CRE- : souris exprimant ou non la CRE recombinase. Le nombre d'animaux engagés dans le protocole expérimental par génotype est indiqué entre parenthèses (*T. Arnould, données non publiées*).

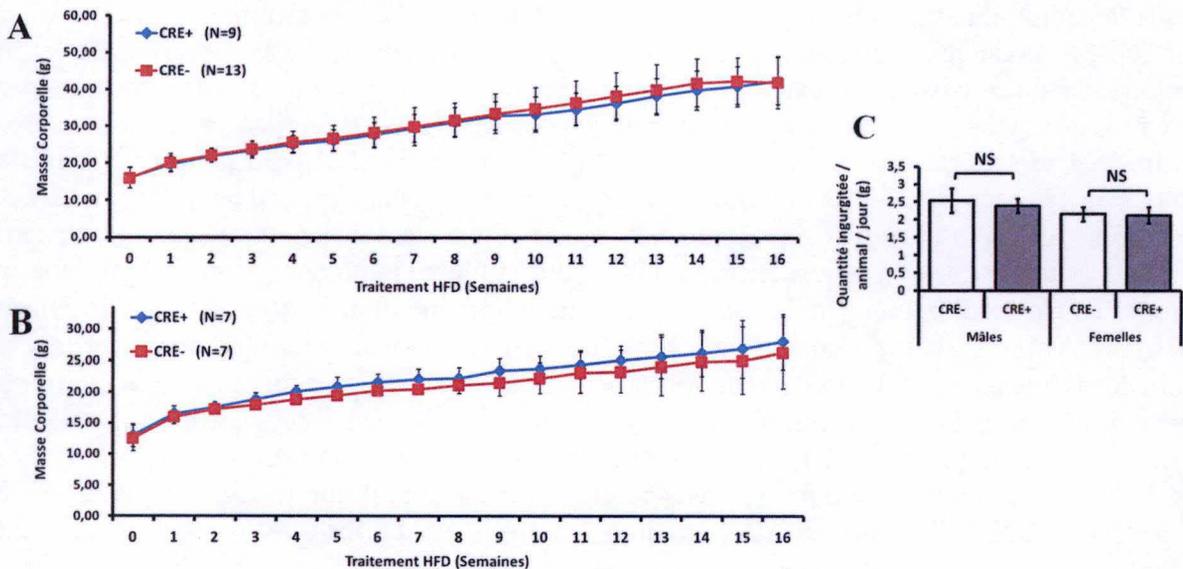


Figure 3.14 : Evolution de la masse corporelle et comparaison de la consommation alimentaire de souris transgéniques qui surexpriment ou non la Sirt3 au sein des tissus adipeux.

Effet d'un régime riche en graisses (60 % de l'apport calorique apportés par des graisses) de 16 semaines sur l'évolution de la masse corporelle (A et B) et le comportement phagique (C) de souris transgéniques surexprimant de manière conditionnelle (CRE+) ou non (CRE-) la Sirt3 dans les adipocytes des tissus adipeux bruns et blancs. (A) Les souris mâles et (B) femelles ont été engagées dans le protocole expérimental à l'âge de 5 semaines, nourries ad libidum avec un régime riche en graisse et pesées tous les 7 jours. (C) La quantité quotidienne de nourriture ingérée par animal pendant ces 16 semaines est également indiquée. CRE+, CRE- : souris exprimant ou non la CRE recombinase. Le nombre d'animaux engagés dans le protocole expérimental par génotype est indiqué entre parenthèses.

Dans ces conditions, nous avons émis l'hypothèse que l'abondance de l'enzyme devrait diminuer dans le tissu adipeux blanc de souris exposées à un régime riche en graisse (pendant 4 mois) et que l'expression du transgène devrait contribuer à compenser cette diminution. Si notre hypothèse est correcte, l'abondance de la Sirt3 devrait donc être plus importante dans le tissu adipeux de la souris transgénique soumise au régime riche en graisses que la souris ne surexprimant pas le transgène. C'est effectivement ce que nous observons pour des extraits de tissu adipeux blanc viscéral à la **Figure 3.12C**.

Dans une expérience préliminaire réalisée dans le laboratoire du Prof. Guarente, des animaux de ces deux groupes ont été soumis à un traitement alimentaire riche en graisses pendant 4 mois afin d'étudier l'évolution de l'obésité et ses désordres associés. Dans le cadre de ce travail, les animaux mâles ont constitué le groupe principal d'investigation, car la complexité du réseau de communication hormonal chez les femelles est souvent associée à un biais dans l'étude de l'obésité (Palmer et Clegg, 2015). Les résultats de ces expériences préliminaires ont montré une légère diminution (non significative) de l'accumulation de la masse corporelle pour les souris mâles qui expriment la Cre recombinase et donc qui surexpriment la Sirt3 (**Figure 3.13A**).

Cinq animaux reproducteurs ont été gracieusement fournis par le laboratoire américain et ont permis de générer l'élevage nécessaire à la production des animaux du protocole expérimental utilisés dans ce travail. Après sevrage, les animaux ont été systématiquement génotypés pour la CRE recombinase selon la description disponible dans la section « matériel et méthodes » (**Figure 3.12B**). L'élevage a ensuite été amplifié pour produire les animaux de protocoles (CRE+ : N=9 et CRE- : N=11) qui ont été soumis à une alimentation riche en graisses pendant 16 semaines. Différentes analyses ont, à terme, été réalisées dans le but de confirmer ou d'infirmer les résultats préliminaires obtenus.

La troisième partie de ce projet a donc été consacrée à l'étude d'un modèle transgénique murin surexprimant conditionnellement la Sirt3 au sein des tissus adipeux, afin de mettre en évidence un éventuel effet bénéfique de la surexpression du gène codant pour la désacétylase mitochondriale sur le développement de l'obésité induite chez des d'animaux nourris avec un régime riche en graisses (60 %).

3.3.2 Evolution des masses corporelles et adipeuses des souris transgéniques pour *Sirt3* en réponse à un traitement riche en graisses pendant 4 mois

Notre premier objectif était de voir si nous pouvions confirmer les différences de masses corporelles observée entre des souris mâles exprimant une copie supplémentaire du gène *Sirt3* dans les tissu adipeux et des souris contrôles soumises à un régime alimentaire riche en graisses. Nous avons dégagé de cette expérience préliminaire que la surexpression de la Sirt3 limitait légèrement la prise de masse corporelle des animaux. Cependant, le nombre d'animaux étant trop faible, les différences observées (oscillant entre 5 et 10 % de la masse corporelle) n'étaient statistiquement pas significatives. Nous avons donc répété l'expérience consistant à soumettre les animaux transgéniques des deux groupes (CRE+ et CRE-, mâles et femelles) à un régime riche en graisses (60 %) (**Figure 3.14 A et B**) et à les peser une fois par semaine. Nous avons également déterminé la quantité de nourriture ingérée par animal et par jour (**Figure 3.14C**).

Les résultats présentés à la **Figure 3.14A et B** montrent que les deux courbes de l'évolution des masses corporelles des groupes de souris surexprimant ou non la désacétylase mitochondriale sont très comparables et qu'aucune différence significative n'est apparue entre

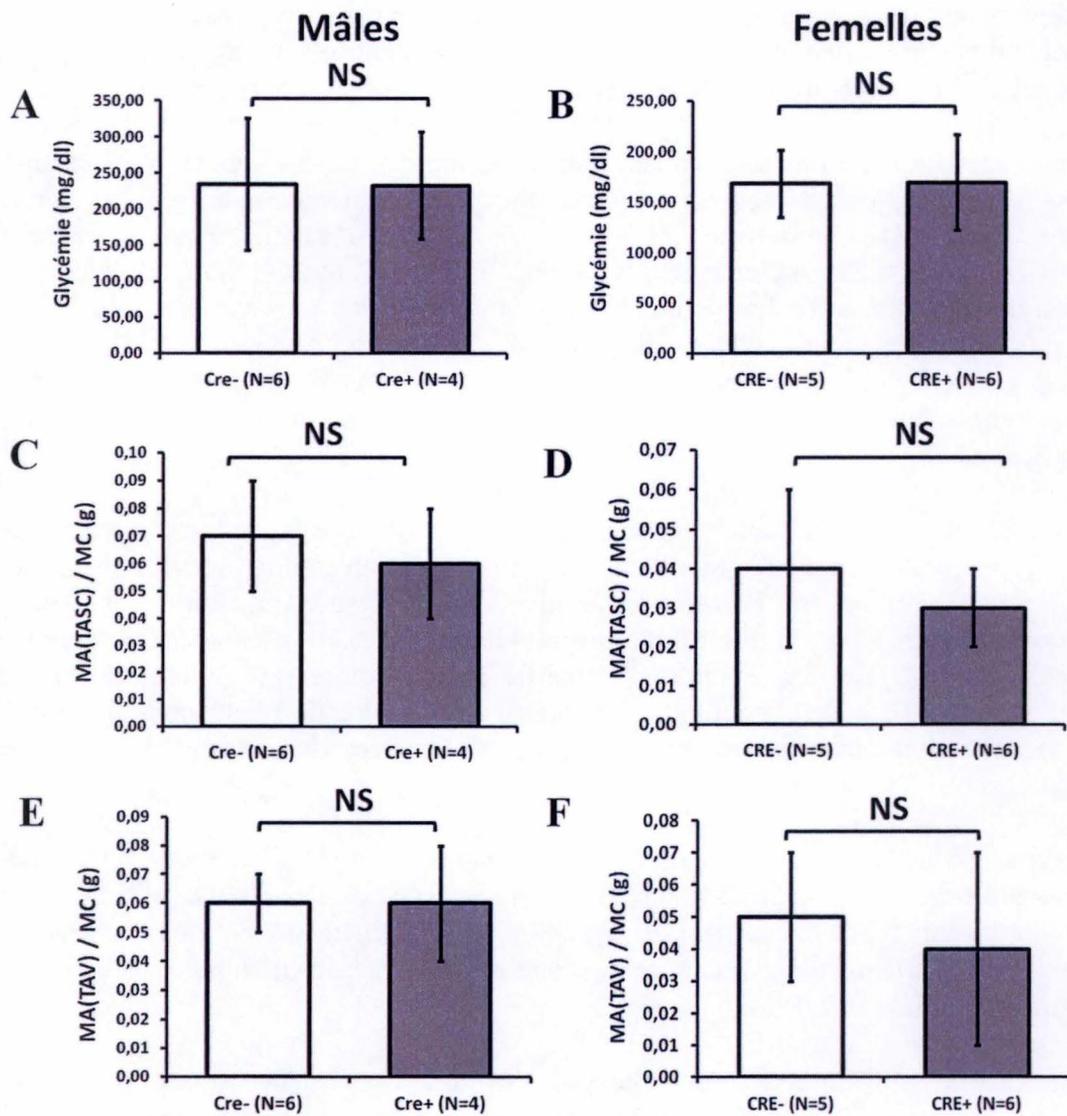


Figure 3.15 : Glycémie et abondance relative des tissus adipeux blancs au terme d'un traitement HFD de 4 mois chez des souris surexprimant conditionnellement ou non la Sirt3 au sein des tissus adipeux.

Effets d'un régime HFD sur la glycémie (A, B) et les masses adipeuses relatives (masses adipeuses normalisée pour les masses corporelles) des tissus adipeux blancs sous-cutanés (TASC) (C, D) et viscéraux (TAV) (E, F) de souris mâles et femelles transgéniques, surexprimant conditionnellement (CRE+) ou non (CRE-) la Sirt3 au sein des tissus adipeux. Les souris ont été engagées dans le protocole à l'âge de 5 semaines. Expérience réalisée sur N=6 et N=5 (CRE-), N=4 et N=6 (CRE+) animaux, chez les mâles et femelles, respectivement. CRE+, CRE- : souris exprimant ou non la CRE recombinase ; MA : masse adipeuse ; TASC : tissu adipeux sous-cutané ; TAV : tissu adipeux viscéral ; MC : masse corporelle.

ces deux groupes d'animaux. Ces données témoignent donc d'une absence d'effet de l'expression du transgène dans les tissus adipeux sur la prise de poids des animaux exposés à un régime riche en graisses pendant une longue durée (16 semaines). Ajoutons encore que les femelles ont une prise de masse corporelle beaucoup plus faible que les mâles dans ces conditions (**Figure 3.14B**). Cette observation, déjà rapportée dans la littérature (Palmer and Clegg, 2015), pourrait être explicable, du moins en partie, par le fait que les souris femelles mangent moins que les souris mâles (**Figure 3.14C**). Par contre, sur cette même figure, nous voyons qu'il n'y a aucune différence statistiquement significative entre les quantités de nourriture ingérées par les souris exprimant ou non le transgène et ce, que l'on s'intéresse aux mâles ou aux femelles.

3.3.3. Mesure de la glycémie des souris mises à jeun au terme du traitement riche en graisse

Malgré ces données décevantes, nous avons poursuivi l'analyse d'autres paramètres que la masse corporelle qui pourraient éventuellement être modifiés entre les deux génotypes. Au terme des traitements, la glycémie à jeun (12 heures de privation de nourriture) a été mesurée à l'aide d'un système de surveillance de la glycémie OneTOUCH Verio (**Figure 3.15A et B**). Nous pouvons observer que la glycémie des mâles est plus élevée que la glycémie mesurée pour les femelles (respectivement, $169,83 \text{ mg/dl} \pm 47,32$ versus $232,75 \text{ mg/dl} \pm 73,92$ pour les animaux qui surexpriment la *Sirt3* dans les tissus adipeux et $168,68 \text{ mg/dl} \pm 33,21$ versus $234,33 \text{ mg/dl} \pm 91,09$ pour les souris contrôles) mais aucune différence significative n'est observée pour des animaux d'un même sexe entre ceux qui surexpriment et ne surexpriment pas le transgène codant la désacétylase mitochondriale. Ces valeurs de glycémies concordent cependant avec l'évolution d'une obésité induite par un régime riche en graisses vers le développement du syndrome métabolique puisque la gamme physiologique de valeurs de glycémie se situe entre 90 mg/dl et 110 mg/dl (Berglund et al., 2008) et que les valeurs obtenues pour les animaux transgéniques sont bien supérieur à ce range normal.

Les animaux ont ensuite été sacrifiés et différents dépôts de tissus adipeux blancs ont été prélevés tels que les tissus adipeux sous-cutanés, englobant les tissus adipeux inter-scapulaires (TASCint) et inguinaux (TASCing) et les tissus adipeux viscéraux, englobant les tissus adipeux abdomino-pelviens (TAVap) et péri-rénaux (TAVpr), selon le protocole disponible dans la section « matériel et méthodes ». Ces tissus ont ensuite immédiatement été pesés, l'un des dépôts de chaque type par animal a été congelé dans l'azote liquide (pour des analyses biochimiques d'expression de gènes) tandis que l'autre a été rapidement fixée dans du formol acétique 4 % pour des préparations histologiques.

3.3.4. Mesure de la masse des tissus adipeux sous-cutanés et viscéraux des souris exposées au traitement riche en graisses

Les masses adipeuses ont été finement extraites, puis pesées et normalisées pour les masses corporelles (MC) des animaux (**Figure 3.15**). On observe d'abord que les mâles possèdent plus de tissus adipeux blancs que les femelles (**Figure 3.15C, D, E et F**). Bien qu'une tendance globale apparaisse dans le sens d'une abondance moins importante des masses adipeuses chez les animaux transgéniques pour la *Sirt3*, par rapport aux contrôles ne surexprimant pas l'enzyme, aussi bien chez les mâles (à l'exception du TAV) que chez les femelles, aucune différence statistiquement significative n'a pu être établie (**Figure 3.15 C et E**). Cette diminution d'abondance adipeuse n'est pas observée pour les masses adipeuses viscérales des mâles (TAV), tissu dont les changements sont les plus importants dans la

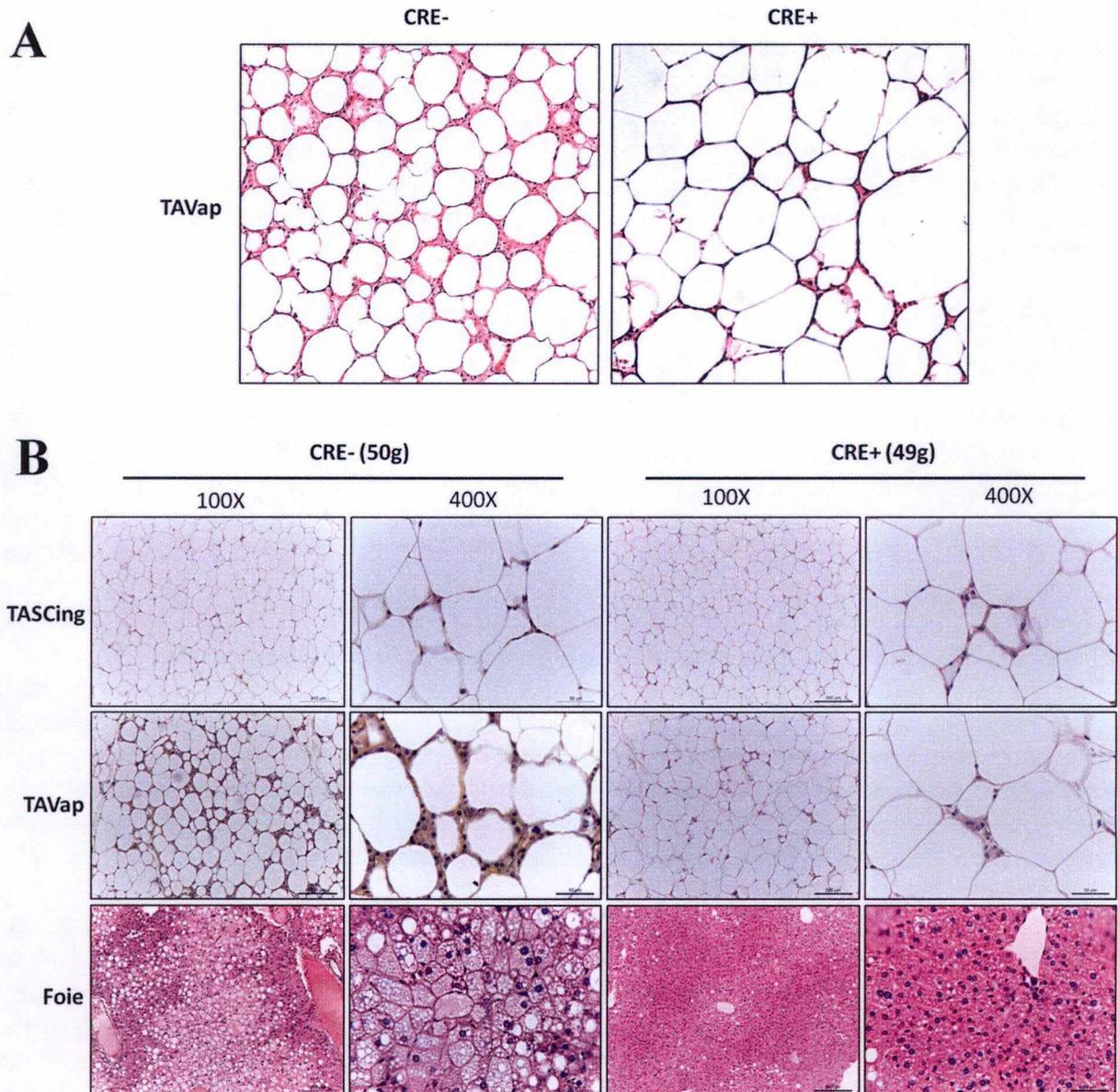


Figure 3.16 : Morphologie des tissus adipeux blancs et du foie au terme d'un traitement HFD de 4 mois chez des souris transgéniques surexprimant conditionnellement ou non la Sirt3 au sein des tissus adipeux.

(A) Coloration des noyaux et cytoplasmes de tissus adipeux viscéraux abdomino-pelviens (TAVap) de souris mâles surexprimant conditionnellement (CRE+) ou non (CRE-) la Sirt3 au sein des tissus adipeux par l'Hématoxyline et l'Eosine (HE), respectivement, permettant une visualisation de la morphologie tissulaire. Résultats préliminaires obtenus au cours de l'année 2014 par T. Arnould. (Données non publiées) (B) Coloration des noyaux, cytoplasmes et fibres conjonctives de tissus adipeux sous-cutanés inguinaux (TASCing), viscéraux abdomino-pelviens (TAVap) et hépatiques (Foie) de souris mâles surexprimant conditionnellement (CRE+) ou non (CRE-) la Sirt3 au sein des tissus adipeux par l'Hémalun, l'Erythrosine et le Safran du Gâtinais (HES), respectivement, permettant une visualisation des morphologies tissulaires. Grossissement : 100 X ou 400 X (barre d'indice : 200 μ m ou 50 μ m, respectivement).

problématique de l'obésité et des pathologies associées. En effet, le tissu adipeux viscéral est, plus que les autres tissus adipeux, associé à l'évolution négative de l'obésité. En conditions d'obésité, ce tissu est, tout comme le tissu adipeux sous-cutané, le siège d'une invasion par les cellules inflammatoires, attirées par les cytokines et chémokines sécrétées par le TA, mais est par contre plus enclin que les autres dépôts à l'installation d'une fibrose, caractérisée par la formation d'une matrice de fibres réticuliniques constituées de collagène 3. Ces deux processus sont négativement associés au développement de l'obésité et agissent en faveur de celui du syndrome métabolique car ils favorisent la nécrose des adipocytes, la délocalisation des acides gras libres et leur prise en charge subséquente par des organes périphériques, ce qui aboutit aux différents stress lipo-gluco-toxiques, responsables, entre autres, de l'insulino-résistance (Chavez et al., 2010) (Rossetti et al., 1990). Dans le but d'évaluer l'apparition de ces modifications tissulaires et leur impact systémique, nous avons donc ensuite réalisé des analyses histologiques des tissus adipeux blancs sous-cutanés, viscéraux, et du foie.

3.3.5 Histologie des tissus adipeux blancs des souris soumises à un traitement riche en graisses pendant 16 semaines

Des observations histologiques (coloration Hématoxyline-Eosine permettant un aperçu de la morphologie tissulaire à partir de la coloration des noyaux et des cytoplasmes, respectivement) réalisées au cours de l'expérience préliminaire à ce projet, ont suggéré que le tissu adipeux blanc viscéral de souris mâles CRE+ surexprimant la *Sirt3*, présentaient peut-être moins d'inflammation et de fibrose en réponse au traitement riche en graisses que le tissu adipeux blanc de souris contrôle (**Figure 3.16**). Malgré qu'aucune différence significative ne soit apparue au niveau des masses corporelles et adipeuses des animaux transgéniques surexprimant la *Sirt3*, nous avons pu observer une tendance similaire concernant les aspects histologiques entre les 2 génotypes (**Figure 3.16A**, T. Arnould, données non publiées). En effet, sur ces coupes histologiques préparées après fixation chimique au formol acétique 4 % des tissus d'individus mâles puis colorées par l'Hémalun, l'Erythrosine et le Safran du Gâtinais, permettant respectivement la mise en évidence des noyaux, cytoplasmes et fibres de conjonctives (voir point du matériel et méthodes 2.10.2), on peut voir le développement d'une fibrose (essentiellement observée dans la zone rétro-péritonéale supérieure du lobe graisseux viscéral abdomino-pelvien) caractérisée par l'envahissement du parenchyme adipocytaire par des fibres réticuliniques (aspect jaunâtre) et semble plus importante pour les souris CRE- que pour les animaux CRE+, compatibles avec l'expression du transgène (**Figure 3.16B**). Pour être corrects, nous devons cependant préciser que ce phénotype n'est visible que chez les animaux ayant développé une obésité sévère (masse ≥ 40 g), ce qui expliquerait l'absence de différence visible lorsque les souris n'ont pas atteint cette masse corporelle au terme du traitement alimentaire riche en graisse.

3.3.6 Pool d'expression adipocytaire au terme du traitement de 16 semaines

Parmi les nombreuses adipokines susceptibles de protéger les tissus et les tissus adipeux blancs en particulier de la fibrose et de l'inflammation, on retrouve l'adiponectine (van Stijn et al., 2014) (Buechler et al., 2011). En raison de ses actions bénéfiques, en faveur d'une protection anti-inflammatoire et de la tolérance périphérique à l'insuline, et du fait que son expression soit fortement diminuée en réponse à l'obésité, nous avons quantifié par RT-qPCR le niveau d'expression relatif de cette adipokine dans les tissus adipeux blancs viscéraux de souris mâles CRE+ et CRE- (**Figure 3.17**). Il apparaît clairement que l'expression de cette adipokine est significativement plus élevée dans les échantillons préparés à partir des tissus adipeux de souris transgéniques surexprimant la désacétylase mitochondriale alors que le

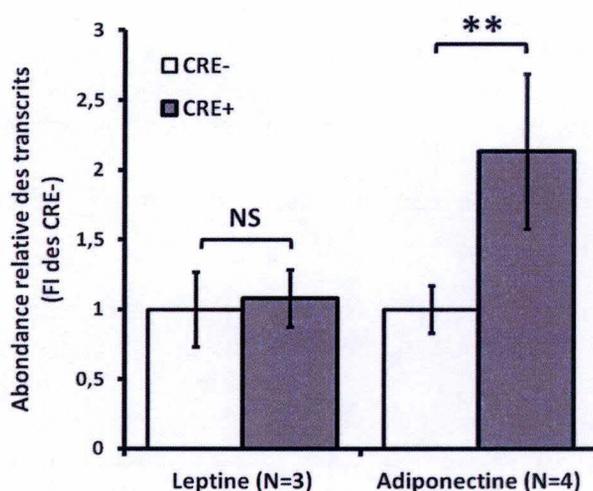


Figure 3.17 : Abondance relative des transcrits de la leptine et l'adiponectine au terme d'un traitement HFD de 4 mois chez des souris qui surexpriment conditionnellement la Sirt3 au sein des tissus adipeux.

L'ARN total a été extrait du tissu adipeux blanc viscéral de souris transgéniques surexprimant conditionnellement la Sirt3 au sein des tissus adipeux blancs, selon le protocole disponible dans la section "matériel et méthodes". Une quantité de 2 µg d'ARN a été utilisée pour la rétro-transcription en ADNc et un aliquot dilué 10 X a été utilisé pour quantifier l'abondance relative de la leptine et de l'adiponectine par RT-qPCR. Les résultats sont calculés sur base des $\Delta\Delta Ct$ obtenus et les valeurs normalisées par rapport au transcrit du facteur de transcription TFIID utilisé comme gène de référence et exprimées en fold d'induction des valeurs obtenues pour l'abondance les individus CRE-. Les résultats représentent la moyenne \pm 1 écart-type pour 3 ou 4 échantillons indépendants, pour la leptine et l'adiponectine, respectivement. Les différences entre moyennes ont été calculées par une ANOVA I suivie d'un test Newman-Keuls (* : $P < 0.05$; ** : $P < 0,01$ et *** ; $P < 0,001$).

niveau d'expression de la leptine est peu ou pas modifié. Il est évident que cette donnée potentiellement intéressante devra être confirmée sur un plus grand nombre d'échantillons (limité à 4 pour chaque groupe, actuellement), reflétée au niveau protéique et circulant dans le sang des animaux traités. Si cette donnée se vérifie, il faudra ensuite rechercher comment la surexpression de la désacétylase mitochondriale permet le contrôle de l'expression de l'adiponectine dans les conditions d'obésité dans le tissu adipeux et vérifier si, en absence d'effet sur l'évolution de la masse corporelle des animaux transgéniques surexprimant *Sirt3* en réponse à un régime riche en graisses, le fait d'avoir une expression plus élevée de la Sirtuine 3 dans ces conditions ne pourrait pas apporter une protection sur un certain nombre de paramètres liés au syndrome métabolique (tolérance au glucose, limitation de l'inflammation tissulaire, de la fibrose adipeuse, ...). De plus, une analyse systématique de la taille des adipocytes ou la quantification de l'invasion de cellules inflammatoires (macrophages, lymphocytes,....) au sein des tissus adipeux blancs devrait être réalisées sur base de marqueurs moléculaires de ces phénomènes.

Ajoutons encore que les effets potentiellement bénéfiques observés dans le tissu adipeux blanc et liés à la surexpression de la Sirt3 dans le tissu adipeux de souris exposées à l'obésité induite pourrait également avoir des effets sur d'autres organes comme le foie (**Figure 3.16B**). En effet, la stéatose hépatique et le nombre d'hépatocytes nécrosés en réponse à l'obésité semble moins importants pour les souris mâles CRE+. Etant donné la lobulation multiple du foie et l'affection progressive de ceux-ci dans le cadre du syndrome métabolique, plusieurs lobes ont été comparés et ont d'autant plus démontré cette différence dans l'aspect « en cité morte » caractéristique de la maladie du foie « gras » non alcoolique (NAFLD). Nous n'excluons donc pas un éventuel effet bénéfique de la surexpression de Sirt3 dans le tissu adipeux, pouvant présenter des répercussions systémiques, car la connexion entre le métabolisme hépatique et l'activité mitochondriale des tissus adipeux et hépatique a déjà été illustrée dans la littérature. (Reilly et al., 2015)

En conclusion nous pouvons dire que malgré l'absence d'effet du transgène *Sirt3* sur l'évolution de la masse corporelle et adipeuse, il semblerait néanmoins autoriser une modulation des propriétés adipocytaires et pourrait influencer positivement le pronostic des individus mâles obèses dans le développement des associations du syndrome métabolique, puisqu'une différence morphologique a pu être observée au niveau du tissu adipeux blanc viscéral, et du foie entre les individus surexprimant ou non la Sirtuine 3 et présentant des masses élevées, et cette différence pourrait être médiée par une modification du pool de sécrétion des adipocytes, tel qu'on l'a observé pour l'adiponectine.

**IV. DISCUSSION, CONCLUSIONS et
PERSPECTIVES**

IV.I DISCUSSION et PERSPECTIVES

4.1.1 Discussion des données obtenues *in vitro*

Nous avons vu précédemment que le rôle de la Sirt3 dans le métabolisme et son impact global positif sur la longévité des espèces, a déjà été bien étudié. En effet, à travers la modulation d'un large panel de protéines et d'enzymes, la Sirt3 joue un rôle très important dans la prévention du vieillissement et des maladies qui s'y rapportent (diminutions sensorielles, cancers, processus neurodégénératifs, ...). L'importance de l'action globale de cette enzyme dans la régulation du métabolisme énergétique cellulaire a été rapportée par Hirschey et ses collaborateurs, notamment à travers la découverte d'une puissante activation de la LCAD en réponse à sa désacétylation par la Sirt3. De plus, il a été récemment suggéré dans la littérature que la Sirt3 pourrait jouer un rôle dans les processus de différenciation cellulaires comme montré pour la différenciation des myoblastes en myocytes (Khalek et al., 2014). Le rôle éventuel de la Sirt3 dans le métabolisme et la différenciation des adipocytes est cependant très peu connu.

Au cours de ce mémoire, nous avons pu mettre en évidence une **augmentation de l'expression de la Sirt3 au cours de l'adipogenèse** des 3T3-L1, *in vitro*. Nous avons montré que cette augmentation de l'expression de l'enzyme s'accompagne d'une désacétylation de la SOD2, une enzyme anti-oxydante essentielle pour la régulation de l'état rédox de la mitochondrie et de la cellule, qui est également un des très nombreux substrats de la Sirt3. Ces changements sont corrélés à l'accumulation des TG dans les cellules et à la cinétique d'activation du PPAR γ , le facteur de transcription central dans la différenciation terminale des préadipocytes en adipocytes (Cristancho et al., 2011 ; Amhadian et al., 2013). Ce facteur de transcription est également connu pour être activé par les ROS produits au cours de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en adipocytes (Tormos et al., 2011). Ces auteurs montrent en effet que les ROS produits au cours de la différenciation adipocytaire résulteraient de la biogenèse mitochondriale stimulée en cours de différenciation et seraient nécessaires à l'activation de ce facteur de transcription spécifique. Le fait que nous observions une augmentation de l'expression du gène de la Sirt3 au cours de la différenciation des 3T3-L1 est compatible avec son rôle protecteur et régulateur du stress oxydatif et probablement expliqué par le fait que les régulateurs de son expression tels que le facteur de transcription ERR α et le co-activateur PGC-1 α , sont également connus pour être activés au cours de la différenciation adipocytaire (Ijichi et al., 2007 ; Rajalin et al., 2010). L'inhibition de l'expression d'ERR α à l'aide de siARN entraîne également une diminution de l'expression du gène codant pour les Fatty Acid Binding Protein 4 (**FABP-4**), PPAR γ et PGC-1 α , dans les 3T3-L1, ce qui démontre que ce facteur de transcription régule l'expression de nombreux marqueurs et régulateurs de l'adipogenèse (Ijichi et al., 2007).

Nous pouvons donc maintenant nous poser la question de savoir quel pourrait être le bénéfice d'une expression augmentée de la Sirt3 au cours de la différenciation. Nous émettons l'hypothèse que la Sirt3 est nécessaire à la régulation du métabolisme oxydatif de la cellule et au contrôle de la quantité de ROS (et plus particulièrement, des radicaux anioniques superoxydes O $_2^{(-)}$) dans la cellule en différenciation. En effet, la production de ROS mitochondriaux au cours de la différenciation augmente et est probablement liée à la biogenèse mitochondriale qui est fortement induite lors de l'adipogenèse (Wilson-Fritch et al., 2003). De nombreux arguments dans la littérature montrent maintenant qu'un contrôle de la production de ROS est nécessaire, par exemple, à la détermination de la différenciation adipocytaire (Lee et al., 2009) et antagonise simultanément l'ostéogenèse (Atashi et al., 2015). En effet, il a été montré que les cascades de signalisation Wnt, Hedgehog et FOXO,

essentielles pour l'engagement d'un précurseur mésenchymateux dans la différenciation adipocytaire, sont régulées par les ROS (Atashi et al., 2015).

Cependant, en fonction de la nature, de la quantité de ROS produits et de l'état des défenses anti-oxydantes de la cellule, il est également bien connu que les ROS peuvent exercer une action toxique, en oxydant les biomolécules présentant des doubles liaisons, comme l'ADN et l'ARN, les acides aminés aromatiques des protéines, en oxydant les groupements thiols des résidus cystéine et en provoquant la peroxydation des lipides membranaires (Cooke et al., 2003). Ils peuvent, de cette manière, affecter de nombreux processus biologiques comme l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. S'il existe de nombreuses sources de production des ROS au sein de la cellule, leur production dans les précurseurs mésenchymateux au début de la différenciation est associée à une surproduction par les complexes I et III de la chaîne de transport des électrons et, dans une moindre mesure, par la NADPH oxydase (Atashi et al., 2015). Cette information est importante car nous avons vu que le complexe I de la chaîne respiratoire a été identifié comme un substrat de la Sirt3 (Ahn et al., 2008). Notre observation du profil d'acétylation de la SOD2 montre que l'augmentation de la Sirt3 est corrélée à une **diminution de l'acétylation (et donc à une activation) de la SOD2**. Il faudrait maintenant interférer avec l'expression de la Sirt3 au cours de l'adipogenèse pour rechercher l'état de l'acétylome mitochondrial (permettant d'identifier les cibles modifiées en cours d'adipogenèse). Ceci pourrait se faire par une approche protéomique en spectrométrie de masse, une approche déjà utilisée par exemple, pour analyser le mitoacétylome en condition ou non de restriction calorique (Hebert et al., 2012).

Rappelons que l'enzyme était déjà reconnue comme un puissant régulateur de la « protection » contre les ROS, à travers son action directe sur la régulation de la SOD2, et indirecte, par exemple, sur les gènes cibles des facteurs de transcription mitochondriaux (Jacobs et al., 2008) (Tseng et al., 2013). De même, à travers la désacétylation de l>IDH2 (enzyme du cycle de Krebs), elle agit indirectement sur la glutathion peroxydase, une autre enzyme de protection contre les ROS, dont l'activité est dépendante de la régénération de son co-facteur, le glutathion (GSH), médiée par la Glutathion S-transférase (**GST**). Cette enzyme utilise le NADPH produit notamment par l>IDH2. Une étude très récente montre d'ailleurs que l'exposition chronique à l'arsenic (présent dans les eaux de boisson) est un facteur de risque du diabète de type 2 et induit, au niveau des mitochondries, une résistance à l'insuline dans les adipocytes et les myotubes murins, en générant un stress oxydatif résultant d'une diminution de l'activité de FoxO3, un facteur de transcription contrôlant l'expression de la SOD2 (Divya et al., 2015). Ces auteurs montrent également que la surexpression de la Sirt3 restaure le potentiel de membrane mitochondrial, réduit le stress oxydatif et restaure l'absorption contrôlée du glucose par l'insuline.

Bien que nous ayons encore peu d'arguments à avancer, la surexpression de la Sirt3 en cours d'adipogenèse reste compatible avec un rôle de sensibilisation des préadipocytes en différenciation à l'insuline. Pour le démontrer, nous pourrions évaluer la réponse au stimulus insulinique (glucose uptake) des 3T3-L1 invalidés ou non pour la Sirt3, à différents temps de la différenciation. Cependant, bien que l'efficacité du silençage soit faible, nous montrons, **en présence d'ARN interférents** dirigés contre l'ARNm de la Sirt3, que **le contenu en TG dans les cellules différenciées augmente légèrement**. Cette observation est compatible avec le taux plus élevé de cellules qui se différencient pour des MEF provenant de souris invalidées pour le gène codant la Sirt3. Nous devons maintenant augmenter l'efficacité du silençage et, si cette observation est confirmée, tenter d'identifier les mécanismes sous-jacents.

Cet effet pourrait résulter d'un contrôle par les ROS de la sensibilité à l'insuline, démontrée à travers l'inhibition de Protein Tyrosine Phosphatase (**PTP**) telle que la PTP1B (Loh et al., 2009). En conséquence, il serait fort intéressant d'analyser le statut rédox des 3T3-L1 aux

stades précoce et avancé de la différenciation, d'établir le lien avec celui de la Sirt3 et d'évaluer les relations fonctionnelle et temporelle connectant ces deux paramètres, en utilisant les modèles, optimisés, générés dans ce travail. Le statut rédox pourrait être déterminé dans les fibroblastes 3T3-L1 normalement différenciés et comparé au statut obtenu dans nos systèmes artificiels de surexpression et d'inactivation de la Sirt3.

Il serait également intéressant d'étudier la régulation de la β -oxydation des acides gras par la Sirt3 dans les adipocytes en différenciation. En effet nous avons vu que la LCAD, une enzyme clé de la β -oxydation des acides gras, est régulée positivement par la Sirt3 (K318/K322) (Bharathi et al., 2013). Il est en effet décrit que, parmi les gènes surexprimés précocement au cours de l'adipogenèse, on retrouve *UCP2* et *CD36*, ce dernier codant pour un transporteur d'acides gras, la carnitine palmitoyltransferase-1 (**CPT1**) qui permet l'entrée et l'oxydation des acides gras dans les mitochondries. Il serait donc intéressant d'étudier les effets d'une répression de la Sirt3 sur la β -oxydation des acides gras en cours d'adipogenèse. Finalement, si la stimulation de la biogenèse mitochondriale a été bien étudiée au cours de l'adipogenèse (Wilson-Fritch et al., 2003), le rôle des événements de fusion et de fission, conditionnant la morphologie et l'efficacité de la respiration mitochondriales, sont encore peu connus au cours du programme de différenciation des 3T3-L1 (Ducluzeau et al., 2011). Ces auteurs ont montré que le réseau mitochondrial se fragmente et apparaît ponctué dans les cellules 3T3-L1 différenciées entourant les gouttelettes lipidiques alors que le réseau est plus réticulé, dense et périnucléaire dans les adipoblastes. De manière surprenante, il est décrit qu'en conditions de stress, la Sirt3 désacétyle et active la protéine Optic Atrophy 1 (**OPA1**) dans des MEF traités à la doxorubicine. L'action activatrice de la désacétylase sur cette GTPase contrôlant la fusion de la membrane mitochondriale interne assure le maintien du réseau et de la structure des crêtes mitochondriales et la survie cellulaire (Samant et al., 2014). Le rôle éventuel de la Sirt3 dans le remodelage de la morphologie de la population mitochondriale et l'activité respiratoire en cours de différenciation devraient donc également être analysés.

Bien qu'au sein des hépatocytes, la Sirt3 agisse en défaveur de la lipogenèse (Ghanta et al., 2011), la synchronisation de sa surexpression endogène et de l'accumulation des TG au sein des 3T3-L1 pourrait suggérer que l'enzyme participe à l'accumulation des lipides. Cependant, si la surexpression de la Sirt3 ne semble pas modifier le contenu en TG dans les cellules différenciées, une légère diminution de son expression, obtenue en présence de siARN, conduit à une légère augmentation des quantités de TG retrouvées associées aux tapis de cellules différenciées. Ces données sont en accord avec les effets de l'inactivation de l'expression dans des MEF, qui présentent un taux de différenciation cellulaire plus élevé (pouvant atteindre 35 %) et une augmentation de la taille des gouttelettes lipidiques (mesurée par la taille du diamètre de Feret) selon le protocole décrit par Rizzatti et ses collaborateurs en 2013 (T. Arnould, données non publiées).

En conclusion, il est évident que ces expériences futures visant à mieux comprendre le rôle de la Sirt3 dans la différenciation des 3T3-L1 ne pourront être entreprises qu'après avoir optimisé la répression de l'expression de la Sirt3 (en augmentant le pourcentage du silençage voire, en l'inactivant complètement).

Nous avons également vu que lors de **l'exposition des 3T3-L1 au FCCP ou au TNF α , l'abondance de la Sirt3 est augmentée**, au niveau protéique, et **ne semble pas passer par une régulation positive de la transcription** du gène *Sirt3*, puisque l'abondance des transcrits de la Sirt3 n'est pas modifiée dans les cellules incubées en présence de FCCP, et même légèrement diminuée pour le TNF α . Il doit donc exister un contrôle sur la traduction ou la

stabilisation de la protéine pour expliquer les différences observées entre l'abondance de l'ARNm et de la protéine, en réponse à des conditions de stress. Ces différences pourraient s'expliquer par (1) une **augmentation de la traduction** des ARNm, (2) une **augmentation de la stabilité** de l'enzyme défavorisant sa dégradation ou encore (3) une **translocation plus importante** des isoformes protéiques longues vers le réseau mitochondrial.

Une augmentation du temps de demi-vie de la protéine (2) pourrait être expliquée par une régulation positive de la prise en charge de la Sirt3 par des protéines de stabilisation telle que la Heat Shock Protein 60 (**Hsp60**) (Yang et al., 2011). Nous avons vu, à travers le grand nombre de protéines ciblées par l'enzyme, que la Sirt3 désacétyle des acteurs agissant en faveur de sa propre fonction. La Sirt3 pourrait bien, ici encore, être l'organisateur de sa propre stabilisation, car si la protéine Hsp60 n'a actuellement pas été identifiée comme une cible de la Sirt3, c'est pourtant le cas des chaperonnes mitochondriales **Hsp10** et **Hsp70**. Il a d'ailleurs été récemment montré que ces deux protéines participent à l'assemblage et à la maturation de la chaperonne Hsp60 (Bottinger et al., 2015). Ceci est donc encore un bel exemple de la rétroaction positive dirigée par la Sirt3 sur sa propre fonction.

Rappelons également que chez la souris, 3 isoformes protéiques sont produites, la plus courte étant restreinte à une localisation cytosolique et les isoformes longues étant adressées aux mitochondries. L'augmentation de l'abondance de l'isoforme protéique courte pourrait provenir d'un mécanisme de régulation positive de la translocation des isoformes longues au sein de l'organite, sans augmentation préalable de l'abondance de leurs transcrits (3). Cette hypothèse est appuyée par l'observation d'une accumulation primaire des formes protéiques de la Sirt3 au sein du noyau, et leur translocation mitochondriale en réponse à un stress UV, à une stimulation par l'étoposide (un inhibiteur de la Topoisomérase II, qui induit des dommages à l'ADN) ou encore suite à une surexpression ectopique du gène codant pour l'enzyme (Scher et al., 2007). Nous devons cependant rester prudents car l'étude menée par Scher a été réalisée sur des cellules humaines.

Pour rechercher l'hypothèse la plus correcte, nous pourrions réaliser des immunoprécipitations entre la Sirt3 et l'Hsp60 et comparer le degré d'interaction des deux protéines dans des adipocytes contrôles ou différenciés et préalablement incubés en présence de FCCP ou de TNF α . Nous pourrions également comparer les abondances des formes longues et courtes de la Sirt3, après fractionnement au sein, notamment, des mitochondries, des noyaux et du cytosol.

En conclusion, *in vitro*, l'action de la Sirt3 au cours de l'adipogenèse pourrait donc à la fois réguler et contrôler le processus de différenciation, contribuer au remodelage de la biogenèse mitochondriale lors de l'adipogenèse et protéger le réseau mitochondrial du stress associé à l'exposition de molécules comme le FCCP et le TNF α . La suite de ce travail devra donc s'intéresser à rechercher le rôle éventuel de la désacétylase mitochondriale dans la différenciation des préadipocytes en adipocytes et les mécanismes contrôlés par l'enzyme dans ces conditions.

4.1.2 Discussion des données obtenues *in vivo*

Des données préliminaires obtenues sur des souris transgéniques qui surexpriment la Sirt3 dans les tissus adipeux nous laissent penser que la surexpression de la désacétylase dans ces tissus pouvait limiter certains effets/marqueurs de l'obésité induite par un régime alimentaire riche en graisses (comme la prise de masse corporelle, l'inflammation et la fibrose) (T. Arnould, données non publiées). Dans le cadre de ce travail, nous avons donc tenté de répéter ces traitements sur un plus grand nombre d'animaux afin de confirmer ou d'infirmer les données. Nous avons également étendu nos recherches aux mesures des masses adipeuses (sous cutanées et viscérales) et de la glycémie à jeun, à des observations histologiques et à la quantification de l'abondance de 2 adipokines clés dans l'obésité et le syndrome métabolique : la leptine et l'adiponectine.

Rappelons que l'obésité est progressivement responsable de l'apparition d'une hyperglycémie, d'une inflammation et d'une fibrose des tissus adipeux blancs et que ces deux adipokines ont effets antagonistes. L'abondance de la leptine est augmentée avec l'obésité et en faveur du développement des processus inflammatoires, alors que l'expression de l'adiponectine, qui présente une activité protectrice contre l'inflammation chronique, est diminuée chez les individus obèses.

Nos résultats montrent premièrement que **la surexpression de la Sirt3 dans les tissus adipeux** de souris soumises à un régime riche en graisses **ne modifie pas l'évolution de la masse corporelle** au cours du temps, bien qu'une **légère diminution (non significative) de la masse des tissus adipeux** sous-cutanés chez les mâles et les femelles et des tissus adipeux viscéraux chez les femelles soit observée. Par contre, il semble qu'il y ait un effet positif de l'expression du transgène sur la **préservation de l'histologie des tissus adipeux blancs, au niveau inflammatoire et fibrotique, et sur le foie, au niveau de la stéatose et de la nécrose hépatocytaires**, caractéristiques du MS. En effet, ces modifications et altérations sont beaucoup moins sévères dans le tissu adipeux viscéral de souris mâles CRE+.

Pour tenter de comprendre l'effet bénéfique exercé sur la fibrose, nous pourrions nous intéresser au rôle du TGF β 1 dans ce contexte. En effet, il vient d'être montré que si la souris KO pour la Sirt3 développe des fibroses dans de nombreux organes causées par une augmentation de l'expression du TGF β 1 résultant d'une hyperacétylation (inhibitrice) de la GSK3 β (une Ser/Thr kinase de la voie de la PI3-K) conduisant à l'activation des facteurs Smad3 et β -catenin régulateurs de l'expression de nombreux gènes à caractère profibrotiques contrôlés par le TGF β 1 (Sundaresan et al., publication à venir).

Cependant, nos observations n'ont actuellement été faites que sur un petit nombre d'animaux (mâles), qui présentaient une obésité avancée. L'observation de la protection de la stéatose hépatique témoignerait d'une moindre lipotoxicité dans les hépatocytes, et donc d'une répercussion « systémique » d'un effet de la surexpression du transgène au sein des tissus adipeux. Cette observation est d'autant plus intéressante que le **niveau d'expression de l'adiponectine est supérieur** chez ces mêmes animaux. En effet, nous avons déjà vu que l'adiponectine est capable d'atténuer les altérations hépatiques induites par les acides gras circulants. Nous devons évidemment vérifier que l'abondance plus importante de l'ARNm de l'adiponectine, observée dans les tissus adipeux viscéraux des animaux CRE+, se confirme au niveau protéique et qu'elle se traduit par une concentration en adipokine plus élevée dans le plasma. Cette analyse sera réalisée par un dosage ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), à partir de prélèvements sanguins.

Nous avons vu dans l'introduction que la restriction calorique s'accompagne d'une augmentation de l'activité de la Sirt3, qui réajuste l'acétylome mitochondrial (Hebert et al., 2013). La diminution de l'apport calorique induit donc un « switch » métabolique favorisant

la production de NAD⁺, qui explique que l'activité de l'enzyme soit renforcée. A l'inverse, les adipocytes soumis à un environnement nutritionnel abondant voient leur métabolisme énergétique déséquilibré en faveur des processus anaboliques. Pour ce type cellulaire, spécialisé dans le stockage des graisses, cette orientation anabolique est associée à une activation de la lipogénèse. La conséquence directe de ce déséquilibre, encore renforcée en condition d'obésité, est l'accumulation de la forme réduite du NAD⁺ (NADH) (Jukarainen et al., 2015). La diminution de la concentration en NAD⁺ agit donc en défaveur de la réaction qu'elle catalyse. Il est donc possible que le peu d'effets bénéfiques observés dans notre étude en réponse à la surexpression de *Sirt3* soit le résultat d'une limitation de son activité par une réduction de la concentration en NAD⁺ dans les conditions hypercaloriques. Rappelons aussi qu'il est assez difficile de mettre en évidence une réelle augmentation de l'abondance protéique dans les tissus adipeux blancs des souris transgéniques et que la différence d'abondance de l'enzyme ne devient vraiment visible que dans les conditions stressantes constituées par un régime riche en graisses et de longue durée (16 semaines). Ceci explique aussi probablement le fait que la souris transgénique CRE⁺ est asymptomatique en conditions nutritionnelles normales. Dans les conditions d'une alimentation hypercalorique, la différence d'abondance de la *Sirt3* pourrait donc être contrée par la diminution de la concentration en NAD⁺, limitant la pleine activation de l'enzyme.

Une seconde explication de la limitation possible de l'effet du transgène provient des limitations des modèles de surexpression conditionnelle actuellement disponibles. Le modèle de surexpression restreint aux tissus adipeux dépendant du promoteur de l'adiponectine n'a été développé que relativement récemment (Wang et al., 2010) pour palier plusieurs désavantages du modèle précédent, basé sur l'utilisation du promoteur du gène *aP2/FABP* (Zhao et al., 2011). En effet, le promoteur du gène codant pour la protéine de liaison aux acides gras, dont on sait maintenant qu'elle est sécrétée par les adipocytes en tant que « nouvelle adipokine », lors de l'activation de la lipolyse (Furuhashi, 2015) ne restreint pas l'expression conditionnelle du transgène aux tissus adipeux, puisque ce promoteur est également activé au sein des macrophages et des cardiomyocytes (Wang et al., 2010). Bien que plus spécifique aux adipocytes (mais pas encore complètement) (Dalamaga et al., 2012), le niveau d'activité du promoteur de l'adiponectine est plus faible que celui d'*aP2/FABP* dans les adipocytes (Wang et al., 2010). Cependant, le promoteur du gène codant pour l'adiponectine est moins influencé par le rythme circadien ou l'état post-prandial (Zhao et al., 2011). Malheureusement, son utilisation dans les conditions d'obésité, connues pour réduire l'expression et la sécrétion de cette adipokine, pourrait également contribuer à limiter son expression. En effet, chez les individus obèses, une inhibition de la transcription du gène codant pour l'adiponectine est observée à travers une hyperméthylation de son promoteur (Kim et al., 2015). Cependant, il reste vrai que même si la surexpression du transgène et l'activité de son produit ne sont probablement pas optimales d'un point de vue fonctionnel pour les raisons expliquées ci-dessus, il semble que des effets sont observés et donc que la surexpression de la *Sirt3* se traduise bien par un effet phénotypique.

Plusieurs raisons expliquent pourquoi les mâles ont été préférentiellement étudiés au cours de cette étude. Premièrement, les femelles ont très peu développé le phénotype « obèse » attendu (avec des masses allant au maximum jusque 30 g alors que la plupart des mâles pouvaient atteindre plus de 50 g). Deuxièmement, il est reconnu qu'un dimorphisme sexuel prononcé existe dans l'installation de ce phénotype obèse, impliquant par exemple des variations hormonales chez les femelles, changements qui compliquent encore d'avantage l'interprétation des données (Davis et al., 2013). La relativement faible prise de poids apparente chez les femelles pourrait être expliquée par l'influence positive des estrogènes et de leurs récepteurs adipeux, particulièrement au niveau des tissus adipeux sous-cutanés, sur

une accumulation des lipides, mais également sur l'amélioration du métabolisme énergétique des adipocytes, et de l'expression de la protéine découplante UCP-1 (associée à une évolution browning-like), aboutissant à une meilleure dissipation de l'énergie sous forme de chaleur et à une moindre fibrose (Ijichi et al., 2007) (Palmer et Clegg, 2015). Un autre fait à considérer est la production plus importante d'adiponectine chez les souris femelles (Gui et al., 2004). L'action protectrice de cette protéine contre l'obésité pourrait à son tour expliquer, du moins en partie, pourquoi les individus femelles développent moins le phénotype obèse.

Malgré l'absence d'effet du traitement riche en graisses sur la prise de masse corporelle des animaux, nous avons pu détecter une légère diminution, non significative, de la masse adipeuse sous-cutanée chez les souris mâles transgéniques pour Sirt3 (CRE+). Une réponse préférentielle du dépôt de tissu adipeux sous-cutané inguinal ne serait pas surprenante dès lors qu'il a été à plusieurs reprises décrit dans la littérature comme un dépôt graisseux présentant une grande capacité d'adaptation, répondant positivement à l'exercice, au froid et à l'induction d'un browning artificiel par une stimulation adrénérgique, par une diminution de sa masse et de ses constituants cellulaires (Sidossis et al., 2015 ; Fisher et al., 2012) Cependant, ce sont bien les changements affectant les tissus adipeux blancs viscéraux tels qu'une accumulation excessive des TG, une modification de l'expression des adipokines et l'invasion de ce tissu par les cellules inflammatoires comme les macrophages M1 et les lymphocytes qui sont associés à un pronostic négatif dans l'obésité et le syndrome métabolique. Il est donc encourageant de constater que c'est au sein de ce tissu viscéral que nous avons vu une meilleure préservation de la structure/histologie tissulaire dans notre échantillon d'animaux CRE+ surexprimant la désacétylase mitochondriale. Nous pouvons émettre l'hypothèse que l'effet positif observé sur la fibrose et sur l'inflammation de bas grade au sein des tissus adipeux viscéraux est corrélé à la sévérité d'atteinte du tissu, et que ces effets bénéfiques ne seraient visibles qu'au-delà d'un certain seuil de déséquilibre homéostatique (> 40 g).

Nous allons donc d'abord poursuivre ces analyses par des études histologiques couplées à des marqueurs spécifiques de l'inflammation, tels que les marqueurs des macrophages (totaux : F4/80+ et CD45) (M1, associés à l'obésité : CD64 ; M2 : CD163 et CD206), et des fibres réticuliniques (collagène 3) caractéristiques de la fibrose. Nous allons parallèlement exploiter des marqueurs moléculaires en RT-qPCR et/ou protéiques, permettant de suivre d'autres adipokines, impliquées dans la communication systémique et particulièrement dans l'inflammation, telles que les cytokines pro-inflammatoires TNF α et MCP-1, ou anti-inflammatoires comme l'IL-10.

Enfin, une approche expérimentale future pour mieux étudier le rôle de la surexpression de la Sirt3 dans l'obésité serait de comparer les résultats obtenus à ceux générés à partir d'une souris transgénique pour laquelle la surexpression du transgène Sirt3 est induite de manière systémique (« germline »). Bien que l'on puisse s'attendre à des effets phénotypiques plus importants et peut-être aussi qualitativement différents chez cette souris, la comparaison des données obtenues dans ces deux modèles permettrait de discriminer les changements observés, et d'attribuer ceux qui seraient spécifiquement liés à la surexpression du transgène codant l'enzyme mitochondriale dans les tissus adipeux (recherche de l'effet autonome ou pas). Enfin, il serait intéressant d'éliminer la variation liée au modèle nutritionnel pour induire l'obésité et de réaliser un croisement de notre lignée avec une colonie de souris génétiquement « programmées » pour développer une obésité génétique, telle que la colonie très répandue de souris *ob*^{-/-} (invalidée pour le gène de la leptine).

IV.II CONCLUSIONS

En conclusion, nous montrons que l'expression de la Sirt3, unique désacétylase mitochondriale exerçant une fonction régulatrice majeure du mitoacétylome, est augmentée au cours de l'adipogenèse et semble corrélée à l'accumulation des TG. Son rôle éventuel comme effecteur et moteur de la différenciation n'a pas vraiment pu être démontré, même si plusieurs arguments nous laissent penser que la modulation de son expression peut éventuellement affecter le contenu en TG. La surexpression du gène codant l'enzyme au cours de l'adipogenèse et le profil de la désacétylation de la SOD2 indiquent que ce rôle éventuel pourrait passer, du moins en partie, par la modulation de l'abondance des espèces réactives de l'oxygène. Le stress mitochondrial induit par un découplage au FCCP ou par une stimulation par le TNF α ne semble pas modifier la transcription du gène *Sirt3* mais conduit à une accumulation de la protéine, passant probablement par une amélioration de sa stabilité et/ou une augmentation de sa translocation mitochondriale.

Chez la souris transgénique mâle, et dans un contexte d'obésité induite par un régime riche en graisses, la surexpression d'une copie du gène *Sirt3* dans le tissu adipeux ne semble pas avoir d'effet significatif sur l'évolution de la masse corporelle des animaux, bien que de petites différences soient observées sur le contenu des tissus adipeux blancs. Les effets les plus visibles sont cependant la limitation de la fibrose et/ou de l'inflammation dans les tissus adipeux de souris surexprimant la désacétylase mitochondriale. Ces effets bénéfiques dans les tissus adipeux blancs viscéraux et la protection de la stéatose dans le tissu hépatique sont corrélés à une abondance plus élevée de l'ARNm codant pour l'adiponectine dans les tissus adipeux, une adipokine connue pour ses effets protecteurs contre la fibrose et la stéatose hépatique. Cependant, les limitations du modèle et l'absence d'un phénotype sévère pourraient masquer certains effets bénéfiques attendus de la surexpression de la Sirt3. Des analyses supplémentaires sont donc nécessaires pour confirmer ou infirmer les données obtenues dans ce travail et surtout rechercher les mécanismes et éventuels liens de causalité entre l'abondance plus grande de la Sirtuine 3 et ses effets bénéfiques sur le métabolisme et l'état du stress oxydatif dans les adipocytes.

BIBLIOGRAPHIE

- ABDEL KHALEK, W., CORTADE, F., OLLENDORFF, V., LAPASSET, L., TINTIGNAC, L., CHABI, B. & WRUTNIAK-CABELLO, C. 2014. SIRT3, a mitochondrial NAD(+)-dependent deacetylase, is involved in the regulation of myoblast differentiation. *PLoS One*, 9, e114388.
- AHMADIAN, M., SUH, J. M., HAH, N., LIDDLE, C., ATKINS, A. R., DOWNES, M. & EVANS, R. M. 2013. PPARgamma signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med*, 19, 557-66.
- AHN, B. H., KIM, H. S., SONG, S., LEE, I. H., LIU, J., VASSILOPOULOS, A., DENG, C. X. & FINKEL, T. 2008. A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 14447-52.
- AILHAUD, G. 2000. Adipose tissue as an endocrine organ. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 24 Suppl 2, S1-3.
- ALBANI, D., ATERI, E., MAZZUCO, S., GHILARDI, A., RODILOSSI, S., BIELLA, G., ONGARO, F., ANTUONO, P., BOLDRINI, P., DI GIORGI, E., FRIGATO, A., DURANTE, E., CABERLOTTO, L., ZANARDO, A., SICULI, M., GALLUCCI, M. & FORLONI, G. 2014. Modulation of human longevity by SIRT3 single nucleotide polymorphisms in the prospective study "Treviso Longeva (TRELONG)". *Age (Dordr)*, 36, 469-78.
- ALHAZZAZI, T. Y., KAMARAJAN, P., JOO, N., HUANG, J. Y., VERDIN, E., D'SILVA, N. J. & KAPILA, Y. L. 2011. Sirtuin-3 (SIRT3), a novel potential therapeutic target for oral cancer. *Cancer*, 117, 1670-8.
- ANDERSON, K. A. & HIRSCHHEY, M. D. 2012. Mitochondrial protein acetylation regulates metabolism. *Essays Biochem*, 52, 23-35.
- ARCHER, S. L. 2013. Mitochondrial dynamics--mitochondrial fission and fusion in human diseases. *N Engl J Med*, 369, 2236-51.
- ARNER, P. & LANGIN, D. 2014. Lipolysis in lipid turnover, cancer cachexia, and obesity-induced insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab*, 25, 255-62.
- ATASHI, F., MODARRESSI, A. & PEPPER, M. S. 2015. The role of reactive oxygen species in mesenchymal stem cell adipogenic and osteogenic differentiation: a review. *Stem Cells Dev*, 24, 1150-63.
- ATKINSON, M. J., SPANNER, M. T., ROSEMAN, M., LINZNER, U., MULLER, W. A. & GOSSNER, W. 2005. Intracellular sequestration of ²²³Ra by the iron-storage protein ferritin. *Radiat Res*, 164, 230-3.
- BAENS-FERRER, C., ROSEMAN, M. M., DUMAS, H. M. & HALEY, S. M. 2005. Parental perceptions of oral health-related quality of life for children with special needs: impact of oral rehabilitation under general anesthesia. *Pediatr Dent*, 27, 137-42.
- BAO, J., LU, Z., JOSEPH, J. J., CARABENCIOV, D., DIMOND, C. C., PANG, L., SAMSEL, L., MCCOY, J. P., JR., LECLERC, J., NGUYEN, P., GIUS, D. & SACK, M. N. 2010a. Characterization of the murine SIRT3 mitochondrial localization sequence and comparison of mitochondrial enrichment and deacetylase activity of long and short SIRT3 isoforms. *J Cell Biochem*, 110, 238-47.
- BAO, J., SCOTT, I., LU, Z., PANG, L., DIMOND, C. C., GIUS, D. & SACK, M. N. 2010b. SIRT3 is regulated by nutrient excess and modulates hepatic susceptibility to lipotoxicity. *Free Radic Biol Med*, 49, 1230-7.
- BARTELT, A. & HEEREN, J. 2014. Adipose tissue browning and metabolic health. *Nat Rev Endocrinol*, 10, 24-36.
- BASDEVANT, A. 2006. [Obesity epidemic: origins and consequences]. *C R Biol*, 329, 562-9; discussion 653-5.
- BELL, E. L., EMERLING, B. M., RICOULT, S. J. & GUARENTE, L. 2011. SirT3 suppresses hypoxia inducible factor 1alpha and tumor growth by inhibiting mitochondrial ROS production. *Oncogene*, 30, 2986-96.
- BELLIZZI, D., COVELLO, G., DI CIANNI, F., TONG, Q. & DE BENEDICTIS, G. 2009. Identification of GATA2 and AP-1 Activator elements within the enhancer VNTR occurring in intron 5 of the human SIRT3 gene. *Mol Cells*, 28, 87-92.
- BELLIZZI, D., DATO, S., CAVALCANTE, P., COVELLO, G., DI CIANNI, F., PASSARINO, G., ROSE, G. & DE BENEDICTIS, G. 2007. Characterization of a bidirectional promoter shared between two human genes related to aging: SIRT3 and PSMD13. *Genomics*, 89, 143-50.
- BELLIZZI, D., ROSE, G., CAVALCANTE, P., COVELLO, G., DATO, S., DE RANGO, F., GRECO, V., MAGGIOLINI, M., FERACO, E., MARI, V., FRANCESCHI, C., PASSARINO, G. & DE BENEDICTIS, G. 2005. A novel VNTR enhancer within the SIRT3 gene, a human homologue of SIR2, is associated with survival at oldest ages. *Genomics*, 85, 258-63.
- BERGLUND, L., BJORLING, E., OKSVOLD, P., FAGERBERG, L., ASPLUND, A., SZIGYARTO, C. A., PERSSON, A., OTTOSSON, J., WERNERUS, H., NILSSON, P., LUNDBERG, E., SIVERTSSON, A., NAVANI, S., WESTER, K., KAMPF, C., HOBER, S., PONTEN, F. & UHLEN, M. 2008. A genecentric Human Protein Atlas for expression profiles based on antibodies. *Mol Cell Proteomics*, 7, 2019-27.
- BHARATHI, S. S., ZHANG, Y., MOHSEN, A. W., UPPALA, R., BALASUBRAMANI, M., SCHREIBER, E., UECHI, G., BECK, M. E., RARDIN, M. J., VOCKLEY, J., VERDIN, E., GIBSON, B. W., HIRSCHHEY, M. D. & GOETZMAN, E. S. 2013. Sirtuin 3 (SIRT3) protein regulates long-chain acyl-

- CoA dehydrogenase by deacetylating conserved lysines near the active site. *J Biol Chem*, 288, 33837-47.
- BORENGASSER, S. J., LAU, F., KANG, P., BLACKBURN, M. L., RONIS, M. J., BADGER, T. M. & SHANKAR, K. 2011. Maternal obesity during gestation impairs fatty acid oxidation and mitochondrial SIRT3 expression in rat offspring at weaning. *PLoS One*, 6, e24068.
- BOSMA, M. 2015. Lipid droplet dynamics in skeletal muscle. *Exp Cell Res*.
- BOTTINGER, L., OELJEKLAUS, S., GUIARD, B., ROSPERT, S., WARSCHEID, B. & BECKER, T. 2015. Mitochondrial heat shock protein (Hsp) 70 and Hsp10 cooperate in the formation of Hsp60 complexes. *J Biol Chem*, 290, 11611-22.
- BUECHLER, C., WANNINGER, J. & NEUMEIER, M. 2011. Adiponectin, a key adipokine in obesity related liver diseases. *World J Gastroenterol*, 17, 2801-11.
- CALVO-ALEN, J., TOLOZA, S. M., FERNANDEZ, M., BASTIAN, H. M., FESSLER, B. J., ROSEMAN, J. M., MCGWIN, G., JR., VILA, L. M., REVEILLE, J. D. & ALARCON, G. S. 2005. Systemic lupus erythematosus in a multiethnic US cohort (LUMINA). XXV. Smoking, older age, disease activity, lupus anticoagulant, and glucocorticoid dose as risk factors for the occurrence of venous thrombosis in lupus patients. *Arthritis Rheum*, 52, 2060-8.
- CARR, R. M. & AHIMA, R. S. 2015. Pathophysiology of lipid droplet proteins in liver diseases. *Exp Cell Res*.
- CASTEILLA, L., PENICAUD, L., COUSIN, B. & CALISE, D. 2008. Choosing an adipose tissue depot for sampling: factors in selection and depot specificity. *Methods Mol Biol*, 456, 23-38.
- CATON, P. W., RICHARDSON, S. J., KIESWICH, J., BUGLIANI, M., HOLLAND, M. L., MARCHETTI, P., MORGAN, N. G., YAQOUB, M. M., HOLNESS, M. J. & SUGDEN, M. C. 2013. Sirtuin 3 regulates mouse pancreatic beta cell function and is suppressed in pancreatic islets isolated from human type 2 diabetic patients. *Diabetologia*, 56, 1068-77.
- CHANDRA, V., HUANG, P., HAMURO, Y., RAGHURAM, S., WANG, Y., BURRIS, T. P. & RASTINEJAD, F. 2008. Structure of the intact PPAR-gamma-RXR- nuclear receptor complex on DNA. *Nature*, 456, 350-6.
- CHANG, H. C. & GUARENTE, L. 2013. SIRT1 mediates central circadian control in the SCN by a mechanism that decays with aging. *Cell*, 153, 1448-60.
- CHANG, H. C. & GUARENTE, L. 2014. SIRT1 and other sirtuins in metabolism. *Trends Endocrinol Metab*, 25, 138-45.
- CHAVEZ, J. A. & SUMMERS, S. A. 2010. Lipid oversupply, selective insulin resistance, and lipotoxicity: molecular mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, 1801, 252-65.
- CHEN, Y., FU, L. L., WEN, X., WANG, X. Y., LIU, J., CHENG, Y. & HUANG, J. 2014. Sirtuin-3 (SIRT3), a therapeutic target with oncogenic and tumor-suppressive function in cancer. *Cell Death Dis*, 5, e1047.
- CHEN, Y., ZHANG, J., LIN, Y., LEI, Q., GUAN, K. L., ZHAO, S. & XIONG, Y. 2011. Tumour suppressor SIRT3 deacetylates and activates manganese superoxide dismutase to scavenge ROS. *EMBO Rep*, 12, 534-41.
- CHOI, J. W., LEE, C. W., LEE, J., CHOI, D. J., SOHNG, J. K. & PARK, Y. I. 2015. 7,8-Dihydroxyflavone inhibits adipocyte differentiation via antioxidant activity and induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocyte cells. *Life Sci*.
- CHOQUET, H. & MEYRE, D. 2011. Genetics of Obesity: What have we Learned? *Curr Genomics*, 12, 169-79.
- CNOP, M. 2008. Fatty acids and glucolipotoxicity in the pathogenesis of Type 2 diabetes. *Biochem Soc Trans*, 36, 348-52.
- COOKE, M. S., EVANS, M. D., DIZDAROGLU, M. & LUNEC, J. 2003. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J*, 17, 1195-214.
- COOPER, H. M. & SPELBRINK, J. N. 2008. The human SIRT3 protein deacetylase is exclusively mitochondrial. *Biochem J*, 411, 279-85.
- COPPACK, S. W. 2001. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *Proc Nutr Soc*, 60, 349-56.
- CRISAN, M., DEASY, B., GAVINA, M., ZHENG, B., HUARD, J., LAZZARI, L. & PEAULT, B. 2008. Purification and long-term culture of multipotent progenitor cells affiliated with the walls of human blood vessels: myoendothelial cells and pericytes. *Methods Cell Biol*, 86, 295-309.
- CRISTANCHO, A. G. & LAZAR, M. A. 2011. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12, 722-34.
- CROTTY ALEXANDER, L. E., MARSH, B. J., TIMMER, A. M., LIN, A. E., ZAINABADI, K., CZOPIK, A., GUARENTE, L. & NIZET, V. 2013. Myeloid cell sirtuin-1 expression does not alter host immune responses to Gram-negative endotoxemia or Gram-positive bacterial infection. *PLoS One*, 8, e84481.
- DALAMAGA, M., DIAKOPOULOS, K. N. & MANTZOROS, C. S. 2012. The role of adiponectin in cancer: a review of current evidence. *Endocr Rev*, 33, 547-94.
- DANIELE, G., GUARDADO MENDOZA, R., WINNIER, D., FIORENTINO, T. V., PENGOU, Z., CORNELL, J., ANDREOZZI, F., JENKINSON, C., CERSOSIMO, E., FEDERICI, M., TRIPATHY, D. & FOLLI,

- F. 2014. The inflammatory status score including IL-6, TNF-alpha, osteopontin, fractalkine, MCP-1 and adiponectin underlies whole-body insulin resistance and hyperglycemia in type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetol*, 51, 123-31.
- DAVIS, K. E., M, D. N., SUN, K., W, M. S., J, D. B., J, A. Z., ZEVE, D., L, D. H., D, W. C., L, M. G., XU, Y., Z, V. W., S, A. K. & CLEGG, D. J. 2013. The sexually dimorphic role of adipose and adipocyte estrogen receptors in modulating adipose tissue expansion, inflammation, and fibrosis. *Mol Metab*, 2, 227-42.
- DISPERSYN, G., NUYDENS, R., CONNORS, R., BORGERS, M. & GEERTS, H. 1999. Bcl-2 protects against FCCP-induced apoptosis and mitochondrial membrane potential depolarization in PC12 cells. *Biochim Biophys Acta*, 1428, 357-71.
- DUCLUZEAU, P. H., PRIOU, M., WEITHEIMER, M., FLAMMENT, M., DULUC, L., IACOBASI, F., SOLETI, R., SIMARD, G., DURAND, A., RIEUSSET, J., ANDRIANTSITOHAINA, R. & MALTHIERY, Y. 2011. Dynamic regulation of mitochondrial network and oxidative functions during 3T3-L1 fat cell differentiation. *J Physiol Biochem*, 67, 285-96.
- EDENS, N. K., LEIBEL, R. L. & HIRSCH, J. 1990. Mechanism of free fatty acid re-esterification in human adipocytes in vitro. *J Lipid Res*, 31, 1423-31.
- EVERARD, A. & CANI, P. D. 2013. Diabetes, obesity and gut microbiota. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 27, 73-83.
- FALCHI, M., EL-SAYED MOUSTAFA, J. S., TAKOUSIS, P., PESCE, F., BONNEFOND, A., ANDERSSON-ASSARSSON, J. C., SUDMANT, P. H., DORAJOO, R., AL-SHAFAI, M. N., BOTTOLO, L., OZDEMIR, E., SO, H. C., DAVIES, R. W., PATRICE, A., DENT, R., MANGINO, M., HYSI, P. G., DECHAUME, A., HUYVAERT, M., SKINNER, J., PIGEYRE, M., CAIAZZO, R., RAVERDY, V., VAILLANT, E., FIELD, S., BALKAU, B., MARRE, M., VISVIKIS-SIEST, S., WEILL, J., POULAIN-GODEFROY, O., JACOBSON, P., SJOSTROM, L., HAMMOND, C. J., DELOUKAS, P., SHAM, P. C., MCPHERSON, R., LEE, J., TAI, E. S., SLADEK, R., CARLSSON, L. M., WALLEY, A., EICHLER, E. E., PATTOU, F., SPECTOR, T. D. & FROGUEL, P. 2014. Low copy number of the salivary amylase gene predisposes to obesity. *Nat Genet*, 46, 492-7.
- FASSHAUER, M. & BLUHER, M. 2015. Adipokines in health and disease. *Trends Pharmacol Sci*, 36, 461-70.
- FENDT, S. M., BELL, E. L., KEIBLER, M. A., DAVIDSON, S. M., WIRTH, G. J., FISKE, B., MAYERS, J. R., SCHWAB, M., BELLINGER, G., CSIBI, A., PATNAIK, A., BLOUIN, M. J., CANTLEY, L. C., GUARENTE, L., BLENIS, J., POLLAK, M. N., OLUMI, A. F., VANDER HEIDEN, M. G. & STEPHANOPOULOS, G. 2013a. Metformin decreases glucose oxidation and increases the dependency of prostate cancer cells on reductive glutamine metabolism. *Cancer Res*, 73, 4429-38.
- FENDT, S. M., BELL, E. L., KEIBLER, M. A., OLENCHOCK, B. A., MAYERS, J. R., WASYLENKO, T. M., VOKES, N. I., GUARENTE, L., VANDER HEIDEN, M. G. & STEPHANOPOULOS, G. 2013b. Reductive glutamine metabolism is a function of the alpha-ketoglutarate to citrate ratio in cells. *Nat Commun*, 4, 2236.
- FERNANDEZ, M., CALVO-ALEN, J., ALARCON, G. S., ROSEMAN, J. M., BASTIAN, H. M., FESSLER, B. J., MCGWIN, G., JR., VILA, L. M., SANCHEZ, M. L. & REVEILLE, J. D. 2005. Systemic lupus erythematosus in a multiethnic US cohort (LUMINA): XXI. Disease activity, damage accrual, and vascular events in pre- and postmenopausal women. *Arthritis Rheum*, 52, 1655-64.
- FESSLER, B. J., ALARCON, G. S., MCGWIN, G., JR., ROSEMAN, J., BASTIAN, H. M., FRIEDMAN, A. W., BAETHGE, B. A., VILA, L. & REVEILLE, J. D. 2005. Systemic lupus erythematosus in three ethnic groups: XVI. Association of hydroxychloroquine use with reduced risk of damage accrual. *Arthritis Rheum*, 52, 1473-80.
- FIFEL, K. 2014. Sirtuin 3: a molecular pathway linking sleep deprivation to neurological diseases. *J Neurosci*, 34, 9179-81.
- FINLEY, L. W., CARRACEDO, A., LEE, J., SOUZA, A., EGIA, A., ZHANG, J., TERUYA-FELDSTEIN, J., MOREIRA, P. I., CARDOSO, S. M., CLISH, C. B., PANDOLFI, P. P. & HAIGIS, M. C. 2011. SIRT3 opposes reprogramming of cancer cell metabolism through HIF1alpha destabilization. *Cancer Cell*, 19, 416-28.
- FISHER, F. M., KLEINER, S., DOURIS, N., FOX, E. C., MEPANI, R. J., VERDEGUER, F., WU, J., KHARITONENKOV, A., FLIER, J. S., MARATOS-FLIER, E. & SPIEGELMAN, B. M. 2012. FGF21 regulates PGC-1alpha and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev*, 26, 271-81.
- FREDERICH, R. C., HAMANN, A., ANDERSON, S., LOLLMANN, B., LOWELL, B. B. & FLIER, J. S. 1995. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med*, 1, 1311-4.
- FREDRIKSON, M. 1986. Racial differences in cardiovascular reactivity to mental stress in essential hypertension. *J Hypertens*, 4, 325-31.

- FRIEDRICH, G. & SORIANO, P. 1991. Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes Dev*, 5, 1513-23.
- FRYE, R. A. 1999. Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 260, 273-9.
- FURUHASHI, M., SAITOH, S., SHIMAMOTO, K. & MIURA, T. 2014. Fatty Acid-Binding Protein 4 (FABP4): Pathophysiological Insights and Potent Clinical Biomarker of Metabolic and Cardiovascular Diseases. *Clin Med Insights Cardiol*, 8, 23-33.
- GAINSFORD, T., WILLSON, T. A., METCALF, D., HANDMAN, E., MCFARLANE, C., NG, A., NICOLA, N. A., ALEXANDER, W. S. & HILTON, D. J. 1996. Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 14564-8.
- GESTA, S., TSENG, Y. H. & KAHN, C. R. 2007. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell*, 131, 242-56.
- GHANTA, S., GROSSMANN, R. E. & BRENNER, C. 2013. Mitochondrial protein acetylation as a cell-intrinsic, evolutionary driver of fat storage: chemical and metabolic logic of acetyl-lysine modifications. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 48, 561-74.
- GIRALT, A. & VILLARROYA, F. 2012. SIRT3, a pivotal actor in mitochondrial functions: metabolism, cell death and aging. *Biochem J*, 444, 1-10.
- GOOSSENS, V., STANGE, G., MOENS, K., PIPELEERS, D. & GROOTEN, J. 1999. Regulation of tumor necrosis factor-induced, mitochondria- and reactive oxygen species-dependent cell death by the electron flux through the electron transport chain complex I. *Antioxid Redox Signal*, 1, 285-95.
- GREEN, M. F. & HIRSCHHEY, M. D. 2013. SIRT3 weighs heavily in the metabolic balance: a new role for SIRT3 in metabolic syndrome. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 68, 105-7.
- GUAN, X., LIN, P., KNOLL, E. & CHAKRABARTI, R. 2014. Mechanism of inhibition of the human sirtuin enzyme SIRT3 by nicotinamide: computational and experimental studies. *PLoS One*, 9, e107729.
- GUARENTE, L. 2013a. Calorie restriction and sirtuins revisited. *Genes Dev*, 27, 2072-85.
- GUARENTE, L. 2013b. Introduction: sirtuins in aging and diseases. *Methods Mol Biol*, 1077, 3-10.
- GUARENTE, L. 2013c. Sirtuins and ageing--new findings. *EMBO Rep*, 14, 750.
- GUI, Y., SILHA, J. V. & MURPHY, L. J. 2004. Sexual dimorphism and regulation of resistin, adiponectin, and leptin expression in the mouse. *Obes Res*, 12, 1481-91.
- HALLOWS, W. C., ALBAUGH, B. N. & DENU, J. M. 2008. Where in the cell is SIRT3?--functional localization of an NAD⁺-dependent protein deacetylase. *Biochem J*, 411, e11-3.
- HALLOWS, W. C., YU, W., SMITH, B. C., DEVRIES, M. K., ELLINGER, J. J., SOMEYA, S., SHORTREED, M. R., PROLLA, T., MARKLEY, J. L., SMITH, L. M., ZHAO, S., GUAN, K. L. & DENU, J. M. 2011. Sirt3 promotes the urea cycle and fatty acid oxidation during dietary restriction. *Mol Cell*, 41, 139-49.
- HASEGAWA, K., WAKINO, S., SIMIC, P., SAKAMAKI, Y., MINAKUCHI, H., FUJIMURA, K., HOSOYA, K., KOMATSU, M., KANEKO, Y., KANDA, T., KUBOTA, E., TOKUYAMA, H., HAYASHI, K., GUARENTE, L. & ITOH, H. 2013. Renal tubular Sirt1 attenuates diabetic albuminuria by epigenetically suppressing Claudin-1 overexpression in podocytes. *Nat Med*, 19, 1496-504.
- HASSAN, M., LATIF, N. & YACOUB, M. 2012. Adipose tissue: friend or foe? *Nat Rev Cardiol*, 9, 689-702.
- HEBERT, A. S., DITTENHAFFER-REED, K. E., YU, W., BAILEY, D. J., SELEN, E. S., BOERSMA, M. D., CARSON, J. J., TONELLI, M., BALLOON, A. J., HIGBEE, A. J., WESTPHALL, M. S., PAGLIARINI, D. J., PROLLA, T. A., ASSADI-PORTER, F., ROY, S., DENU, J. M. & COON, J. J. 2013. Calorie restriction and SIRT3 trigger global reprogramming of the mitochondrial protein acetylome. *Mol Cell*, 49, 186-99.
- HEERWAGEN, M. J., MILLER, M. R., BARBOUR, L. A. & FRIEDMAN, J. E. 2010. Maternal obesity and fetal metabolic programming: a fertile epigenetic soil. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 299, R711-22.
- HEIDENREICH, W. F., MULLER, W. A., PARETZKE, H. G. & ROSEMANN, M. 2005. Bone cancer risk in mice exposed to 224Ra: protraction effects from promotion. *Radiat Environ Biophys*, 44, 61-7.
- HERSKOVITS, A. Z. & GUARENTE, L. 2013. Sirtuin deacetylases in neurodegenerative diseases of aging. *Cell Res*, 23, 746-58.
- HIRSCHEY, M. D., SHIMAZU, T., CAPRA, J. A., POLLARD, K. S. & VERDIN, E. 2011a. SIRT1 and SIRT3 deacetylate homologous substrates: AceCS1,2 and HMGCS1,2. *Aging (Albany NY)*, 3, 635-42.
- HIRSCHEY, M. D., SHIMAZU, T., GOETZMAN, E., JING, E., SCHWER, B., LOMBARD, D. B., GRUETER, C. A., HARRIS, C., BIDDINGER, S., ILKAYEVA, O. R., STEVENS, R. D., LI, Y., SAHA, A. K., RUDERMAN, N. B., BAIN, J. R., NEWGARD, C. B., FARESE, R. V., JR., ALT, F. W., KAHN, C. R. & VERDIN, E. 2010. SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation. *Nature*, 464, 121-5.

- HIRSCHEY, M. D., SHIMAZU, T., HUANG, J. Y., SCHWER, B. & VERDIN, E. 2011b. SIRT3 regulates mitochondrial protein acetylation and intermediary metabolism. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 76, 267-77.
- HIRSCHEY, M. D., SHIMAZU, T., JING, E., GRUETER, C. A., COLLINS, A. M., AOUIZERAT, B., STANCAKOVA, A., GOETZMAN, E., LAM, M. M., SCHWER, B., STEVENS, R. D., MUEHLBAUER, M. J., KAKAR, S., BASS, N. M., KUUSISTO, J., LAAKSO, M., ALT, F. W., NEWGARD, C. B., FARESE, R. V., JR., KAHN, C. R. & VERDIN, E. 2011c. SIRT3 deficiency and mitochondrial protein hyperacetylation accelerate the development of the metabolic syndrome. *Mol Cell*, 44, 177-90.
- HO, K. T., AHN, C. W., ALARCON, G. S., BAETHGE, B. A., TAN, F. K., ROSEMAN, J., BASTIAN, H. M., FESSLER, B. J., MCGWIN, G., JR., VILA, L. M., CALVO-ALEN, J. & REVEILLE, J. D. 2005. Systemic lupus erythematosus in a multiethnic cohort (LUMINA): XXVIII. Factors predictive of thrombotic events. *Rheumatology (Oxford)*, 44, 1303-7.
- HOTFILDER, M., ROTTGERS, S., ROSEMANN, A., SCHRAUDER, A., SCHRAPPE, M., PIETERS, R., JURGENS, H., HARBOTT, J. & VORMOOR, J. 2005. Leukemic stem cells in childhood high-risk ALL/t(9;22) and t(4;11) are present in primitive lymphoid-restricted CD34+CD19- cells. *Cancer Res*, 65, 1442-9.
- HOTTA, K., FUNAHASHI, T., BODKIN, N. L., ORTMAYER, H. K., ARITA, Y., HANSEN, B. C. & MATSUZAWA, Y. 2001. Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes*, 50, 1126-33.
- HUANG, D., YANG, C., WANG, Y., LIAO, Y. & HUANG, K. 2009. PARP-1 suppresses adiponectin expression through poly(ADP-ribosyl)ation of PPAR gamma in cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res*, 81, 98-107.
- IJICHI, N., IKEDA, K., HORIE-INOUE, K., YAGI, K., OKAZAKI, Y. & INOUE, S. 2007. Estrogen-related receptor alpha modulates the expression of adipogenesis-related genes during adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*, 358, 813-8.
- IRIBARREN, C., JACOBS, D. R., KIEFE, C. I., LEWIS, C. E., MATTHEWS, K. A., ROSEMAN, J. M. & HULLEY, S. B. 2005. Causes and demographic, medical, lifestyle and psychosocial predictors of premature mortality: the CARDIA study. *Soc Sci Med*, 60, 471-82.
- IWAHARA, T., BONASIO, R., NARENDRA, V. & REINBERG, D. 2012. SIRT3 functions in the nucleus in the control of stress-related gene expression. *Mol Cell Biol*, 32, 5022-34.
- JACOBS, K. M., PENNINGTON, J. D., BISHT, K. S., AYKIN-BURNS, N., KIM, H. S., MISHRA, M., SUN, L., NGUYEN, P., AHN, B. H., LECLERC, J., DENG, C. X., SPITZ, D. R. & GIUS, D. 2008. SIRT3 interacts with the daf-16 homolog FOXO3a in the mitochondria, as well as increases FOXO3a dependent gene expression. *Int J Biol Sci*, 4, 291-9.
- JEFFERY, E., CHURCH, C. D., HOLTRUP, B., COLMAN, L. & RODEHEFFER, M. S. 2015. Rapid depot-specific activation of adipocyte precursor cells at the onset of obesity. *Nat Cell Biol*, 17, 376-85.
- JEONG, S. M., LEE, J., FINLEY, L. W., SCHMIDT, P. J., FLEMING, M. D. & HAIGIS, M. C. 2015. SIRT3 regulates cellular iron metabolism and cancer growth by repressing iron regulatory protein 1. *Oncogene*, 34, 2115-24.
- JING, E., EMANUELLI, B., HIRSCHEY, M. D., BOUCHER, J., LEE, K. Y., LOMBARD, D., VERDIN, E. M. & KAHN, C. R. 2011. Sirtuin-3 (Sirt3) regulates skeletal muscle metabolism and insulin signaling via altered mitochondrial oxidation and reactive oxygen species production. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 14608-13.
- JING, E., O'NEILL, B. T., RARDIN, M. J., KLEINRIDERS, A., ILKEYEVA, O. R., USSAR, S., BAIN, J. R., LEE, K. Y., VERDIN, E. M., NEWGARD, C. B., GIBSON, B. W. & KAHN, C. R. 2013. Sirt3 regulates metabolic flexibility of skeletal muscle through reversible enzymatic deacetylation. *Diabetes*, 62, 3404-17.
- JUKARAINEN, S., HEINONEN, S., RAMO, J. T., RINNANKOSKI-TUIKKA, R., RAPPOU, E., TUMMERS, M., MUNIANDY, M., HAKKARAINEN, A., LUNDBOM, J., LUNDBOM, N., KAPRIO, J., RISSANEN, A., PIRINEN, E. & PIETILAINEN, K. H. 2015. Obesity is associated with low NAD/SIRT pathway expression in adipose tissue of BMI-discordant monozygotic twins. *J Clin Endocrinol Metab*, jc20153095.
- KALLIOMAKI, M., COLLADO, M. C., SALMINEN, S. & ISOLAURI, E. 2008. Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. *Am J Clin Nutr*, 87, 534-8.
- KAUR, J. 2014. A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiol Res Pract*, 2014, 943162.
- KENDRICK, A. A., CHOUDHURY, M., RAHMAN, S. M., MCCURDY, C. E., FRIEDERICH, M., VAN HOVE, J. L., WATSON, P. A., BIRDSEY, N., BAO, J., GIUS, D., SACK, M. N., JING, E., KAHN, C.

- R., FRIEDMAN, J. E. & JONSCHER, K. R. 2011. Fatty liver is associated with reduced SIRT3 activity and mitochondrial protein hyperacetylation. *Biochem J*, 433, 505-14.
- KIM, M., LEE, J. S., OH, J. E., NAN, J., LEE, H., JUNG, H. S., CHUNG, S. S. & PARK, K. S. 2015. SIRT3 Overexpression Attenuates Palmitate-Induced Pancreatic beta-Cell Dysfunction. *PLoS One*, 10, e0124744.
- KINCAID, B. & BOSSY-WETZEL, E. 2013. Forever young: SIRT3 a shield against mitochondrial meltdown, aging, and neurodegeneration. *Front Aging Neurosci*, 5, 48.
- KLOK, M. D., JAKOBSDOTTIR, S. & DRENT, M. L. 2007. The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. *Obes Rev*, 8, 21-34.
- KLYMENKO, S., TROTT, K., ATKINSON, M., BINK, K., BEBESHKO, V., BAZYKA, D., DMYTRENKO, I., ABRAMENKO, I., BILOUS, N., MISURIN, A., ZITZELSBERGER, H. & ROSEMANN, M. 2005a. Aml1 gene rearrangements and mutations in radiation-associated acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *J Radiat Res*, 46, 249-55.
- KLYMENKO, S. V., BINK, K., TROTT, K. R., BEBESHKO, V. G., BAZYKA, D. A., DMYTRENKO, I. V., ABRAMENKO, I. V., BILOUS, N. I., ZITZELSBERGER, H., MISURIN, A. V., ATKINSON, M. J. & ROSEMANN, M. 2005b. MLL gene alterations in radiation-associated acute myeloid leukemia. *Exp Oncol*, 27, 71-5.
- KONDO, M., SHIBATA, R., MIURA, R., SHIMANO, M., KONDO, K., LI, P., OHASHI, T., KIHARA, S., MAEDA, N., WALSH, K., OUCHI, N. & MUROHARA, T. 2009. Caloric restriction stimulates revascularization in response to ischemia via adiponectin-mediated activation of endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*, 284, 1718-24.
- KORDE, A. S., SULLIVAN, P. G. & MARAGOS, W. F. 2005. The uncoupling agent 2,4-dinitrophenol improves mitochondrial homeostasis following striatal quinolinic acid injections. *J Neurotrauma*, 22, 1142-9.
- KWON, Y., KIM, J., LEE, C. Y. & KIM, H. 2015. Expression of SIRT1 and SIRT3 varies according to age in mice. *Anat Cell Biol*, 48, 54-61.
- LANGIN, D., LARROUY, D., BARBE, P., MILLET, L., VIGUERIE-BASCANDS, N., ANDREELLI, F., LAVILLE, M. & VIDAL, H. 1999. Uncoupling protein-2 (UCP2) and uncoupling protein-3 (UCP3) expression in adipose tissue and skeletal muscle in humans. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 23 Suppl 6, S64-7.
- LAW, I. K., LIU, L., XU, A., LAM, K. S., VANHOUTTE, P. M., CHE, C. M., LEUNG, P. T. & WANG, Y. 2009. Identification and characterization of proteins interacting with SIRT1 and SIRT3: implications in the anti-aging and metabolic effects of sirtuins. *Proteomics*, 9, 2444-56.
- LEE, H., LEE, Y. J., CHOI, H., KO, E. H. & KIM, J. W. 2009. Reactive oxygen species facilitate adipocyte differentiation by accelerating mitotic clonal expansion. *J Biol Chem*, 284, 10601-9.
- LEE, Y. Y. 2015. What is Obesity Doing to Your Gut? *Malays J Med Sci*, 22, 1-3.
- LI, L., YANG, G., SHI, S., YANG, M., LIU, H. & BODEN, G. 2009. The adipose triglyceride lipase, adiponectin and visfatin are downregulated by tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in vivo. *Cytokine*, 45, 12-9.
- LI, Y., WONG, K., GILES, A., JIANG, J., LEE, J. W., ADAMS, A. C., KHARITONENKOV, A., YANG, Q., GAO, B., GUARENTE, L. & ZANG, M. 2014. Hepatic SIRT1 attenuates hepatic steatosis and controls energy balance in mice by inducing fibroblast growth factor 21. *Gastroenterology*, 146, 539-49 e7.
- LIBERT, S. & GUARENTE, L. 2013. Metabolic and neuropsychiatric effects of calorie restriction and sirtuins. *Annu Rev Physiol*, 75, 669-84.
- LIU, T. F., VACHHARAJANI, V., MILLET, P., BHARADWAJ, M. S., MOLINA, A. J. & MCCALL, C. E. 2015. Sequential actions of SIRT1-RELB-SIRT3 coordinate nuclear-mitochondrial communication during immunometabolic adaptation to acute inflammation and sepsis. *J Biol Chem*, 290, 396-408.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-8.
- LO, K. A. & SUN, L. 2013. Turning WAT into BAT: a review on regulators controlling the browning of white adipocytes. *Biosci Rep*, 33.
- LOH, K., DENG, H., FUKUSHIMA, A., CAI, X., BOIVIN, B., GALIC, S., BRUCE, C., SHIELDS, B. J., SKIBA, B., OOMS, L. M., STEPTO, N., WU, B., MITCHELL, C. A., TONKS, N. K., WATT, M. J., FEBBRAIO, M. A., CRACK, P. J., ANDRIKOPOULOS, S. & TIGANIS, T. 2009. Reactive oxygen species enhance insulin sensitivity. *Cell Metab*, 10, 260-72.
- LOMA-SANNER, I., KANG, E. Y., SEPEHRDAD, S., GOLDSTEIN, S. L., HERMAN, M. S., ACCARDO, P. J., GREEN, P. H. & ROSEMAN, B. 2005. A floppy child with failure to thrive. *Lancet*, 366, 176.
- LOMBARD, D. B., ALT, F. W., CHENG, H. L., BUNKENBORG, J., STREEPER, R. S., MOSTOSLAVSKY, R., KIM, J., YANCOPOULOS, G., VALENZUELA, D., MURPHY, A., YANG, Y., CHEN, Y., HIRSCHHEY, M. D., BRONSON, R. T., HAIGIS, M., GUARENTE, L. P., FARESE, R. V., JR.,

- WEISSMAN, S., VERDIN, E. & SCHWER, B. 2007. Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation. *Mol Cell Biol*, 27, 8807-14.
- MAHLKNECHT, U. & VOELTER-MAHLKNECHT, S. 2011. Genomic organization and localization of the NAD-dependent histone deacetylase gene sirtuin 3 (Sirt3) in the mouse. *Int J Oncol*, 38, 813-22.
- MARTINEZ-REDONDO, P. & VAQUERO, A. 2013. The diversity of histone versus nonhistone sirtuin substrates. *Genes Cancer*, 4, 148-63.
- MAURY, E. & BRICHARD, S. M. 2010. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol*, 314, 1-16.
- MCALLISTER, E. J., DHURANDHAR, N. V., KEITH, S. W., ARONNE, L. J., BARGER, J., BASKIN, M., BENCA, R. M., BIGGIO, J., BOGGIANO, M. M., EISENMANN, J. C., ELOBEID, M., FONTAINE, K. R., GLUCKMAN, P., HANLON, E. C., KATZMARZYK, P., PIETROBELLI, A., REDDEN, D. T., RUDEN, D. M., WANG, C., WATERLAND, R. A., WRIGHT, S. M. & ALLISON, D. B. 2009. Ten putative contributors to the obesity epidemic. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 49, 868-913.
- MERIAL, C., BOULOUMIE, A., TROCHERIS, V., LAFONTAN, M. & GALITZKY, J. 2000. Nitric oxide-dependent downregulation of adipocyte UCP-2 expression by tumor necrosis factor-alpha. *Am J Physiol Cell Physiol*, 279, C1100-6.
- MICHEL, S., WANET, A., DE PAUW, A., ROMMELAERE, G., ARNOULD, T. & RENARD, P. 2012. Crosstalk between mitochondrial (dys)function and mitochondrial abundance. *J Cell Physiol*, 227, 2297-310.
- MITCHELL, P. 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, 191, 144-8.
- MOSCHEN, A. R., WIESER, V., GERNER, R. R., BICHLER, A., ENRICH, B., MOSER, P., EBENBICHLER, C. F., KASER, S. & TILG, H. 2013. Adipose tissue and liver expression of SIRT1, 3, and 6 increase after extensive weight loss in morbid obesity. *J Hepatol*, 59, 1315-22.
- MOUCHIROUD, L., HOUTKOOPE, R. H., MOULLAN, N., KATSYUBA, E., RYU, D., CANTO, C., MOTTIS, A., JO, Y. S., VISWANATHAN, M., SCHOONJANS, K., GUARENTE, L. & AUWERX, J. 2013. The NAD(+)/Sirtuin Pathway Modulates Longevity through Activation of Mitochondrial UPR and FOXO Signaling. *Cell*, 154, 430-41.
- NAITO, T., OKAMOTO, M., SADAKANE, O., SHIMEGI, S., OSAKI, H., HARA, S., KIMURA, A., ISHIKAWA, A., SUEMATSU, N. & SATO, H. 2013. Effects of stimulus spatial frequency, size, and luminance contrast on orientation tuning of neurons in the dorsal lateral geniculate nucleus of cat. *Neurosci Res*, 77, 143-54.
- NAKAMURA, Y., OGURA, M., TANAKA, D. & INAGAKI, N. 2008. Localization of mouse mitochondrial SIRT proteins: shift of SIRT3 to nucleus by co-expression with SIRT5. *Biochem Biophys Res Commun*, 366, 174-9.
- ONYANGO, P., CELIC, I., MCCAFFERY, J. M., BOEKE, J. D. & FEINBERG, A. P. 2002. SIRT3, a human SIR2 homologue, is an NAD-dependent deacetylase localized to mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 13653-8.
- OZDEN, O., PARK, S. H., KIM, H. S., JIANG, H., COLEMAN, M. C., SPITZ, D. R. & GIUS, D. 2011. Acetylation of MnSOD directs enzymatic activity responding to cellular nutrient status or oxidative stress. *Aging (Albany NY)*, 3, 102-7.
- PALACIOS, O. M., CARMONA, J. J., MICHAN, S., CHEN, K. Y., MANABE, Y., WARD, J. L., 3RD, GOODYEAR, L. J. & TONG, Q. 2009. Diet and exercise signals regulate SIRT3 and activate AMPK and PGC-1alpha in skeletal muscle. *Aging (Albany NY)*, 1, 771-83.
- PARK, J., MORLEY, T. S., KIM, M., CLEGG, D. J. & SCHERER, P. E. 2014. Obesity and cancer-mechanisms underlying tumour progression and recurrence. *Nat Rev Endocrinol*, 10, 455-65.
- PEIRCE, V., CAROBBIO, S. & VIDAL-PUIG, A. 2014. The different shades of fat. *Nature*, 510, 76-83.
- PELLEGRINI, L., PUCCI, B., VILLANOVA, L., MARINO, M. L., MARFE, G., SANSONE, L., VERNUCCI, E., BELLIZZI, D., REALI, V., FINI, M., RUSSO, M. A. & TAFANI, M. 2012. SIRT3 protects from hypoxia and staurosporine-mediated cell death by maintaining mitochondrial membrane potential and intracellular pH. *Cell Death Differ*, 19, 1815-25.
- PERUSSE, L. & BOUCHARD, C. 2003. [Genetics of obesity and metabolic complications in the Quebec Family Study]. *Med Sci (Paris)*, 19, 937-42.
- POULSEN, R. C., KNOWLES, H. J., CARR, A. J. & HULLEY, P. A. 2014. Cell differentiation versus cell death: extracellular glucose is a key determinant of cell fate following oxidative stress exposure. *Cell Death Dis*, 5, e1074.
- PULGARON, E. R. & DELAMATER, A. M. 2014. Obesity and type 2 diabetes in children: epidemiology and treatment. *Curr Diab Rep*, 14, 508.
- QIU, X., BROWN, K., HIRSCHHEY, M. D., VERDIN, E. & CHEN, D. 2010. Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation. *Cell Metab*, 12, 662-7.

- RAJALIN, A. M., POLLOCK, H. & AARNISALO, P. 2010. ERRalpha regulates osteoblastic and adipogenic differentiation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 396, 477-82.
- RARDIN, M. J., NEWMAN, J. C., HELD, J. M., CUSACK, M. P., SORENSEN, D. J., LI, B., SCHILLING, B., MOONEY, S. D., KAHN, C. R., VERDIN, E. & GIBSON, B. W. 2013. Label-free quantitative proteomics of the lysine acetylome in mitochondria identifies substrates of SIRT3 in metabolic pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110, 6601-6.
- REILLY, S. M., AHMADIAN, M., ZAMARRON, B. F., CHANG, L., UHM, M., POIRIER, B., PENG, X., KRAUSE, D. M., KORYTNAYA, E., NEIDERT, A., LIDDLE, C., YU, R. T., LUMENG, C. N., ORAL, E. A., DOWNES, M., EVANS, R. M. & SALTIEL, A. R. 2015. A subcutaneous adipose tissue-liver signalling axis controls hepatic gluconeogenesis. *Nat Commun*, 6, 6047.
- RIZZATTI, V., BOSCHI, F., PEDROTTI, M., ZOICO, E., SBARBATI, A. & ZAMBONI, M. 2013. Lipid droplets characterization in adipocyte differentiated 3T3-L1 cells: size and optical density distribution. *Eur J Histochem*, 57, e24.
- ROSE, G., DATO, S., ALTOMARE, K., BELLIZZI, D., GARASTO, S., GRECO, V., PASSARINO, G., FERACO, E., MARI, V., BARBI, C., BONAFE, M., FRANCESCHI, C., TAN, Q., BOIKO, S., YASHIN, A. I. & DE BENEDICTIS, G. 2003. Variability of the SIRT3 gene, human silent information regulator Sir2 homologue, and survivorship in the elderly. *Exp Gerontol*, 38, 1065-70.
- ROSEMAN, H. M. 2005. Progression from obesity to type 2 diabetes: lipotoxicity, glucotoxicity, and implications for management. *J Manag Care Pharm*, 11, S3-11.
- ROSEMANN, T., KORNER, T., WENSING, M., GENSICHEN, J., MUTH, C., JOOS, S. & SZECSENYI, J. 2005a. Rationale, design and conduct of a comprehensive evaluation of a primary care based intervention to improve the quality of life of osteoarthritis patients. The PraxArt-project: a cluster randomized controlled trial [ISRCTN87252339]. *BMC Public Health*, 5, 77.
- ROSEMANN, T., KORNER, T., WENSING, M., SCHNEIDER, A. & SZECSENYI, J. 2005b. Evaluation and cultural adaptation of a German version of the AIMS2-SF questionnaire (German AIMS2-SF). *Rheumatology (Oxford)*, 44, 1190-5.
- ROSEN, E. D. & MACDOUGALD, O. A. 2006. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 885-96.
- ROSSETTI, L., DEFONZO, R. A., GHERZI, R., STEIN, P., ANDRAGHETTI, G., FALZETTI, G., SHULMAN, G. I., KLEIN-ROBBENHAAR, E. & CORDERA, R. 1990. Effect of metformin treatment on insulin action in diabetic rats: in vivo and in vitro correlations. *Metabolism*, 39, 425-35.
- ROSSETTI, L. & GIACCARI, A. 1990. Relative contribution of glycogen synthesis and glycolysis to insulin-mediated glucose uptake. A dose-response euglycemic clamp study in normal and diabetic rats. *J Clin Invest*, 85, 1785-92.
- SADOSHIMA, J. 2011. Sirt3 targets mPTP and prevents aging in the heart. *Aging (Albany NY)*, 3, 12-3.
- SADOUL, K., WANG, J., DIAGOURAGA, B. & KHOCHBIN, S. 2011. The tale of protein lysine acetylation in the cytoplasm. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 970382.
- SAMANT, S. A., ZHANG, H. J., HONG, Z., PILLAI, V. B., SUNDARESAN, N. R., WOLFGHEHER, D., ARCHER, S. L., CHAN, D. C. & GUPTA, M. P. 2014. SIRT3 deacetylates and activates OPA1 to regulate mitochondrial dynamics during stress. *Mol Cell Biol*, 34, 807-19.
- SANDERS, B. D., JACKSON, B. & MARMORSTEIN, R. 2010. Structural basis for sirtuin function: what we know and what we don't. *Biochim Biophys Acta*, 1804, 1604-16.
- SAUVE, A. A. 2010. Sirtuin chemical mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, 1804, 1591-603.
- SCHER, M. B., VAQUERO, A. & REINBERG, D. 2007. SirT3 is a nuclear NAD⁺-dependent histone deacetylase that translocates to the mitochondria upon cellular stress. *Genes Dev*, 21, 920-8.
- SCHLICKER, C., GERTZ, M., PAPATHEODOROU, P., KACHHOLZ, B., BECKER, C. F. & STEEGBORN, C. 2008. Substrates and regulation mechanisms for the human mitochondrial sirtuins Sirt3 and Sirt5. *J Mol Biol*, 382, 790-801.
- SCHMIDT, O., PFANNER, N. & MEISINGER, C. 2010. Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11, 655-67.
- SCHNEIDER, A., ROSEMANN, T., WENSING, M. & SZECSENYI, J. 2005. Physicians perceived usefulness of high-cost diagnostic imaging studies: results of a referral study in a German medical quality network. *BMC Fam Pract*, 6, 22.
- SCHWER, B., NORTH, B. J., FRYE, R. A., OTT, M. & VERDIN, E. 2002. The human silent information regulator (Sir)2 homologue hSIRT3 is a mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide-dependent deacetylase. *J Cell Biol*, 158, 647-57.
- SHIMAZU, T., HIRSCHHEY, M. D., HUA, L., DITTENHAFFER-REED, K. E., SCHWER, B., LOMBARD, D. B., LI, Y., BUNKENBORG, J., ALT, F. W., DENU, J. M., JACOBSON, M. P. & VERDIN, E. 2010.

- SIRT3 deacetylates mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase 2 and regulates ketone body production. *Cell Metab*, 12, 654-61.
- SHORE, D., SQUIRE, M. & NASMYTH, K. A. 1984. Characterization of two genes required for the position-effect control of yeast mating-type genes. *EMBO J*, 3, 2817-23.
- SIDOSSIS, L. S., PORTER, C., SARAF, M. K., BORSHEIM, E., RADHAKRISHNAN, R. S., CHAO, T., ALI, A., CHONDRONIKOLA, M., MLCAK, R., FINNERTY, C. C., HAWKINS, H. K., TOLIVER-KINSKY, T. & HERNDON, D. N. 2015. Browning of Subcutaneous White Adipose Tissue in Humans after Severe Adrenergic Stress. *Cell Metab*, 22, 219-27.
- SIMIC, P., WILLIAMS, E. O., BELL, E. L., GONG, J. J., BONKOWSKI, M. & GUARENTE, L. 2013a. SIRT1 suppresses the epithelial-to-mesenchymal transition in cancer metastasis and organ fibrosis. *Cell Rep*, 3, 1175-86.
- SIMIC, P., ZAINABADI, K., BELL, E., SYKES, D. B., SAEZ, B., LOTINUN, S., BARON, R., SCADDEN, D., SCHIPANI, E. & GUARENTE, L. 2013b. SIRT1 regulates differentiation of mesenchymal stem cells by deacetylating beta-catenin. *EMBO Mol Med*, 5, 430-40.
- SINCLAIR, D. A. & GUARENTE, L. 2014. Small-molecule allosteric activators of sirtuins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 54, 363-80.
- SIVITZ, W. I. & YOREK, M. A. 2010. Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*, 12, 537-77.
- SMITH, B. C., SETTLES, B., HALLOWS, W. C., CRAVEN, M. W. & DENU, J. M. 2011. SIRT3 substrate specificity determined by peptide arrays and machine learning. *ACS Chem Biol*, 6, 146-57.
- SMITH, C. J. & RYCKMAN, K. K. 2015. Epigenetic and developmental influences on the risk of obesity, diabetes, and metabolic syndrome. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 8, 295-302.
- SNYDER, E. E., WALTERS, B., PERUSSE, L., CHAGNON, Y. C., WEISNAGEL, S. J., RANKINEN, T. & BOUCHARD, C. 2004. The human obesity gene map: the 2003 update. *Obes Res*, 12, 369-439.
- SOL, E. M., WAGNER, S. A., WEINERT, B. T., KUMAR, A., KIM, H. S., DENG, C. X. & CHOUDHARY, C. 2012. Proteomic investigations of lysine acetylation identify diverse substrates of mitochondrial deacetylase sirt3. *PLoS One*, 7, e50545.
- SOMEYA, S., YU, W., HALLOWS, W. C., XU, J., VANN, J. M., LEEUWENBURGH, C., TANOKURA, M., DENU, J. M. & PROLLA, T. A. 2010. Sirt3 mediates reduction of oxidative damage and prevention of age-related hearing loss under caloric restriction. *Cell*, 143, 802-12.
- SPALDING, K. L., ARNER, E., WESTERMARK, P. O., BERNARD, S., BUCHHOLZ, B. A., BERGMANN, O., BLOMQUIST, L., HOFFSTEDT, J., NASLUND, E., BRITTON, T., CONCHA, H., HASSAN, M., RYDEN, M., FRISEN, J. & ARNER, P. 2008. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*, 453, 783-7.
- TAO, R., VASSILOPOULOS, A., PARISIADOU, L., YAN, Y. & GIUS, D. 2014. Regulation of MnSOD enzymatic activity by Sirt3 connects the mitochondrial acetylome signaling networks to aging and carcinogenesis. *Antioxid Redox Signal*, 20, 1646-54.
- TCHERNOF, A. & DESPRES, J. P. 2013. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol Rev*, 93, 359-404.
- TEJERINA, S., DE PAUW, A., VANKONINGSLOO, S., HOUBION, A., RENARD, P., DE LONGUEVILLE, F., RAES, M. & ARNOULD, T. 2009. Mild mitochondrial uncoupling induces 3T3-L1 adipocyte differentiation by a PPARgamma-independent mechanism, whereas TNFalpha-induced differentiation is PPARgamma dependent. *J Cell Sci*, 122, 145-55.
- TEODORO, J. S., DUARTE, F. V., GOMES, A. P., VARELA, A. T., PEIXOTO, F. M., ROLO, A. P. & PALMEIRA, C. M. 2013. Berberine reverts hepatic mitochondrial dysfunction in high-fat fed rats: a possible role for Sirt3 activation. *Mitochondrion*, 13, 637-46.
- TILG, H. & MOSCHEN, A. R. 2006. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*, 6, 772-83.
- TO, M. S., AROMATARIS, E. C., CASTRO, J., ROBERTS, M. L., BARRITT, G. J. & RYCHKOV, G. Y. 2010. Mitochondrial uncoupler FCCP activates proton conductance but does not block store-operated Ca(2+) current in liver cells. *Arch Biochem Biophys*, 495, 152-8.
- TORMOS, K. V., ANSO, E., HAMANAKA, R. B., EISENBART, J., JOSEPH, J., KALYANARAMAN, B. & CHANDEL, N. S. 2011. Mitochondrial complex III ROS regulate adipocyte differentiation. *Cell Metab*, 14, 537-44.
- TOURNIAIRE, F., ROMIER-CROUZET, B., LEE, J. H., MARCOTORCHINO, J., GOURANTON, E., SALLES, J., MALEZET, C., ASTIER, J., DARMON, P., BLOUIN, E., WALRAND, S., YE, J. & LANDRIER, J. F. 2013. Chemokine Expression in Inflamed Adipose Tissue Is Mainly Mediated by NF-kappaB. *PLoS One*, 8, e66515.
- TRAN, T. T., YAMAMOTO, Y., GESTA, S. & KAHN, C. R. 2008. Beneficial effects of subcutaneous fat transplantation on metabolism. *Cell Metab*, 7, 410-20.

- TSENG, A. H., SHIEH, S. S. & WANG, D. L. 2013. SIRT3 deacetylates FOXO3 to protect mitochondria against oxidative damage. *Free Radic Biol Med*, 63, 222-34.
- VAN STIJN, C. M., KIM, J., BARISH, G. D., TIETGE, U. J. & TANGIRALA, R. K. 2014. Adiponectin expression protects against angiotensin II-mediated inflammation and accelerated atherosclerosis. *PLoS One*, 9, e86404.
- VANKONINGSLOO, S., DE PAUW, A., HOUBION, A., TEJERINA, S., DEMAZY, C., DE LONGUEVILLE, F., BERTHOLET, V., RENARD, P., REMACLE, J., HOLVOET, P., RAES, M. & ARNOULD, T. 2006. CREB activation induced by mitochondrial dysfunction triggers triglyceride accumulation in 3T3-L1 preadipocytes. *J Cell Sci*, 119, 1266-82.
- WABITSCH, M., BRENNER, R. E., MELZNER, I., BRAUN, M., MOLLER, P., HEINZE, E., DEBATIN, K. M. & HAUNER, H. 2001. Characterization of a human preadipocyte cell strain with high capacity for adipose differentiation. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 25, 8-15.
- WALLBERG-HENRIKSSON, H. & ZIERATH, J. R. 2015. Metabolism. Exercise remodels subcutaneous fat tissue and improves metabolism. *Nat Rev Endocrinol*, 11, 198-200.
- WANG, Z. V., DENG, Y., WANG, Q. A., SUN, K. & SCHERER, P. E. 2010. Identification and characterization of a promoter cassette conferring adipocyte-specific gene expression. *Endocrinology*, 151, 2933-9.
- WEINERT, B. T., MOUSTAFA, T., IESMANTAVICIUS, V., ZECHNER, R. & CHOUDHARY, C. 2015. Analysis of acetylation stoichiometry suggests that SIRT3 repairs nonenzymatic acetylation lesions. *EMBO J*, 34, 2620-32.
- WEISBERG, S. P., MCCANN, D., DESAI, M., ROSENBAUM, M., LEIBEL, R. L. & FERRANTE, A. W., JR. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*, 112, 1796-808.
- WILSON-FRITCH, L., BURKART, A., BELL, G., MENDELSON, K., LESZYK, J., NICOLORO, S., CZECH, M. & CORVERA, S. 2003. Mitochondrial biogenesis and remodeling during adipogenesis and in response to the insulin sensitizer rosiglitazone. *Mol Cell Biol*, 23, 1085-94.
- WINNIK, S., GAUL, D. S., PREITNER, F., LOHMANN, C., WEBER, J., MIRANDA, M. X., LIU, Y., VAN TITS, L. J., MATEOS, J. M., BROKOPP, C. E., AUWERX, J., THORENS, B., LUSCHER, T. F. & MATTER, C. M. 2014. Deletion of Sirt3 does not affect atherosclerosis but accelerates weight gain and impairs rapid metabolic adaptation in LDL receptor knockout mice: implications for cardiovascular risk factor development. *Basic Res Cardiol*, 109, 399.
- YANG, X., JANSSON, P. A., PELLME, F., LAAKSO, M. & SMITH, U. 2005. Effect of the interleukin-6 (-174) g/c promoter polymorphism on adiponectin and insulin sensitivity. *Obes Res*, 13, 813-7.
- YANG, Y., CIMEN, H., HAN, M. J., SHI, T., DENG, J. H., KOC, H., PALACIOS, O. M., MONTIER, L., BAI, Y., TONG, Q. & KOC, E. C. 2010. NAD⁺-dependent deacetylase SIRT3 regulates mitochondrial protein synthesis by deacetylation of the ribosomal protein MRPL10. *J Biol Chem*, 285, 7417-29.
- YAO, H., HWANG, J. W., SUNDAR, I. K., FRIEDMAN, A. E., MCBURNEY, M. W., GUARENTE, L., GU, W., KINNULA, V. L. & RAHMAN, I. 2013. SIRT1 redresses the imbalance of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-9 in the development of mouse emphysema and human COPD. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 305, L615-24.
- YU, W., DITTENHAFFER-REED, K. E. & DENU, J. M. 2012. SIRT3 protein deacetylates isocitrate dehydrogenase 2 (IDH2) and regulates mitochondrial redox status. *J Biol Chem*, 287, 14078-86.
- ZAMMIT, C., LIDDICOAT, H., MOONSIE, I. & MAKKER, H. 2010. Obesity and respiratory diseases. *Int J Gen Med*, 3, 335-43.
- ZENG, H., LI, L. & CHEN, J. X. 2014a. Loss of Sirt3 limits bone marrow cell-mediated angiogenesis and cardiac repair in post-myocardial infarction. *PLoS One*, 9, e107011.
- ZENG, L., YANG, Y., HU, Y., SUN, Y., DU, Z., XIE, Z., ZHOU, T. & KONG, W. 2014b. Age-related decrease in the mitochondrial sirtuin deacetylase Sirt3 expression associated with ROS accumulation in the auditory cortex of the mimetic aging rat model. *PLoS One*, 9, e88019.
- ZHAO, T. & ZHAO, J. 2011. Genetic effects of adiponectin on blood lipids and blood pressure. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 74, 214-22.
- ZIMMERMANN, R., STRAUSS, J. G., HAEMMERLE, G., SCHOISWOHL, G., BIRNER-GRUENBERGER, R., RIEDERER, M., LASS, A., NEUBERGER, G., EISENHABER, F., HERMETTER, A. & ZECHNER, R. 2004. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science*, 306, 1383-6.

ANNEXE

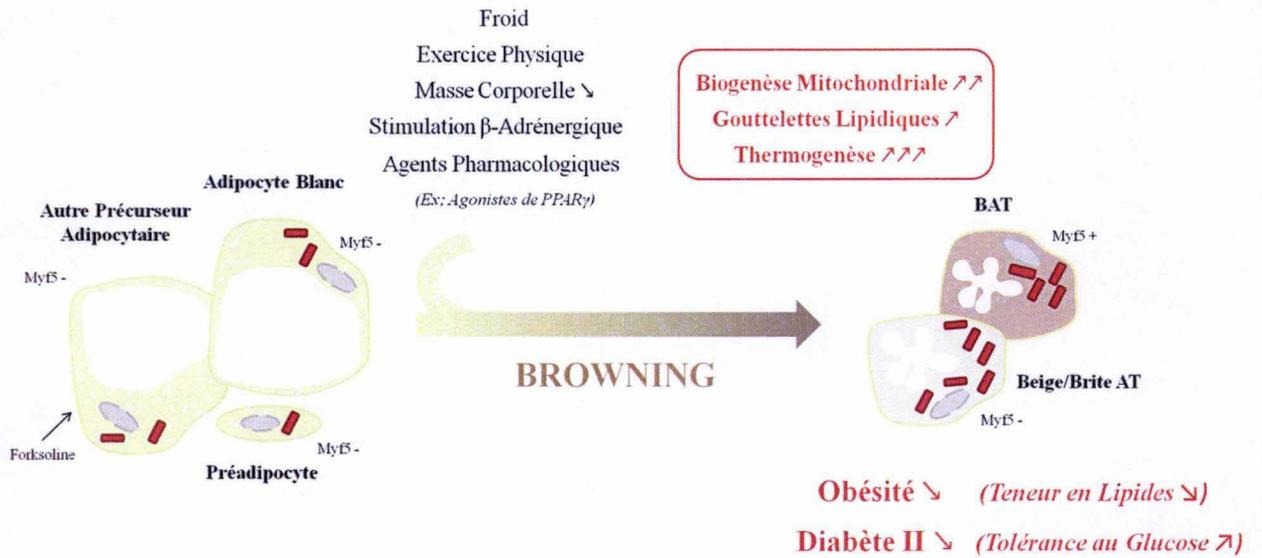


Figure A1 : Représentation schématique du phénomène de Browning

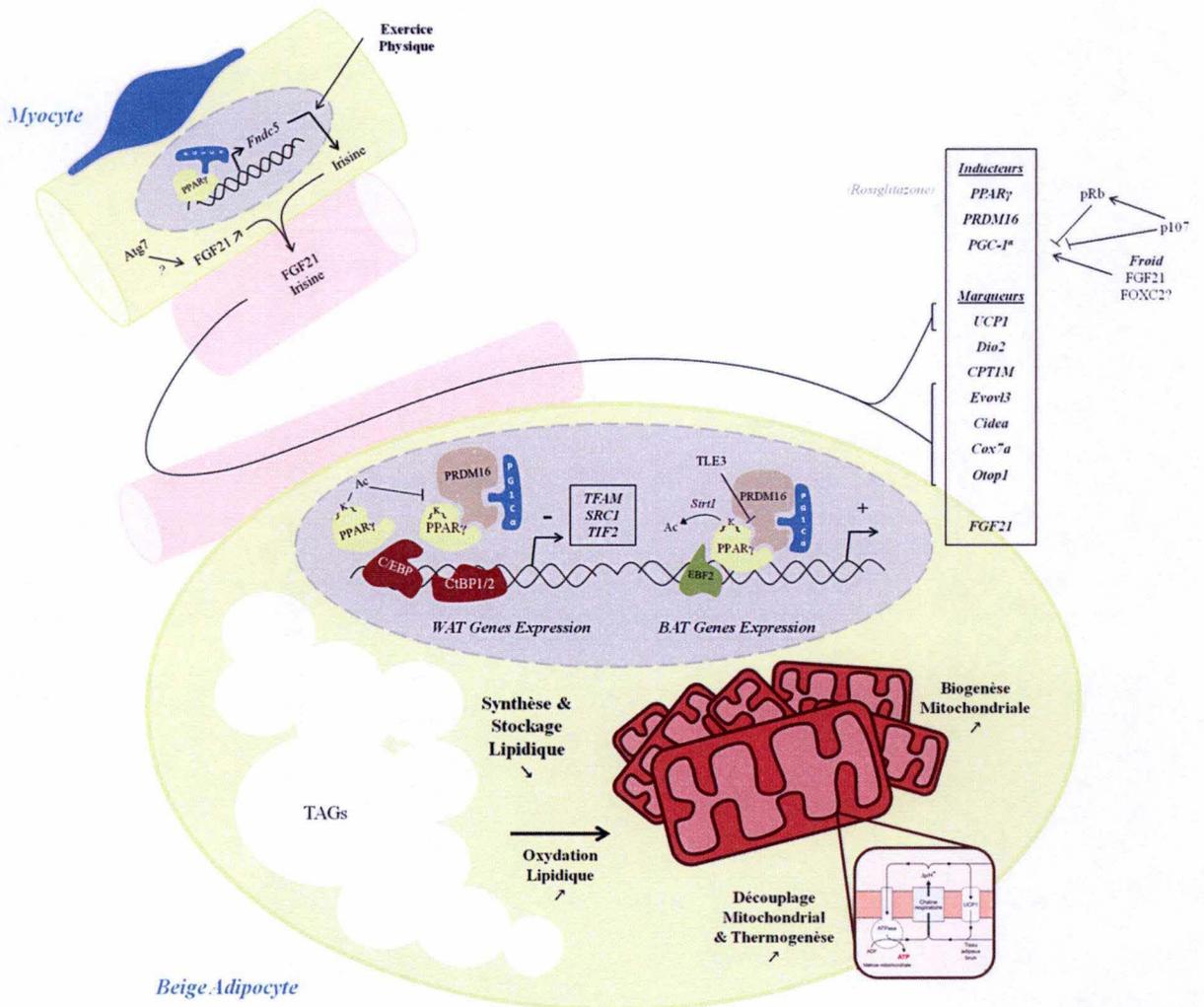


Figure A2 : Modification du pool d'expression génique d'un adipocyte lors du phénomène de browning (figure principalement basée sur Kinyui et al, 2013) (« Découplage Mitochondrial & Thermogenèse » adapté de Ricquier and Bouillaud, 1998).

ANNEXE 1 – Le Browning

Etant donné la diversité des prédispositions conduisant à un phénotype obèse, il sera difficile de mettre au point un traitement efficace globalement exploitable au sein de la population affectée. Cette perspective reste néanmoins envisageable en ciblant par exemple les mécanismes énergétiques cellulaires fondamentaux. Dans les années 1930, le **dinitrophénol (DNP)**, un ionophore inhibiteur de la phosphorylation oxydative, a été utilisé dans des régimes amaigrissant pour impacter directement le processus de génération de l'ATP (Korde et al, 2005). Cet agent découplant permet le retour des protons de l'espace inter-membranaire vers la matrice mitochondriale. Il dissipe ainsi le gradient électrochimique de ces protons, généré par la chaîne des électrons et nécessaire au fonctionnement du complexe V (ATPase) de la chaîne, qui constitue la machinerie de production de l'ATP. Cette perturbation permet de dissiper « gratuitement » de l'énergie et favorise, en amont, l'oxydation du fuel énergétique excédentaire. Cette molécule constitua donc un grand espoir thérapeutique. Malheureusement, elle présenta de nombreux effets indésirables : en effet, son action s'accompagne d'une libération de chaleur et donc d'une augmentation de la température corporelle (fièvre), d'une fatigue extrême (diminution de la production d'énergie et oxydation progressive) entraînant l'absence de production d'ATP nécessaire au déroulement des processus cellulaires vitaux. L'effet de cet agent étant corrélé à la dose administrée, plusieurs cas de décès liés à des surdoses ont été signalés, conduisant à l'interdiction de son utilisation, en 2015 (Interpol), comme principe amaigrissant. Il existe cependant un découplage mitochondrial à l'état naturel, déployé par les adipocytes bruns. Ces cellules sont largement représentées chez les animaux hibernant. En effet, la dissipation de l'énergie accumulée au cours des saisons d'abondance, sous forme de chaleur leur permet de réguler la température corporelle tout au long de l'hiver. Ce phénomène est appelé la « **thermogenèse** ». Il correspond à un découplage mitochondrial assuré en grande partie par la protéine Uncoupling Protein 1 (**UCP1**). Deux autres UCP ont depuis été découvertes, et sont exprimées, bien qu'en moindre proportion, soit à travers l'ensemble de l'organisme (et par les adipocytes blancs) (**UCP2**), soit par les cellules musculaires squelettiques (**UCP3**) (Langin et al., 1999). Dès lors est né un nouvel intérêt de recherche : la transdifférenciation d'adipocytes blancs en adipocytes bruns. Si certaines études ont réussi à produire un phénotype intermédiaire appelé « adipocyte **beige** », d'autres ont pu montrer que cette cellule proviendrait d'un précurseur indépendant et ne consisterait donc pas en une transdifférenciation au sens propre. Quoiqu'il en soit, l'objectif reste possible, et l'ensemble des méthodes favorisant l'apparition d'une thermogenèse chez un quelconque adipocyte sont englobées sous le terme de **browning**. A ce jour, 3 inducteurs du browning ont été identifiés. L'utilisation de ses agonistes ont établi le rôle du **PPAR γ** dans ce phénomène. Les mécanismes permettant le switch de l'activité de ce FT vers la différenciation WAT ou BAT sont complexes et passent par la modification de l'accessibilité de l'ADN à travers d'autres FT positifs ou négatifs. Le second inducteur est le coactivateur **PRDM16**, nécessaire et quant à lui suffisant au déclenchement du browning. Enfin, un autre coactivateur, **PGC-1 α** a lui aussi été associé au développement de la thermogenèse. Ces trois facteurs interagissent et forment un complexe qui favorise la réduction de l'expression de gènes spécifiques du WAT, l'augmentation de celle de gènes anti-WAT et celle de gènes spécifiques du BAT. Quelques uns des gènes identifiés sont reportés dans la figure ci-contre. La composition du pool graisseux d'un individu est très variable : on a pu notamment y trouver des adipocytes thermogéniques. Ce déploiement est corrélé à la masse de l'individu (inversement), à son activité physique et à une exposition au froid (proportionnellement). Ceci confirme la découverte d'une régulation systémique du browning, notamment par les muscles qui, régulièrement stimulés, sécrèteraient des myokines telles que le **FGF21** et l'**Irisine**, toutes deux en faveur du browning du WAT. C'est donc en partie dans le but de produire un browning artificiel au sein de tissus adipeux obèses qu'il est nécessaire de connaître avec précision les mécanismes impliqués dans la différenciation adipocytaire blanche, brune, ou autre.

ABREVIATIONS

<i>Abréviation</i>	<i>Nomenclature complète</i>
ACS2	Acétyl-Coenzyme A synthétase 2
AdipoQ	Adiponectine
aP2 (FABP4)	Adipocyte Protein 2
ATGL	Adipose Triglycerides Lipase
C/EBP	CCAAT/Enhancer Binding Protein
CPT1	Carnitine PalmitoylTransferase1
CRE	Cre Recombinase
BMI	Body Mass Index/ Indice de Masse Corporelle
DNP	Dinitrophénol
eCB	Système Endocannabinoïde
ERRα	Estrogen Relata
FABP4 (aP2)	Fatty Acid Binding Protein 4
FCCP	Carbonyl Cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone
FFA	Free Fatty Acids / Acides gras libres
FGF21	Fibroblast Growth factor 21
FOXO	Fork Head Bos Protein
GSH	Glutathion
GDH	Glutamate Déshydrogénase
GLUT4	Glucose Transporter 4
GSK3β	Glycogen Synthase Kinase 3 β
GST	Glutathion S-Transferase
H	Histone
HIF1-α	Hypoxia)Inducible Factor 1- α
HSL	Hormone Sensitive Lipase
HSP	Heat Shock Protein
IDH2	Isocitrate Dehydrogenase
IL	Interleukine
IRS1	Insulin Receptor Substrates
K	Lysine
KO	Knock Out
LCAD	Long Chain AcylCoA Deshydrogénase

LPL	Lipoprotein Lipase
MCP1	Monocyte Chemoattractant Protein 1
MDH2	Malate Dehydrogenase 2
MEF	Mouse Embryonic Fibroblasts
MGL	Monoglyceride Lipase
Myf5	Myogenic Factor 5
mPTP	Mitochondrial Permeability Transition Pore
MS	Metabolic Syndrom / Syndrome Métabolique
MSC	Cellule Souche Mésenchymateuse
NAFLD	Non Alcoholic Fatty Liver Disease
ob	Leptine
OPA1	Optic Atrophy 1
ORO	Oil Red O
OXPHOS	Phosphorylation oxydative
PDH	Pyruvate Déshydrogénase
PGC1-α	Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ coactivator 1 α
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PPARγ	Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ
PRDM16	PR Domain Containing 16
PSMD13	Proteasome 26S Subunit, Non-ATPase, 13
RE	Endoplasmic Reticulum
ROS	Reactive Oxygene Species
Sirt	Sirtuine
SOD2/ MnSOD	Super Oxyde Dismutase 2
TA	Tissu Adipeux
TABI	Tissu Adipeux Blanc
TABr	Tissu Adipeux Brun
TASC	Tissu Adipeux (Blanc) Sous Cutané
TASCing	Tissu Adipeux (Blanc) Sous Cutané Inguinal
TASCint	Tissu Adipeux (Blanc) Sous Cutané Interscapulaire
TAV	Tissu Adipeux (Blanc) Viscéral
TAVap	Tissu Adipeux (Blanc) Viscéral Abdomino-Pelvien
TAVpr	Tissu Adipeux (Blanc) Viscéral Périrénal
TCAc	Cycle des acides tricarboxyliques
TG	Triglycérides

TGFβ1	Transforming Growth Factor β 1
TNFα	Tumor Necrosis Factor α
UCP1	Uncoupling protein-1
UV	Ultra-Violet
RXR	Retinoid X Receptor