



UNIVERSITE LIBRE DE BRUXELLES

Faculté des Sciences

Institut de Biologie et de Médecine

Moléculaires

Laboratoire de Parasitologie Moléculaire



# Étude du rôle de l'apolipoprotéine L6 dans le tissu adipeux murin

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences par

Corentin Vermeiren

Novembre 2018

Thèse réalisée sous la direction de David Pérez-Morga et Etienne Pays



# Étude du rôle de l'apolipoprotéine L6 dans le tissu adipeux murin

**Corentin Vermeiren**

Laboratoire de Parasitologie Moléculaire

Département de Biologie Moléculaire

Faculté des Sciences

Université Libre de Bruxelles

## **Thèse présentée auprès du jury composé de :**

Pr. Louis Droogmans (Président)

Université Libre de Bruxelles

Pr. A.M. Marini (Secrétaire)

Université Libre de Bruxelles

Pr. D. Pérez-Morga (Directeur de thèse)

Université Libre de Bruxelles

Pr. E. Pays (Co-Directeur de thèse)

Université Libre de Bruxelles

Pr. Oberdan Leo (Président du comité d'accompagnement)

Université Libre de Bruxelles

Pr. Bernard Robaye (Membre du comité d'accompagnement)

Université Libre de Bruxelles

Pr. Martine Raes (Expert extérieur)

Université de Namur

Pr. Amandine Everard (Expert extérieur)

Université Catholique de Louvain



## Résumé

Les apolipoprotéines L (APOL) forment une famille de protéines conservées chez les mammifères. La première APOL découverte, et la plus extensivement étudiée depuis, est l'APOL1 humaine. Présente dans le sérum humain, elle protège contre plusieurs espèces de trypanosomes africains. Également présente dans les cellules, sa fonction n'est pas encore connue, mais des mutations dans sa séquence ont été associées à un risque de développer des maladies rénales. De façon générale, les APOLs sont induites en conditions inflammatoires et ont été associées à des phénomènes de mort cellulaire et de résistance antivirale. Néanmoins, aucun modèle global ne permet encore de relier ces différentes observations. Quant à l'APOL6 murine, qui est l'objet de cette thèse de doctorat, elle n'a jamais été étudiée jusqu'ici.

Ce travail a permis de montrer que l'APOL6 murine est principalement exprimée par les adipocytes présents dans le tissu adipeux. Dans deux modèles de culture cellulaire *in vitro* d'adipocytes, la lignée 3T3-L1 ou des cellules souches prélevées du tissu adipeux de souris, l'adipogénèse a causé l'induction de l'expression de l'APOL6. Celle-ci a pu encore être augmentée suite à la stimulation des cellules par de l'IFN $\gamma$ , et diminuée en les exposant au TGF $\beta$ . L'ajout de facteurs élevant la concentration en AMP cyclique (la forskoline ou le 3-isobutyl 1-méthylxanthine) a également permis de diminuer l'expression d'APOL6.

*In vivo*, l'expression d'APOL6 dans les adipocytes de souris obèses était plus faible que dans ceux de souris saines. Lorsque des souris déficientes pour l'APOL6 (*APOL6* KO) ont été nourries par un régime riche en graisses, elles ont pris moins de poids que les souris sauvages (WT) correspondantes. De plus, les adipocytes des souris *APOL6* KO obèses étaient plus petits que ceux des contrôles WT. Le moment auquel la différence de poids entre souris *APOL6* KO et WT a commencé à apparaître coïncidait avec la mise en place de l'inflammation dans le tissu adipeux. Ceci, en conjonction avec le fait que son expression est induite par l'IFN $\gamma$ , suggère que l'état inflammatoire du tissu joue un rôle important dans le phénotype des souris *APOL6* KO.

Finalement, la recherche de protéines interagissant avec l'APOL6 par immunoprécipitation a permis de mettre en évidence une majorité de protéines associées au cytosquelette d'actine. Parmi celles-ci, l'actine elle-même, mais aussi des myosines, des tropomyosines, la gelsoline, des membres du complexe Arp2/3, etc.

Sur base de ces différents résultats, nous proposons comme modèle que l'APOL6 est une protéine exprimée par les adipocytes et associée à leur cytosquelette d'actine qui permet la

régulation de la taille de leurs gouttelettes lipidiques en fonction de l'état inflammatoire du tissu.

## Abstract

Apolipoproteins L (APOL) form a family of proteins that are conserved among mammals. The first APOL to be discovered and the most extensively studied APOL is human APOL1. Found in human serum, APOL1 protects against several species of African trypanosomes. Also found within the cells, its function isn't known yet, but mutations in its sequence have been associated with an increased risk to develop kidney diseases. Overall, APOLs are induced under inflammatory conditions and have been associated with cell death and antiviral resistance. However, no coherent model has been proposed to link all these observations. Murine APOL6, which is the object of this work, had never been studied before.

This work has shown that murine APOL6 is mainly expressed by adipocytes within the adipose tissue. With two *in vitro* cell culture models, the 3T3-L1 cell line and adipose tissue extracted mesenchymal stem cells, adipogenesis caused the induction of APOL6 expression. This expression was further promoted by stimulation with IFN $\gamma$  and decreased by stimulation with TGF $\beta$ . Cyclic AMP elevating agents such as forskolin or 3-isobutyl 1-methylxanthin were also able to inhibit APOL6 expression.

*In vivo*, APOL6 expression was lower in the adipocytes from obese mice than in those from lean mice. APOL6 knocked out (*APOL6* KO) mice fed with a high fat diet gained less weight than their wild type (WT) counterparts. Furthermore, the adipocytes from obese *APOL6* KO mice were on average smaller than those from obese WT mice. Interestingly, the moment when *APOL6* KO mice started gaining less weight than the WT coincided with the appearance of the inflammatory phenotype that is characteristic of obese adipose tissue. This, along with the fact that APOL6 expression is induced by IFN $\gamma$ , suggests that inflammation plays an important role in the phenotype of these mice.

Finally, while looking for APOL6 interacting proteins by immunoprecipitation, we found a lot of actin cytoskeleton related associated proteins. Among them, actin itself, but also several myosins, tropomyosins, gelsolin, Arp2/3 complex, etc.

Considering these results, we propose a model where APOL6 is expressed by adipocytes and is associated with their actin cytoskeleton in order to regulate the size of their lipid droplets, depending on the inflammatory state of the adipose tissue.

# Table des matières

<b>Résumé</b> .....	5
<b>Abstract</b> .....	7
<b>Remerciements</b> .....	11
<b>Table des abréviations</b> .....	15
<b>1. Introduction</b> .....	23
<b>1.1. Les Apolipoprotéines L</b> .....	23
1.1.1. La découverte des Apolipoprotéines L.....	23
1.1.2. Les APOLs et le facteur trypanolytique .....	25
1.1.3. Les APOLs et la mort cellulaire .....	29
1.1.4. Les APOLs et la résistance antivirale .....	33
1.1.5. Les APOLs et les maladies rénales.....	35
1.1.6. Les APOLs dans d'autres pathologies .....	39
1.1.7. L'Apolipoprotéine L6 murine.....	40
<b>1.2. Le tissu adipeux et les adipocytes</b> .....	45
1.2.1. Les adipocytes .....	45
1.2.2. L'adipogénèse.....	51
1.2.3. Les gouttelettes lipidiques.....	57
1.2.4. La lipolyse .....	61
1.2.5. Le cytosquelette des adipocytes .....	64
1.2.6. L'obésité, la résistance à l'insuline et l'inflammation du tissu adipeux .....	67
<b>2. Objectif du travail</b> .....	77
<b>3. Matériel et méthodes</b> .....	81
3.1. Analyse bioinformatique de l'APOL6.....	81
3.1.1. Prédiction de la structure secondaire .....	81
3.1.2. Prédiction de la localisation subcellulaire .....	81
3.1.3. Prédiction de domaines transmembranaires .....	82
3.1.4. Prédiction de sites de modifications post-traductionnelles.....	82
3.2. Réactifs et milieux .....	83
3.3. Anticorps .....	83
3.4. Génération de souris <i>APOL6</i> KO.....	85
3.5. Culture cellulaire, différenciation et traitements.....	90
3.6. Extraction d'ARN et analyse par qRT-PCR .....	92
3.7. Extraction de protéines et analyse par Western blot .....	92
3.8. Immunoprécipitation .....	93



3.9.	Régime gras et pesée des souris .....	95
3.10.	Mesures de la surface des adipocytes.....	96
3.11.	Cytométrie en flux.....	97
3.12.	Respect des règles d'éthique.....	99
3.13.	Analyse statistique .....	99
<b>4.</b>	<b>Résultats.....</b>	<b>103</b>
4.1.	Analyse bioinformatique de l'APOL6.....	103
4.1.1.	Prédiction de la structure secondaire de l'APOL6.....	103
4.1.2.	Prédiction d'hélices transmembranaires .....	103
4.1.3.	Prédiction de la localisation subcellulaire de l'APOL6.....	106
4.1.4.	Prédiction de modifications post-traductionnelles.....	107
4.2.	L'APOL6 murine est spécifiquement exprimée par les adipocytes .....	109
4.3.	L'expression de l'APOL6 diminue suite à un régime gras.....	115
4.4.	Le profil d'expression de l'APOL6 humaine diffère de celui de la souris .....	117
4.5.	L'expression d'APOL6 est induite pendant l'adipogénèse .....	119
4.6.	L'expression d'APOL6 ne dépend pas de stimuli inflammatoires à part IFN $\gamma$ et TGF $\beta$ .....	123
4.7.	L'expression d'APOL6 est diminuée par l'œstradiol et la progestérone.....	124
4.8.	L'expression d'APOL6 est inhibée en présence d'AMPc .....	127
4.9.	L'APOL6 n'est pas nécessaire à l'adipogénèse .....	132
4.10.	L'APOL6 n'est pas nécessaire à la lipolyse.....	133
4.11.	Dans les souris <i>APOL6</i> KO, l'augmentation de poids due à un régime riche en graisses est limitée	135
4.12.	La taille des adipocytes de souris <i>APOL6</i> KO est limitée .....	136
4.13.	Les anticorps anti-APOL6 immunoprécipitent des composants du cytosquelette d'actine	145
<b>5.</b>	<b>Discussion et perspectives.....</b>	<b>153</b>
<b>6.</b>	<b>Références.....</b>	<b>170</b>



## Remerciements

Je tiens à remercier les fonds ayant permis de financer ce travail, sans lesquels cette thèse n'aurait pas été possible. J'ai eu l'honneur de bénéficier d'une bourse du FRIA-FNRS pendant la plus grande partie de ce projet. Ensuite, la fondation Jaumotte-Demoulin et le fonds David et Alice Van Buuren m'ont permis de le terminer. Le laboratoire a aussi pu bénéficier de financements européens de l'ERC, wallons du Welbio, et inter-universitaires de l'ARC.

Ensuite, j'aimerais remercier les personnes et laboratoires ayant collaboré sur ce projet. Premièrement l'équipe de Diapath du CMMI, notamment Cédric Balsat, Justine Allard, Yves-Rémi Van Eycke et Christine Decaestecker qui, ensemble, m'ont bien aidé dans la réalisation des coupes de tissu adipeux, dans l'imagerie et l'analyse qui a suivi. Ensuite, le laboratoire de Bernard Robaye de l'IRIBHM, et principalement Laura Kostov, qui m'a initié à l'extraction et à la culture d'ATMSC et à la coloration au Nile Red. Je remercie aussi l'ensemble du laboratoire d'immunobiologie de Muriel Moser, et tout particulièrement Guillaume Oldenhove, qui m'aura été d'une aide infinie pendant toute la durée de mon passage à Gosselies et qui a même fourni quelques résultats présentés dans ce travail, et Anaëlle Taquin, pour les dernières expériences de cytométrie. Finalement, le laboratoire MaSUN de l'université de Namur et Marc Dieu, pour sa grande expertise en matière de spectrométrie de masse.

Bien sûr, une thèse ne serait pas possible sans promoteur, et au cours de la mienne, j'ai eu la chance d'en avoir trois (!). À l'entame sous la direction de Luc Vanhamme, les évolutions de ma thèse ainsi que des circonstances externes m'ont amené à changer de promoteur, mais je n'oublie pas le travail effectué avec toi durant ces deux premières années. Ensuite, David Pérez-Morga et Etienne Pays ont collectivement repris le flambeau, permettant de m'amener jusqu'à la conclusion. Je vous remercie tous les deux pour l'apport que vous avez eu sur cette thèse, que ce soit au niveau scientifique ou au niveau humain.

Tout au long de mon passage dans le laboratoire, une personne a tout particulièrement contribué à me former, à me soutenir et à me guider, et il s'agit de Sophie Uzureau. Elle m'a accueilli et encadré lors de mon mémoire et au début de ma thèse, et a ainsi grandement contribué à façonner le scientifique que je suis devenu. Dans les dernières années, j'ai pris plus de liberté quant à mon travail, mais elle a toujours été là pour me conseiller, même jusqu'aux relectures de ce manuscrit. Sophie, sois bien assurée que tu as ma plus profonde gratitude.

Outre Sophie, deux autres personnes ont activement contribué à ce projet, et il s'agit de Jean De Clercq et Vincent Martens. Jean a rejoint notre équipe, notamment pour s'occuper de nos

élevages de souris, une tâche ô combien difficile (et pas toujours très gratifiante), avec 2 animaleries de statuts sanitaires différents et une quinzaine de lignées à gérer. Grâce à lui, tout le temps passé à d'interminables génotypages a pu être dédié à faire d'autres expériences. De plus, son aide sur d'autres manip a toujours été appréciée. Ensuite, Vincent a pris le relais lorsque Jean a entamé un changement de carrière. Grâce à Vincent qui, outre les souris, s'occupait aussi de garder mes cultures cellulaires en vie, j'ai encore pu continuer à faire des expériences pendant la durée de la rédaction de ce manuscrit. À tous les deux, un grand merci pour votre aide, et bon courage pour la suite !

Je souhaiterais aussi remercier tous les membres de mon laboratoire, que ce soit notre petite équipe APOL, l'équipe de Luc, celle des poissons, ou encore l'équipe de la microscopie CMMI. Il est difficile de citer tout le monde, car qu'on ait été proches ou non, chacun participait à faire du laboratoire ce qu'il est. Je remercie Laurence, Pat, Babette et Poupou, vous êtes les véritables piliers du labo. Un grand merci aussi à Pauline, Marjorie, Daniel, Sébastien, les différents doctorants et les post-doctorants étrangers étant passés par le labo. Parmi les « anciens », Pierrick, Fred, Gilles et Anne méritent aussi d'être cités. Les mémorants aussi, avec une mention spéciale pour les deux courageux passés par notre équipe : Errard et Audrey.

Naguissa et Marie, nous avons tous passé le FRIA la même année, mais avons eu des trajectoires bien différentes. Ce fut un grand plaisir de passer ces quelques années avec vous, et je vous souhaite une belle réussite dans vos projets respectifs.

Même s'ils ont déjà été cités brièvement plus haut, je voudrais remercier particulièrement mes deux collègues de bureau, à savoir Babette et « de toute façon, tout le monde s'en fout » Poupou. Votre compagnie était toujours agréable, et j'espère que la mienne ne vous a pas dérangé. Maintenant, il va falloir vous trouver quelqu'un d'autre pour régler vos problèmes d'ordinateur. Heureusement, Vincent semble bien assez compétent pour cela.

Enfin, voici quelques remerciements plus personnels. Tout d'abord, bien évidemment, Natalia qui m'aura partagé mon quotidien pendant toute cette thèse, ainsi qu'avant (et même après, j'espère !). Je n'ai pas grand-chose à rajouter ici pour elle, car de toute façon, je préfère communiquer autrement que par manuscrit de thèse interposé (ça prend un peu trop longtemps pour envoyer un message).

Ensuite, je voudrais remercier tous mes amis, bien que la même remarque que ci-dessus s'applique aussi (mais pourquoi me suis-je lancé dans des remerciements personnels ?). L'exercice de citer des noms est toujours périlleux, au risque d'en oublier un, mais je vais quand

même m'y hasarder. Un grand merci (sans ordre particulier) à Leslie, Annabelle, Boris, Florence, Nhung, Philippe, Quentin, Cloé, Roman, Antoine, Yannick (à moins que ce soit Roger ?), Laurent, Kimi, Ben, Raph, Ludo, Nanie, Omar, Lucie, Sylvie, le groupe du badminton, surtout l'équipe d'interclub et le comité, avec Stéphanie, Coraline, Yves, Albane, Gaelle, Maxence, Olivier, le groupe de la promo avec Emilie, Fanny, Charlotte, Nico, Nadia, Cédric, Sébastien, Cyril, et puis, enfin, tous ceux que j'aurais pu oublier (aïe aïe aïe...).

Et finalement, un grand merci à ma famille et à mes parents pour leur soutien continu, tant figurativement que matériellement. Au passage, je suis sûr que pour ma mère, le temps entre deux visites ou coups de téléphone a en effet dû ressembler à l'écriture d'une thèse entière. En tout cas c'est ce qu'elle essaye de me faire croire. Mais je la remercie aussi beaucoup, la seule à suivre une conversation de biologiste dans la famille (au risque d'embêter toute autre personne autour de la table, en particulier mon père). D'ailleurs, en tant que docteure en biologie, elle a peut-être eu une influence dans mes choix de carrière, mais ça, on ne le saura jamais pour sûr.



## Table des abréviations

ACAT : Acyl-coa:cholestérol acyl transférase

ACK : tampon de lyse à base d'ammonium, chlore et potassium

ADF : *Actin depolymerizing factor*

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADP : Adénosine diphosphate

AF : Alexa Fluor

Akt/PKB : Protéine Kinase B

AMP : Adénosine monophosphate

AMPC : AMP cyclique

APC : Allophycocyanine

APOL : Apolipoprotéine L

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

Arp2/3 : *Actin-Related Proteins 2/3*

ATCC : *American type culture collection*

ATG : *Autophagy gene*

ATGL : *Adipose triglyceride lipase*

ATMSC : Cellule souche mésenchymateuse dérivée du tissu adipeux (*Adipose tissue-derived stem cell*)

ATP : Adénosine triphosphate

Bcl-2 : *B-cell lymphoma 2*

BH : *Bcl-2 Homology*

BCA : *Bicinchoninic acid assay*

BLAST : *Basic local alignment search tool*

BMP : *Bone morphogenic protein*

BMP<sub>r</sub> : *Bone morphogenic protein receptor*

BSA : Albumine de serum bovin (*Bovine serum albumin*)

CCL : CC Chemokine ligand

CD : *Cluster of differentiation*

C/EBP : *CCAAT-enhancer-binding protein*

CGI-58 : *Comparative gene identification-58*

CIDE : *Cell Death Inducing DFFA Like Effector*

CLS : Structures en forme de couronne (*Crown-like structures*)

CREB : *cAMP responsive-element binding protein*

Cy : Cyanine

DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole

DC : Cellule dendritique (*Dendritic cell*)

DGAT : Diglycérol acyl-transférase

DMEM : *Dubelcco's modified Eagle medium*

Drp1 : *dynamin-related protein 1*

EDTA : acide éthylènediaminetétraacétique

ER : Réticulum endoplasmique (*Endoplasmic reticulum*)

FABP4 : *Fatty acid binding protein 4*

FITC : Isothiocyanate de fluorescéine

FLA-ST : Flagelline provenant de *Salmonella typhimurium*

FLIP : *FLICE-like inhibitory protein*

FMNL1 : *Formin-like 1*

FSL1 : Peptide synthétique activant l'hétérodimère TLR2/6

FSP27 : *Fat-specific protein 27*



G0 : APOL1 WT

G1 : APOL1 ayant les mutations Ser342Gly et Ile384Met

G2 : APOL1 ayant la mutation Asn388-Tyr389del

Gag : *Group-specific antigen*

GF : Dépourvue de germes (*Germ free*)

GLUT4 : *Glucose transporter 4*

GMP : Guanosine monophosphate

GSK-3 $\beta$  : *Glycogen synthase kinase-3 $\beta$*

GTP : Guanosine triphosphate

HDL : Lipoprotéine de haute densité (*High density lipoprotein*)

HF : Régime riche en graisses (*High fat*)

HPRT : Hypoxanthine Phosphoribosyltransférase 1

HRP : *Horseradish peroxidase*

HSL : *Hormone sensitive lipase*

HUVEC : *Human umbilical vein endothelial cells*

IBMX : 3-isobutyl-1-méthylxanthine

IFN : Interféron

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine

ILC : Cellules lymphoïdes innées (*Innate lymphoid cells*)

iNKT : Lymphocytes T *Natural Killer* invariants (*invariant Natural Killer T cells*)

IRAP : *Insulin-responsive aminopeptidase*

JNK : *Jun N-terminal kinase*

Kb : kilobase

KLF : *Kruppel-like factor*

KO : Déficiante (*Knocked out*)

LC3 : *Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B*

LD : Gouttelette lipidique (*Lipid droplet*)

LDL : Lipoprotéine de faible densité (*Low density lipoprotein*)

LF : Régime pauvre en graisses (*Low fat*)

LPS : Lipopolysaccharide

M1 : Macrophages classiquement activés

M2 : Macrophages alternativement activés

MAPK : *Mitogen-activated protein kinase*

MCP-1 : *Monocyte chemoattractant protein 1*

MGL : *Monoglyceride lipase*

MHC : Complexe majeur d'histocompatibilité (*Major histocompatibility complex*)

MYH : Chaîne lourde de la myosine (*Myosin heavy chain*)

Nef : *Negative Regulatory Factor*

NK : *Natural Killer*

NMIIA : Myosine non musculaire IIA (*Non-muscle myosin IIA*)

Pam3CSK4 : Peptide synthétique activant l'hétérodimère TLR1/2

PBS : *Phosphate buffer saline*

PCR : Réaction en chaîne par polymérase (*Polymerase chain reaction*)

PDE3 : Phosphodiesterase 3

PE : Phycoérythrine

PFA : Paraformaldéhide

PGC1- $\alpha$  : *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*

PI3K : Phosphatidylinositol-3 kinase

PI3P : Phosphatidylinositol-3-phosphate

PKA : Protéine Kinase A

PKG : Protéine Kinase G

PLIN : Périlipine

Poly(I:C) : Acide polyinosinique-polycytidylique (*Polyinosinic:polycytidylic acid*)

PPAR : *Peroxisome proliferator-activated receptor*

PPIA : Peptidylprolyl Isomérase A

PRDM16 : *PR domain containing 16*

qRT-PCR : PCR quantitative en temps réel (*Quantitative real time PCR*)

RACE : Amplification rapide des extrémités d'ADN complémentaire (*Rapid amplification of cDNA ends*)

RELM $\alpha$  : *Resistin-like molecule  $\alpha$*

RIPA : *Radioimmunoprecipitation assay buffer*

RNAi : Interférence ARN (*RNA interference*)

ROS : *Reactive oxygen species*

RPLP0 : *Ribosomal protein lateral stalk subunit P0*

SDS : dodécylsulfate de sodium (*Sodium dodecyl sulfate*)

siRNA : Petit ARN interférant (*Small interfering RNA*)

SPF : Dépourvu de pathogènes spécifiques (*Specific-pathogen-free*)

SRA : *Serum resistance-associated protein*

SREBP : *Sterol regulatory element-binding protein*

ssRNA40 : ARN simple brin 40 (*single strand RNA 40*)

SVF : Fraction stromale vasculaire (*Stromal vascular fraction*)

TA : Tissu adipeux

T.b. : *Trypanosoma brucei*

TBS : *Tris-buffered saline*

TG : Triglycéride

TgsGP : *Trypanosoma brucei gambiense specific glycoprotein*

Th : *T helper*

TLR : *Toll-like receptors*

TNF : *Tumor Necrosis Factor*

UCP1 : *Uncoupling protein 1*

UPR : *Unfolded protein response*

UTR : Région non traduite (*Untranslated region*)

Vif : *Viral infectivity factor*

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

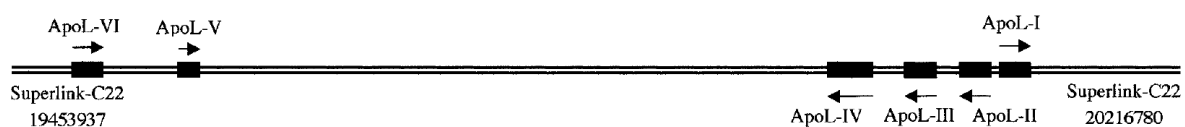
VLDL : Lipoprotéine de très faible densité (*Very low density lipoprotein*)

WT : Sauvage (*Wild type*)

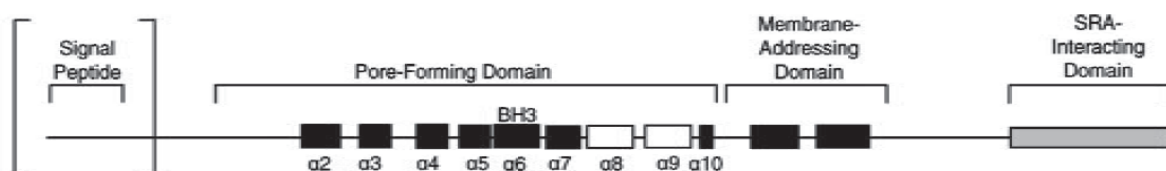
# Introduction

## Partie I – Les apolipoprotéines L

## THE HUMAN APOLIPOPROTEIN L GENE CLUSTER



**Figure 1 : Localisation et disposition des gènes des APOLs humaines sur le chromosome 22.** Les gènes des APOLs humaines sont tous situés sur le chromosome 22. Ceux-ci sont répartis en deux groupes, les APOLs 1, 2, 3 et 4 formant un locus de 130 kb, et les APOLs 5 et 6 étant localisés dans un locus distant de 400 kb du premier. Figure provenant de Page et al. 2001.



**Figure 2 : Domaines de l'APOL1.** L'APOL1 humaine est composée de plusieurs domaines. Ceux-ci sont, en partant de son extrémité N-terminale, un peptide signal permettant l'adressage de la protéine vers la voie de sécrétion ; un domaine formateur de pores ioniques composés de plusieurs hélices alpha, au sein duquel se trouve une séquence BH3 ; un domaine d'adressage de la protéine en membrane ; et finalement le domaine interagissant avec le SRA. Figure provenant de Vanhollebeke et Pays 2006.

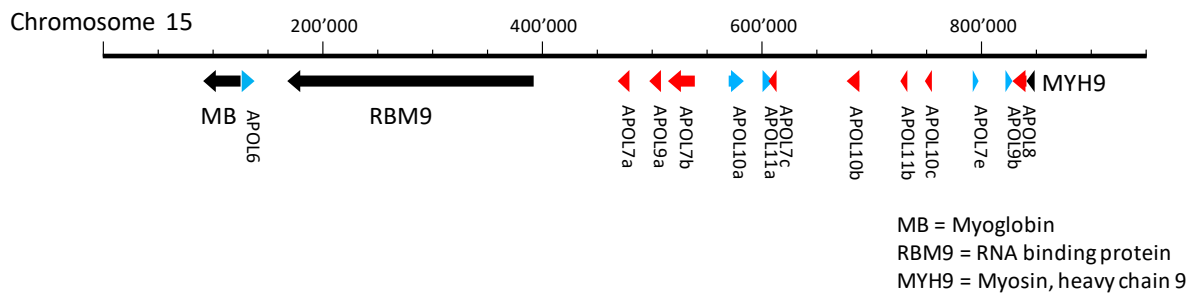
# 1. Introduction

## 1.1. Les Apolipoprotéines L

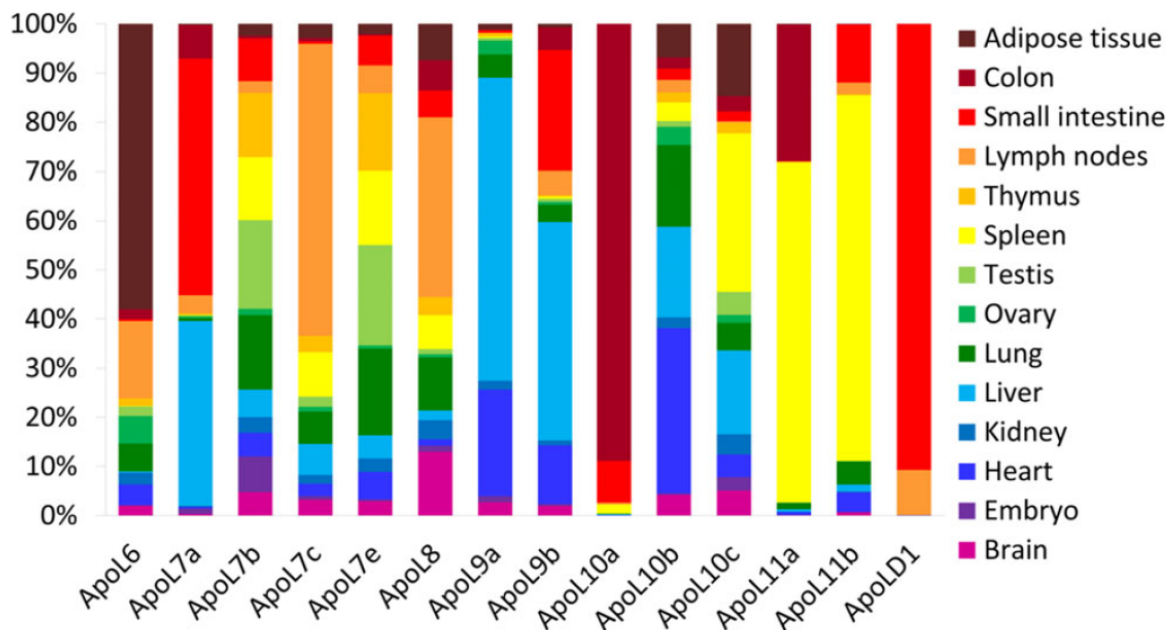
### 1.1.1. La découverte des Apolipoprotéines L

Les Apolipoprotéines L (APOL) sont une famille de protéines encore relativement peu décrites dans la littérature scientifique. Elles sont conservées dans les génomes des mammifères (Vanhollebeke, B. & Pays 2006; Smith, E. E. & Malik 2009) et ont été sujettes à une évolution rapide et à de nombreuses duplications, inversions, et autres réarrangements chromosomiques (Monajemi et al. 2002), ce qui explique la grande variabilité du nombre d'isoformes d'une espèce à l'autre. Ainsi, par exemple, le génome humain contient 6 APOLs tandis que celui du rat en contient 7 et que celui de la souris en contient 13.

La première APOL à avoir été identifiée est l'APOL1 humaine, identifiée en 1997 au sein des lipoprotéines à haute densité (HDL) de type 3 dans le sérum humain, ce qui lui a valu son nom d'apolipoprotéine (Duchateau et al. 1997). En raison de sa présence dans les HDL, la quantité d'APOL1 est plus élevée dans le sérum des patients atteints d'hypercholestérolémie, d'hypertriglycéridémie, et d'hyperlipidémie, et est corrélée avec les taux de cholestérol et de lipides chez des patients sains (Duchateau et al. 2000; Albert et al. 2005). Par la suite, les autres APOLs humaines (APOL2, 3, 4, 5 et 6) ont été identifiées dans le génome (Duchateau et al. 2001; Page et al. 2001). Toutes les APOLs se situent sur le chromosome 22, les APOL1, 2, 3 et 4 sont situées dans un locus de 130 kb tandis que les APOL5 et 6 sont situées à 400 kb du locus principal (Figure 1) (Page et al. 2001; Monajemi et al. 2002). Les APOL1, 2, 3 et 4 ont une identité de séquence ADN de 80% mais une homologie de séquence protéique de seulement 42%, ce qui indique que les gènes sont issus de duplications mais ont divergé depuis (Monajemi et al. 2002). L'APOL1 est détectée sous deux formes : une forme disposant d'un peptide signal, sécrétée et liée aux HDL et une forme sans peptide signal qui n'est pas sécrétée. Aucune des autres APOLs ne dispose d'un peptide signal et leur localisation est sans doute exclusivement intracellulaire (Vanhollebeke, B. & Pays 2006). Il a été montré que l'expression des APOLs est généralement induite par des stimuli inflammatoires, parmi lesquels les cytokines TNF $\alpha$  (Monajemi et al. 2002), IFN $\alpha$  (Hayashi et al. 2005), IFN $\beta$  (Stojdl et al. 2003) et IFN $\gamma$  (Sana et al. 2005; Zhaorigetu et al. 2011, 2008; Liao et al. 2011).



**Figure 3 : Localisation et disposition des gènes des APOLs murines sur le chromosome 15.** Les gènes des APOLs murines sont tous situés sur le chromosome 15. Ceux-ci sont situés dans un locus majeur de 373 kb, à l'exception du gène APOL6 qui est situé seul à une distance de 336 kb de ce locus principal. Les flèches rouges et bleues représentent les gènes d'APOLs, la couleur signifiant leur orientation. Les flèches noires représentent les autres gènes présents dans cette région chromosomique.



**Figure 4 : Profil d'expression des APOLs murines dans plusieurs organes.** L'expression des différentes APOLs murines a été mesurée par qRT-PCR à partir d'échantillons d'ARN commercial de souris. Les résultats sont présentés sous forme de pourcentage de l'expression totale. Chaque couleur représente un organe différent. Figure provenant de Uzureau et al. 2016.

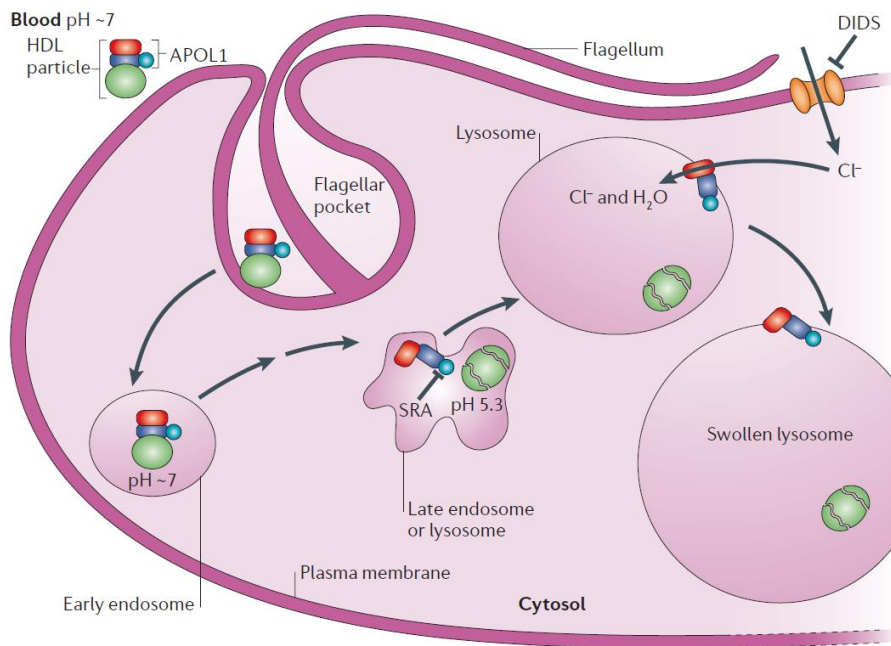


L'APOL1 se compose de plusieurs domaines (Figure 2) (Vanhollebeke, B. & Pays 2006). À l'extrémité N-terminale de la protéine se trouve le peptide signal destiné à la sécrétion de la protéine dans le sérum, absent des isoformes intracellulaires. Ensuite, plusieurs hélices alpha constituent un domaine formateur de pores ioniques au sein duquel se trouve une séquence BH3. Ces hélices sont suivies d'un domaine d'adressage membranaire, responsable de l'insertion de l'APOL1 en membrane lorsque la protéine est exprimée dans *Escherichia coli*. Finalement, à l'extrémité C-terminale de la protéine se trouve un domaine glissière à leucine appelé « *SRA-interacting domain* » car celui-ci est la cible de la protéine SRA, produite par *Trypanosoma brucei rhodesiense*. Nous reviendrons plus en détails sur ces différentes particularités dans les sections suivantes.

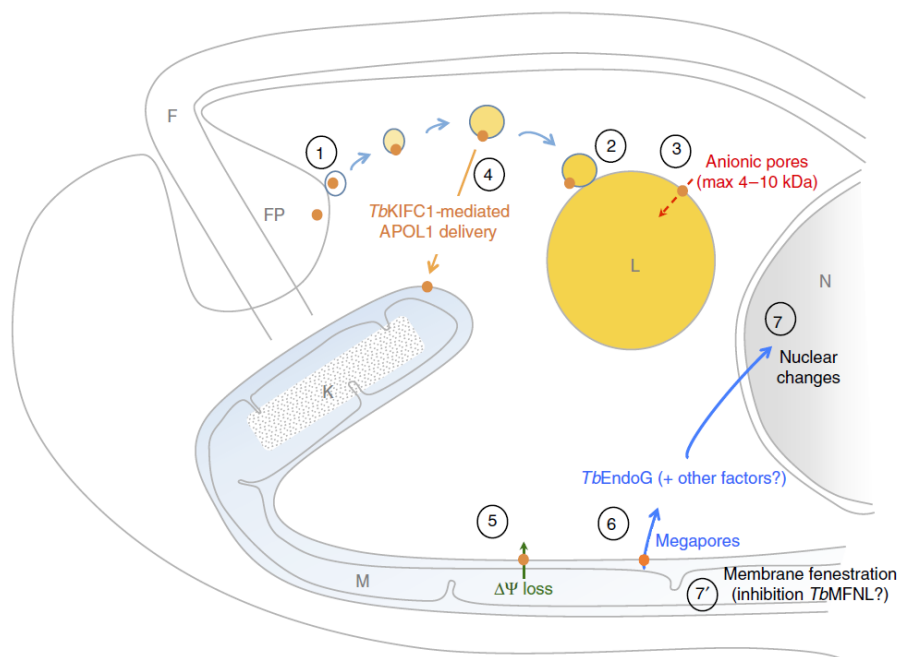
Les APOLs des autres mammifères ont été identifiées par homologie avec les APOLs humaines. Chez la souris, la seule APOL orthologue à une APOL humaine est l'APOL6. Par conséquent, la numérotation des APOLs murines débute par l'APOL6, puis continue en différentes sous-familles : APOL7a, 7b, 7c, 7e, 8, 9a, 9b, 10a, 10b, 10c, 11a et 11b. Les gènes des APOLs murines sont situés sur le chromosome 15 dans une disposition similaire à celle des APOLs humaines. En effet, toutes les APOLs murines se regroupent dans un locus principal de 373 kb, à l'exception du gène *APOL6* qui se situe à 336 kb de ce locus (Figure 3). Leur longueur varie de 264 à 418 acides aminés, et leur point isoélectrique varie de 10.3 à 4.0. En plus de ces différences, le profil d'expression des APOLs murines au sein des organes diffère d'isoforme à isoforme (Figure 4). Ces variations entre APOLs, et tout particulièrement la répartition de leur expression au sein de l'organisme, suggèrent une certaine spécialisation de chaque APOL au cours de l'évolution.

### **1.1.2. Les APOLs et le facteur trypanolytique**

Le premier domaine à avoir vraiment porté l'attention sur une APOL est la parasitologie. En effet, notre laboratoire a identifié l'APOL1 au sein des HDL comme étant le facteur trypanolytique (Vanhamme et al. 2003). Dans la nature, les trypanosomes africains sont tous lysés par le sérum humain à l'exception de deux sous-espèces responsables de la maladie du sommeil. Il s'agit de *Trypanosoma brucei rhodesiense*, présent en Afrique subsaharienne orientale et causant une forme aiguë de la maladie, et *Trypanosoma brucei gambiense*, présent en Afrique subsaharienne occidentale et centrale, causant une forme plus chronique de la maladie et représentant 97% des cas détectés (Simarro et al. 2011).



**Figure 5 : Modèle d'internalisation de l'APOL1, d'intégration dans la membrane de l'endosome et de gonflement du lysosome.** L'APOL1 est schématisée par trois de ses domaines : le domaine formateur de pores ioniques (rouge), le domaine d'adressage membranaire (bleu foncé) et le domaine interagissant avec le SRA (bleu clair). Dans le sérum, l'APOL1 est associée aux particules d'HDL (vert). Suite à son endocytose par les trypanosomes au niveau de la poche flagellaire, le complexe se retrouve dans la voie endocyttaire. Lorsque le pH diminue, l'APOL1 est libérée, change de conformation et s'insère dans la membrane du lysosome. Ceci induit la création de pores ioniques, faisant rentrer des ions  $\text{Cl}^-$  dans le lysosome, ce qui provoque son gonflement suite à l'influx d'eau par osmose. Figure provenant de Pays et al. 2006.



**Figure 6 : Modèle de trypanolyse mis à jour, comprenant le transport de l'APOL1 vers la mitochondrie et la fenestration de celle-ci.** Conformément au modèle précédent, l'APOL1 associée aux HDL est internalisée par endocytose (1), se retrouve dans le lysosome (2) et provoque le gonflement de celui-ci (3). Ce nouveau modèle le complète en ajoutant les étapes suivantes : la kinésine *TbKIFC1* transporte l'APOL1 vers la mitochondrie (4), ce qui provoque une dépolarisation de la membrane mitochondriale (5). Ceci induit la sortie de la nucléase *TbEndoG* (6) qui provoque la fragmentation de l'ADN (7). En même temps, la membrane mitochondriale subit une fenestration (7'). Figure provenant de Vanwalleghem et al. 2015.

Un cas d'infection par *Trypanosoma evansi*, un trypanosome normalement non infectieux pour l'homme, a été observé chez un patient en Inde. La raison de cette infection était l'absence d'APOL1 dans son sérum suite à une mutation des deux allèles du gène conduisant à un décalage de son cadre de lecture (Vanhollebeke, Benoit et al. 2006). Le mécanisme de la trypanolyse par l'APOL1 proposé à l'époque (décrit à la Figure 5) part de l'observation que le trypanosome ingère les HDL par la voie endocytaire. Lorsque le pH diminue, l'APOL1 change de conformation et expose son domaine d'hélices  $\alpha$  amphipathiques lui permettant de s'insérer dans la membrane endo-lysosomiale, pour former un pore membranaire (Pays et al. 2006). Un influx d'ions cause alors la rentrée d'eau par osmose, et le gonflement du lysosome suivi de la mort du parasite (Vanhollebeke, Benoit et al. 2007).

Il a ensuite été montré que le gonflement du lysosome n'est pas responsable en lui-même de la mort du parasite, puisqu'en inhibant l'influx d'ions dans le lysosome par un milieu hypo-osmotique, la mort survient quand même (Vanwalleghem et al. 2015). Ces nouveaux éléments ont permis d'élucider la véritable cause de la mort du trypanosome (Figure 6). Des vésicules porteuses de pores formés par l'APOL1 sont transportées à la mitochondrie du parasite par une kinésine appelée *TbKIFC1*. Une fois dans la membrane mitochondriale, les pores formés par l'APOL1 provoquent une dépolarisation de cette membrane et sa fenestration. Il s'en suit une perméabilisation de la membrane mitochondriale provoquant la libération de molécules pro-apoptotiques similaires à celles qu'on retrouve chez les cellules de mammifères. Parmi celles-ci, on retrouve un homologue de l'endonucléase G qui va fragmenter l'ADN, ce qui contribue à mener *in fine* à la mort du parasite (Vanwalleghem et al. 2015). Des résultats récents obtenus au laboratoire ont montré que cette dépolarisation en elle-même n'est pas l'agent principal de la mort du parasite. En effet, la kinésine *TbKIFC1* transporte aussi l'APOL1 à la surface cellulaire, ce qui dépolarise la membrane plasmique et contribue aussi à la mort du trypanosome.

Notre laboratoire a aussi largement contribué à comprendre les mécanismes par lesquels deux parasites sont capables d'éluder les défenses de l'hôte. Brièvement, *T.b. rhodesiense* résiste à l'action du sérum humain en produisant une protéine (appelée SRA) capable de neutraliser l'APOL1 en se liant à sa région carboxy-terminale (Xong et al. 1998). Le mécanisme par lequel *T.b. gambiense* se protège de l'APOL1 est plus complexe. La défense est multifactorielle et comprend une augmentation de la rigidité des membranes sous l'action de la glycoprotéine TgsGP, contrecarrant l'insertion d'APOL1 et la formation de pores ; une inactivation du récepteur au complexe haptoglobine-hémoglobine par lequel une partie de l'APOL1 rentre dans

le trypanosome ; et une augmentation de l'activité d'une cystéine protéase, permettant de dégrader l'APOL1 plus rapidement dans le lysosome (Uzureau, P. et al. 2013).

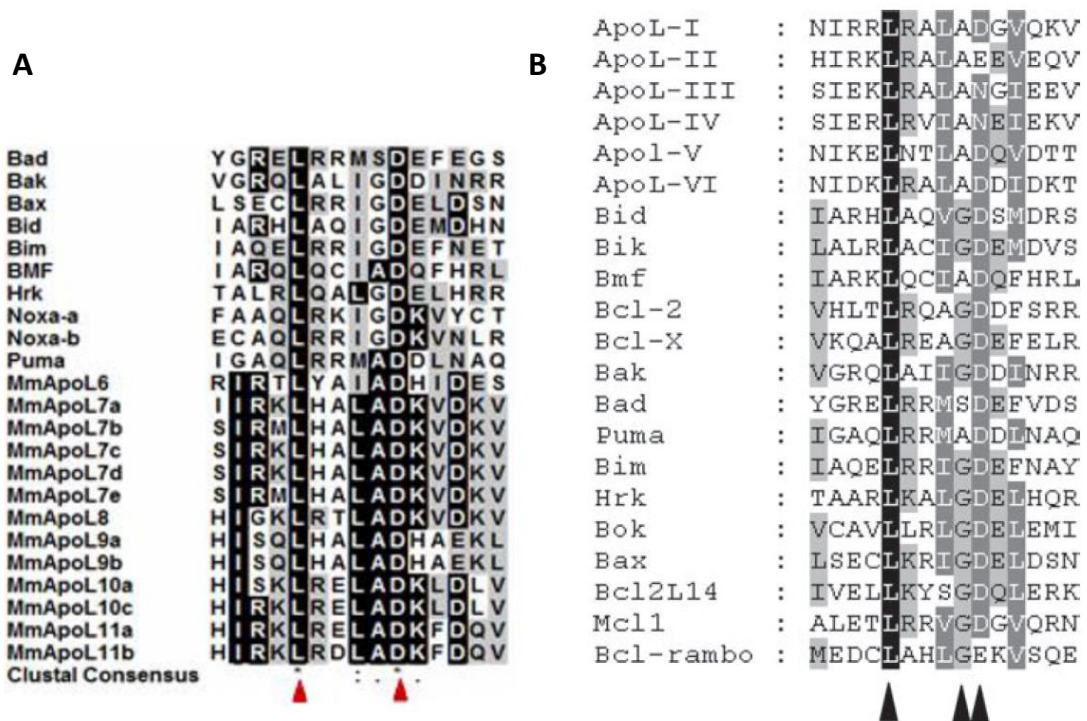


Figure 7 : Comparaison des peptides BH3 des APOLs murines (A) et humaines (B) à ceux des protéines de la famille de Bcl-2. Figures provenant de (A) Uzureau et al. 2016 et (B) Vanhollenbeke et Pays, 2006.

### 1.1.3. Les APOLs et la mort cellulaire

Les APOLs ont toutes en commun un domaine formateur de pores ioniques ressemblant à celui de certaines colicines bactériennes (Perez-Morga et al. 2005), mais se rapprochant en réalité beaucoup plus de ceux de certaines protéines de la famille de Bcl-2 (Vanhollebeke, B. & Pays 2006). Ce domaine est responsable de la perméabilisation du lysosome et de la mitochondrie chez les trypanosomes (Vanwalleghem et al. 2015; Pays et al. 2006). Elles partagent également une séquence BH3, marque typique des protéines de la famille de Bcl-2 (Vanhollebeke, B. & Pays 2006). La Figure 7 présente un alignement des motifs BH3 des APOLs murines (Figure 7A) et humaines (Figure 7B) avec ceux de protéines de la famille de Bcl-2.

En raison de ces similitudes, les APOLs ont d'abord été étudiées comme étant de nouveaux régulateurs de la mort cellulaire. Deux articles du même groupe ont alors montré que la surexpression ectopique du gène de l'APOL6 humaine dans des cellules *in vitro* entraîne leur mort par apoptose (Liu, Z. et al. 2005; Zhaorigetu et al. 2011). Dans le premier, l'APOL6 a été surexprimée dans plusieurs lignées cellulaires (DLD-1, HEK293, HepG2, MCF-7, DU-145), ce qui a entraîné la libération du cytochrome c et de Smac/DIABLO hors de la mitochondrie, ainsi que l'activation des caspases 8 et 9 (Liu, Z. et al. 2005). La surexpression d'un mutant de l'APOL6 dépourvu de séquence BH3 n'a, au contraire, pas été capable d'activer l'apoptose. Dans le second, les auteurs ont montré dans des cellules HUVEC, ainsi que dans des myofibroblastes dérivés de la chape fibreuse de lésions athéroscléreuse, que l'expression d'APOL6 était stimulée par la présence d'IFN $\gamma$ . Suite à cette augmentation d'expression d'APOL6, l'apoptose est déclenchée, notamment *via* la génération de dérivés réactifs de l'oxygène (« *Reactive Oxygen Species* », ROS), la séquestration de Bcl-xL, une protéine anti-apoptotique de la famille de Bcl-2, et finalement l'activation des caspases 3, 8 et 9 (Zhaorigetu et al. 2011). Les auteurs ont montré par immunoprécipitation que la séquestration de Bcl-xL passe par une interaction avec l'APOL6. En plus de l'activation de l'apoptose, la surexpression d'APOL6 provoque l'inhibition de l'autophagie. Ainsi, les auteurs ont observé une dégradation de Beclin-1, une protéine centrale dans l'initiation de l'autophagie, ainsi que l'inhibition de la translocation de LC3-II (Zhaorigetu et al. 2011). Ces résultats sont résumés par le schéma proposé par les auteurs, présenté ici à la Figure 8. Sur bases de ces résultats, les auteurs de ces deux études concluent que l'APOL6 humaine est une protéine BH3-only pro-apoptotique et inhibitrice de l'autophagie, et que son activité dépend de sa séquence BH3.

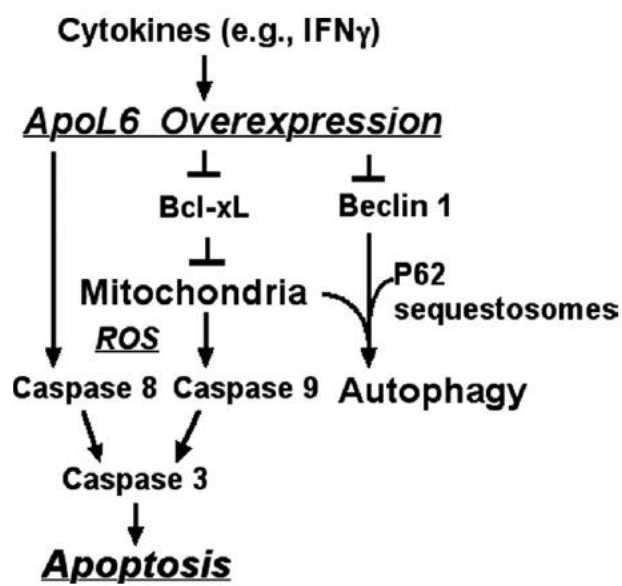


Figure 8 : Modèle d'action de l'APOL6 humaine sur l'apoptose et l'autophagie dans des myofibroblastes dérivés de lésions athéroscléreuses, proposé par Zhaorigetu et al. 2011.

De façon similaire, le même groupe a montré que la surexpression d'*APOL1* entraîne la mort cellulaire de type II, par autophagie (Zhaorigetu et al. 2008; Wan et al. 2008). Dans les mêmes lignées cellulaires déjà utilisées pour l'étude de l'*APOL6*, les auteurs ont montré que la surexpression de l'*APOL1* conduit à l'augmentation du ratio LC3-II/LC3-I, et à la formation de vacuoles d'autophagosomes, aboutissant *in fine* à la mort cellulaire de type II (Wan et al. 2008). Lorsque l'autophagie est inhibée, les effets de l'*APOL1* sont absents et le taux de survie des cellules est amélioré. À l'inverse des observations faites sur les cellules surexprimant l'*APOL6*, l'apoptose est inhibée dans les cellules surexprimant l'*APOL1* (Wan et al. 2008).

Selon une autre étude, conduite sur des cellules épithéliales bronchiales (HBEC), l'ajout d' $\text{IFN}\gamma$  stimule l'expression de l'*APOL2* (Liao et al. 2011). Lorsque l'expression d'*APOL2* est inhibée par interférence ARN, l'effet pro-apoptotique de l' $\text{IFN}\gamma$  est aggravé (augmentation de l'activation de la caspase 3, dégradation de l'ADN, mort cellulaire), ce qui indique que la présence de l'*APOL2* protège ces cellules de l'apoptose. Par ailleurs, l'expression d'*APOL2* est plus élevée dans des tissus pulmonaires cancéreux par rapport aux tissus sains (Liao et al. 2011). À l'inverse, les auteurs d'une autre étude n'ont pas détecté de capacité de la part de l'*APOL2* d'induire ou d'inhiber l'apoptose ou l'autophagie. Ni sa surexpression, ni l'inhibition de son expression par siRNA n'ont affecté ces deux processus cellulaires (Galindo-Moreno et al. 2014). Ils ont toutefois observé par immunoprécipitation une faible interaction entre *APOL2* et Bcl-2 mais, au regard de leurs autres résultats, concluent en l'absence d'implication de l'*APOL2* dans les processus d'apoptose ou d'autophagie (Galindo-Moreno et al. 2014).

Nous avons vu que plusieurs études, provenant d'un même groupe, vont dans le sens que l'*APOL1* et l'*APOL6* induisent la mort cellulaire par autophagie et par apoptose, respectivement (Wan et al. 2008; Zhaorigetu et al. 2011; Liu, Z. et al. 2005). Il est néanmoins important de noter que les travaux de ce groupe ont tous été basés sur des expériences de surexpression des *APOLs* visées. Or, il est connu que les *APOLs* sont capables de produire des pores dans des membranes, ce qui aboutit à la mort des bactéries dans lesquelles elles sont surexprimées (Perez-Morga et al. 2005). La surexpression de protéines formatrices de pores membranaires a donc un potentiel lytique intrinsèque. La pertinence *in vivo* des résultats obtenus par la surexpression *in vitro* des *APOLs* est donc débattue. De plus, l'importance de la séquence BH3 a été démontrée en la supprimant de la protéine, sans la remplacer par une autre séquence d'acides aminés. Or, la délétion d'une quinzaine d'acides aminés au milieu du domaine formateur de pores ioniques est susceptible de complètement désorganiser ce domaine, le rendant non fonctionnel. Il n'est donc pas sûr que l'effet observé par les auteurs soit

réellement dû à la séquence BH3 en elle-même. Un autre groupe a montré l'activité anti-apoptotique de l'APOL2 suite à l'activation de son expression par l'IFN $\gamma$  (Liao et al. 2011), ce qui a été ensuite contredit par une autre étude plus récente (Galindo-Moreno et al. 2014). En conclusion, bien que plusieurs APOLs possèdent effectivement une séquence BH3 et présentent des similitudes avec les protéines de la famille de Bcl-2, l'implication des APOLs dans les phénomènes de mort cellulaire est encore sujette à question.

Les travaux réalisés dans notre laboratoire par Sophie Uzureau vont plutôt dans le sens d'une implication dans la mort cellulaire. Son travail portait sur le rôle des APOLs murines dans la survie des cellules dendritiques (DC) (Uzureau, S. et al. 2016). Elle a montré que les APOLs des sous-familles 7 et 11, majoritairement exprimées dans les tissus lymphoïdes (Figure 4), sont exprimées par les DCs, tout particulièrement au sein des DCs CD8 $\alpha$ +, et que leur expression est fortement induite par l'activation de ces DCs. Parmi les facteurs responsables de l'activation des DCs, le poly(I:C), un ARN double brin utilisé pour mimer une infection virale et reconnu par le TLR3, est le plus efficace pour augmenter l'expression des APOLs. Cette stimulation par le poly(I:C) a d'ailleurs été répliquée dans des DCs humaines, celle-ci augmentant l'expression des APOL1 et 3. Après l'activation des DCs par un agent pathogène, celles-ci mûrissent et migrent vers les ganglions lymphatiques pour présenter leurs antigènes aux lymphocytes T, ce qui participe au démarrage de la réponse immunitaire adaptative. Toutefois, afin d'éviter une réponse trop forte et prolongée qui pourrait avoir des effets délétères sur l'organisme, les DCs entament aussi un programme de mort cellulaire par apoptose. Dans son travail, Sophie Uzureau a montré que l'inhibition des APOLs 7a et 11a/11b dans les DCs murines prolonge la vie de celles-ci, indiquant un rôle dans le déclenchement de l'apoptose (Uzureau, S. et al. 2016). Ceci est supporté par l'observation d'une interaction entre les APOLs 7 et Bcl-xL, une protéine anti-apoptotique de la famille de Bcl-2 qui avait déjà été identifiée comme interagissant avec l'APOL6 humaine (Zhaorigetu et al. 2011). Finalement, la seule présence des peptides BH3 des APOLs 7 et 11 suffit à déclencher la mort cellulaire des DCs, suggérant que l'effet pro-apoptotique des APOLs passe par une interaction avec Bcl-xL *via* leurs domaines BH. Cela suggère donc que les APOLs 7 et 11, activées lors de la maturation des DCs, participent au contrôle de la réponse immunitaire en favorisant l'apoptose dans les DCs (Uzureau, S. et al. 2016).



#### 1.1.4. Les APOLs et la résistance antivirale

Les travaux de Sophie Uzureau ont établi un lien entre APOLs et infection virale, par la voie TLR3. D'autres études récentes ont montré plus qu'un lien, mais une véritable action antivirale des APOLs.

Chez la souris, l'APOL9b a été identifiée lors d'un crible visant à rechercher les gènes activés par des IFN de type I mais peu exprimés dans les neurones (Kreit et al. 2014). En effet, les neurones sont des cellules différenciées qui ne sont que peu renouvelables. Par conséquent, en cas d'infection virale, ils ont recours à des modes de défense qui ne sont pas cytotolytiques. Une de ces méthodes de défense est le recours à la réponse IFN de type I (IFN $\alpha$  et IFN $\beta$ ) (Paul et al. 2007). Les auteurs ont montré que les neurones, malgré la présence d'IFN de type I, sont incapables de se protéger contre l'infection des virus testés, au contraire de cultures de fibroblastes L929 (Kreit et al. 2014). Ils ont alors effectué un crible pour détecter des gènes induits par l'IFN $\beta$  dans les fibroblastes mais peu exprimés dans les neurones. Parmi les gènes identifiés, l'APOL9b est le seul dont la protéine présente une activité antivirale. En effet, lorsque l'APOL9b est surexprimée dans des cellules L929 ou dans des neurones, la réplication du virus KJ26 (un dérivé du virus de Theiler de l'encéphalomyélite murine) est diminuée de 50%, de même que la proportion de cellules infectées. De plus, l'inhibition de l'expression d'APOL9b par interférence ARN augmente l'efficacité de la réplication virale (Kreit et al. 2014).

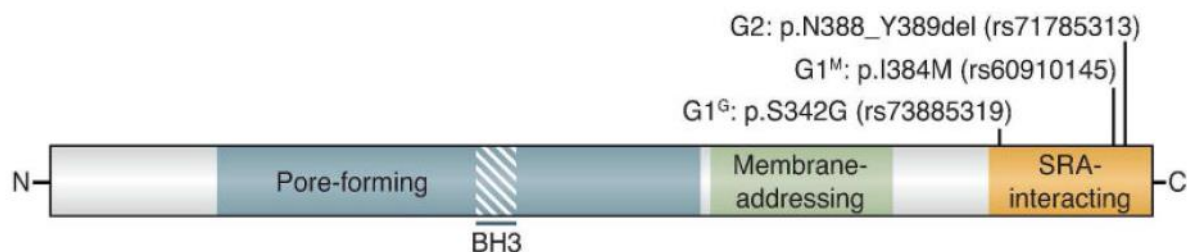
Chez l'humain, une étude portant sur plusieurs centaines de gènes induits par la réponse interféron (dont font partie les APOLs) a identifié les APOLs 1, 2, 3 et 6 comme ayant une activité antivirale contre le virus de l'hépatite C et contre le virus de l'encéphalite équine vénézuélienne (Schoggins et al. 2011). Une analyse protéomique de cellules en culture suite à l'infection du virus de la grippe porcine H3N2 a montré une augmentation d'expression de l'APOL2 humaine et sa relocalisation partielle au niveau de la mitochondrie, mais sans en élucider le mécanisme (Wu, X. et al. 2013).

Deux articles ont aussi montré l'implication de certaines APOLs dans la défense contre le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Le premier démontre que l'APOL1, exprimée par des macrophages stimulés à l'IFN $\gamma$ , inhibe la réplication du VIH (Taylor et al. 2014). Les auteurs ont transfecté des cellules 293T avec un plasmide permettant l'expression de l'APOL1 et les ont ensuite infectées par le VIH. Ils ont constaté dans les cellules exprimant l'APOL1 une diminution de l'ordre de 70% à 95% de l'abondance de protéines virales telles que Vif, Nef,

Vpu et Gag. Cette observation est expliquée par le fait que l'expression de ces gènes est inhibée et que la stabilité des protéines elles-mêmes est diminuée.

Les auteurs ont ensuite montré qu'en présence d'APOL1, il y a une augmentation du nombre de lysosomes, et que la dégradation lysosomiale est nécessaire à son activité antivirale. En présence d'APOL1, Gag et de Vif sont davantage ciblés vers le lysosome pour être dégradés. Finalement, la présence d'APOL1 induit aussi la sécrétion de Vif dans des microvésicules vers le milieu extérieur. Tout ceci résulte en une déplétion des protéines virales dans la cellule, ce qui limite le potentiel infectieux du VIH (Taylor et al. 2014).

Le second article identifie lors d'un crible les APOL1, APOL3 et APOL6 humaines comme étant capables d'inhiber par plus de 50% la réplication du VIH (McLaren et al. 2015). L'APOL1 et l'APOL6 sont tout particulièrement efficaces, puisqu'elles permettent de bloquer jusqu'à 90% de la production de virus, en inhibant l'expression des gènes viraux. Ceci supporte donc les résultats obtenus par Taylor et al., et ajoute l'APOL3 et l'APOL6 à la liste des APOLs ayant une capacité antivirale.



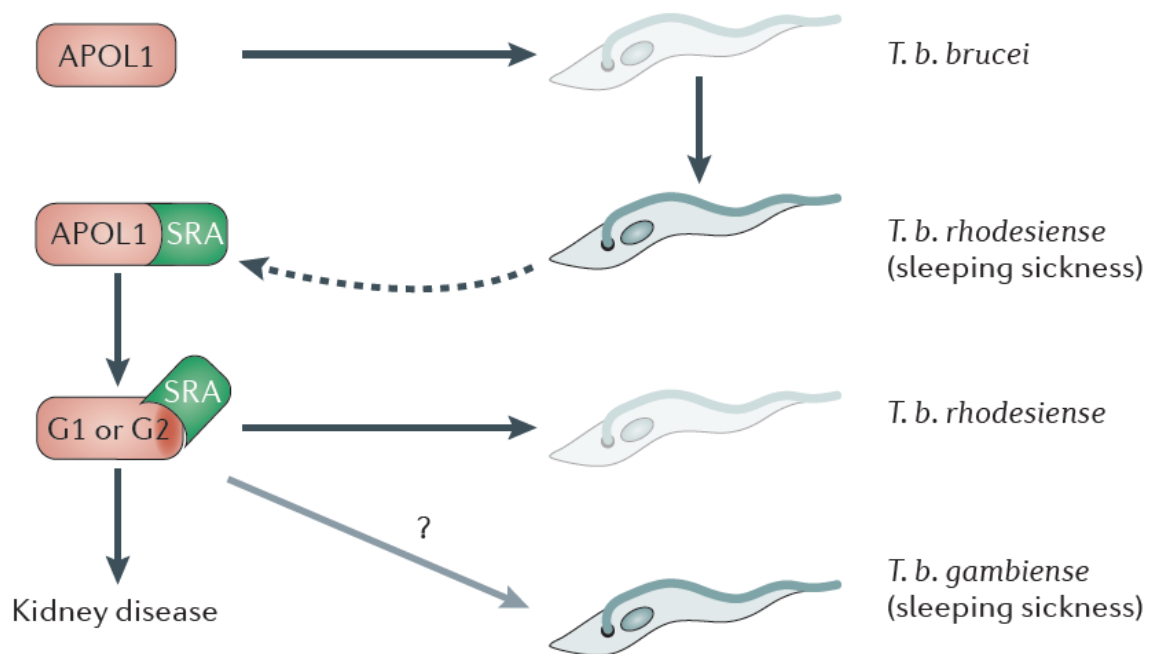
**Figure 9 : Localisation des altérations de séquence des variants G1 et G2 de l'APOL1 humaine.** Deux variants de l'APOL1 ont été associés à un risque plus élevé de développer des maladies rénales : les variants G1 et G2. Le variant G1 contient deux mutations ponctuelles (S342G et I384M), tandis que le variant G2 contient une délétion de deux acides aminés (N388 et Y389 del). Ces variations sont toutes présentes dans le domaine interagissant avec la protéine SRA, à l'extrémité C-terminale de l'APOL1. Figure provenant de Limou et al., 2015.

### 1.1.5. Les APOLs et les maladies rénales

Deux variants de l'APOL1 ont été identifiés comme présentant un facteur de risque important dans le déclenchement de plusieurs maladies rénales (Genovese et al. 2010). Ces néphropathies se caractérisent par une augmentation de la perméabilité de la filtration sang/urine par les podocytes. Les podocytes sont des cellules rénales spécialisées présentes dans les corpuscules de Malpighi dans le rein et qui entourent les capillaires sanguins du glomérule en déployant des extensions, les pédicelles, qui permettent une filtration très efficace du contenu sanguin. Un défaut au niveau de cette filtration provoque de la protéinurie, c'est-à-dire la présence de protéines de plus haut poids moléculaire dans l'urine, et endommage le rein. Chez les personnes atteintes de ces maladies rénales, on observe un effacement des pédicelles, ce qui diminue l'efficacité de la filtration.

Les deux variants de l'APOL1 impliqués dans le risque de développer des néphropathies sont appelés APOL1 G1 et APOL1 G2. Ces deux variants diffèrent de l'APOL1 WT (parfois appelée G0) par des modifications dans la partie C-terminale de la protéine, au sein du domaine interagissant avec le SRA de *T.b. rhodesiense*. Il s'agit de deux mutations ponctuelles chez G1 (Ser342Gly et Ile384Met) et d'une délétion de deux acides aminés chez G2 (Asn388-Tyr389del), comme présenté à la figure 9 (Genovese et al. 2010). Ces modifications sont probablement apparues en réponse aux infections de trypanosomes dans la course évolutive entre l'activité trypanolytique du sérum humain et les moyens de défense des trypanosomes, telle qu'illustrée à la figure 10 (Wasser et al. 2012; Capewell et al. 2015; Pays et al. 2014).

En effet, ces mutations sont principalement répandues en Afrique et chez les personnes d'origine africaine. La présence de ces variants de l'APOL1 empêche le SRA, antidote de *T.b. rhodesiense* contre l'APOL1, de se lier à sa cible. Par conséquent, ces variants offrent une protection contre ce parasite, en échappant au SRA et en provoquant sa mort. Cet avantage a néanmoins un coût, puisqu'à l'état homozygote il augmente significativement le risque de contracter une maladie rénale (Genovese et al. 2010). Le risque de développer une de ces maladies augmente en cas de présence de deux allèles mutés, que ce soit G1/G1, G1/G2 ou G2/G2, bien que le risque soit un peu plus élevé avec la combinaison G1/G1 (Ito et al. 2014). Les patients homozygotes pour l'APOL1 mutée présentent une probabilité 7 à 10 fois plus élevée de développer des maladies rénales associées à l'hypertension, 10 à 17 fois plus élevée de développer une glomérulosclérose segmentale focale, et 29 fois plus élevée de développer une néphropathie associée au VIH (Genovese et al. 2010; Papeta et al. 2011; Kopp et al. 2011; Kruzell-Davila et al. 2016).



**Figure 10 : Course évolutive entre les trypanosomes et les humains.** L'APOL1 humaine présente dans le sérum est capable de lyser les trypanosomes africains *T. b. brucei*. La sous-espèce *T. b. rhodesiense* a acquis la faculté de résister à ce facteur trypanolytique grâce la protéine SRA qui neutralise l'action de l'APOL en se liant à sa queue C-terminale. Deux variants de l'APOL1, G1 et G2, sont insensibles à l'action neutralisante du SRA grâce à des modifications dans ce domaine C-terminal, et donc permettent de tuer *T. b. rhodesiense*. En contrepartie, la présence de ces mutations entraîne un risque de développer des maladies rénales. L'autre trypanosome africain responsable de la maladie du sommeil, *T. b. gambiense*, ne dépend pas de la protéine SRA pour se défendre de l'APOL1 et n'est donc pas affecté par G1 et G2. Il est possible que cette sous-espèce soit apparue en réponse à la présence d'APOL1 G1 et G2. Figure provenant de Pays et al., 2014.

Le mécanisme par lequel l'APOL1 mutée intervient dans les maladies rénales n'est pas encore bien compris. Il a été montré par l'étude de patients ayant subi des greffes de rein que l'APOL1 produite par les podocytes eux-mêmes est impliquée, car c'est le génotype de l'APOL1 du donneur d'organe, et non pas du patient receveur, qui détermine le risque de développer la maladie (Lee et al. 2012; Reeves-Daniel et al. 2011). Néanmoins, l'APOL1 circulante joue aussi un rôle, comme l'a montré une étude démontrant que l'association des mutants de l'APOL1 (principalement G2) en circulation et du récepteur soluble de l'urokinase activatrice de plasminogène à la surface des podocytes déclenche une voie de signalisation passant par l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  qui aboutit à la formation d'autophagosomes et la perturbation du cytosquelette, menant au détachement des podocytes (Hayek et al. 2017).

Il semblerait que la dysfonction rénale ne provienne pas d'une perte de fonction de l'APOL1, puisque des individus dépourvus totalement d'APOL1 ne présentent pas de risque accru de développer la maladie (Johnstone et al. 2012). Il apparaît donc que celle-ci provienne d'un gain de fonction délétère causé par l'homozygotie de l'APOL1 mutante. Au regard des études publiées sur les APOLs, notamment par rapport à leur implication dans la mort cellulaire (Wan et al. 2008; Zhaorigetu et al. 2008), il pourrait être envisagé que la dysfonction rénale découle d'une diminution de la survie des podocytes. L'hypothèse est que l'APOL1 mutée serait ainsi responsable de la mort des podocytes en induisant l'apoptose ou la mort cellulaire par autophagie. Pour tester cette hypothèse, un groupe a créé des souris transgéniques exprimant l'APOL1 G0 (WT) ou l'APOL1 G2 sous le contrôle du promoteur du gène néphrine, exprimé dans les podocytes (Bruggeman et al. 2016). Les auteurs n'ont détecté aucune différence significative dans le taux d'apoptose ou d'autophagie dans les podocytes exprimant l'APOL1 G2 par rapport à la G0. Par contre, ils ont observé une diminution significative de la densité de podocytes lorsque les souris avaient atteint un âge de 200 jours (Bruggeman et al. 2016). Cela supporte donc le fait que l'APOL1 G2 est impliquée dans la dysfonction des podocytes, mais ne permet pas de conclure que cela est dû à une mort cellulaire accrue.

Une autre hypothèse est en lien avec l'activité trypanolytique de l'APOL1, celle-ci pénétrant dans le parasite *via* la voie endocytaire et causant le gonflement du lysosome (Perez-Morga et al. 2005). L'idée serait ici que l'APOL1 mutée causerait une perméabilité accrue du lysosome chez les podocytes, à l'instar de ce qui est observé chez les trypanosomes. Une étude réalisée sur des podocytes *in vitro* a montré que la surexpression des variants de l'APOL1 dans ces cellules cause leur gonflement et diminue leur viabilité (Lan et al. 2014). De plus, une perméabilisation du lysosome a été constatée, ainsi qu'une disruption du réseau d'actine.

Le phénotype est amélioré en bloquant l'acidification du lysosome ou en bloquant les canaux d'ions Cl<sup>-</sup>, ce qui indique que l'insertion des mutants de l'APOL1 dans la membrane lysosomiale pourrait en être la cause (Lan et al. 2014). Finalement, différents facteurs aggravant le phénotype ont été identifiés, tels que l'hypoxie, le TNF $\alpha$  ou la présence du VIH (Lan et al. 2014). Il convient de noter, par rapport à cette étude, qu'il s'agissait de surexpression des variants de l'APOL1 dans les podocytes, comme lors des études sur la mort cellulaire par apoptose ou par autophagie discutés plus haut. Le même point d'attention est donc valable, à savoir que la surexpression d'une protéine formatrice de pores membranaires est susceptible de causer une baisse de viabilité de la cellule, indépendamment d'une fonction éventuellement différente de la protéine.

Néanmoins, un point soulevé par cette étude est qu'une infection par le VIH est un facteur aggravant du phénotype. Ceci est en accord avec l'observation que la présence des allèles mutés de l'APOL1 augmente le risque de développer une néphropathie associée au VIH d'un facteur 29, le plus élevé de toutes les maladies rénales (Papeta et al. 2011). De plus, des études ont montré que l'APOL1 WT est capable d'inhiber la réplication du VIH (Taylor et al. 2014; McLaren et al. 2015), ce qui soulève la question de savoir quelle serait l'incidence des variants de l'APOL1 sur le virus.

Dans notre laboratoire, le travail de Sophie Uzureau a permis d'identifier d'autres mécanismes qui pourraient être responsables des dysfonctionnements de la filtration podocytaire (manuscrit en préparation). Elle a en effet montré que des modifications dans la queue C-terminale de l'APOL1 dans les podocytes la mènent à interagir de façon dérégulée avec d'autres protéines, notamment l'APOL3 et des protéines du cytosquelette. Parmi celles-ci, MYH9, la chaîne lourde de la myosine non musculaire de type II. Ces interactions ont plusieurs conséquences, dont un dérèglement du cytosquelette d'actine, ce qui provoque un changement de morphologie des podocytes. La forme de ces cellules étant particulièrement importante, une modification de celle-ci permettrait d'expliquer l'effacement des pédicelles et une diminution de l'efficacité de filtration.

### 1.1.6. Les APOLs dans d'autres pathologies

Les APOLs ont aussi été mentionnées dans d'autres contextes. Par exemple, très tôt dans l'étude des APOLs, un lien avec la schizophrénie a émergé. En effet, le locus dans lequel se situent les APOLs humaines est associé à un risque accru de développer cette maladie (Mimmack et al. 2002). Il a été montré que l'expression des APOL1, 2 et 4 est plus élevée chez les patients atteints de schizophrénie que chez des patients contrôles (Mimmack et al. 2002).

Les APOLs ont aussi été citées en lien avec certains cancers. Par exemple, l'APOL2 est surexprimée dans le cancer du col utérin résultant d'une infection au papillomavirus humain (Ahn et al. 2004). Par contre, l'expression de l'APOL1 est inversement corrélée au potentiel tumoral de cellules de cancer du sein (Dombkowski et al. 2006). Plus récemment, il a été montré que l'expression d'APOL1 est plus élevée dans les zones tumorales du carcinome thyroïdien papillaire que dans les zones saines (Chidiac et al. 2016).

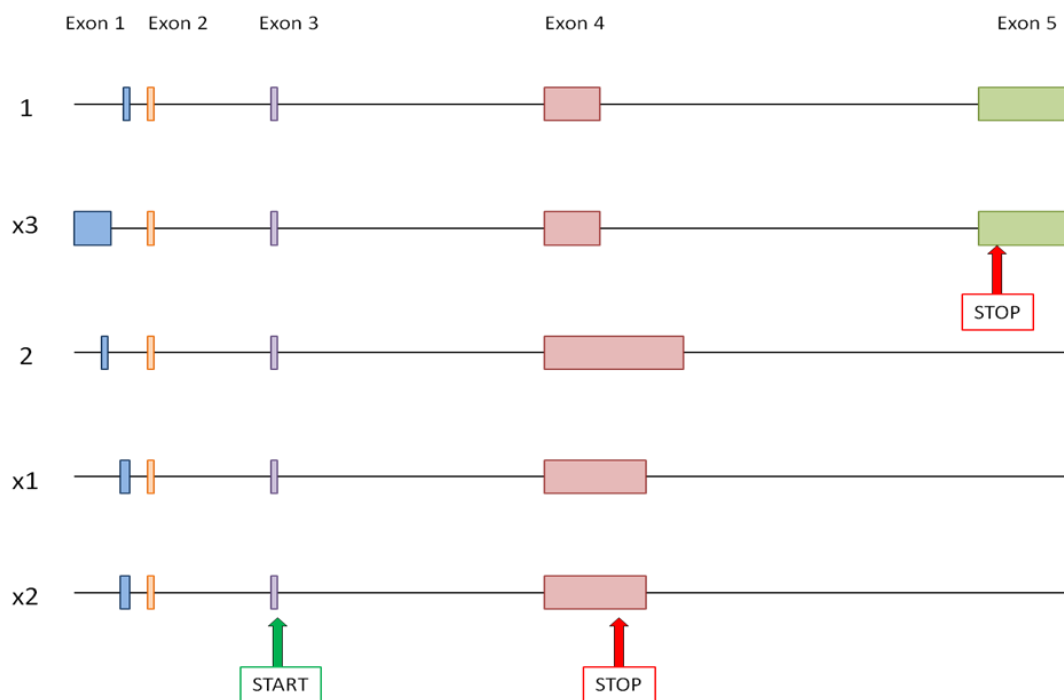
Deux études récentes ont identifié l'APOL6 humaine dans le cadre de l'arthrite rhumatoïde. Les deux groupes, se basant sur des analyses bioinformatiques de bases de données publiques, ont chacun identifié le gène *APOL6* comme étant à la fois surexprimé et hypométhylé dans des biopsies provenant du tissu synovial du genou de personnes souffrant d'arthrite rhumatoïde, comparés à des échantillons de personnes souffrant d'ostéoarthrite (Zhang, L. et al. 2017; Fang et al. 2018).

Certaines APOLs sont aussi impliquées dans le métabolisme. Une étude a montré que la partie N-terminale de l'obestatine, un peptide capable de diminuer la prise de graisses (Zhang, J. V et al. 2005), ainsi qu'un homologue à celle-ci sont capables d'augmenter l'expression de l'APOL8 murine dans le tissu adipeux épидидymal (Nagaraj et al. 2014). De plus, l'expression de plusieurs APOLs humaines est augmentée suite à la stimulation de cellules par des agonistes de PPAR $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$  (Uski 2008), des régulateurs importants du métabolisme des adipocytes. Finalement, il a été montré que plusieurs microARN impliqués dans la biologie des adipocytes se lient à la séquence 3'UTR de l'APOL6 humaine, et que la présence de mutations dans ces sites augmente le risque de développer le syndrome métabolique (Ye et al. 2013).

Collectivement, ces différentes études indiquent que les protéines de la famille des APOLs pourraient être impliquées dans de nombreuses pathologies mais, dans la plupart des cas, les mécanismes n'ont pas encore été élucidés.

### 1.1.7. L'Apolipoprotéine L6 murine

Jusqu'ici, la grande majorité des publications dans le domaine des APOLs concerne les APOLs humaines, au premier rang desquelles se situe l'APOL1. Les APOLs murines sont au nombre de 13 et leurs gènes sont tous localisés sur le chromosome 15 au sein d'un locus principal, à l'exception du gène *APOL6* qui en est distante de 336kb (Figure 3). L'*APOL6* peut être transcrite de cinq manières différentes, en raison d'un épissage alternatif (Figure 11). Ces cinq transcrits peuvent résulter en 2 isoformes protéiques différentes. La première isoforme correspond à 5 exons, tandis que la seconde ne correspond qu'aux 4 premiers exons, mais possède un 4ème exon plus long (Figure 11). L'isoforme 1 est longue de 321 acides aminés tandis que l'isoforme 2 en contient 329. Parmi ceux-ci, les 292 premiers acides aminés sont communs aux deux isoformes. Leurs séquences sont présentées aux figures 12 (nucléotides) et 13 (acides aminés). Les deux isoformes ne diffèrent donc que dans leur extrémité C-terminale.



**Figure 11 : Schéma représentant les différents transcrits de l'APOL6, ainsi que la position des codons start et stop.** Tous les transcrits diffèrent par leur exon 1. Les exons 2 et 3 sont identiques. Deux transcrits ont un exon 5 et sont traduits en APOL6 isoforme 1. Trois transcrits sont dépourvus d'exon 5 mais possèdent un exon 4 plus long, et sont traduits en APOL6 isoforme 2.



ATGGCTTTGGTGCAAACCTCCAACCCCGAGCCATCAGACAGAGGAGGACTATGAGGCTGATGCTGAGTTGCTAAGGGACAAGGATGA  
 CAGTCCTCTGGATGTTGAAGATGATGTTCTGTTTCTAAAACAGTTCCCGAGCTGGAGAAAGAAGGAGAAGAAGCGCATTAGAACGCT  
 CTATGCTATCGCAGACCACATTGACGAAAGCCACCAAAAAGCTACCAAGATCAAAGTGGTGACTACCTCTGCATCAGTCGCCTCTGG  
 AGTCCTGAGTCTCCTGGGTTTGGCCCTGGCTACAACAAGTGCAGGGGGAAGCCTGGTCTCCTACTGCTGTTGGGCATGGTTTGGGG  
 GCAGTTGCCGGGGTCACCGAGATCGTGACCAATGTGAGGAAAACTCTCGCAATAAAAGAGCCCTTGCTCAGGTCAACAGCATCAT  
 GCCTAACAGCGACCAGGAGCTGGAGGGGGTCAAGGGAGAGAAGACGACCTTTGTCACAGCTGCCGGTGACCTTGCTACAATGT  
 GGAACGCCTGGGATAATATCAAAAAGCACCTCCGAGCCCTCCAGCTAACCCAGAACCCACCCACGTCACCTCAGCTGCCAAAAA  
 GCTCATGACTGCGGGCCACGTATCAGCTCGAAGTGGCAGGCAGGTACAAAAGGCCCTTTGGGGGCACAGCCCTGGCAATGACCAAA  
 AATGCTCTGAGGATGGGACGTGCAGCTGCTGCCCTCTCCCTTGCCAGGACATATATACTCTCTGGGAGGACTGGAAGGATCTGAA  
 GCGGCAAACCCAACAGAGCTTGCAAGAAGAGTTAAGAGCACGGGCTGCAGAACGGGAGCGGGTGTAGCTGAACACACCTGTCCG  
 CTACAGAAAGCTGCAG {   
                           AGACTCAGCAAAGAGGCCGCAAGGTCTCTTTGAAAGGAAACAAGGTGACTCAGCC  
                           TCCATCCTCTCGACTGAGAGAGCAAGACTCTGGTGA  
                           GTAAGGGTCGGGTTCTATCTTTTGTGTTGTTGTTGTTTCTTCTGGAGCTGAGGAC  
                           TGATCCAGGGCCTTGTCTTGTCTAGGCAAGCACTCTACCACTGAGCTAAATCTCTAA

**Figure 12 : Séquence de l'ARNm de l'APOL6 murine.**

**Noir:** séquence commune aux deux isoformes. **Bleu:** extrémité 3' de l'isoforme 1. **Rouge:** extrémité 3' de l'isoforme 2.

MALVQTPTPSHQTEEDYEADAELLRDKDDSPLDVEDDVFLKQFPSWRKKEKKRIRTLYAIADHIDESH  
 QKATKIKVVTTASVASGVLSLLGLALATTTAGGSLVLTAVGHGLGAVAGVTEIVTNVRKNSRNKRALAQV  
 NSIMPNSDQELEGVKEKTTFFVTAAGDLVYKCGNAWDNIKKHLRALQLTRTQPHVTSAAKKLMTAGHV  
 SARSGRQVQKAFGGTALAMTKNALRMGRAAAALSLGQDIYTLWEDWKDLKAANPTELAEELRARAEE  
 RERVLAEHTCRYRKLQ {   
                           RLSKEAARSSLKGNKVTQPPSSSTERARLW  
                           VRVGFYLLLLLFFVLELRTDPRALFLLGKHSTTELNL

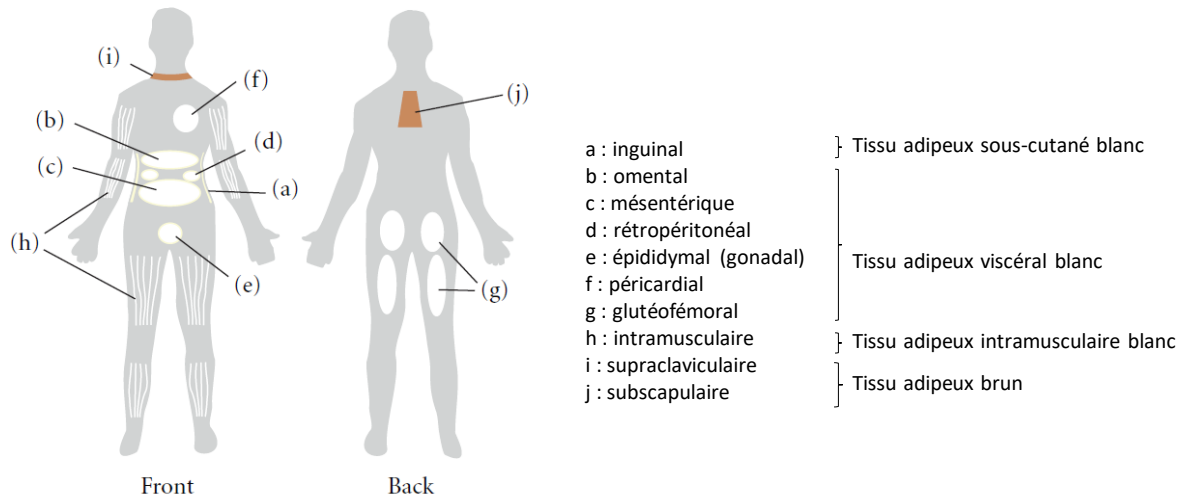
**Figure 13 : Séquence protéique de l'APOL6 murine.**

**Noir:** séquence commune aux deux isoformes. **Bleu:** extrémité carboxy-terminale de l'isoforme 1. **Rouge:** carboxy-terminale de l'isoforme 2.

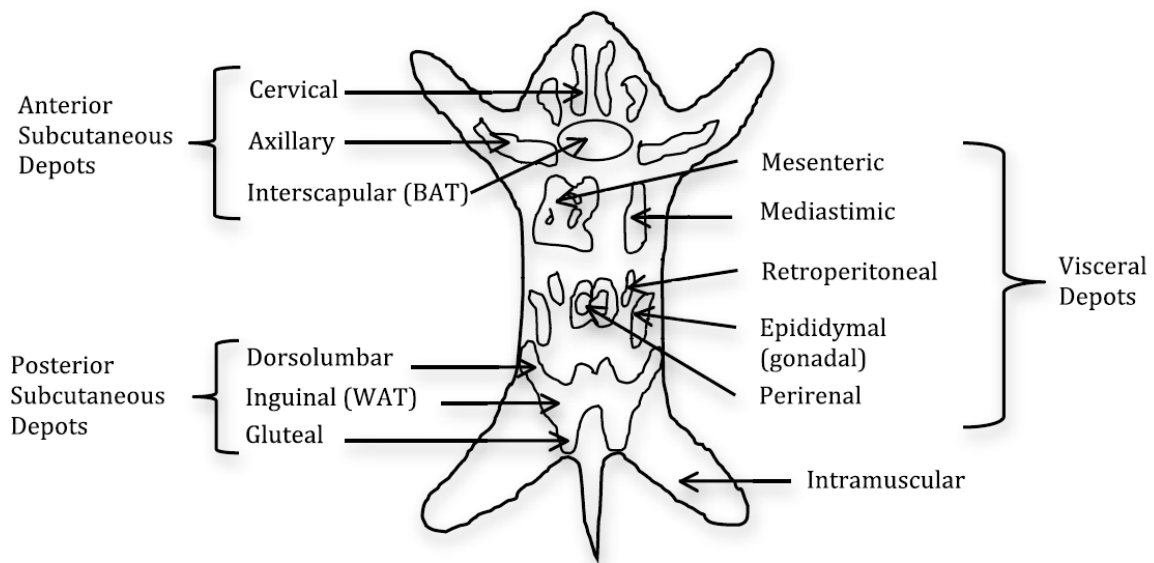


# Introduction

Partie II – Le tissu adipeux et les adipocytes



**Figure 14 : Distribution des dépôts de tissu adipeux chez l'humain.** Figure provenant de Bjorndal et al. 2011.

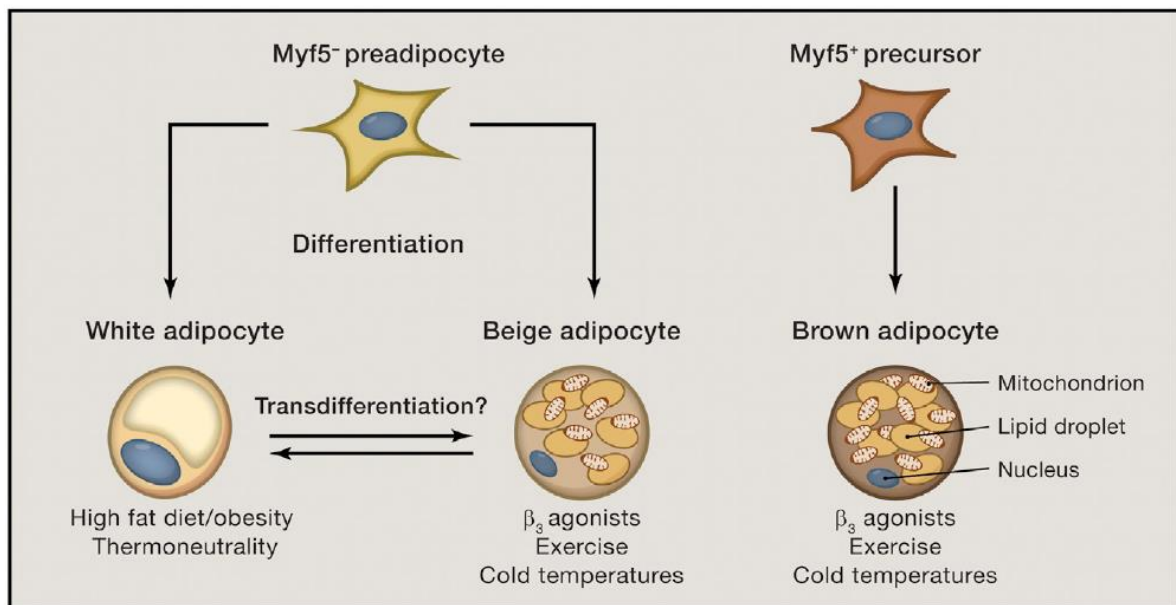


**Figure 15 : Distribution des dépôts de tissu adipeux chez la souris.** Figure provenant de Chusyd et al. 2016.

## 1.2. Le tissu adipeux et les adipocytes

### 1.2.1. Les adipocytes

Chaque APOL murine a son propre profil d'expression au sein des organes de la souris (Figure 4), et l'APOL6 est majoritairement exprimée au sein du tissu adipeux. Le tissu adipeux (TA) est le lieu privilégié de stockage des graisses dans l'organisme. Outre sa fonction de réservoir d'énergie, le TA joue un rôle dans la thermorégulation de l'organisme, l'homéostasie du glucose et la signalisation hormonale (Proenca et al. 2014). Il consiste en plusieurs dépôts dispersés en différents points du corps (Bjørndal et al. 2011; Wronska & Kmiec 2012). La plupart des dépôts sont situés dans la cavité péritonéale (TA viscéral) ou sous la peau (TA sous-cutané), mais il existe aussi des dépôts intramusculaires. Les noms et les localisations des différents dépôts de TA sont présentés à la Figure 14 pour le TA humain et à la Figure 15 pour le TA murin. Le type cellulaire le plus caractéristique du TA est l'adipocyte. Il existe plusieurs sortes d'adipocytes : les adipocytes blancs, bruns, et les adipocytes beiges. La morphologie et l'origine de ces trois types d'adipocytes sont illustrés à la Figure 16.



**Figure 16 : Morphologie, caractéristiques et origines des adipocytes blancs, beiges et bruns.** Les adipocytes blancs et beiges sont issus de mêmes progéniteurs négatifs pour le facteur de transcription Myf5, tandis que les adipocytes bruns sont issus de précurseurs positifs pour ce marqueur. Le cytoplasme des adipocytes blancs est principalement occupé par une large gouttelette lipidique, et leur expansion est induite par un régime gras ou en cas d'obésité. Les adipocytes beiges et bruns ont plusieurs petites gouttelettes lipidiques et un grand nombre de mitochondries, et sont induits par l'exercice, les températures basses, et les agonistes des récepteurs  $\beta$  adrénergiques tels que l'adrénaline. Plusieurs études ont avancé la possibilité de transdifférenciation entre adipocytes blancs et beiges. Figure provenant de Brestoff et Artis, 2015.

Les adipocytes blancs sont les plus courants et correspondent à l'archétype de la cellule graisseuse. Ils sont sphériques et contiennent une large gouttelette lipidique (« *Lipid Droplet* », LD) qui peut atteindre une taille telle qu'elle repousse tous les autres organites contre la membrane cytoplasmique en périphérie. La taille des adipocytes varie de 30 à 200  $\mu\text{m}$  de diamètre (Wronska & Kmiec 2012) et dépend de leur contenu en lipides. Les adipocytes blancs sont aussi capables de sécréter un grand nombre de molécules collectivement appelées adipokines. Ce sont les adipocytes blancs qui sont associés à la prise de poids, à l'obésité et aux différentes maladies qui y sont reliées. Nous reviendrons ultérieurement et plus en détails sur plusieurs aspects de la biologie des adipocytes blancs.

Les adipocytes bruns se retrouvent dans le tissu adipeux brun, abondant chez les nouveau-nés mais dont la prévalence diminue avec l'âge (Blaza 1983). Chez l'adulte, la localisation du TA brun se limite principalement au dépôt supraclaviculaire, ainsi qu'aux régions paravertébrales, médiastiniques, para-aortiques, et au niveau de l'apex cardiaque (Ikeda et al. 2018; Sacks & Symonds 2013). Les adipocytes bruns sont des cellules spécialisées dans la thermorégulation de l'organisme. Ils sont morphologiquement différents des adipocytes blancs en cela qu'ils n'ont pas une grande LD, mais plusieurs plus petites LD. Ils adoptent une forme polygonale et contiennent un grand nombre de mitochondries. Ces adipocytes ont recours la lipolyse et à la  $\beta$ -oxydation des acides gras non pas pour produire de l'ATP mais pour dégager de la chaleur. Ceci est possible grâce à la protéine « *uncoupling protein 1* » (UCP1), qui dissipe le gradient de protons de part et d'autre de la membrane interne de la mitochondrie, ce qui a pour conséquence de découpler la chaîne d'oxydation de la production d'ATP (Cedikova et al. 2016). Toute l'énergie résultant de la  $\beta$ -oxydation est donc dissipée en chaleur, qui participe à la thermogénèse. En raison de leur nombre élevé de mitochondries, ils sont capables de cataboliser une grande quantité de lipides pour produire beaucoup de chaleur en peu de temps (Cedikova et al. 2016). De plus, la présence de plusieurs petites LD au lieu d'une seule grande permet d'augmenter la surface spécifique de celles-ci et y permet donc un meilleur accès des lipases. En outre, le TA brun est fortement innervé et vascularisé, ce qui permet une activation rapide de la thermogénèse par la stimulation des adipocytes par des catécholamines produites par le système nerveux. Les catécholamines se lient aux récepteurs  $\beta$ -adrénergiques présents dans la membranes des adipocytes et permettent d'activer la lipolyse, la  $\beta$ -oxydation et l'expression de UCP1 (Rehmark et al. 1990; Nielsen et al. 2014).

Les adipocytes beiges (aussi appelés brite pour « *brown-in-white* ») sont morphologiquement et fonctionnellement similaires aux adipocytes bruns, ayant aussi une fonction de thermogénèse. Ils sont situés au sein de dépôts de TA blanc, et dérivent des mêmes précurseurs que les adipocytes blancs (Sanchez-Gurmaches & Guertin 2014), mais ressemblent à et se comportent comme des adipocytes bruns. Certaines études ont même proposé que les adipocytes beiges pourraient dériver directement d'adipocytes blancs matures effectuant une transdifférenciation (Cinti 2009; Barbatelli et al. 2010), bien qu'il n'y ait pas encore de consensus définitif à ce sujet (Ikeda et al. 2018). Néanmoins, il a été montré que lorsque les souris exposées au froid sont réchauffées, les adipocytes beiges qui étaient apparus dans le TA blanc retournent progressivement à un phénotype d'adipocyte blanc (Rosenwald et al. 2013), notamment en dégradant leurs mitochondries par mitophagie (Altshuler-Keylin et al. 2016). Cela démontre leur potentiel de plasticité phénotypique et de transdifférenciation, et indique que l'état d'adipocyte beige est temporaire et réversible. Il semblerait donc que les adipocytes beiges soient une forme d'adipocytes thermogéniques inductibles, et qu'ils émanent du tissu adipeux blanc lorsqu'il y aurait un besoin particulier de chaleur dans l'organisme (Ikeda et al. 2018).

Les adipocytes ne sont pas uniquement des réservoirs de triglycérides. Ils sont aussi capables de synthétiser et de sécréter un grand nombre de signaux, appelés adipokines (Rodríguez et al. 2015). Ces adipokines peuvent être des cytokines (TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6), des chémokines (MCP-1), des hormones (Leptine, Adiponectine), etc. Certaines ont un effet local, tandis que d'autres circulent dans tout l'organisme et ont des effets à longue distance. Le tableau 1 publié par Rodriguez et al., reprend un grand nombre d'adipokines identifiées jusqu'à présent. Le tissu adipeux est donc considéré depuis quelques années comme un organe endocrinien à part entière (Rodríguez et al. 2015). Certaines de ces adipokines ont des fonctions liées à la régulation du métabolisme énergétique, comme par exemple la leptine qui est l'hormone de satiété, sécrétée lorsque l'organisme dispose de suffisamment de réserves. D'autres adipokines ont une fonction immunitaire, comme MCP-1 qui permet le recrutement de macrophages au sein du tissu adipeux. Ces dernières jouent un rôle important dans les interactions complexes entre le système immunitaire et les adipocytes, notamment en cas d'obésité, et qui seront abordées plus bas.

Les adipocytes produisent aussi une matrice extracellulaire composée majoritairement de collagène de types I à VI, de laminine et de fibronectine (Divoux & Clément 2011). Cette matrice est importante pour maintenir l'intégrité des adipocytes et du TA et joue un rôle dans l'adipogénèse et la formation du tissu (Divoux & Clément 2011).

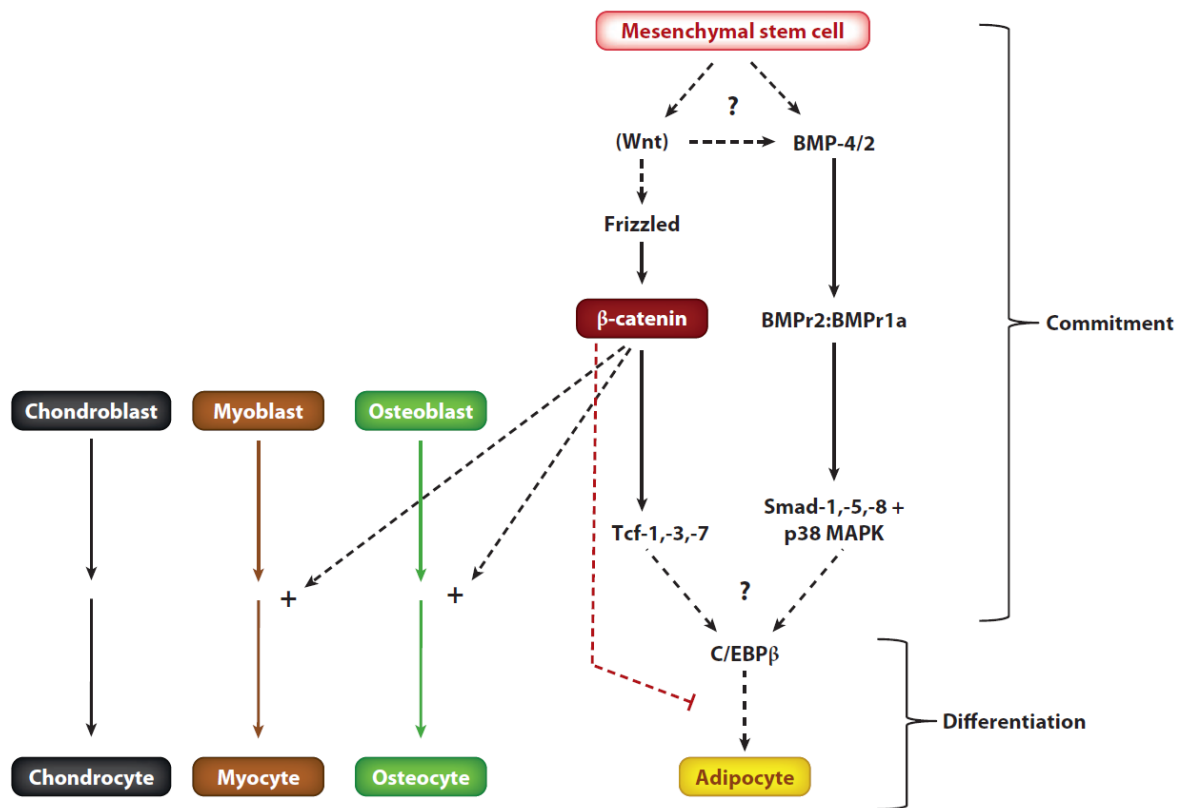
Table 1. *Adipokines secreted by adipose tissue*

Adipokine	Main Metabolic Effect
Adiponectin	Hormone with antidiabetic, antiatherogenic, and anti-inflammatory properties
Adipsin	Protein involved in activation of the alternative complement pathway
Angiotensinogen	Precursor molecule of angiotensin II that causes vasoconstriction, increased BP, and release of aldosterone from the adrenal cortex
Apelin	Peptide implicated in control of BP and one of the most potent stimulators of cardiac contractility; inhibits insulin secretion; involved in lipolysis
ASP	Hormone produced by the complement pathway that regulates whole body glucose and lipid metabolism
Calprotectin	Proinflammatory factor involved in cell adhesion, chemotaxis, and antimicrobial activity
Cardiotrophin-1	Cytokine involved in hypertrophy of cardiomyocytes
Cathepsins S, L, K	Cysteine proteases that promote adipogenesis and extracellular matrix remodeling
Chemerin	Chemoattractant protein involved in adaptive and innate immunity and in adipogenesis
CCL2, 3, 5, 7, 8, 11	Chemokines involved in monocyte chemotaxis
Clusterin	Lipoprotein that promotes tumor progression and angiogenesis and is involved in metabolic and cardiovascular diseases
CRP	Acute-phase reactant involved in inflammatory processes
Fetuin A	Protein that reflects liver fat content; associated with lipid-induced inflammation and insulin resistance; promotes cancer progression
FGF-21	Hormone that stimulates glucose uptake into adipocytes and increases thermogenesis, energy expenditure, and fat utilization
FIAF/ANGPTL4	Protein induced by fasting and hypoxia
FNDC5/irisin	Myokine/adipokine involved in promotion of myogenesis and fat browning
Ghrelin	Orexigenic and adipogenic hormone that exerts a depressor effect on BP control and acts as a cardioprotective agent
Haptoglobin	Acute-phase reactant with angiogenic and chemotactic properties
Hepcidin	Proinflammatory cytokine that activates MMP-9
HGF	Factor that stimulates proliferation and development in adipocytes and antiinflammatory effects
HMGB1	Alarmin involved in DNA repair and secretion of insulin in pancreatic $\beta$ -cells
Hsp72	Damage-activated protein that induces neutrophil and natural killer cell recruitment
IGF-1	Factor that stimulates proliferation and differentiation in adipocytes
IL-1 $\beta$	Proinflammatory cytokine involved in a paracrine inflammatory pathway in adipose tissue
IL-6	Proinflammatory cytokine implicated in acute-phase responses
IL-8/CXCL8	Chemokine involved in pathogenesis of atherosclerosis and cardiovascular diseases
IP-10/CXCL10	Chemokine produced by T cells
Leptin	Anorexigenic hormone with lipolytic and vasoactive effects in addition to other pleiotropic activities
Lipocalin-2	Adipokine showing anti-inflammatory properties
MCP-1	Chemoattractant protein that promotes inflammation and macrophage infiltration in adipose tissue
MIF	Factor involved in proinflammatory processes and immunoregulation.
MMP2 and 9	Proteins implicated in adipogenesis
NUCB2/Nesfatin-1	Anorexigenic peptide also involved in the inflammatory response
NGF	Neurotrophin involved in development and survival of sympathetic neurons
Omentin	Novel adipokine that modulates insulin sensitivity and exerts anti-inflammatory properties
Osteopontin	Proinflammatory factor involved in vascular and myocardial remodeling; cytokine implicated in insulin resistance and cancer
PAI-1	Potent inhibitor of fibrinolysis implicated in development of atherosclerotic plaques
PEDF	Secreted glycoprotein that belongs to the noninhibitory serpin group with antiangiogenic, antioxidant, antiinflammatory, and lipolytic effects
PGI <sub>2</sub> and PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub>	Factors implicated in regulatory functions such as inflammation, blood clotting, ovulation, menstruation, and acid secretion
Progranulin	Chemoattractant protein involved in adipose tissue inflammation and neurodegenerative diseases
RBP4	Factor involved in development of insulin resistance, visceral fat distribution, and dyslipidemia
Resistin	Hormone involved in development of insulin resistance, which participates in the proinflammatory response
SAA	Acute-phase reactant produced in response to injury, infection, or inflammation
SRFP5	Inhibitor of WNT5a signaling with anti-inflammatory properties
STAMP2	Metalloreductase that plays a role in cellular import of copper and iron and in reduction of macrophage recruitment and polarization toward the M1 phenotype
Tenascin C	Damage-activated protein that induces immune responses and extracellular matrix remodeling
TGF $\beta$	Regulatory factor of preadipocyte proliferation, differentiation, and apoptosis
Tissue factor	Major cellular initiator of the coagulation cascade
TIMP-1	Inhibitor that decreases adipogenesis and impairs glucose tolerance
TNF $\alpha$	Proinflammatory cytokine involved in systemic inflammation and development of insulin resistance in obesity
TWEAK	Proinflammatory cytokine of the TNF superfamily that inhibits adipose tissue growth
Vaspin	Adipokine of the serine protease inhibitor family showing insulin-sensitising effects
VEGF	Factor involved in angiogenesis stimulation in adipose tissue
Visfatin/NAMPT	NAD <sup>+</sup> biosynthetic enzyme involved in regulation of $\beta$ -pancreatic cells
WNT5a	Secreted glycoprotein of the WNT family with anti-adipogenic and proinflammatory actions
WISP1	Secreted matricellular protein that regulates adipogenesis and adipose tissue inflammation
YKL-40	Proinflammatory factor that stimulates innate immune system, extracellular matrix remodeling, and angiogenesis
Zinc $\alpha$ 2-glycoprotein	Soluble glycoprotein with lipolytic effects

**Tableau 1 : Adipokines sécrétées par le tissu adipeux.** Les adipocytes ne sont pas simplement des réservoirs de lipides, mais sont aussi capables de sécréter un grand nombre de molécules, collectivement appelées adipokines. Tableau provenant de Rodriguez et al. 2015.



En plus des adipocytes et de leur matrice extracellulaire, le TA contient d'autres cellules collectivement appelées fraction stromale vasculaire (« *Stromal Vascular Fraction* », SVF). Cet ensemble de types cellulaires reprend les cellules souches, les préadipocytes, les fibroblastes, les cellules endothéliales formant les vaisseaux sanguins qui irriguent le tissu, les neurones qui innervent le tissu, et finalement les cellules du système immunitaire résidentes ou qui infiltrent le tissu (Ouchi et al. 2011). Parmi ces différents types cellulaires présents dans la TA, les cellules immunes ont été particulièrement étudiées pour leur rôle dans la régulation de l'homéostasie du TA et dans le déclenchement du syndrome métabolique. Cette fraction comprend des macrophages (le type de leucocyte le plus prévalent dans le TA), des lymphocytes (comprenant des lymphocytes « *natural killer* » (NK), des T helper (Th), des T régulateurs, et des lymphocytes B), des éosinophiles, des cellules lymphoïdes innées (« *Innate Lymphoid Cells* », ILC) et des mastocytes (Ouchi et al. 2011; Chung et al. 2018).



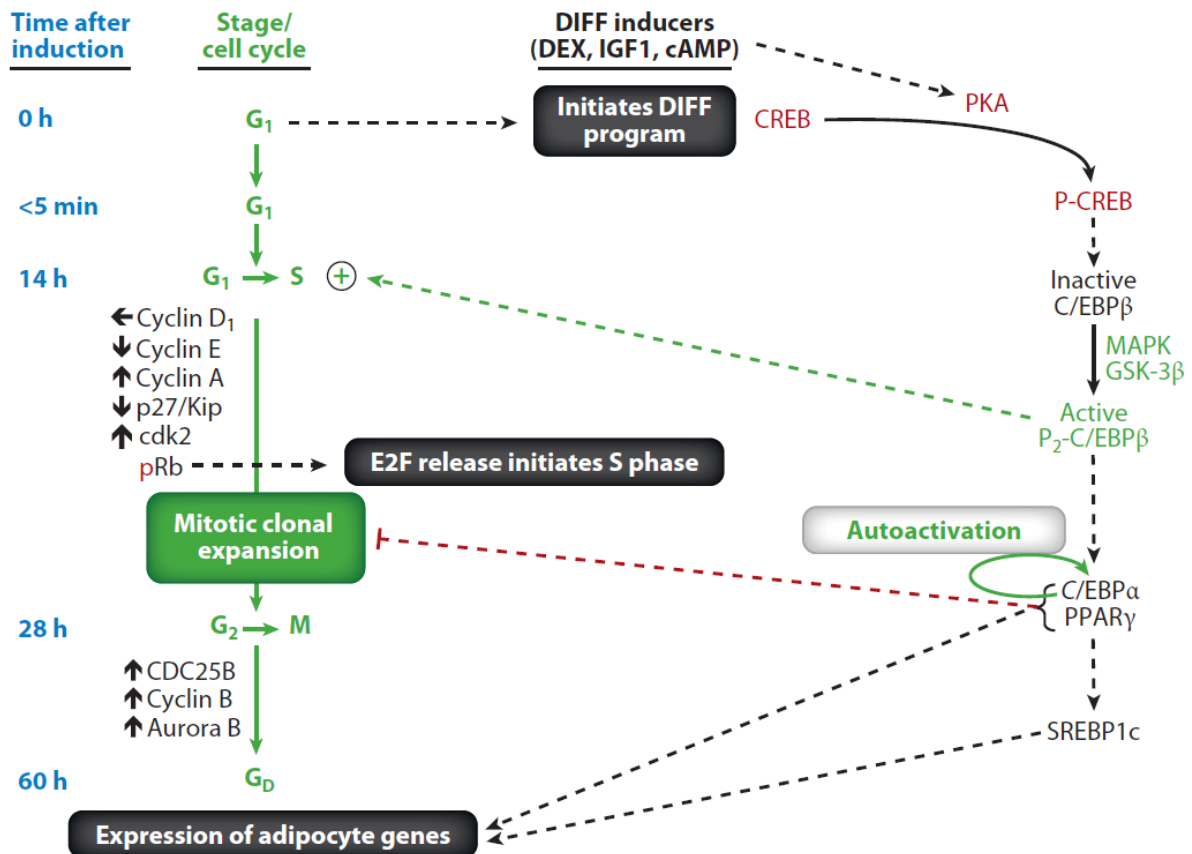
**Figure 17 : Voies de signalisation principales régulant le passage d'une cellule souche mésenchymateuse à un préadipocyte.** Deux voies majeures sont impliquées : la voie BMP, passant par BMP4 et BMP2 et qui a un effet activateur sur la décision de se transformer en préadipocyte ; et la voie Wnt, passant par la  $\beta$ -caténine, et qui a aussi un effet activateur sur cette décision mais un effet inhibiteur plus tard, sur la différenciation des préadipocytes en adipocytes. Les lignes en pointillés indiquent que les éléments précis de la cascade de signalisation ne sont pas encore élucidés. Figure provenant de Tang et al., 2012.

### 1.2.2. L'adipogénèse

Les adipocytes se différencient à partir de précurseurs appelés préadipocytes. Ceux-ci dérivent eux-mêmes des cellules souches mésenchymateuses présentes dans le TA ou dans la moelle osseuse. Ces cellules souches sont pluripotentes et peuvent se différencier en adipocytes, myocytes, chondrocytes et ostéocytes (Tang & Lane 2012). Lorsqu'ils s'engagent dans la voie de l'adipogénèse, ils deviennent des préadipocytes et perdent la capacité à se différencier en d'autres types cellulaires que des adipocytes. Les signaux nécessaires au passage de la cellule souche mésenchymateuse au préadipocyte ne sont pas connus, mais plusieurs voies de signalisation ont été identifiées comme ayant un impact positif ou négatif sur cette première étape (Figure 17). Par exemple, les facteurs de croissance morphogéniques « *bone morphogenic protein 4 et 2* » (BMP4 et BMP2) ont un effet activateur vers l'adipogénèse tandis que la voie de signalisation impliquant les protéines Hedgehog a un effet inhibiteur (Bowers et al. 2006; Zehentner et al. 2000). La voie de signalisation canonique de Wnt a un effet activateur lors du passage de la cellule souche au préadipocyte mais a un effet inhibiteur plus tard, lors de la différenciation du préadipocyte en adipocyte (Kang et al. 2007; Bowers & Lane 2008).

La voie BMP impliquée dans la transformation de la cellule souche mésenchymateuse en préadipocyte fonctionne comme ceci (Figure 17) : les BMPs se lient à leur récepteur, un hétérodimère BMP<sub>r1</sub>:BMP<sub>r2</sub>, qui induit la phosphorylation et l'activation de la BMP<sub>r1</sub> kinase, qui en retour phosphoryle Smad1, 5 et 8. Ceux-ci forment un complexe avec Smad4 et migrent ensuite dans le noyau pour agir en tant que facteur de transcription (Huang et al. 2009).

La voie de signalisation faisant intervenir Wnt implique la  $\beta$ -caténine (Figure 17). Lorsque Wnt est absent, la  $\beta$ -caténine est phosphorylée par « *glycogen synthase kinase-3 $\beta$*  » (GSK-3 $\beta$ ), ce qui induit son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome (Reya & Clevers 2005). Lorsque Wnt se lie à son récepteur frizzled, le complexe GSK-3 $\beta$  ne peut pas phosphoryler la  $\beta$ -caténine, qui peut donc s'accumuler et rentrer dans le noyau pour activer l'expression des facteurs de transcription permettant l'activation de gènes nécessaires pour l'adipogénèse (Christodoulides et al. 2009; Reya & Clevers 2005).

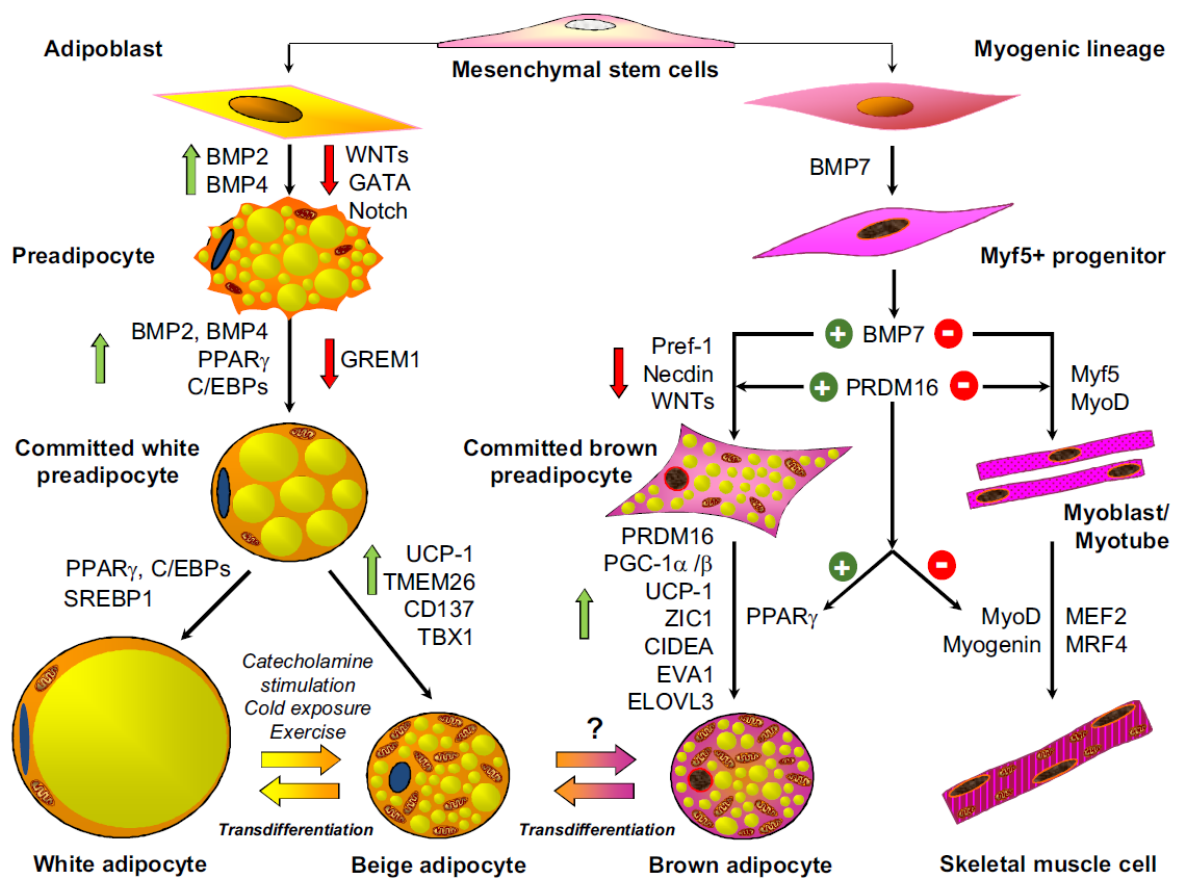


**Figure 18 : Voies de signalisation principales régulant la différenciation d'un préadipocyte en un adipocyte.** Les préadipocytes peuvent se différencier en adipocytes suite à un cocktail de différenciation (DIFF) comprenant de la dexaméthasone (DEX), de l'insuline ou de l'insulin-like growth factor (IGF1) et de l'AMPc (cAMP). Ces stimuli vont activer CREB et la PKA qui induisent l'expression des facteurs de transcription de l'adipogénèse, à savoir en premier lieu C/EBPβ, puis C/EBPα et PPARγ, et finalement SREBP. En parallèle, le cycle cellulaire arrêté en phase G1 est relancé, l'ADN est répliqué et les cellules entrent dans une phase d'expansion clonale mitotique. Finalement, tous ceci induit l'expression de gènes exprimés spécifiquement par les adipocytes, provoquant notamment les changements morphologiques et métaboliques nécessaires à la fonction adipocytaire. Figure provenant de Tang et al., 2012.

Une fois la cellule souche engagée dans la voie de l'adipogénèse, celle-ci devient un préadipocyte, prêt à se différencier en adipocyte (Figure 18). Pour induire l'adipogénèse *in vitro*, un cocktail adipogénique est ajouté. Il contient de l'insuline, de la dexaméthasone et un facteur permettant d'augmenter la concentration en AMP cyclique (AMPc) intracellulaire, souvent du 3-isobutyl-1-méthylxanthine (IBMX). Lorsque ce cocktail est ajouté, les cellules arrêtent leur cycle cellulaire. L'élévation du taux d'AMPc provoque l'activation de la « *protein kinase A* » (PKA) qui phosphoryle et active « *cAMP responsive-element binding protein* » (CREB) (Rogne & Taskén 2014). Celle-ci entre alors dans le noyau et promeut l'expression de « *CCAAT/enhancer-binding protein-β* » (C/EBPβ) (Zhang, J. W. et al. 2004) qui est aussi un facteur de transcription, mais qui ne peut pas se lier à l'ADN à ce stade, à défaut de pouvoir former un dimère (Tang & Lane 2012).

À ce moment-là, les cellules entrent de manière synchrone dans la phase d'expansion clonale mitotique. Cette première phase de l'adipogénèse est caractérisée par la réplication de l'ADN et le redémarrage du cycle cellulaire qui était arrêté jusque-là. Cette étape est indispensable dans l'adipogénèse *in vitro*, comme par exemple avec le modèle cellulaire 3T3-L1, qui effectue une à deux divisions synchrones avant sa différenciation (Tang et al. 2003), mais son utilité est débattue concernant la différenciation *in vivo* (Rogne & Taskén 2014; Otto & Lane 2005). Durant la réplication de l'ADN, C/EBPβ est phosphorylé par « *mitogen-activated protein kinase* » (MAPK) puis par GSK-3β, ce qui lui permet de former des homodimères et dès lors lui confère la capacité à se lier à l'ADN (Tang et al. 2005). Parmi les gènes dont l'expression est induite par C/EBPβ, on retrouve C/EBPα et « *peroxysome proliferator-activated receptor-γ* » (PPARγ) (Christy et al. 1991) (Figure 18). Une fois activée, leur expression est maintenue par autoactivation de C/EBPα (Christy et al. 1991). Ces deux protéines sont des facteurs de transcription qui permettront ensuite à la cellule d'induire l'expression de tous les gènes nécessaires au développement du phénotype d'adipocyte (Tang & Lane 2012). PPARγ est considéré comme un maître régulateur de l'adipogénèse parce que son expression est à la fois nécessaire et suffisante à la différenciation (Lin & Lane 1994; Farmer 2006).

D'autres familles de protéines jouent aussi un rôle dans le déroulement de l'adipogénèse. Les « *sterol regulatory element-binding protein* » (SREBP) sont des facteurs de transcription induits par C/EBPα et PPARγ qui activent l'expression des gènes nécessaires pour la lipogénèse (Horton 2002).

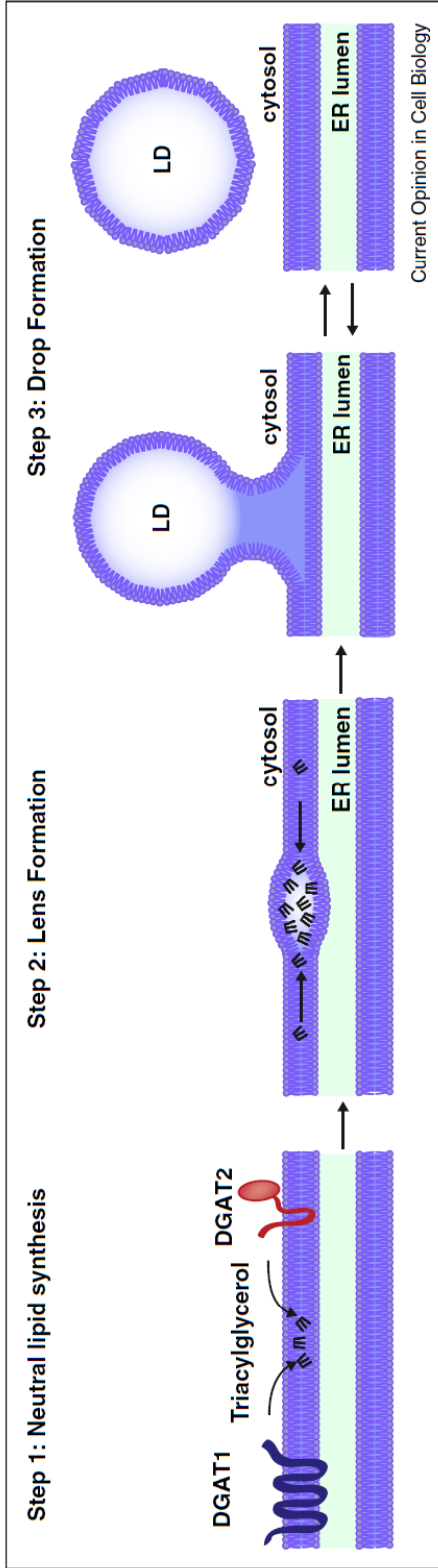


**Figure 19 : Comparaison de l'ontogénie des adipocytes blancs, beiges, bruns et des myocytes à partir des cellules souches mésenchymateuses.** Les principales différences dans la différenciation des adipocytes bruns par rapport aux adipocytes blancs sont les suivantes. Les adipocytes bruns proviennent de progéniteurs exprimant le facteur de transcription Myf5, aussi capables de se différencier en cellules musculaires. Une fois le signal de différenciation activé, lié au froid ou à l'exercice par exemple, la voie BMP est activée, passant par BMP7, au contraire des adipocytes blancs passant par BMP4 et 2. Le facteur de transcription PRDM16 est essentiel à la différenciation en adipocytes bruns, bien que d'autres protéines y jouent un rôle telles que UCP-1, PGC-1 $\alpha$ , etc. Figure provenant de Rodriguez et al., 2015.

Les « *Kruppel-like factors* » (KLF) sont des facteurs de transcription qui ont, selon les membres, soit un effet activateur (KLF5, 6, 9 et 15), soit un effet inhibiteur (KLF2 et 7) sur l'expression de gènes nécessaires à l'adipogénèse (Moreno-Navarrete & Fernandez-Real 2012). Les protéines de la famille des MAPK sont pro-adipogéniques, comme par exemple ERK1 et p38, tandis que des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF $\alpha$  et l'IL1 sont anti-adipogéniques en agissant sur différentes voies de signalisation (Moreno-Navarrete & Fernandez-Real 2012). La matrice extracellulaire, composée principalement des collagènes et de la laminine, ainsi que les forces mécaniques qui agissent sur les cellules dans le tissu ont aussi de l'importance dans la différenciation des adipocytes (Poulos et al. 2016). Par exemple, les préadipocytes cultivés sur une surface rigide ont une expression plus faible des gènes lipogéniques que s'ils sont cultivés sur une surface présentant une rigidité similaire à celle du TA (Spiegelman & Ginty 1983).

Les différentes voies de signalisation mentionnées ci-dessus concernent majoritairement les adipocytes blancs. Les adipocytes beiges sont issus des mêmes progéniteurs et se distinguent des adipocytes blancs par l'expression de gènes spécifiques à la thermogénèse tels que UCP1. Les voies de signalisation impliquées ne sont pas bien connues, mais les stimuli identifiés sont l'exposition au froid, l'exercice et les catécholamines (Rodríguez et al. 2015). Les adipocytes bruns, eux, proviennent de progéniteurs positifs pour le marqueur Myf5. La voie de signalisation BMP joue aussi un rôle dans leur différenciation, mais elle est médiée par BMP7 et non pas par BMP2 et 4 comme dans le cas des adipocytes blancs. Un facteur de transcription essentiel à la différenciation en adipocyte brun est PRDM16 (« *PR domain containing 16* ») sans lequel celle-ci n'est pas possible (Ikeda et al. 2018). En bref, les inhibiteurs d'adipogénèse (WNT, Nectin, Pref-1) sont d'abord inhibés, et les inducteurs d'adipogénèse (les C/EBPs, PPAR $\gamma$ ) sont stimulés, puis les marqueurs spécifiques d'adipocytes bruns (principalement PRDM16, UCP1, PGC1- $\alpha$ ) sont exprimés, et finalement la mitogénèse est activée (Figure 19) (Rodríguez et al. 2015). En l'absence de PRDM16 et de BMP7, les précurseurs d'adipocytes bruns peuvent se différencier en myocytes de muscles squelettiques, *via* l'expression de Myf5 et MyoD.

Une fois les adipocytes différenciés, ils ont une durée de vie de plusieurs années dans le TA. Néanmoins, il arrive que certains adipocytes meurent et qu'ils soient alors remplacés par la différenciation de nouveaux préadipocytes. Ainsi, chez l'humain, 50% de la population d'adipocytes est renouvelée en moyenne tous les 8 ans (Spalding et al. 2008).



**Figure 20 : Modèle de formation *de novo* de gouttelettes lipidiques à partir du réticulum endoplasmique.** La formation de gouttelettes lipidiques à partir du réticulum endoplasmique (ER) se déroule en plusieurs étapes. Premièrement, les enzymes insérés dans la membrane du ER, les DGAT, synthétisent des triglycérides. Ceux-ci étant hydrophobes, ils s'accumulent entre les deux feuillettes de la membrane du ER. La mobilité des lipides neutres entre les feuillettes membranaires leur permet de se déplacer et de se rassembler spontanément. Ceci forme ce qu'on appelle des lentilles de phase lipidique dans la membrane. Cette lentille grossit et, passé un certain seuil, donne naissance à un bourgeon. Ce bourgeon peut rester attaché au ER, mais peut aussi se détacher et former une gouttelette lipidique à part entière. Figure provenant de Wilfling et al. 2014.



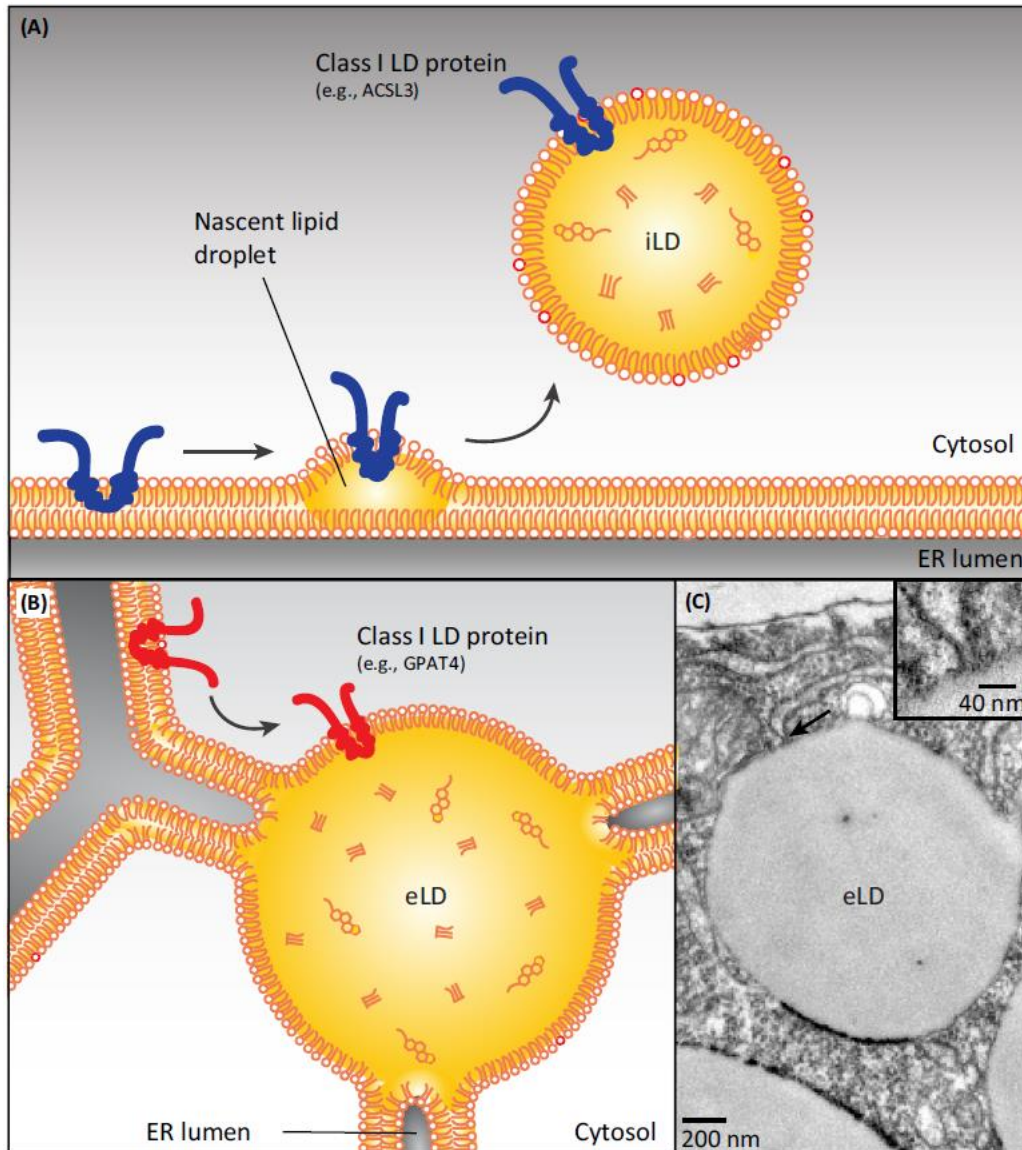
### 1.2.3. Les gouttelettes lipidiques

La principale caractéristique des adipocytes blancs est la grande gouttelette lipidique, ou « *Lipid Droplet* » (LD) qu'ils contiennent. La cellule y stocke des lipides neutres, majoritairement des triglycérides (TG) et des esters de cholestérol. La LD est entourée d'une monocouche de phospholipides (par ordre d'abondance : phosphatidylcholine, phosphatidyléthanolamine et phosphatidylinositol) et est enveloppée d'un réseau de fibres de vimentine ainsi que de la protéine périlipine qui restreint l'accès à sa surface.

Selon le modèle le plus souvent cité (et illustré à la Figure 20), la formation des LD débute dans le réticulum endoplasmique (ER) (Joshi et al. 2017). Les enzymes diglycérol acyl-transférases (DGAT1 et 2) et acyl-CoA:cholestérol acyl-transférases (ACAT1 et 2) sont essentiels à l'estérification des acides gras en TG (Smith, S. J. et al. 2000; Chang et al. 2006). Ces enzymes sont ancrés dans la membrane du ER grâce à leur domaine transmembranaire. Sous leur action, des TG sont synthétisés et, ceux-ci étant hydrophobes, ils s'accumulent entre les deux feuilletts de la bicouche membranaire. Celle-ci peut accommoder environ 3-7% de TG entre ses deux feuilletts, mais au-delà, une « lentille » de lipides neutres se forme (Khandelia et al. 2010). Les TG ne sont pas nécessairement synthétisés au lieu même de formation de la lentille, puisqu'ils peuvent diffuser entre les deux feuilletts membranaires (Wilfling, Haas, et al. 2014). Au fur et à mesure de leur accumulation, les deux feuilletts commencent à s'écarter et un bourgeon se forme (Figure 20). Lorsque la tension de surface devient trop importante, le bourgeon se détache du ER et forme une LD entourée d'une monocouche de phospholipides provenant du feuillet cytoplasmique du ER (Vanni 2017). Bien que certaines simulations montrent que la seule tension de surface suffise à déclencher la séparation de la LD du ER (Vanni 2017), il est possible que des protéines participent à ce processus.

Ce modèle de biogénèse des LD est notamment supporté par le fait que des protéines membranaires du ER se retrouvent dans la couche phospholipidique entourant la LD. En effet, la présence de protéines insérées uniquement dans le feuillet externe de la membrane du ER est bien expliquée par le modèle de bourgeonnement. Néanmoins, le fait que certaines protéines transmembranaires intégrales (traversant les deux feuilletts de la membrane) se retrouvent associées aux LD (entourée d'un feuillet unique) indique que des morceaux de bicouche lipidique du ER sont aussi emportés lors du bourgeonnement des LD (Wilfling, Haas, et al. 2014). Il y a aussi une sélection qui est faite entre les protéines qui doivent être transférées à la LD et celles qui doivent rester dans le ER. En effet, la surface de la LD est enrichie en certaines protéines par rapport à la membrane du ER, ce qui indique un processus de tri. Le site de

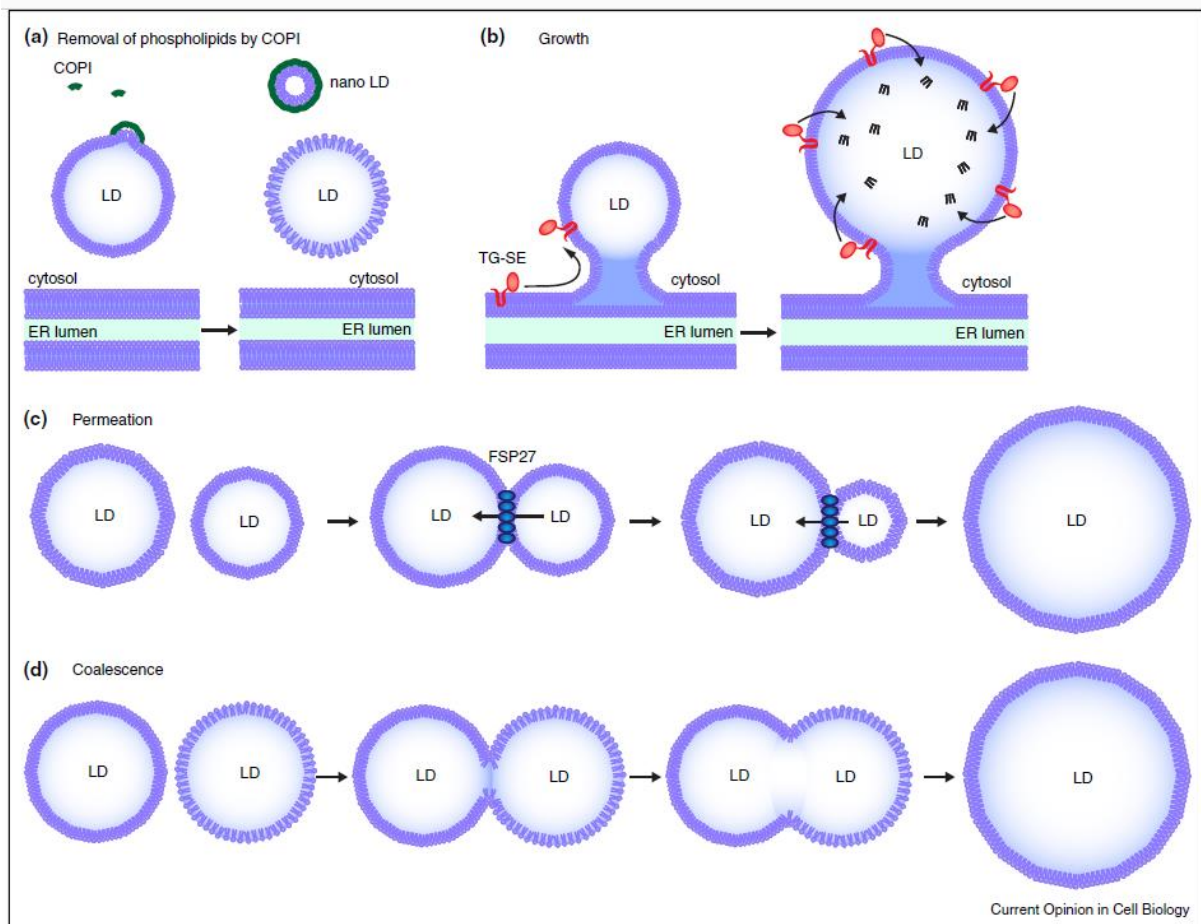
biogénèse de la LD sur le ER n'est probablement pas dû au hasard, certaines portions du ER étant apparemment dédiées à cette fonction (Ohsaki et al. 2009).



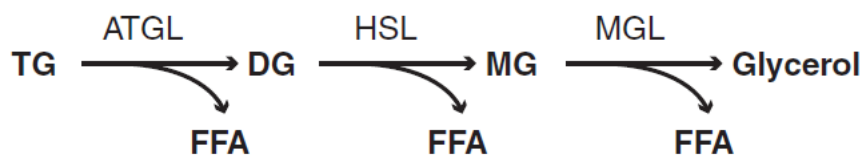
**Figure 21 : Modèles d'adressage de protéines membranaires arborant un motif en épingle à cheveux du réticulum endoplasmique (ER) vers les gouttelettes lipidiques (LD).** Les protéines membranaires incorporées à la membrane des LD peuvent accéder à celle-ci lors de sa formation, ou *via* des ponts avec le ER.

**A :** Incorporation lors de la formation de la LD. **B :** Incorporation *via* des ponts membranaires reliant le ER et la LD. **C :** Image de microscopie électronique à transmission montrant la présence d'un pont membranaire. Figure provenant de Kory et al. 2016.

Une fois la LD séparée du ER, ces deux organelles restent en étroite association, comme attesté par l'observation de ponts membranaires entre eux (Figure 21) (Barbosa et al. 2015; Wilfling, Thiam, et al. 2014; Jacquier et al. 2011). Cette association pourrait permettre l'approvisionnement de la LD en protéines membranaires et en lipides synthétisés dans le ER (Figure 21) (Kory et al. 2016; Wilfling, Thiam, et al. 2014). Plusieurs analyses protéomiques ont été effectuées dans le but de déterminer le protéome associé aux LD, que ce soit chez l'homme, chez la souris ou dans d'autres espèces, dans les adipocytes ou dans d'autres types cellulaires, en conditions basales ou suite à certains stimuli (Zhang, C. & Liu 2018; Ding et al. 2012; Yang, L. et al. 2012; Brasaemle et al. 2004). Un grand nombre de protéines ont ainsi été identifiées, parmi lesquelles, dans le TA murin, des protéines associées au métabolisme lipidique, au trafic membranaire et au transport, au cytosquelette, à la signalisation cellulaire, à la mitochondrie, au réticulum endoplasmique ou encore des chaperonnes et des histones (Ding et al. 2012; Zhang, C. & Liu 2018). Aucune APOL n'a été identifiée comme étant liée aux LD dans le TA murin, bien que d'autres apolipoprotéines (des précurseurs de l'APOA-I et de l'APOE) l'ont été (Ding et al. 2012). Au total, les protéines peuvent être recrutées à la surface des LD de quatre manières différentes. Certaines protéines possèdent une structure hydrophobe (qui peut être en épingle à cheveu ou se présenter sous forme d'un domaine hydrophobe) qui s'insère dans un seul feuillet membranaire (Kory et al. 2016; Zhang, C. & Liu 2018). Ces protéines peuvent donc facilement passer du ER à la LD lors de la formation de cette dernière ou par l'intermédiaire de ponts membranaires entre les deux (Jacquier et al. 2011). D'autres protéines provenant du cytosol interagissent avec la monocouche phospholipidique à l'aide d'hélices amphipathiques ou de domaines hydrophobes (Kory et al. 2016). C'est notamment le cas des périlipines (Kimmel & Sztalryd 2016). Finalement, certaines protéines interagissent de façon indirecte avec la LD par l'intermédiaire d'autres protéines déjà présentes à la surface de la LD, ou interagissent avec les phospholipides la composant grâce à une modification lipidique telle que la palmitoylation (Kory et al. 2016; Zhang, C. & Liu 2018). Bien que ces méthodes d'ancrage soient nécessaires à la localisation des protéines à la surface des LD, elles ne sont probablement pas suffisantes. Par exemple, une étude a montré que la cavéoline 1, en plus d'une structure en épingle à cheveu, possédait une séquence dotée d'une charge positive augmentant son potentiel de localisation à la surface des LD mais pas au ER (Ingelmo-Torres et al. 2009). L'encombrement stérique joue aussi un rôle important dans l'accès des protéines à la surface de la LD (Kory et al. 2015). Par exemple, une des fonctions des périlipines est de bloquer l'accès aux lipases lorsque la lipolyse n'est pas nécessaire.



**Figure 22 : Modèles de mécanismes de croissance des gouttelettes lipidiques (LD).** Les LD peuvent croître par synthèse de lipides additionnels ou par des phénomènes permettant de combiner deux LD. **(a)** La machinerie COPI retire des phospholipides de la membrane des LD, ce qui provoque une augmentation de la tension de surface et facilite l'interaction avec le réticulum endoplasmique (ER). **(b)** Les ponts membranaires liant les LD au ER permettent aux enzymes de synthèse de triglycérides de migrer vers les LD et de participer à leur croissance. **(c)** Les LD de petite taille peuvent transférer leurs lipides à des LD plus grandes *via* un procédé de perméation dans lequel la protéine FSP27 joue un rôle important. **(d)** Sous certaines conditions, par exemple en cas de tension de surface élevée, deux LD peuvent fusionner par coalescence. Figure provenant de Wilfling et al. 2014.



**Figure 23 : Les différentes étapes d'hydrolyse des triglycérides en acides gras.** Les triglycérides sont composés de 3 acides gras attachés à une molécule de glycérol. L'enzyme ATGL permet de catalyser la séparation d'un premier acide gras, formant ainsi un diglycéride. L'enzyme HSL permet de catalyser la seconde étape, ce qui produit un monoglycéride. Finalement, l'enzyme MGL permet de catalyser la séparation du dernier acide gras et du glycérol. Figure provenant de Nielsen et al. 2014.

Une fois formées, les LD sont très petites, ayant un diamètre de l'ordre de la centaine de nm, ce qui est encore loin des grandes LD observées dans les adipocytes matures, pouvant atteindre un diamètre de plus de 100  $\mu\text{m}$  (Olofsson et al. 2009). Les LD sont des organelles dynamiques, elles sont capables de grandir, de diminuer de taille, de fusionner, d'effectuer de la fission, de transférer des lipides de l'une à l'autre et de se déplacer au sein du cytoplasme. Plusieurs de ces processus sont illustrés à la Figure 22. La croissance de taille des LD provient de la synthèse de nouveaux TG *in situ* ou dans le ER (Wilfling, Haas, et al. 2014) tandis que la diminution de taille provient principalement de la lipolyse ou du transfert de lipides à une autre LD. La fusion des LD permet de diminuer la tension de surface de deux petites LD en en formant une plus grande. Ce processus nécessite leur rapprochement grâce au réseau de microtubules et des dynéines servant de moteur pour se déplacer (Boström et al. 2007). La liaison entre les deux LD se fait grâce au système de protéines SNAREs permettant la fusion de vésicules (Boström et al. 2007). Une fois en contact, les deux LD coalescent pour n'en former qu'une (Wilfling, Haas, et al. 2014).

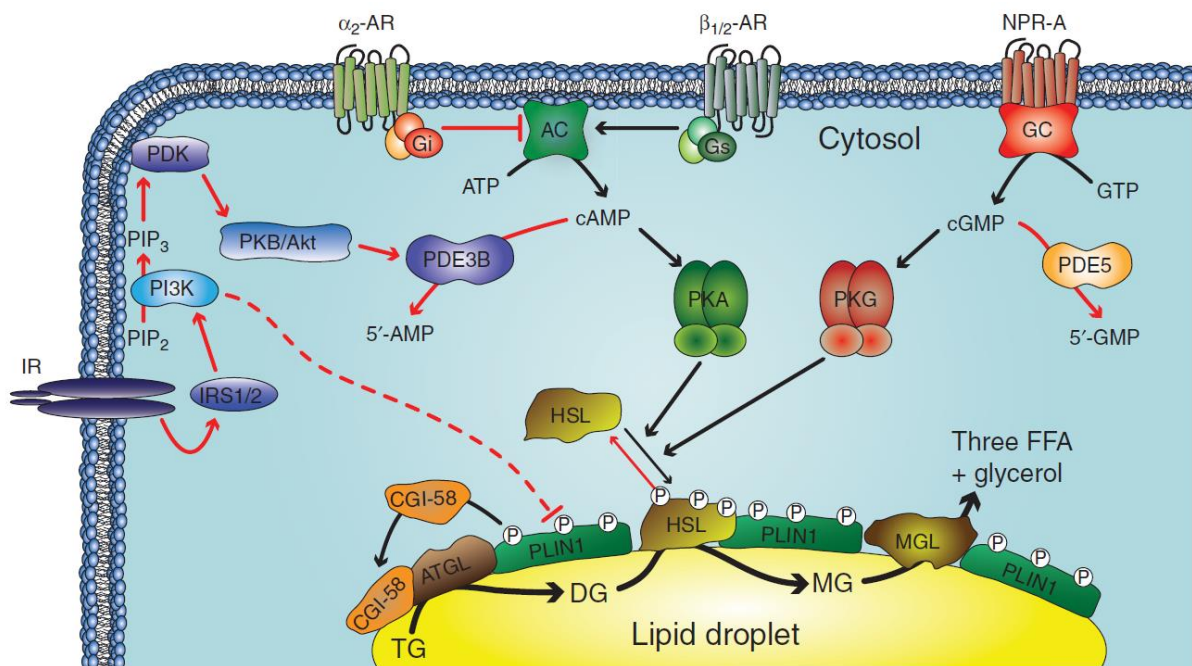
Le phénomène de fusion semble néanmoins relativement rare, et ne suffit en tout cas pas à expliquer seul la taille des LD (Boschi et al. 2015). Le processus dominant semble être le transfert de lipides d'une petite LD à une grande LD, jusqu'à la disparition de la première (Sun et al. 2013; Gong et al. 2011). Pour cela, une protéine essentielle est « *Fat-specific protein 27* » (Fsp27), aussi appelée CIDEc, présente au point de contact entre deux LD et activée par la périlipine 1, qui permettrait la création d'un pore entre les deux LD et le transfert de lipides de l'une à l'autre (Puri et al. 2007; Gong et al. 2011; Sun et al. 2013). Les deux autres protéines de la famille, CIDEa et CIDEb auraient une fonction similaire au sein des adipocytes bruns et des hépatocytes, respectivement (Gao et al. 2017).

#### **1.2.4. La lipolyse**

En cas de manque d'énergie dans l'organisme, l'adipocyte peut faire de la lipolyse. La lipolyse est induite par l'exercice physique ainsi que par la diète, tandis qu'elle est inhibée par l'ingestion d'aliments. Le but de la lipolyse est d'hydrolyser les TG stockés dans les LD en trois molécules d'acides gras et une molécule de glycérol, qui pourront ensuite être libérés dans la circulation et utilisés par d'autres cellules comme substrat pour la  $\beta$ -oxydation, qui permet de synthétiser des molécules d'ATP (Nielsen et al. 2014). L'hydrolyse des TG en acides gras se déroule en trois étapes, et nécessite trois enzymes différents (Figure 23). Premièrement, la lipase « *Adipose Triglyceride Lipase* » (ATGL) hydrolyse le TG pour donner un diglycéride et un acide gras. Ensuite, la « *Hormone Sensitive Lipase* » (HSL) hydrolyse le diglycéride en un

monoglycéride et un deuxième acide gras. Finalement, la « *Monoglyceride Lipase* » (MGL) clive le monoglycéride en une molécule de glycérol et un dernier acide gras. Au total, trois molécules d'acides gras et une molécule de glycérol sont obtenues par l'hydrolyse complète d'une molécule de TG. Celles-ci sont alors exportées hors de la cellule, entrent dans la circulation, et peuvent être utilisées pour la formation d'ATP par d'autres cellules.

La lipolyse est déclenchée par la stimulation de récepteurs  $\beta$ -adrénergiques couplés aux protéines G par des signaux extracellulaires, principalement des catécholamines (l'adrénaline et la noradrénaline) (Robidoux et al. 2004; Nielsen et al. 2014). Les catécholamines sont émises par la médullosurrénale et peuvent atteindre les adipocytes soit directement depuis des nerfs présents dans le TA, soit *via* la circulation sanguine. La TA blanc étant moins innervé que le TA brun, la voie passant par la circulation y est plus importante (Robidoux et al. 2004). Les catécholamines peuvent aussi inhiber la lipolyse en stimulant le récepteur  $\alpha$ 2-adrénergique, dont la sous-unité  $G_i$  a un effet inhibiteur, au contraire de la sous-unité  $G_s$  de son équivalent  $\beta$ -adrénergique qui a un effet stimulateur (Robidoux et al. 2004).



**Figure 24 : Les principales voies de signalisation contrôlant la lipolyse.** La lipolyse nécessite la phosphorylation de PLIN1 et de HSL par PKA ou PKG. La PKA est activée par l'AMPc, qui est produit par l'adénylate cyclase (AC). Celle-ci est stimulée par les récepteurs  $\beta$ 1/2-adrénergiques mais inhibée par le récepteur  $\alpha$ 2-adrénergique. La PKG est activée par le GMPc, produit par la guanylate cyclase (GC), qui est couplée au récepteur aux peptides natriurétiques (NPR-A). La stimulation du récepteur à l'insuline (IR) induit l'augmentation de l'activité de PDE3B, qui convertit l'AMPc en AMP, ce qui diminue l'activité lipolytique. Le GMPc est converti en GMP par PDE5, mais les événements en amont sont encore inconnus. Les flèches noires et les flèches rouges représentent des interactions pro- et anti-lipolytiques, respectivement. Figure provenant de Nielsen et al. 2014.

Qu'elles soient stimulatrices ou inhibitrices, suite à la liaison d'adrénaline sur le récepteur adrénergique, les sous-unités G vont interagir avec l'adénylate cyclase, présente sur la face cytosolique de la membrane plasmique. L'adénylate cyclase, lorsqu'elle est activée, permet la conversion d'ATP en AMPc. L'augmentation de la concentration en AMPc permet l'activation de la PKA (Rogne & Taskén 2014). La PKA peut alors phosphoryler un certain nombre de substrats, au nombre desquels la périlipine 1 (PLIN1) et HSL (Rogne & Taskén 2014).

Les périlipines sont une famille de protéines qui entourent étroitement la LD, bloquant son accès aux lipases. De plus, elles séquestrent CGI-58, un co-activateur de ATGL. Une fois PLIN1 phosphorylée, un changement de conformation rend l'accès possible aux lipases, libère CGI-58, permettant d'activer ATGL (Granneman et al. 2009). Cette dernière se dirige alors vers la surface de la LD pour catalyser la première étape de l'hydrolyse des TG en acides gras, tel qu'expliqué plus haut et illustré à la Figure 24. La phosphorylation de HSL par la PKA permet aussi son activation et son recrutement à la LD en interagissant avec PLIN1 (Rogne & Taskén 2014). En plus de la phosphorylation, HSL a besoin de former un complexe avec « *fatty acid binding protein 4* » (FABP4) pour pouvoir fonctionner et être recrutée à la LD (Smith, A. J. et al. 2007).

En parallèle à cette voie de signalisation passant par l'adrénaline, les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, l'adénylate cyclase et la PKA, il existe une deuxième voie similaire qui passe par l'activation de la guanylate cyclase par des peptides natriurétiques. La guanylate cyclase transforme le GTP en GMP cyclique qui active alors la PKG, ce qui induit la phosphorylation des mêmes cibles que la PKA, à savoir PLIN1 et HSL (Figure 24) (Sengenès et al. 2003).

Ces voies de signalisation stimulant la lipolyse peuvent être inhibées par l'action de l'insuline. Le récepteur à l'insuline est une tyrosine kinase qui, une fois activée, s'auto-phosphoryle et induit l'activation de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K). Celle-ci phosphoryle le PIP2 en PIP3, ce qui permet l'activation de Akt, une kinase qui active PDE3, dont la fonction est de dégrader l'AMPc en AMP, inhibant ainsi la lipolyse (Nielsen et al. 2014). Ces trois voies de signalisation principales sont schématisées à la Figure 24. D'autres voies de signalisation secondaires existent, impliquant le  $\text{TNF}\alpha$ , l'hormone de croissance, les glucocorticoïdes, ou encore d'autres hormones (Nielsen et al. 2014).

### 1.2.5. Le cytosquelette des adipocytes

Le cytosquelette joue un rôle important pour tous les types cellulaires. C'est non seulement lui qui confère les propriétés structurales et mécaniques à la cellule, mais il est aussi impliqué dans un grand nombre de procédés cellulaires, allant du déplacement des organites à l'expression de certains gènes, en passant par l'endocytose, la présentation antigénique, la motilité cellulaire et bien d'autres.

La morphologie des adipocytes est très caractéristique, ceux-ci étant sphériques et contenant une LD qui occupe jusqu'à 90% de leur volume. Le cytosquelette est activement impliqué dans la forme, l'organisation spatiale et les mouvements intracellulaires de ces cellules. Lors de l'adipogénèse, la morphologie de la cellule est bouleversée, ce qui implique d'importants changements cytosquelettiques.

Dans les adipocytes, le réseau de filaments intermédiaires est majoritairement composé de vimentine. Pendant l'adipogénèse, ces filaments sous forme de fibres traversant la cellule se réorganisent en une sorte de cage, ou de panier, qui entoure la LD (Franke et al. 1987). Ce phénomène semble jouer un rôle dans l'adipogénèse puisque la perturbation des filaments de vimentine suite à l'ajout de nocodazole réduit la formation des LD (Lieber & Evans 1996).

Comme dans le cas de filaments intermédiaires de vimentine, les fibres de microtubules se réorganisent aussi en forme de cages autour des LD naissantes (Yang, W. et al. 2013). Néanmoins, après cette phase de l'adipogénèse précoce, les microtubules se retrouvent ensuite dans une disposition périnucléaire (Yang, W. et al. 2013).

Le cytosquelette de microfilaments d'actine est également remodelé pendant l'adipogénèse. Néanmoins, au contraire des filaments intermédiaires et des microtubules, l'actine ne forme pas de cage autour des LD naissantes (Kanzaki & Pessin 2001). Lors de la différenciation, les fibres d'actine qui traversent les préadipocytes sous forme de fibres de stress sont remplacées par ce qu'on appelle de l'actine corticale, c'est-à-dire de plus petits filaments proches de la membrane plasmique (Kanzaki & Pessin 2001; Mor-Yossef Moldovan et al. 2018). Pour effectuer ce changement, la gelsoline semble impliquée, permettant la coupure des fibres en plus petits filaments. En effet, il a été montré que la gelsoline est essentielle à l'adipogénèse (Kawaji et al. 2010). L'inhibition de l'expression de la gelsoline par RNAi empêche les préadipocytes 3T3-L1 de se différencier, notamment en inhibant l'expression de *PPAR $\gamma$*  et de *C/EBP $\alpha$* , et en inhibant la phase d'expansion clonale mitotique, tout ceci résultant en une plus faible accumulation de LD (Kawaji et al. 2010).

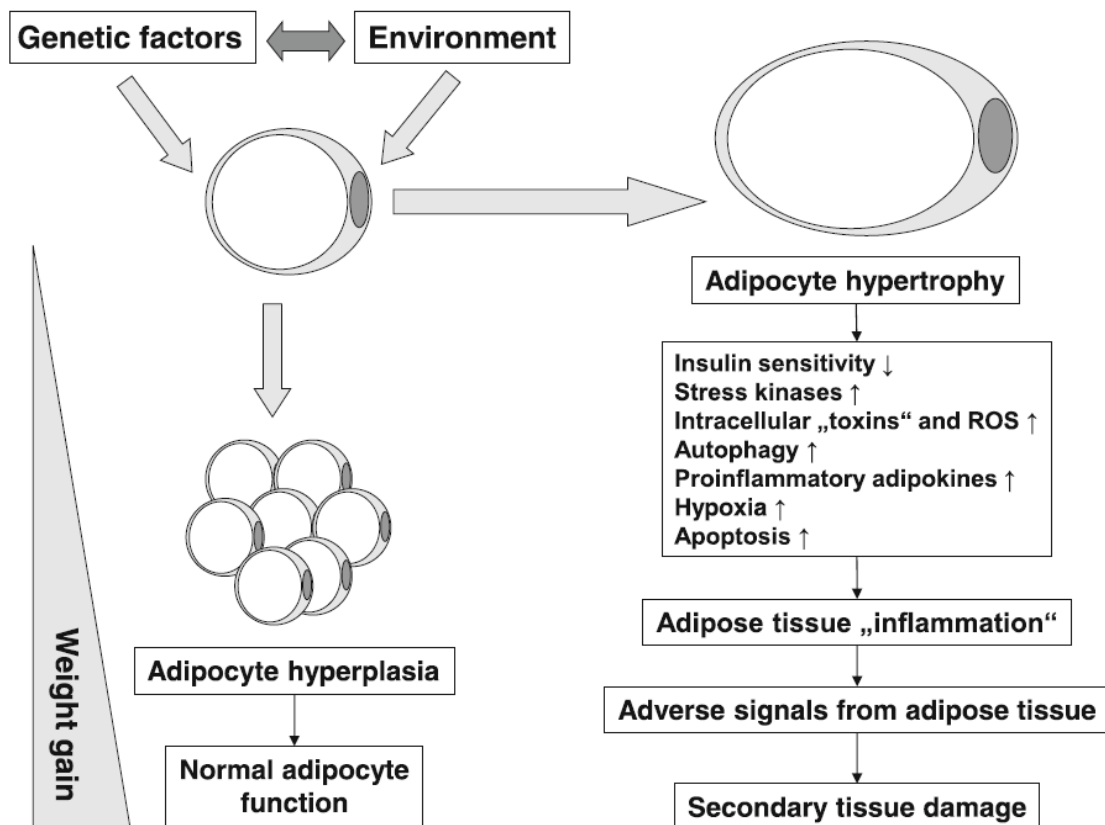


Outre l'adipogénèse, le cytosquelette d'actine, en association avec les protéines motrices myosines, est aussi impliqué dans différents processus de la biologie des adipocytes eux-mêmes. Ainsi, il a été montré que la myosine non musculaire II A (NMIIA) est impliquée dans l'adressage des vésicules contenant le transporteur de glucose GLUT4, la leptine et l'adiponectine vers la membrane plasmique (Bedi et al. 2017; Stall et al. 2014; Steimle et al. 2005; Kee et al. 2015).

Les protéines du cytosquelette peuvent aussi avoir un impact sur la taille des LD. Les syntrophines sont des protéines adaptatrices formant des complexes à la membrane plasmique qui permettent de relier certains récepteurs à leurs effecteurs en aval, facilitant ainsi la transmission de différents signaux extracellulaires à l'intérieur de la cellule (Bhat et al. 2013). L'utrophine, qui est similaire à la dystrophine, se lie à l'actine d'une part et aux syntrophines d'autre part, et participe ainsi au lien entre le cytosquelette d'actine et la matrice extracellulaire (Bhat et al. 2013). Les éléments de ces complexes, aussi connus pour être impliqués dans des myopathies comme la dystrophie musculaire de Duchenne (Shieh 2018), ont été détectés dans des préadipocytes et des adipocytes dans la lignée de cellules murines 3T3-L1, notamment associés aux LD (Krautbauer et al. 2018; Romo-Yáñez et al. 2011). Selon une étude récente, l'inhibition de l'expression de la syntrophine  $\beta 2$  ou de l'utrophine par interférence ARN résulte en une augmentation de la taille des LD dans les adipocytes, sans impact sur l'adipogénèse en elle-même (Krautbauer et al. 2018). Cet accroissement de taille des LD s'est accompagné d'un plus faible nombre de LD, et ni la lipogénèse, ni la lipolyse n'étaient impactées, ce qui suggère plutôt une augmentation des épisodes de fusion ou de transfert de lipides des petites LD aux plus grandes. De plus, la quantité d'actine était diminuée, ce qui s'explique par le fait que l'utrophine est impliquée dans la dynamique de l'actine (Krautbauer et al. 2018; Rybakova et al. 2002).

Une autre étude récente a démontré l'implication de l'actine, de NMIIA et de la formine FMNL1 (« *formin-like 1* ») dans la dissociation des LD de cellules U2OS (Pfisterer et al. 2017). Dans ce travail, les auteurs ont montré : (1) que FMNL1 promeut l'assemblage de fibres d'actine autour d'une LD et recrute NMIIA ; (2) que NMIIA et FMNL1 se localisent aux sites de dissociation des LD, c'est-à-dire à l'endroit où une LD est séparée en deux lors d'un épisode de fission ; et (3) que l'inhibition de NMIIA par siRNA résulte en un plus faible nombre de LD mais que celles-ci sont plus grosses et plus riches en triglycérides (Pfisterer et al. 2017). Par conséquent, les auteurs proposent que ces différents éléments assistent à la fission des LD en assemblant un anneau d'actine autour de celles-ci grâce à l'action de FMNL1, et en contractant

celui-ci dans une action de pincement grâce à la force motrice de NMIIA (Pfisterer et al. 2017).

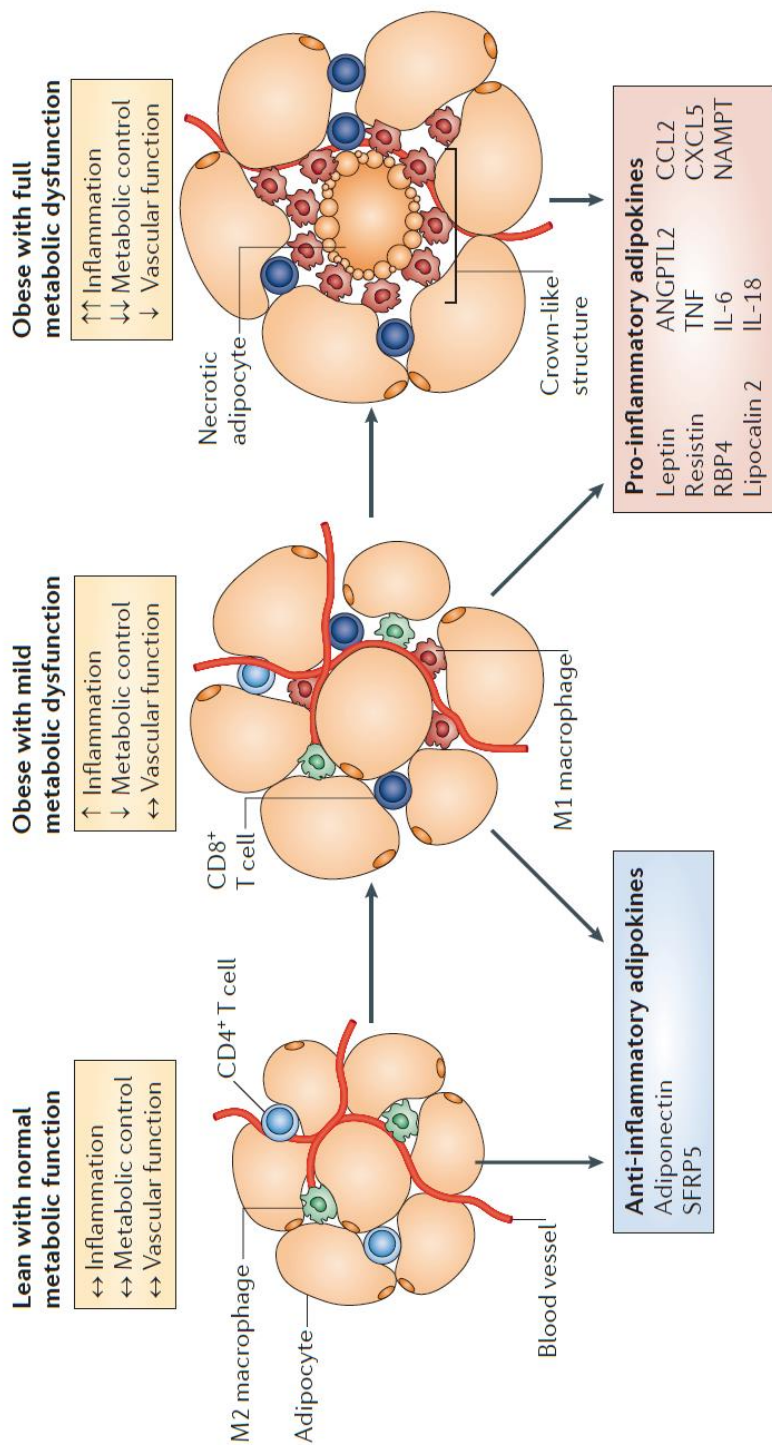


**Figure 25 : Hyperplasie et hypertrophie des adipocytes : impacts sur le tissu adipeux.** Une balance énergétique continuellement positive provoque une accumulation de lipides. Selon les prédispositions génétiques ainsi que l’environnement, certains individus vont plutôt stocker ces lipides en augmentant le nombre d’adipocytes (hyperplasie), ce qui est associé à une fonction normale des adipocytes. Néanmoins, la plupart des individus vont plutôt augmenter la taille des adipocytes (hypertrophie), ce qui est souvent associé à des défaillances de la fonction adipocytaire et à des pathologies liées à l’obésité. Figure provenant de Klöting et Blüher 2014.

### **1.2.6. L'obésité, la résistance à l'insuline et l'inflammation du tissu adipeux**

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, en 2016, 39% de la population adulte mondiale était en surpoids, et 13% était obèse (Organisation Mondiale de la Santé, 2016). La surcharge pondérale est définie par un indice de masse corporelle (la masse en kg divisée par le carré de la taille en m) entre 25 et 30 kg/m<sup>2</sup>, tandis que l'obésité se situe au-delà de 30 kg/m<sup>2</sup>. Les causes majeures de l'obésité sont d'une part une consommation trop élevée de calories, due à une alimentation excessive et/ou comprenant trop de graisses et de sucres, et d'autre part une dépense de calories trop faibles, due à un manque d'activité physique. Ce déséquilibre dans la balance énergétique induit un flux positif net d'énergie dans l'organisme et une augmentation du stockage de celle-ci dans les adipocytes au sein du TA. L'obésité n'est qu'une facette de toute une série de dysfonctionnements regroupés sous le nom de syndrome métabolique. Outre l'obésité, les patients ayant le syndrome métabolique présentent une dyslipidémie (trop de lipides dans le sang), une hyperglycémie (trop de glucose dans le sang), une hyperinsulinémie (trop d'insuline dans le sang), de l'hypertension et de la résistance à l'insuline (Samson & Garber 2014). Les conséquences du syndrome métabolique sont multiples et comprennent une augmentation des risques de développer des maladies cardiovasculaires, du diabète de type II, de l'ostéoarthrite, une cirrhose du foie non alcoolique, plus de 10 types de cancers, des apnées du sommeil, etc. (Samson & Garber 2014).

L'obésité est caractérisée principalement par l'expansion du TA, afin de stocker l'énergie apportée en excès à l'organisme. Lorsque le TA s'étend, cela peut se dérouler de deux manières, non exclusives. Soit le nombre d'adipocytes augmente, ce qui est connu sous le nom d'hyperplasie, soit le nombre d'adipocytes reste plus ou moins constant mais leur taille augmente, chacun accumulant plus de lipides, ce qui correspond à l'hypertrophie (Björntorp & Sjöström 1971). Puisque les adipocytes déjà différenciés ne peuvent plus se diviser, l'augmentation du nombre d'adipocytes par hyperplasie provient exclusivement de l'adipogénèse *de novo* de préadipocytes (Wang, Q. A. et al. 2013). Alors que l'expansion par hyperplasie induit peu d'effets négatifs, car les adipocytes restent « normaux » (on parle d'obésité métaboliquement saine), l'expansion par hypertrophie engendre des effets délétères (Figure 25) (Klötting & Blüher 2014). En effet, l'hypertrophie des adipocytes provoque un stress cellulaire qui déclenche l'inflammation de bas grade dans le TA et la résistance à l'insuline. Par conséquent l'augmentation des risques de développer des maladies cardiovasculaires ou le diabète de type II est corrélée à l'hypertrophie des adipocytes.



**Figure 26 : Modulation phénotypique du tissu adipeux au cours de la prise de poids.** Le tissu adipeux sain est constitué d'adipocytes, de vaisseaux sanguins et de cellules immunitaires tolérantes telles que des macrophages M2, lymphocytes T CD4, des éosinophiles, etc. Lorsque l'obésité se développe, les adipocytes augmentent en taille pour stocker les lipides excédentaires. L'hypertrophie adipocytaire engendre le recrutement de cellules immunitaires pro-inflammatoires telles que les macrophages M1 et les lymphocytes T CD8, mais le tissu peut maintenir ses fonctions métaboliques. Néanmoins, ces changements peuvent s'aggraver et aboutir à une dysfonction métabolique caractérisée par une infiltration importante de cellules pro-inflammatoires, de la nécrose adipocytaire et la formation de structures en forme de couronne par les macrophages autour de ces adipocytes nécrotiques. Les adipokines sécrétées par les adipocytes, anti-inflammatoires dans le tissu sain, sont aussi remplacées par des adipokines pro-inflammatoires en conditions d'obésité. Figure provenant de Ouchi et al., 2011.

### *La résistance à l'insuline*

La contribution du TA hypertrophié au diabète passe par la résistance des adipocytes à l'insuline. Cette molécule, sécrétée par les cellules  $\beta$  du pancréas lorsque la concentration de glucose dans le sang est élevée comme après un repas par exemple, déclenche une voie de signalisation chez les adipocytes qui favorise la translocation de vésicules contenant les transporteurs GLUT4 à leur membrane plasmique (Govers 2014). GLUT4 permet ensuite d'augmenter l'import de glucose dans les adipocytes et donc de diminuer sa concentration en circulation. L'insuline agit également au niveau du foie pour empêcher la production de glucose endogène, appelée gluconéogenèse (Han, H. S. et al. 2016). Lorsque les adipocytes sont dits résistants à l'insuline, cela signifie que l'effet de l'insuline est atténué et qu'il en faut de plus hautes concentrations pour produire le même effet. Les cellules  $\beta$  du pancréas augmentent donc leur production d'insuline ce qui crée un stress qui mène, à terme, à leur apoptose et donc à la déplétion de cette population cellulaire (Ma et al. 2012). À un certain point, la production d'insuline devient trop faible pour avoir un effet et l'organisme est incapable de contrôler la concentration de glucose dans le sang, ce qui provoque une hyperglycémie caractéristique du diabète de type II (Dostou & Gerich 2001).

### *Le stress adipocytaire et le déclenchement de l'inflammation*

L'hypertrophie met les adipocytes sous stress (Figure 26), ce qui rend ceux-ci résistants à l'insuline et provoque un taux de synthèse de TG et un taux de lipolyse plus élevés (Blüher 2013). L'hypoxie générée dans le tissu due à la diminution du réseau vasculaire (Fleischmann et al. 2005) ainsi qu'à la surcharge de nutriments, principalement des acides gras, augmente le stress du ER et active la réponse UPR (« *unfolded protein response* »). Celle-ci implique la transcription de gènes promouvant le repliement et la dégradation de protéines, mais peut aboutir à des réactions inflammatoires et à l'apoptose si le stress se maintient (Khan & Wang 2014). Le taux d'apoptose des adipocytes est d'ailleurs augmenté dans le TA de personnes ou de souris obèses (Alkhoury et al. 2010). Les voies de signalisation liées au stress, p38 MAPK et Jun N-terminal kinase (JNK), sont activées chez les patients obèses ayant majoritairement des adipocytes hypertrophiés (Rudich et al. 2007). Ces différents stress aboutissent à la sécrétion de plus d'adipokines pro-inflammatoires et au recrutement de cellules immunitaires dans le tissu. Notamment, les macrophages sont recrutés par la mort des adipocytes et se localisent autour de ceux-ci, formant ainsi des structures en forme de couronne caractéristiques (Cinti et al. 2005).

### *L'influence du système immunitaire dans le tissu adipeux et l'inflammation de bas grade*

En conditions basales, les cellules immunitaires présentes dans le TA sont tolérogènes, non inflammatoires, orientées vers un phénotype de type Th2. Celles-ci comprennent des macrophages M2, des éosinophiles, des lymphocytes T régulateurs, et des ILC2. Les cytokines sécrétées sont les interleukines (IL) IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 ou IL-33 (Chung et al. 2018). Les macrophages ont un phénotype appelé M2, ou alternativement activé, au contraire du phénotype pro-inflammatoire M1, ou classiquement activé (Weisberg et al. 2003). Les macrophages M2 consomment des acides gras comme substrat énergétique et ont des fonctions immunosuppressives telles que la réparation des tissus et dans l'ensemble contribuent à l'homéostasie de leur environnement (Hill et al. 2014). Par exemple, ils phagocytent les adipocytes morts et leurs contenus intracellulaires dans le but d'éviter le déclenchement de l'inflammation. Cet environnement tolérogène participe aussi au maintien de la sensibilité des adipocytes à l'insuline et promeut la thermogénèse et l'adipogénèse d'adipocytes beiges (Qiu et al. 2014; Brestoff et al. 2015).

Lorsque l'obésité se déclenche, l'environnement immunitaire du tissu change et devient pro-inflammatoire. Les populations de cellules de phénotype Th2 diminuent et sont remplacées par des cellules pro-inflammatoires de phénotype Th1 qui infiltrent le tissu. Parmi celles-ci, des monocytes qui se différencient en macrophages M1, des neutrophiles, des lymphocytes CD4 Th1 et des lymphocytes CD8 cytotoxiques (Kanda et al. 2006).

L'augmentation du nombre de monocytes et de macrophages est particulièrement significative. Ainsi, les macrophages représentent environ 10% des cellules du TA en conditions normales, alors que cette proportion monte à 40% en cas d'obésité (Weisberg et al. 2003). Leur recrutement au niveau du TA d'individus obèses est aidé par la sécrétion des chémokines MCP-1 et CCL5 par les adipocytes et les macrophages résidents du TA respectivement (Chung et al. 2018). Dans le tissu, les contacts d'adhésion entre les adipocytes et les macrophages par le biais de l'intégrine  $\alpha 4$  et de VCAM sont aussi importants pour la rétention de ces derniers dans le TA (Chung et al. 2017). En plus du recrutement, l'augmentation de la population de macrophages est aussi causée par la prolifération de ceux-ci dans le TA. Ainsi, il a été montré que le marqueur de prolifération Ki67 était surexprimé en cas d'obésité (Amano et al. 2014). Finalement, les macrophages peuvent aussi passer d'un phénotype M2 à un phénotype M1 par transdifférenciation.

Les macrophages M1 sont caractérisés par l'expression de CD11c à leur surface. Ils

consomment du glucose comme substrat énergétique et contribuent à l'inflammation du tissu (Hill et al. 2014). Ils produisent du NO, du TNF $\alpha$ , de l'IFN $\gamma$ , de l'IL-1 $\beta$ , de l'IL-6, de l'IL-12 et de l'IL-23 (Hao et al. 2012). Ils expriment aussi des chémokines permettant de recruter des lymphocytes Th1 : CXCL9 et 10 (Martinez et al. 2006). Ils expriment des taux élevés de « *Toll-like receptors* » (TLRs) permettant de reconnaître des signaux de danger tels que des microorganismes pathogènes ou des problèmes internes tels que des lésions, etc. (Kawai & Akira 2011). Les macrophages M1 expriment fortement l'hétérodimère TLR4/TLR2, dont un ligand bien connu est le lipopolysaccharide (LPS) bactérien. La présence de LPS a été détectée au sein du TA de personnes obèses, même en l'absence de bactéries dans le tissu, ce qui contribue à l'inflammation de bas grade. Le LPS observé dans le TA provient en grande partie du microbiote intestinal.

En plus de macrophages M1, d'autres cellules immunitaires pro-inflammatoires infiltrent le TA d'individus obèses. Parmi celles-ci, les neutrophiles sont les plus rapides, leur concentration augmentant déjà 3 jours après le début d'un régime riche en graisses chez la souris (Talukdar et al. 2012). En conséquence, la concentration en élastase, une sérine-protéase notamment produite par les neutrophiles, est augmentée dans le tissu. Ceci conduit à la dégradation du collagène IV de la matrice extracellulaire et participe au développement de la résistance à l'insuline en dégradant le récepteur à l'insuline chez les adipocytes (Talukdar et al. 2012). Les neutrophiles produisent également de la myéloperoxydase, qui contribue également à l'inflammation (Borato et al. 2016).

De façon similaire aux macrophages, les ILC sont présentes dans le TA sain sous forme de ILC2, alors que dans le TA obèse, le phénotype ILC1 prédomine. Les ILC2 sécrètent de l'IL-5 et de l'IL-13, ce qui favorise le maintien des populations d'éosinophiles et de macrophages M2 (Molofsky et al. 2013). Ils participent aussi à l'induction de la différenciation d'adipocytes beiges en sécrétant des peptides qui induisent l'expression d'UCP1 chez les adipocytes (Brestoff et al. 2015). De plus, l'IL-33 est une cytokine importante pour l'induction des ILC2 et est aussi liée à la prise de poids. Ainsi, des souris IL-33 KO présentent moins d'ILC2 et prennent plus de poids que des souris contrôles, même lorsqu'elles sont soumises à un régime normal. Or, l'injection d'IL-33 provoque le retour à un poids normal et induit une augmentation du nombre d'ILC2 et de macrophages M2 dans le TA (Brestoff et al. 2015). Les ILC1, au contraire, sont pro-inflammatoires et sécrètent du TNF $\alpha$  ainsi que de grandes quantités d'IFN $\gamma$ , ce qui promeut la polarisation des macrophages vers un phénotype M1 et contribue à la résistance à l'insuline (O'Sullivan et al. 2016; Saetang & Sangkhathat 2018). L'IFN $\gamma$

contrecarre également l'action de l'IL-33 et interfère ainsi avec l'activation des ILC2 (Molofsky et al. 2015). Récemment, une étude a montré que les patients souffrant de diabète de type II avaient un plus grand nombre d'ILC1 dans le TA et en circulation (Liu, F. et al. 2018). Finalement, bien qu'aucune étude ne lie directement les ILC3 avec la prise de poids, il a été montré que l'IL-17 et l'IL-22, deux cytokines produites par les ILC3, sont associées à des maladies liées à l'obésité et au syndrome métabolique (Saetang & Sangkhathat 2018).

### *L'influence du sexe sur la prise de poids*

La prise de poids n'affecte pas les individus masculins et féminins de la même manière. En moyenne, les femmes ont une adiposité plus élevée que les hommes. Ainsi, la proportion de graisses dans l'organisme d'une femme adulte ayant un BMI entre 20 et 25 kg/m<sup>2</sup> varie de 25% à 35%, tandis que celle-ci varie de 10% à 20% chez les hommes (Santosa & Jensen 2015). À indice de masse corporelle égal, les femmes ont en moyenne 10% plus de graisses que les hommes (Karastergiou et al. 2012). Néanmoins, les femmes sont moins susceptibles de développer les maladies associées à l'obésité telles que le diabète de type II et les maladies cardiovasculaires (Manolopoulos et al. 2010). Ceci est dû au fait que l'obésité chez les femmes, bien que plus importante, est aussi plus saine que chez les hommes (du moins avant la ménopause). Plusieurs raisons expliquent ce phénomène.

Premièrement, les hommes et les femmes ont tendance à accumuler les graisses dans des dépôts de TA différents dans le corps. Alors que chez les hommes les dépôts viscéraux (le ventre) seront les plus importants, les femmes stockeront plus de graisses dans les dépôts sous-cutanés du bas du corps (les hanches, les cuisses et les fesses) (Yim et al. 2008; Demerath et al. 2007). Or les effets négatifs de l'obésité sont plus associés aux dépôts viscéraux qu'aux dépôts sous-cutanés (Manolopoulos et al. 2010). En effet, dans les dépôts viscéraux, les adipocytes ont tendance à croître par hypertrophie, ce qui engendre un stress adipocytaire, le recrutement des cellules pro-inflammatoires et donc la mise en place de l'inflammation de bas grade (Klötting & Blüher 2014). À l'inverse, les dépôts sous-cutanés s'étendent majoritairement par hyperplasie, ce qui correspond à la multiplication des adipocytes et à une obésité plus saine. Ainsi, les adipocytes des dépôts sous-cutanés sont généralement plus petits en taille que leurs homologues des dépôts viscéraux, même en conditions non obèses (Lafontan 2012).

Ensuite, les hormones sexuelles influencent la prise de poids et la répartition des graisses (Karastergiou et al. 2012; Varlamov et al. 2014). En effet, les différences d'adiposité entre hommes et femmes débutent à la puberté, et se terminent à la ménopause (Polotsky & Polotsky 2010). Après la ménopause, les femmes ont tendance à accumuler les graisses de façon similaire

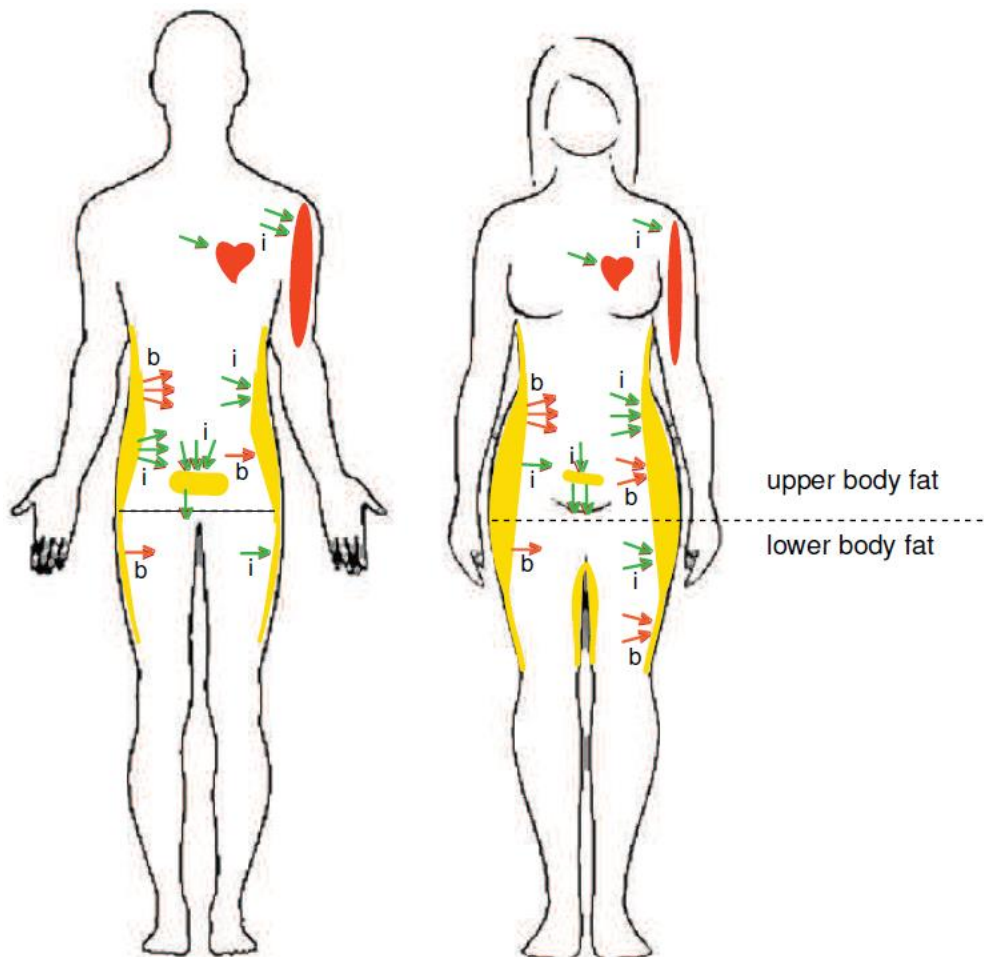


aux hommes, et leur risque de développer des maladies cardiovasculaires augmente parallèlement (Polotsky & Polotsky 2010). Plusieurs modèles humains et murins ont été utilisés pour étudier l'influence des hormones sexuelles sur la prise de poids. Chez l'humain, des études ont été faites sur des femmes avant et après ménopause, sur des femmes atteintes du syndrome des ovaires polykystiques, et sur des personnes entreprenant un traitement hormonal pour changer de sexe. Chez la souris, des expériences de stérilisation de mâles ou d'ovariectomie de femelles, ainsi que l'utilisation de modèles génétiques déficients pour certaines hormones ont été utilisés. Ces différentes études ont collectivement permis de démontrer que les hormones sexuelles étaient déterminantes dans la balance métabolique. Les hormones qui ont été le plus étudiées et qui semblent être le plus impliquées dans la balance métabolique sont les œstrogènes.

Le 17 $\beta$ -éthynyl-estradiol, l'œstrogène prédominant pendant la période reproductive d'un individu, inhibe l'expression du gène de la lipoprotéine lipase, une enzyme impliquée dans la lipogénèse, et augmente l'expression du gène de la lipase HSL, impliquée dans la lipolyse (Jelenik & Roden 2013). Ces deux actions, ensemble, résultent en une plus faible accumulation de triglycérides dans les adipocytes. Le 17 $\beta$ -éthynyl-estradiol agit également au niveau du foie où il diminue la gluconéogenèse et l'accumulation de graisse, au niveau du pancréas où il stimule la production d'insuline, ou encore au niveau du cerveau où il promeut l'augmentation de l'activité physique et la diminution de l'appétit (Jelenik & Roden 2013; Varlamov et al. 2014). Les œstrogènes participent également à l'environnement anti-inflammatoire du TA, leur diminution induisant le recrutement de cellules immunitaires pro-inflammatoires (Vieira Potter et al. 2012).

La progestérone a un effet antagoniste à celui des œstrogènes sur le métabolisme du glucose et son utilisation par les muscles. Alors que les œstrogènes promeuvent la sensibilité à l'insuline, et l'utilisation de glycogène par les cellules musculaire, la progestérone promeut la résistance à l'insuline et la  $\beta$ -oxydation des acides gras comme source d'énergie pour les muscles (Varlamov et al. 2014). Chez les femelles, la progestérone promeut aussi l'induction de l'expression d'enzymes lipogéniques et l'expansion du TA (Stelmanska & Swierczynski 2013).

Les androgènes (dont fait partie la testostérone) ont un effet positif sur l'état métabolique des individus. Une déficience en androgènes tant chez l'homme que chez des souris mâles est associée à la résistance à l'insuline et à l'obésité, ce qui est remédié par un traitement à la testostérone (Varlamov et al. 2014).



**Figure 27 : Comparaison de la balance entre lipogénèse et lipolyse entre l’homme et la femme.** La lipogénèse est représentée par des flèches rentrantes dans le tissu, tandis que la lipolyse est représentée par des flèches sortantes du tissu. La distinction est faite entre la situation en conditions basales (b, flèches rouges) et la situation en conditions d’induction par l’insuline (i, flèches vertes). Figure provenant de Varlamov 2014.

Enfin, outre l'influence des hormones, les différences sexuelles dans le métabolisme proviennent également d'une différence de transport, d'accumulation et d'élimination des acides gras au sein même du TA (Wang, X. et al. 2011). En ce qui concerne le transport des lipides au moyen de lipoprotéines dans le plasma, il a été observé que les taux de triglycérides et de cholestérol associés aux HDL sont plus élevés chez les femmes, mais que ceux correspondant aux LDL, aux VLDL et aux chylomicrons sont plus élevés chez les hommes (Wang, X. et al. 2011). Bien que la sécrétion des LDL et VLDL soit plus rapide chez les femmes, leur concentration dans le plasma est plus faible grâce à un taux d'élimination encore plus rapide (Wang, X. et al. 2011; Santosa & Jensen 2015). Ceci explique en partie la prévalence plus faible des maladies cardiovasculaires chez les femmes avant la ménopause.

Au niveau du TA lui-même, *in fine*, l'accumulation de graisse dépend de la balance entre la lipogénèse et la lipolyse (Santosa & Jensen 2015; Varlamov et al. 2014). Ces phénomènes sont difficiles à étudier indépendamment car ils sont eux-mêmes fortement influencés par les hormones. De plus, l'intensité de la lipogénèse et de la lipolyse varie d'un dépôt de TA à l'autre, et varie selon que l'organisme soit au repos, en activité, au sommeil, à jeun ou après un repas, etc. La lipolyse et la lipogénèse sont actives en conditions basales mais peuvent être aussi induites par l'insuline selon les différentes conditions citées plus haut. Dans les grandes lignes, il ressort que dans le TA sous-cutané, la lipolyse basale est similaire entre hommes et femmes, mais la lipolyse induite est plus élevée chez les hommes, tandis que la lipogénèse, tant basale qu'induite y est plus élevée chez les femmes. La résultante est une plus grande accumulation de graisses dans le TA sous-cutané chez la femme (Varlamov et al. 2014). À l'inverse, dans le TA viscéral, la lipolyse est plus faible chez les hommes que chez les femmes, tandis que la lipogénèse y est plus élevée. Cela aboutit donc à une plus grande masse de TA viscéral chez les hommes (Varlamov et al. 2014). Ces différentes observations sont reprises sur la figure 27.



## 2. Objectif du travail

L'objectif de ce travail était de tenter d'éclaircir le rôle de l'APOL6 murine au sein du tissu adipeux de la souris, et plus particulièrement au sein des adipocytes.

À l'entame de ce projet, bien que nous eussions déjà des informations sur d'autres membres de la famille des APOLs, nous ne savions presque rien sur ce gène particulier, si ce n'est sa position sur le chromosome et sa séquence génomique. Suite à des résultats préliminaires incomplets, nous étions amenés à croire que l'APOL6 était exprimée majoritairement dans l'intestin, ce qui s'est avéré ne pas être le cas. Le projet s'est ensuite articulé autour de la recherche du site majeur d'expression de l'APOL6. Comme les résultats le montreront, il s'agit des adipocytes dans le tissu adipeux.

Une fois la localisation tissulaire et cellulaire de l'APOL6 déterminée, nous avons entrepris de l'étudier sous deux aspects majeurs. Premièrement, nous avons voulu explorer les conditions dans lesquelles la transcription du gène pouvait être activée ou inhibée. Pour cela, un modèle de culture *in vitro* a été utilisé : la lignée de cellules 3T3-L1, différenciables en adipocytes. Ces cellules ont été soumises à des stimuli de diverses natures et l'expression de l'APOL6 a été mesurée par qRT-PCR pour déterminer si les stimuli avaient engendré un effet. Deuxièmement, nous avons utilisé un modèle de souris *APOL6* KO dans le but de rechercher un phénotype observable nous permettant d'approfondir l'étude de la fonction de l'APOL6. Pour atteindre ce but, nous avons utilisé les souris pour l'étude de l'APOL6 *in vivo*, et nous avons extrait des cellules souches mésenchymateuses du tissu adipeux de ces souris pour les différencier en adipocytes et les étudier *in vitro*. Ici, c'était la comparaison entre les souris WT et les souris *APOL6* KO qui a été mise en avant dans l'étude.

Finalement, ces différentes informations collectées, et en tenant compte des éléments connus sur d'autres APOLs, nous avons tenté de présenter un modèle expliquant une fonction possible de l'APOL6 au sein des adipocytes.



# Matériels & Méthodes





## 3. Matériel et méthodes

### 3.1. Analyse bioinformatique de l'APOL6

#### 3.1.1. Prédiction de la structure secondaire

Afin d'avoir un aperçu des principales structures possibles adoptées par la protéine, une prédiction de sa structure secondaire a été effectuée à l'aide de 2 méthodes : GOR et SOPMA.

##### *GOR*

GOR est une méthode de prédiction de structure secondaire développée par Garnier, Osguthorpe et Robson basée sur des probabilités que chaque acide aminé se retrouve impliqué dans une certaine structure (Garnier et al. 1978). Ces probabilités sont dérivées de résultats empiriques obtenus par cristallographie aux rayons X. En plus de l'acide aminé en question, GOR prend aussi en compte les 8 acides aminés de part et d'autre de celui-ci. Il s'agit donc de la probabilité conditionnelle qu'un acide aminé  $x$  prenne telle conformation, sachant qu'il est entouré des acides aminés  $[x-8, x-7, \dots, x+7, x+8]$ . Notre analyse de l'APOL6 a été effectuée à l'aide de l'outil GOR4 en ligne fourni par le PBL (Pôle Bioinformatique Lyonnais) à l'adresse suivante :

[http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_gor4.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html)

##### *SOPMA*

SOPMA (« *Self-Optimized Prediction Method With Alignment* ») est une méthode basée sur l'alignement de la protéine d'intérêt sur une base de données de protéines de structure connue. Notre analyse de l'APOL6 a été effectuée à l'aide de l'outil en ligne fourni par le PBL (Pôle Bioinformatique Lyonnais) à l'adresse suivante :

[http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_sopma.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)

#### 3.1.2. Prédiction de la localisation subcellulaire

Afin de mieux cerner la localisation subcellulaire de l'APOL6, une analyse bioinformatique a été effectuée à l'aide de deux outils. Connaître la localisation de la protéine est d'un intérêt tout particulier, puisque cela peut influencer les protocoles de certaines expériences, comme les méthodes d'extraction de la protéine, par exemple.

##### *TargetP*

Le premier outil utilisé, TargetP, a été fourni en ligne par le CBS (Center for Biological

Sequence analysis, Technical University of Denmark) à l'adresse suivante :

<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>

Celui-ci recherche dans la séquence de la protéine la présence d'une séquence N-terminale d'adressage de la protéine vers la mitochondrie ou vers le réticulum endoplasmique et le système d'adressage à la membrane plasmique de la cellule.

### *Psort II*

Le second outil de prédiction de localisation subcellulaire utilisé est Psort II, fourni par le Human Genome Center de l'université de Tokyo, et disponible à l'adresse suivante : <http://psort.hgc.jp/form2.html>

Celui-ci regroupe plusieurs outils différents et fournit en résultat une probabilité que la protéine se retrouve dans tel ou tel compartiment cellulaire. Il recherche non seulement les séquences signal vers différents compartiments (noyau, mitochondrie, peroxysome, etc.), mais également des motifs typiques des protéines de certains compartiments, comme des hélices transmembranaires par exemple.

### **3.1.3. Prédiction de domaines transmembranaires**

Une recherche d'hélices transmembranaires a aussi été effectuée. La plupart des outils bioinformatiques se basent sur l'hydrophobicité des acides aminés le long de la protéine pour déterminer l'existence de régions transmembranaires. Nous avons utilisé un outil fourni par le CBS à l'adresse suivante : <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>

### **3.1.4. Prédiction de sites de modifications post-traductionnelles**

Plusieurs outils permettant de prédire les sites pouvant être sujets aux modifications post-traductionnelles les plus courantes ont été utilisés :

NetAcet 1.0, permettant de prédire les sites d'acétylation, fourni par le CBS à l'adresse suivante : <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetAcet/>

NetPhos 2.0, permettant de prédire les sites de phosphorylation, fourni par le CBS à l'adresse suivante : <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>

NetNGlyc 1.0, permettant de prédire les sites de N-glycosylation, fourni par le CBS à l'adresse suivante : <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>

NetOGlyc 4.0, permettant de prédire les sites de O-glycosylation, fourni par le CBS à l'adresse suivante : <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>

Sulfinator, permettant de prédire les sites de sulfination, fourni par ExPASy à l'adresse suivante : <http://web.expasy.org/sulfinator/>

Myristoylator, permettant de prédire les sites de myristoylation, fourni par ExPASy à l'adresse suivante : <http://web.expasy.org/myristoylator/>

CSS-Palm, permettant de prédire les sites de palmitoylation, fourni par Cuckoo à l'adresse suivante : <http://csspalm.biocuckoo.org/online.php>

Sumosp, permettant de prédire les sites de sumoylation, fourni par Cuckoo à l'adresse suivante : <http://sumosp.biocuckoo.org/online.php>

UbPred, permettant de prédire les sites d'ubiquitination, fourni par UCSD (université de San Diego) à l'adresse suivante : <http://www.ubpred.org/>

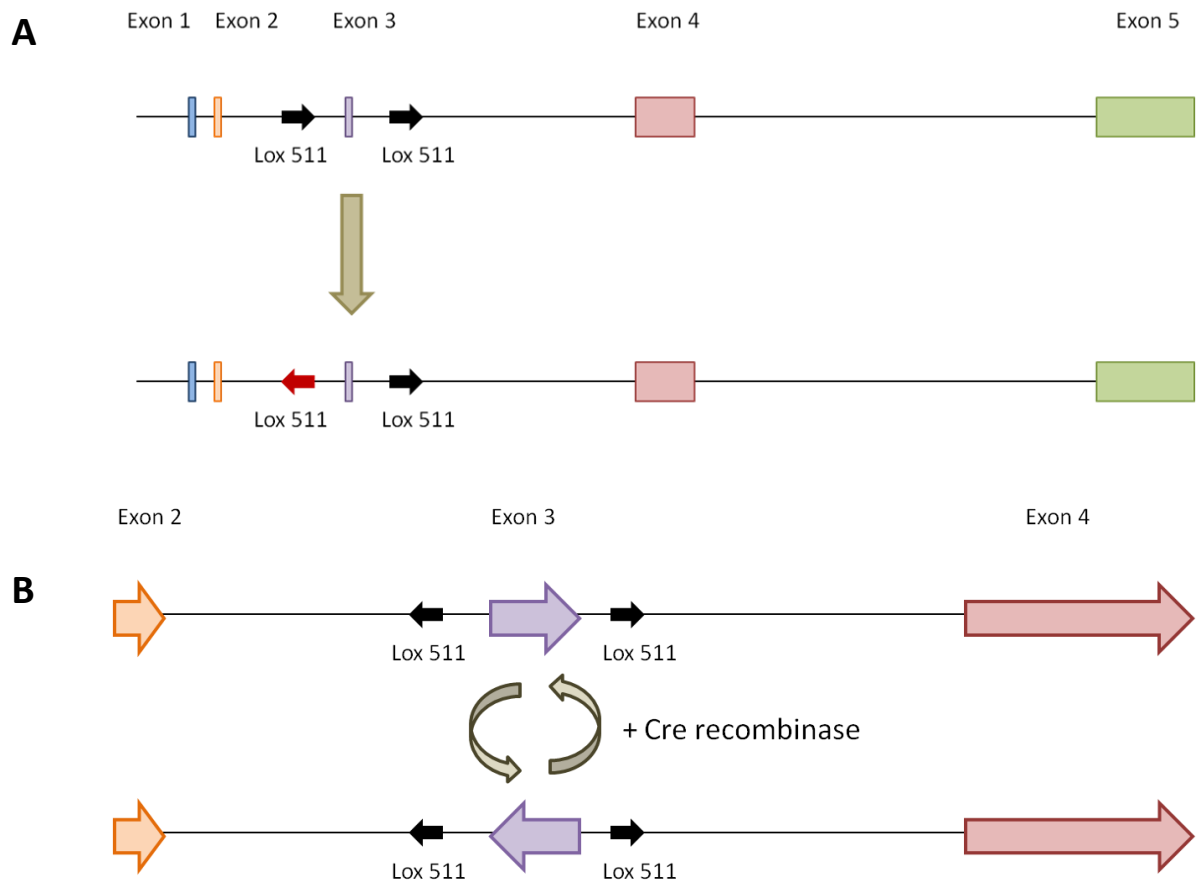
### **3.2. Réactifs et milieux**

Le milieu de culture DMEM GlutaMAX 4.5g/L glucose (31966.021) et la solution de Trypsine 0.25 %-EDTA (25200-056) proviennent de chez Gibco. Le milieu de culture RPMI 1640 (R8758-500ML), la solution de Pénicilline-Streptomycine (P4333-100ML), le 8-Bromo-cAMP (B788-25MG), le Nile Red (N3013-100MG), l'Oil Red O (O0625), la BSA FA-free (A8806-5G), ainsi que les composants du cocktail d'adipogénèse que sont la dexaméthasone (D2915-200MG), l'insuline (I9278-5ML) et le 3-isobutyl-1-méthylxanthine (I7018-100MG) ont été obtenus chez Sigma. Le FBS a été obtenu chez Biowest (S1810-500, lot S16141S1810). Le DPBS (BE17-512F) vient de chez Lonza. La forskoline (BML-CN100-0010) et la triacétine C (BML-EI218-0100) ont pour origine Enzo Life Sciences. Le formaldéhyde 16 % (28908) vient de chez Thermo. Le Trizol (11 667 165 001) et les pastilles anti-protéases (05 056 489 001) viennent de chez Roche. Les différentes cytokines et adiponectines utilisées : IL1 $\beta$ , IL6, IL10, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ , IFN $\beta$ , IFN $\gamma$ , Leptine, Adiponectine et MCP-1 ont été obtenues chez Peprotech. Les agonistes TLR suivants : LPS, poly(I:C), ssRNA40, MDP, Pam3CSK4, FLA-ST, FSL1 proviennent de chez Invivogen (tlrl-kit1mw).

### **3.3. Anticorps**

Les anticorps anti-APOL6 ont été générés sur demande par Thermo Fisher Scientific par immunisation de lapins (5 injections au total) avec le peptide APOL6 suivant, allant de l'acide aminé 36 à l'acide aminé 52 de la protéine : DDVLFLKQFPSWRKKEK. Ce peptide provenant de la partie N-terminale de la protéine, il est commun aux deux isoformes de l'APOL6. Ceci

offre l'avantage de détecter l'APOL6 totale, mais l'inconvénient de ne pas pouvoir distinguer les deux isoformes.



**Figure 28 : Génération des souris APOL6 KO.** **A** : Disposition des 5 exons de l'isoforme 1 de l'APOL6. L'exon 3, dans lequel se trouve le codon start, a été flanqué par des sites Lox dans le but de le supprimer par croisement avec la recombinaison Cre. Par erreur, un des sites Lox a été inversé. **B** : Zoom sur la région allant de l'exon 2 à l'exon 4. L'inversion d'un site Lox a provoqué l'inversion de l'exon 3 au lieu de sa délétion.

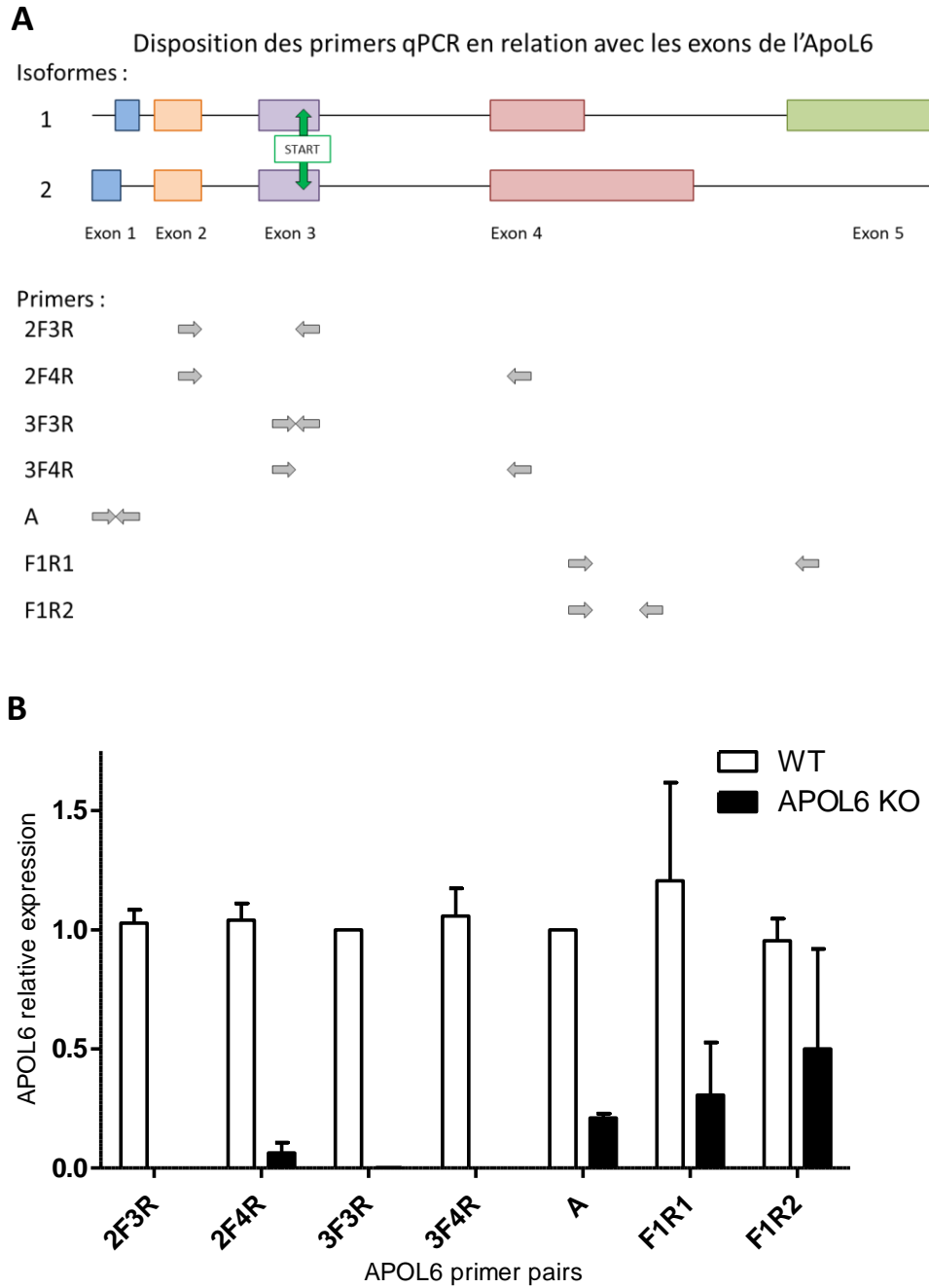
Le sérum récupéré au terme de ces injections a été purifié par colonne d'affinité contre le peptide immunogène. Les anticorps ainsi obtenus ont été testés par Western blot sur des échantillons de tissu adipeux WT et *APOL6* KO. Une bande aux environs de 40 kDa (le poids moléculaire théorique de l'*APOL6* est de 35 kDa) était présente dans les échantillons WT mais absente des échantillons KO. Aucune autre bande n'était visible sur la plupart des Western blots, à l'exception des échantillons 3T3-L1 qui présentaient également une seconde bande vers 50 kDa.

Parmi les autres anticorps utilisés, l'anti-périlipine produit en chèvre provient de Novus Biologicals (NB100-60554), l'anti-actine  $\beta$  couplé à la HRP et l'anticorps secondaire anti IgG de chèvre couplé à la HRP proviennent de chez Sigma (A3854 et A9452 respectivement). Les anticorps secondaires anti IgG de lapin couplés à la HRP proviennent de chez Promega (W4011).

### **3.4. Génération de souris *APOL6* KO**

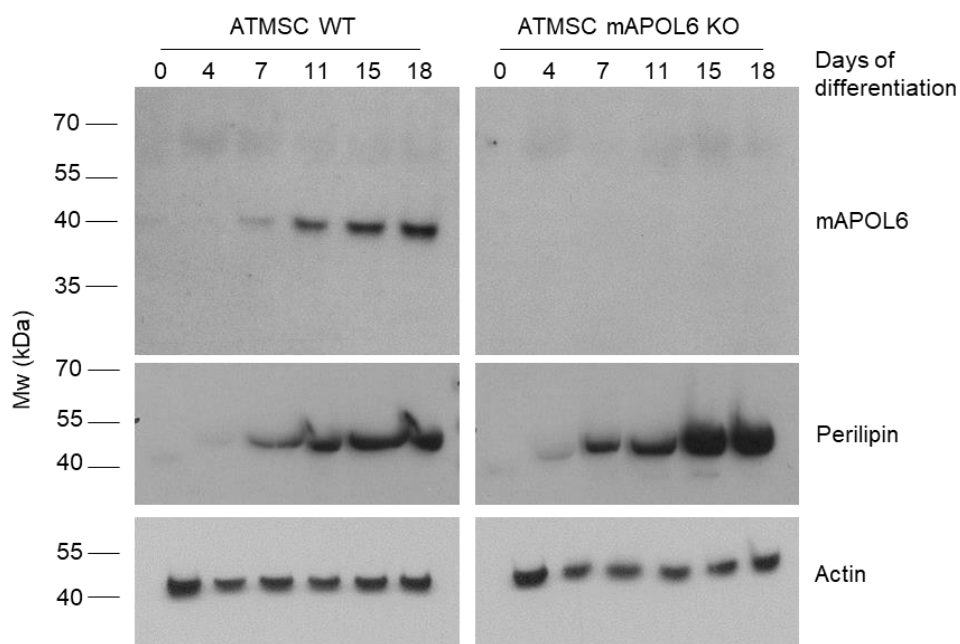
Les souris *APOL6* KO ont été générées par la société PolyGene AG (Rümland, Suisse) en flanquant l'exon 3, dans lequel est situé le codon start de la protéine, par des sites lox dans le but de l'exciser par croisement avec des souris exprimant la recombinaise CRE. Suite à une erreur de la société, un des sites lox a été inversé, ce qui a provoqué une inversion de l'exon 3 en lieu et place de son excision (Figure 28). L'analyse de l'ARNm de l'*APOL6* par 5'RACE suivie de son séquençage a permis de confirmer l'absence de l'exon 3 du transcrit, l'inversion provoquant son exclusion de l'ARNm par la machinerie d'épissage. L'analyse par qRT-PCR d'échantillons d'ARN de TA de souris WT et *APOL6* KO à l'aide de plusieurs amorces réparties sur l'ARNm de l'*APOL6* a montré une diminution de l'expression de l'ARNm dans les souris *APOL6* KO (Figure 29), suggérant que celui-ci soit déstabilisé en l'absence d'exon 3. Les amorces se liant à l'exon 3 ont montré une réduction d'expression de 100 %, ce qui est logique puisque l'exon 3 n'est plus présent. Les couples se liant à d'autres régions de l'ARNm ont montré une réduction de l'expression d'*APOL6* allant de 50 % à 90 % (Figure 29). L'analyse d'échantillons de tissu adipeux *APOL6* KO par Western blot avec nos anticorps anti-*APOL6* suggère l'absence de protéine *APOL6* dans ces souris (Figure 30).

Les souris ont été rétrocroisées dans le fond génétique C57BL/6 sur minimum 10 générations avant d'être utilisées dans des expériences. Le génotypage de ces souris a été fait par PCR. Les souris étaient maintenues dans des cages ventilées individuellement et leur statut sanitaire a été vérifié tous les 6 mois à l'aide de souris sentinelles.

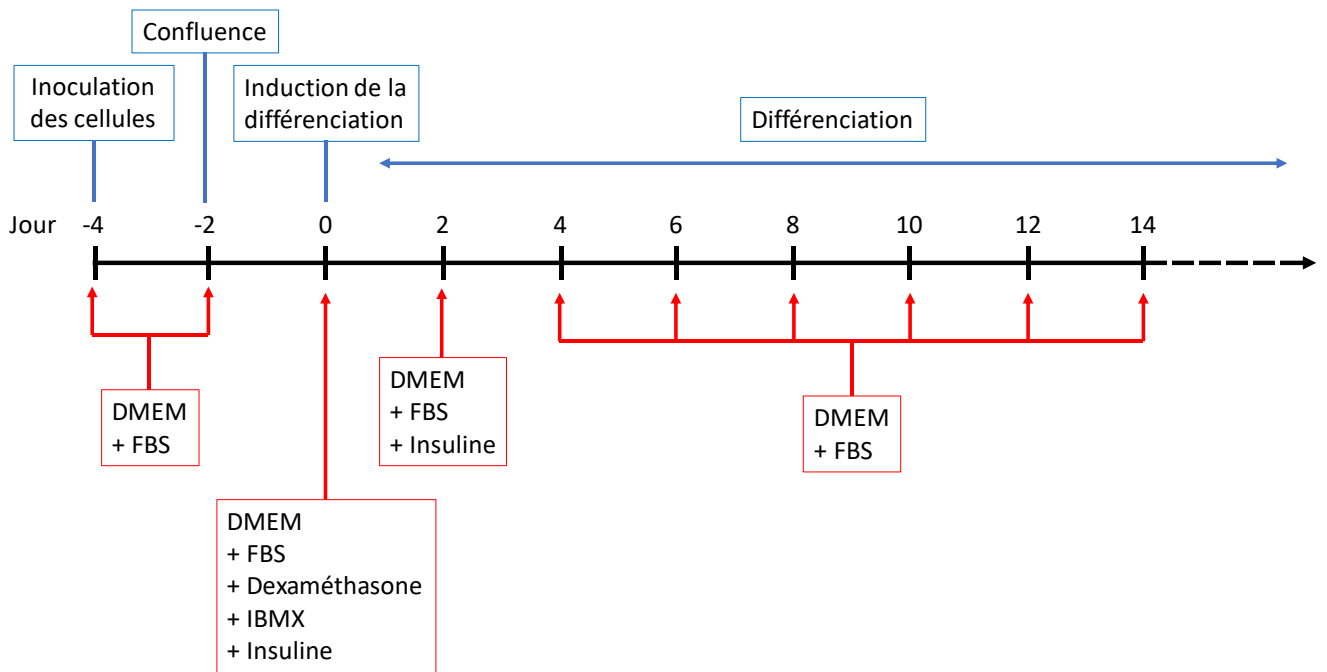


**Figure 29 : Vérification de l'absence de transcrits dans les souris APOL6 KO.** **A** : Disposition des différentes amorces utilisées par rapport aux exons des deux isoformes de l'APOL6 et au codon Start se trouvant dans l'exon 3. **B** : Résultats de qRT-PCR obtenus avec ces différentes amorces sur des extraits d'ARN de tissu adipeux gonadal de souris WT et APOL6 KO (WT : n=4, KO : n=5).

Pendant la quasi-totalité de la durée des expériences, le statut sanitaire de la colonie a répondu aux exigences « *specific pathogen-free* » (SPF) telles qu'édictées par les recommandations FELASA. Plus récemment, une contamination par *Helicobacter pylori* a été détectée. Cette bactérie tend à se retrouver dans l'estomac des individus infectés. Il convient de noter que sa présence éventuelle au sein de l'intestin pourrait avoir des répercussions sur la prise de poids. En effet, il a été amplement montré ces dernières années que le microbiote intestinal jouait un rôle important dans le développement de l'obésité (Rastelli et al. 2018). De ce fait, une déstabilisation de ce microbiote par des bactéries pathogènes pourrait influencer ces expériences. Néanmoins, chez l'humain, la relation entre la présence de *H. pylori* et l'obésité est débattue, mais ne semble pas être associée à une prévalence plus élevée d'obésité selon une récente étude sur plus de 13.000 patients (Hollander, Den et al. 2017). Par conséquent, nous avons décidé de continuer les expériences avec cet élevage *APOL6* KO. Notons finalement que la plupart des expériences de prise de poids des souris ont été réalisées avant l'infection.



**Figure 30 : Expression de l'APOL6 pendant la différenciation de cellules ATMSC WT ou APOL6 KO en adipocytes par Western blot. L'actine et la périlipine sont présentées comme contrôles.**



**Figure 31 : Ligne du temps indiquant la composition du milieu de culture cellulaire utilisée pendant la différenciation de préadipocytes en adipocytes.** Le jour 0 correspond au début de la différenciation, deux jours après la constatation de la confluence, par l'ajout du cocktail de différenciation comprenant la dexaméthasone, l'IBMX et l'insuline. Au jour 2, seule l'insuline est ajoutée. Les jours suivants, aucun facteur de différenciation n'est ajouté au milieu et celui-ci est renouvelé tous les deux jours.



<b>Stimulus</b>	<b>Concentration</b>
<b>Cytokines</b>	
IL1 $\beta$	10 ng/mL
IL6	10 ng/mL
IL10	10 ng/mL
TNF $\alpha$	10 ng/mL
TGF $\beta$	10 ng/mL
IFN $\beta$	1000 U/mL
IFN $\gamma$	10 ng/mL
<b>Adipokines</b>	
Leptine	10 ng/mL
Adiponectine	100 $\mu$ g/mL
<b>Agonistes TLR</b>	
Pam3CSK4 – TLR1/2	100 ng/mL
Poly(I:C) – TLR3	25 $\mu$ g/mL
LPS – TLR4	100 ng/mL
FLA-ST – TLR5	100 ng/mL
FSL1 – TLR6/2	100 ng/mL
ssRNA40 – TLR7	5 $\mu$ g/mL
<b>Hormones sexuelles</b>	
Testostérone	10 $\mu$ M
Œstradiol	10 nM
Progestérone	10 $\mu$ M

**Tableau 2 : Stimuli utilisés sur les adipocytes 3T3-L1, ainsi que leurs dilutions dans le milieu de culture.**

### 3.5. Culture cellulaire, différenciation et traitements

Toutes les cellules ont été cultivées dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) contenant du GlutaMAX (remplaçant plus stable pour la glutamine) et 4.5 g/L de glucose, supplémenté de 10 % de sérum fœtal bovin (FBS). Le milieu était dépourvu d'antibiotiques afin de détecter rapidement toute contamination éventuelle, sauf lors des premiers passages des ATMSC durant lesquels de la pénicilline (100 U/mL) et de la streptomycine (100 µg/mL) ont été ajoutées, les prélèvements cellulaires n'étant pas stériles puisque provenant de la dissection de souris. Les expériences impliquant des hormones sexuelles ont été réalisées dans du milieu équivalent mais dépourvu de colorant rouge de phénol, celui-ci ayant une faible activité oestrogénique pouvant biaiser les résultats.

La lignée cellulaire 3T3-L1 a été obtenue auprès de l'ATCC (American Type Culture Collection, Virginie, USA). Compte tenu du fait que l'efficacité de différenciation de ces cellules en adipocytes tend à diminuer avec le nombre de passages, cette lignée n'a jamais été utilisée pour plus de 8 passages (comptés après réception des cellules) et était redémarrée régulièrement à partir d'une ampoule fraîche.

Les ATMSC (« *Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells* ») ont été isolés du tissu adipeux inguinal de souris WT ou *APOL6* KO tel qu'indiqué ci-dessous. Le tissu a d'abord été finement découpé puis incubé pendant 45 min dans de la collagénase de type IV à 400 U/mL (Thermo) à 37° C sous agitation à 200 rpm (tours par minute). Les bouts de tissu digérés ont ensuite été filtrés sur un filtre à pores de 70 µm dans du RPMI 10 % FBS. Le filtrat contenant les cellules a été centrifugé à 1500 rpm pendant 15 min à 4° C. Le culot a alors été resuspendu dans du milieu frais, centrifugé à nouveau pendant 7 min, et finalement resuspendu dans du DMEM 10 % FBS contenant du β-mercaptoéthanol (50 µM), de la pénicilline (100 U/mL) et de la streptomycine (100 µg/mL). Les cellules ont d'abord été cultivées dans des flasques de 25 cm<sup>2</sup>, puis ont été amplifiées par 2 passages successifs jusqu'à des flasques de 175 cm<sup>2</sup>, à partir desquelles des ampoules ont été congelées. Plus fortement encore que pour les 3T3-L1, l'efficacité de différenciation des ATMSC, ainsi que leur capacité de prolifération, diminue avec le nombre de passages. Ainsi, ces cellules n'ont jamais été utilisées au-delà du passage 5 (compté à partir de leur prélèvement hors du tissu adipeux).

Pour la lignée 3T3-L1 comme pour les ATMSC, l'induction de l'adipogénèse a été réalisée en amenant les cellules à confluence puis en rajoutant un cocktail de différenciation consistant en de la dexaméthasone (1 µM), de l'insuline (10 µg/mL) et de l'IBMX (500 µM) (Figure 31).

Après deux jours, le milieu a été renouvelé avec uniquement de l'insuline. Ensuite, le milieu était renouvelé tous les deux jours sans ajout d'autres composants jusqu'à obtention d'une différenciation suffisante des cellules en adipocytes.

Les adipocytes ont été soumis à plusieurs traitements dans le but d'évaluer l'évolution de l'expression d'APOL6 en réponse à différents stimuli. Parmi ceux-ci, des cytokines, des adipokines, des hormones sexuelles, des activateurs ou inhibiteurs de l'autophagie et des agonistes des TLRs (Tableau 2). Les cellules ont été laissées en présence de ces molécules pour 24 h, sauf en cas de mention contraire.

Cible	Amorce sens (« <i>forward</i> »)	Amorce antisens (« <i>reverse</i> »)
<b>Apolipoprotéines L</b>		
APOL6	TTAGAAGACAAGCTGCCTCA	GAGGACTGTCATCCTTGTC
APOL7a	TTCAGAGATTGCAAGGCATTCAGA	CTTGGCATTATTTGCTAGGCGAGTG
APOL8	ACATGCTGGGCTCGCCTTTCTC	TGTTCCCCACTCCTCCCCTTTCT
APOL9a	AGGTGCGGGCCAGTCTGAA	ACCTGCGGGCGGTGGCACG
APOL10a	GCCAGGATTAGAGAAATAGGGCTTA	ATCCTTCAAACCTCGAATTGTTGC
APOL11b	GCCAGGATTAGAGCAGGAGTGTTA	CATCATGCAGATCCGTTGCTTGGTC
<b>Gènes de référence</b>		
RPLP0	CTTCATTGTGGGAGCAGACA	TCTCCAGAGCTGGGTTGTTC
HPRT	GTTGGATACAGGCCAGACTTTGTTG	GATTCAACTTGCCTCATCTTAGGC
PPIA	CGTCTCCTTCGAGCTGTTTG	CCACCCTGGCACATGAATC
<b>Gènes spécifiquement exprimés par les adipocytes</b>		
Leptine	GTGCTGCAGATAGCCAATGA	CTCAAAGCCACCACCTCTGT
PPAR $\gamma$	GCCCTTTGGTGACTTTATGGA	GCAGCAGGTTGTCTTGGATG
Adiponectine	TGTTGGAATGACAGGAGCTG	CGAATGGGTACATTGGGAAC
UCP1	CCTGCCTCTCTCGGAAACAA	GTAGCGGGGTTTGATCCCAT

Tableau 3 : Séquences des amorces sens et anti-sens utilisées pour les expériences de qRT-PCR

### **3.6. Extraction d'ARN et analyse par qRT-PCR**

L'extraction d'ARN à partir de culture cellulaire a été effectuée en lavant les cellules dans du PBS froid, puis en les récoltant dans du Trizol (Roche) par pipetage. Dans le cas où le matériel de départ était du tissu (tissu adipeux ou autres organes), celui-ci a d'abord été dissocié en utilisant le FastPrep-24 (MP biomedical) en conjonction avec la matrice de lyse D (constituée de billes sphériques de céramique de 1.4 mm). Ensuite, l'ARN (provenant de tissus ou de cellules) a été extrait à partir du Trizol à l'aide de colonnes du kit Direct-zol RNA Miniprep kit de Zymo, et sa concentration a été mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'ondes de 260 nm. La pureté de l'ARN a été vérifiée en comparant l'absorbance à 260 nm avec les absorbances à 280 nm et 230 nm. Les réactions de transcription inverse ont été réalisées à partir de 1 µg d'ARN au moyen du kit PrimeScript RT reagent kit with gDNA eraser de Takara. Finalement, les réactions de qPCR ont été effectuées à l'aide du kit SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) provenant aussi de Takara. Les conditions de cycling étaient les suivantes : une étape de dénaturation à 95° C pendant 30 s, suivie de 40 cycles d'amplification consistant chacun en une étape de dénaturation de 5 s à 95° C suivie d'une étape d'hybridation des amorces et d'amplification de 30 s à 60° C. L'amplification était suivie par une étape de courbes de fusion afin d'évaluer la pureté des produits amplifiés par la réaction. Cette étape consistait en 1 min à 60° C puis en une augmentation graduelle de la température jusqu'à 95° C par incréments de 0.3° C toutes les 15 s. Cette étape finale permet de produire des courbes dont le pic indique la température de fusion des produits PCR. Si ce pic est unique et identique entre tous les échantillons, cela signifie que le produit PCR amplifié est sans doute identique entre tous les échantillons, et donc probablement notre produit d'intérêt. Ceci a été confirmé par séquençage du produit PCR lors de la mise au point de celle-ci. Les séquences des amorces utilisées sont présentées dans le tableau 3.

### **3.7. Extraction de protéines et analyse par Western blot**

Les protéines ont été extraites des cellules en culture suite à un lavage dans du PBS froid, puis par l'ajout du tampon Laemmli (Tris HCl 60 mM pH 6.8, SDS 2 %, glycerol 10 %), permettant de lyser les cellules et de récupérer les protéines prêtes à être chargées sur un gel. Les tissus ont été d'abord dissociés dans du tampon RIPA (Tris HCl 25 mM pH 7.6, NaCl 150 mM, SDS 0.1 %, NP-40 1 %, sodium déoxycholate 0.5 %, inhibiteurs de protéases (Roche)) à l'aide du FastPrep-24 (MP biomedical) en utilisant la matrice de lyse D. Les lysats de tissus dans le RIPA ont ensuite été incubés 1 h à 4° C pour permettre une extraction maximale des protéines,

puis ont été centrifugés à 10.000 rpm pendant 15 min. Le surnageant a été récolté puis dosé par test BCA (test d'acide bicinchoninique), mis à concentration, et mélangé à du Laemmli 2x avant d'être chargé sur gel.

Pour effectuer un Western blot, les protéines en solution dans du Laemmli ont été chargées sur un gel de polyacrylamide 10 % ou avec un gradient 4-12 %, ensuite la migration a été effectuée à un potentiel électrique de 180 V, puis les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose à 100 V pendant 1 h. La membrane a ensuite été bloquée par du lait dilué à 5 % dans un tampon TBS (Tris 20 mM pH 7.5, NaCl 150 mM), puis a été incubée pendant la nuit sous agitation à 4°C avec les anticorps primaires dilués dans du TBS contenant du tween20 à 0.05 % et du lait à 1 %. Les anticorps anti-APOL6 (lapin) ont été utilisés à la dilution 1/2000, et les anticorps anti-pérlipine (chèvre) à la dilution 1/5000. Ensuite, les membranes ont été lavées 3 fois au TBS tween20 0.05 % pendant 10 min, et incubées 1 h à température ambiante avec les anticorps secondaires couplés à l'enzyme « *Horseradish peroxidase* » (HRP). Les anticorps anti-IgG de lapin et anti-IgG de chèvre couplés à la HRP ont été utilisés à la dilution 1/5000 et les anticorps anti-actine-HRP à la dilution 1/50000. Après 2 lavages au TBS tween20 0.05 % et 1 dernier lavage au TBS pendant 10 min, le substrat de la peroxydase (PerkinElmer) a été ajouté et les membranes ont été exposées à un film photographique en chambre noire. Les films ont été développés grâce à la développeuse (Curix 60 AGFA).

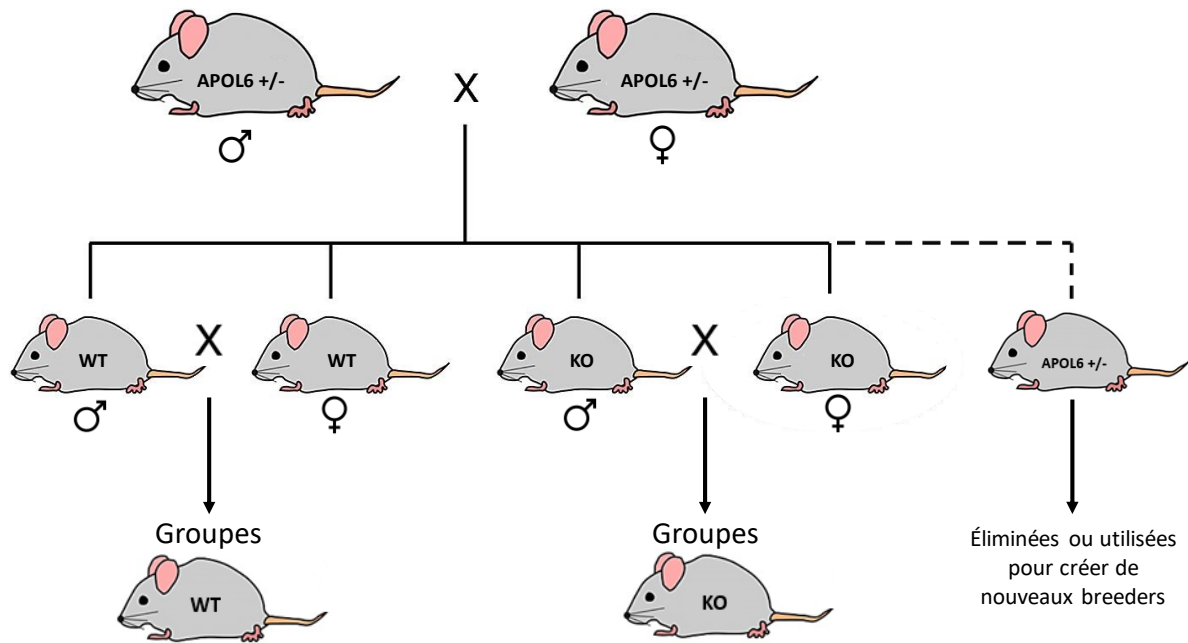
### **3.8. Immunoprécipitation**

Pour l'expérience d'immunoprécipitation, les cellules et les tissus ont été lysés dans du RIPA comme décrit au point plus haut, puis les protéines ont été incubées pendant la nuit à 4° C avec les anticorps anti-APOL6. Le tout a ensuite été incubé pendant 1 heure avec 20 µL de billes de G-sépharose pré-bloquées avec une solution de BSA 5 %. Les billes ont ensuite été lavées à quatre reprises par du tampon RIPA, puis une fois par du PBS. Finalement, les protéines encore liées aux billes ont été éluées à l'aide de tampon Laemmli dépourvu de β-mercaptoéthanol. La concentration en protéines a été dosée par test BCA. Les protéines ont été mises à concentration et la migration a été effectuée sur un gel de polyacrylamide à gradient 4-12 %, puis celui-ci a été coloré par la méthode du nitrate d'argent (Thermo). Les pistes ont été découpées en fines bandes et analysées par spectroscopie de masse à la plateforme de spectrométrie de masse (MaSUN) à l'université de Namur.

Après deux lavages à l'eau distillée, les bandes de gel ont été réduites avec de l'acétonitrile 100%. Ensuite, les protéines ont été digérées pendant la nuit à 37° C avec de la trypsine diluée

dans un tampon  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM, avant d'être extraites du gel. Les protéines digérées ont ensuite été séparées par chromatographie en phase liquide. L'équipement utilisé était un système de chromatographie liquide Ultimate 3000 (Thermo) avec une colonne de phase inverse 75  $\mu\text{m}$  x 250 mm (Acclaim PepMap 100 C18). La phase mobile comportait deux composants : une partie A composée de 0.1 % d'acide formique et de 5 % d'acétonitrile, et une partie B composée de 0.1 % d'acide formique et de 80 % d'acétonitrile. Au moment initial, le digestat de protéines a été injecté dans un ratio 95 % A et 5 % B, puis la proportion de B a été augmentée linéairement pour atteindre 40 % au bout de 25 min, puis jusqu'à 100 % de B dans les 5 min suivantes. Après 10 min à 100%, la proportion de B a ensuite été diminuée jusqu'à 5 % en 20 min. La chromatographie était couplée au spectromètre de masse nano-LC-ESI-MS/MS maXis Impact UHR-TOF (Bruker, Bremen, Germany) *via* un injecteur CaptiveSpray (Bruker). Les spectres de spectrométrie de masse ont été acquis pour 0.5 s dans l'intervalle de ratio masse/charge entre 50 et 2200.

La liste de données a été créée grâce à DataAnalysis 4.1 (Bruker) et sauvegardée sous format XML dans le but d'être analysée grâce au logiciel ProteinScape 3.1 (Bruker) avec le moteur de recherche Mascot 2.5.1 (Matrix Science). Au moment de l'analyse, Mascot 2.5.1 datait de septembre 2017, contenait un total de 119.449.461 séquences dont 233.309 séquences de *Mus musculus*. Pour l'analyse, le nombre maximum de clivages manqués a été fixé à 1. La Carbamidométhylation a été autorisée comme modification fixe, l'oxydation de la méthionine, Gln – pyro-Glu et la déamidation de l'asparagine et de la glutamine ont été autorisées en tant que modifications variables. La tolérance de masse pour les peptides monoisotopiques était de 7 ppm et la tolérance MS/MS a été fixée à 0.05 Da. La liste de pics a été confrontée à la base de données UniRef 100 avec comme taxonomi *Mus Musculus*. Finalement, les résultats ont été importés et visualisés à l'aide du logiciel Scaffold 4.8.4 (Proteome Software). Dans ce logiciel, outre la visualisation des données, celles-ci ont été validées avec un second moteur de recherche : X!Tandem. Dans Scaffold, le taux de faux-positifs a été fixé à 1 %.



**Figure 32 : Stratégie de croisement pour en vue de l'obtention de groupes de souris homozygotes.** Des souris hétérozygotes littermates ont d'abord été croisées. Les souris WT résultant de ce croisement ont ensuite été croisées entre elles pour donner des portées WT utilisées lors des expériences. Il en a été de même pour les souris *APOL6* KO. Les souris hétérozygotes ont été soit éliminées, soit conservées pour renouveler les breeders de départ.

### 3.9. Régime gras et pesée des souris

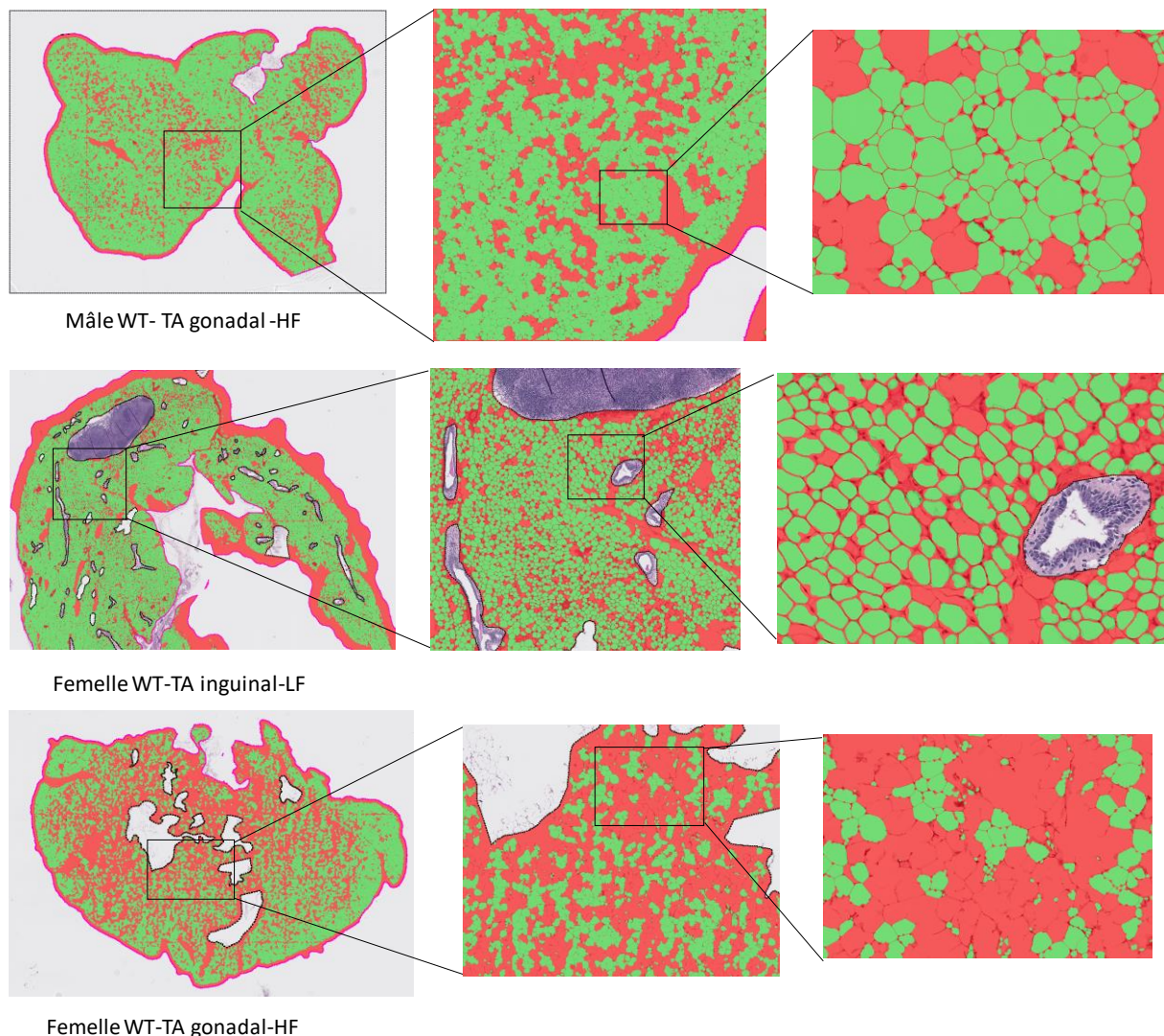
Des souris WT ou *APOL6* KO ont été soumises pendant 21 semaines à un régime riche en graisses (High Fat, HF) contenant 60 % de matières grasses, ou pauvre en graisses (Low Fat, LF) contenant 10 % de matières grasses. Les souris avaient accès à volonté tant à l'eau qu'à la nourriture. Elles ont été pesées au moment du début du régime, c'est-à-dire lorsqu'elles avaient atteint l'âge de 8 semaines, et chaque semaine ensuite. Les souris étaient groupées par génotypes homogènes (les souris WT ensemble et séparées des souris *APOL6* KO). Au sein de chaque groupe, les individus provenaient d'une même portée (étaient « littermates »), et leurs parents (les « breeders ») provenaient eux-mêmes d'un croisement hétérozygote et étaient littermates avec les breeders de l'autre génotype. La figure 32 schématise la stratégie de reproduction. Les données présentées ont été normalisées par rapport à leur masse de départ (=100 %) et représentent la moyenne des différentes souris de chaque groupe. Pour les souris mâles, les groupes comprennent de 11 à 13 souris, réparties sur 4 expériences indépendantes, tandis que pour les souris femelles, les groupes comprennent de 7 à 8 souris, réparties sur 3 expériences indépendantes. En fin d'expérience, les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale, puis le tissu adipeux a été prélevé pour d'autres expériences, notamment pour la pesée des différents dépôts de tissu adipeux, pour la mesure de la taille des adipocytes, ainsi que pour

l'analyse par cytométrie en flux des populations de cellules immunitaires au sein du tissu adipeux.

### **3.10. Mesures de la surface des adipocytes**

Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec l'équipe de DiaPath, du CMMI. Les tissus adipeux provenant des dépôts gonadal et inguinal ont été prélevés de souris mâles ou femelles, WT ou *APOL6* KO, nourries au régime LF or HF. Les tissus ont été immédiatement immergés puis conservés pendant une nuit dans de la PFA 4 %. Les tissus ont ensuite été inclus dans de la paraffine et des tranches de 4  $\mu\text{m}$  d'épaisseur ont été découpées au microtome. Ces tranches ont ensuite été marquées à l'aide d'une coloration hématoxyline-éosine et scannées grâce au NanoZoomer-XR Digital slides scanner (Hamamatsu), puis observées avec le logiciel NDP viewer (Hamamatsu). Les images ont été analysées au grossissement 10x avec le logiciel Visiomorph (Visiopharm, Hoersholm, Danemark). Les régions endommagées du tissu ou celles contenant des vaisseaux sanguins ou des ganglions lymphatiques ont été exclues manuellement. Les adipocytes ont été analysés et mesurés comme décrit ci-dessous. Les objets ayant une intensité en niveau de gris inférieure à 230 et qui n'étaient pas assez circulaires (selon un filtre interne au logiciel) ont été exclus, ceux-ci étant considérés comme des artefacts. Pour les autres objets, une érosion avec un élément structurant circulaire de 21 pixels de diamètre a été effectuée dans le but de détecter les bords des objets, puis une squelettisation suivie d'une dilatation pour ramener le bord à 3 pixels d'épaisseur ont été effectuées. À nouveau, les objets n'atteignant pas la valeur de 0.55 de circularité (selon la formule  $4\pi \cdot \text{aire de l'objet} / (\text{périmètre de l'objet})^2$ ) ont été exclus. Les objets plus grands que 0.05  $\text{mm}^2$  ont aussi été exclus car il s'agissait souvent de groupes de plusieurs adipocytes dont les membranes étaient cassées et qui étaient donc erronément considérés comme un seul grand adipocyte. Les objets restants ont été considérés comme étant des adipocytes (en vert, Figure 33). Ils ont donc été comptés et leurs surfaces ont été mesurées.





**Figure 33 : Illustration du résultat de la détection d'adipocytes sur trois exemples de coupes de tissu adipeux.** Les objets considérés comme des adipocytes selon les filtres décrits au point 3.10 sont marqués en vert et leurs surfaces ont été mesurées. Les objets non reconnus comme des adipocytes sont marqués en rouge et ont été exclus de l'analyse. Les zones éliminées manuellement, telles que celles comprenant des ganglions, apparaissent dans leur coloration d'hématoxyline et d'éosine. Les coupes illustrées ont été choisies pour leur représentativité des différents échantillons. Par exemple, la coupe du bas, provenant du TA gonadal d'une souris femelle WT nourrie au régime HF, a été abîmée pendant la découpe, résultant en de nombreuses parois d'adipocytes déchirées, et donc un nombre plus élevé de rejets par le logiciel.

### 3.11. Cytométrie en flux

Dans le but d'analyser les populations de cellules immunitaires dans le tissu adipeux, la fraction stromale vasculaire du tissu adipeux gonadal a été isolée de manière similaire à la méthodologie expliquée concernant l'extraction d'ATMSC. Une fois le culot de cellules non adipocytaires récolté, une lyse ACK a été effectuée dans le but d'éliminer les globules rouges. Ensuite, le culot a été resuspendu et dilué dans du PBS, puis les cellules ont été comptées et réparties dans une plaque de 96 puits dans le but de les marquer avec nos anticorps (liste des anticorps dans

le tableau 4). Après une centrifugation pour les culotter au fond des puits, les cellules ont été resuspendues et incubées 20 min à 4° C dans du PBS contenant les anticorps primaires ayant une cible située à l'extérieur de la membrane plasmique cellulaire. Ensuite, les cellules ont été lavées dans du PBS, centrifugées et resuspendues dans du PBS contenant les anticorps secondaires lorsque les anticorps primaires n'étaient pas directement couplés à un fluorochrome. Pour marquer les antigènes à l'intérieur des cellules, celles-ci ont ensuite été fixées et perméabilisées 15 min à 4° C (Fix/Perm eBioscience), puis lavées dans une solution de perméabilisation (eBioscience). Après une nouvelle centrifugation, les cellules ont été marquées 15 min à 4° C avec les anticorps primaires visant les protéines internes, dilués dans la solution de perméabilisation. Après un lavage et une centrifugation supplémentaire, les anticorps secondaires ont été ajoutés pour 10 min, puis les cellules ont été lavées et ont finalement été resuspendues dans du PBS et transférées dans des tubes compatibles avec le cytomètre en flux.

Cible	Fluorochrome	Dilution	Référence
Fc block	-	1/200	
Viabilité	APC-Cy7	1/1000	1813800 (Life Technologies)
MHC II	Biotine	1/500	553622
Streptavidine	PE-Cy7	1/400	557598
CD11b	AF700	1/350	557960
CD11c	Percp Cy5.5	1/100	560584
CD64	APC	1/150	558539
RELM $\alpha$	-	1/200	500-P214 (Peprtech)
IgG de lapin	FITC	1/200	554020
Siglec F	PE	1/200	562068

**Tableau 4 : Anticorps utilisés pour les expériences de cytométrie en flux.** Les anticorps sont présentés ainsi que la molécule à laquelle ils étaient couplés pour leur détection, la dilution utilisée, et leur référence. Les références sont toutes de BD Biosciences, sauf si mention contraire.

### **3.12. Respect des règles d'éthique**

L'institut dispose d'un agrément d'élevage (EL2500482) et d'expérience (LA1500474) sur animaux de laboratoire. Toutes les expériences effectuées sur des souris de laboratoire ont été approuvées par le comité éthique de l'institut (IBMM, ULB ; numéro de protocole pour le régime HF/LF : CEBEA84). Tous les opérateurs ont suivi une formation reconnue en techniques sur animaux de laboratoire. Les souris utilisées dans des expériences ont été euthanasiées par dislocation cervicale.

### **3.13. Analyse statistique**

Le logiciel Prism 5 Graphpad a été utilisé pour l'analyse statistique. Les données sont représentées en moyennes +/- la déviation standard. Les tests statistiques utilisés sont : Mann-Whitney pour comparer deux groupes, et Kruskal-Wallis suivi de Dunns pour les ensembles comprenant plus de deux groupes. Les résultats ont été considérés comme statistiquement significatifs lorsque  $p < 0,05$ .



# Résultats



## 4. Résultats

### 4.1. Analyse bioinformatique de l'APOL6

#### 4.1.1. Prédiction de la structure secondaire de l'APOL6

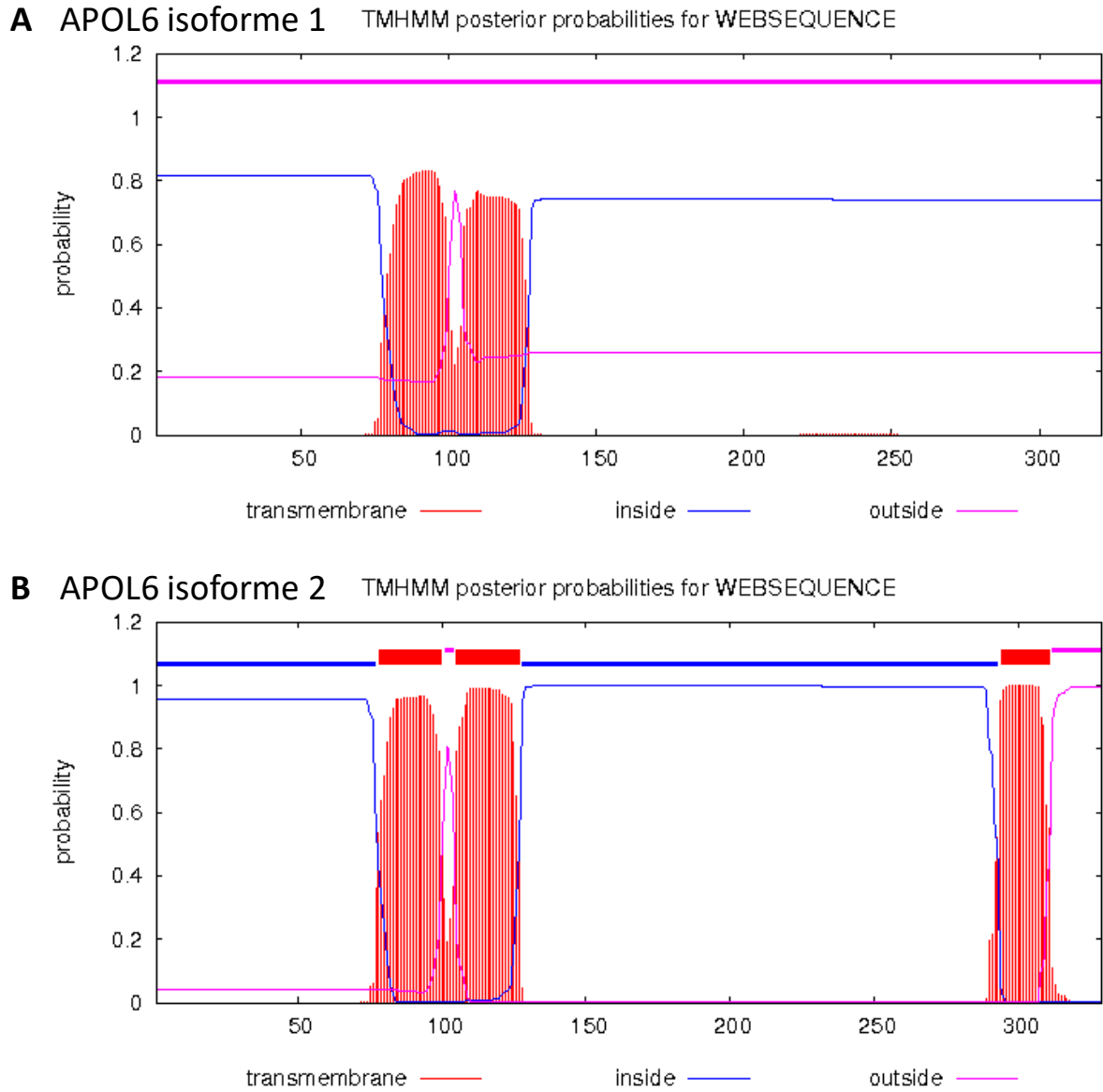
La fonction d'une protéine est déterminée par sa structure, celle-ci provenant elle-même de sa séquence. Il est par conséquent intéressant de tenter de prédire la structure qu'une protéine peut adopter à l'aide d'outils bioinformatiques. La figure 34 présente le résultat des prédictions bioinformatiques de structures secondaires par les outils Gor4 et Sopma.

En comparant ces deux prédictions, on remarque des similitudes, mais également quelques différences. Gor4 comme Sopma ont prédit une majorité d'hélices alpha, disséminées sur toute la longueur de la protéine, à l'exception des extrémités N- et C-terminales. Néanmoins, la première différence frappante est que Sopma a prédit plus d'hélices alpha que Gor4 (70.72 % contre 56.07 %). En contrepartie, Gor4 a prédit plus de régions non structurées (31.46 % contre 20.25 % pour Sopma) et de courts brins beta (12.46 % contre 5.61 %).

Malgré les différences de prédictions entre ces deux outils, il est possible de conclure que la conformation secondaire adoptée par l'APOL6 est probablement composée de nombreuses hélices alpha. Ceci est aussi supporté par la comparaison avec la structure, mieux connue, de l'APOL1 humaine. En effet, celle-ci est composée d'un domaine formateur de pores ioniques et d'un domaine d'adressage membranaire tous deux composés d'hélices alpha (Figure 2). Par conséquent, il est probable que l'APOL6 soit elle-aussi composée de plusieurs hélices, peut-être assemblées en domaines similaires à ceux de l'APOL1 humaine.

#### 4.1.2. Prédiction d'hélices transmembranaires

Les protéines peuvent être soit solubles, présentes à l'état libre dans le cytosol ou tout autre compartiment cellulaire, soit liées à une membrane. Leurs propriétés et leurs fonctions en sont naturellement affectées. Un type de protéines liées à la membrane sont les protéines ancrées par des domaines transmembranaires. Afin de savoir si l'APOL6 serait de ce type, une recherche d'hélices transmembranaires a été effectuée, à l'aide de l'outil du CBS : TMHMM-2.0. Le résultat est présenté sur la figure 35A et B.



**Figure 35 : Prédiction d'hélices transmembranaires des isoformes 1 (A) et 2 (B) de l'APOL6 murine.** Le logiciel utilisé était TMHMM de DTU Bioinformatics de la Technical University of Denmark.



On observe la présence de plusieurs domaines prédits comme pouvant être transmembranaires (en rouge). Deux sont présents entre les acides aminés 78 à 100 et 105 à 127, dans la partie commune aux deux isoformes. Pour l'isoforme 2, en plus des deux premiers domaines, un troisième a été prédit de l'acide aminé 294 à l'acide aminé 311. Les deux hélices transmembranaires prédites communes aux deux isoformes de l'APOL6 s'alignent avec les hélices 8 et 9 du domaine pore-forming de l'APOL1.

Nous avons donc vu au point précédent que l'APOL6 serait composée de plusieurs hélices, et apparemment deux (ou trois dans le cas de l'isoforme 2) d'entre elles serait transmembranaires. Ce résultat ouvrirait donc la porte à une localisation membranaire de la protéine. Celle-ci aurait donc deux passages transmembranaires séparés par une courte charnière, l'isoforme 2 ayant un troisième passage à son extrémité C-terminale.

	APOL6 isoforme 1	APOL6 isoforme 2
Taille (aa)	321	329
Réticulum endoplasmique	0 %	34,8 %
Mitochondrie	17,4 %	17,4 %
Cytoplasme	17,4 %	0 %
Noyau	47,8 %	0 %
Membrane plasmique	8,7 %	30,4 %
Appareil de Golgi	0 %	4,3 %
Vésicules de sécrétion	4,3 %	4,3 %
Cytosquelette	0 %	0 %
Extracellulaire	4,3 %	4,3 %

**Tableau 5 : Prédiction bioinformatique de la localisation de l'APOL6 (isoformes 1 et 2) par PsortII. Les valeurs représentent la probabilité que la protéine se retrouve dans le compartiment cellulaire.**

### 4.1.3. Prédiction de la localisation subcellulaire de l'APOL6

Les cellules eucaryotes, contrairement aux procaryotes, sont très compartimentées. Chacun de ces compartiments assume une ou plusieurs fonctions très spécialisées. Connaître la localisation subcellulaire d'une protéine permet donc, dans certains cas, de mieux en cerner la fonction. Il était donc important de tenter de prédire la localisation subcellulaire de l'APOL6. Pour cela, deux outils ont été utilisés : TargetP et PsortII.

TargetP est basé sur la recherche de séquences signal N-terminales d'adressage vers la mitochondrie ou le réticulum endoplasmique et la voie de sécrétion. Aucune de ces séquences n'a été mise en évidence par ce programme dans la séquence de l'APOL6, ce qui suggère que celle-ci n'est pas adressée vers ces organites.

PsortII explore plus de possibilités de compartiments cellulaires en se basant, en plus des séquences signal disponibles, sur d'autres propriétés de la protéine, comme le taux d'acides aminés basiques, ou hydrophobes, etc. Les résultats donnés par PsortII sont présentés dans le tableau 5.

Ce qu'on remarque en premier lieu, c'est la forte différence entre les prédictions pour l'isoforme 1 et l'isoforme 2, alors qu'elles ont 291 acides aminés en commun et ne diffèrent que par leur partie C-terminale. PsortII a prédit que l'isoforme 1 serait plutôt nucléaire (probabilité de 47.8 %) ou mitochondriale ou cytoplasmique (probabilité de 17.4 %), alors que l'isoforme 2 appartiendrait plutôt au réticulum endoplasmique (34.8 %) ou à la membrane plasmique de la cellule (30.4 %). Rappelons toutefois que ces prédictions sont indicatives et devraient être complémentées par des expériences.

La différence observée entre les deux isoformes ne peut donc être due qu'à la queue C-terminale de la protéine, à partir de l'acide aminé 292 jusqu'à l'acide aminé 321 ou 329 pour l'isoforme 1 ou 2 respectivement. Or, c'est justement dans cette région que se situe la troisième région transmembranaire de l'isoforme 2 prédite par l'outil TMHMM (Figure 35). La présence de cette hélice transmembranaire semble donc suffisante pour modifier les prédictions de localisation de la protéine, augmentant la probabilité qu'elle se trouve à la membrane plasmique ou au réticulum endoplasmique.

#### 4.1.4. Prédiction de modifications post-traductionnelles

La séquence d'une protéine est extrêmement importante pour lui conférer sa fonction. Toutefois, la séquence n'est pas très modulable, et de nombreux processus de régulation font intervenir des modifications post-traductionnelles. Celles-ci sont souvent impliquées dans la régulation d'une fonction de la protéine. Les modifications post-traductionnelles ont donc été investiguées, à l'aide de plusieurs outils. Les résultats de ces prédictions sont montrés dans le tableau 6.

Alors qu'aucun site d'acétylation ou de myristoylation n'ont été trouvés par les outils bioinformatiques, un site de sulfonation (sur la tyrosine en position 17), 15 sites de phosphorylation (10 sur sérine, 4 sur thréonine et 1 sur tyrosine), 4 sites d'ubiquitination (sur les lysines 27, 155, 158 et 306), 1 site de palmitoylation (sur la cystéine 285) et 1 site de sumoylation (sur la lysine 155) ont été prédits. Finalement, une asparagine a été prédite comme pouvant être N-glycosylée, en plus de 7 thréonines et de 7 sérines qui ont été prédites comme pouvant être O-glycosylées.

La sulfonation, ou sulfurylation, est une modification post-traductionnelle se déroulant dans l'appareil de Golgi et qui consiste en l'ajout d'un sulfate sur le groupement phénol d'une tyrosine. La sulfurylation est principalement observée sur des protéines transmembranaires ou sécrétées dans le but de modifier l'affinité de leurs interactions avec d'autres protéines hors des cellules (Yang, Y. S. et al. 2015; Byrne et al. 2018). La sulfurylation intervient par exemple dans la chimiotaxie des leucocytes en leur permettant d'adhérer aux cellules endothéliales (Yang, Y. S. et al. 2015). Selon les prédictions bioinformatiques, l'APOL6 n'aurait qu'une probabilité de 4.3 % de se retrouver sécrétée hors de la cellule, et aucune séquence signal n'a été détectée (Tableau 5). Par contre, celle-ci aurait une probabilité de 8.7 % à 30.4 % de se retrouver ancrée dans la membrane plasmique, selon l'isoforme (Tableau 5). La sulfurylation pourrait donc jouer un rôle dans ce cas, bien que la tyrosine prédite comme pouvant être sulfatée est aussi prédite comme étant intracellulaire (Figure 35).

La palmitoylation est une modification qui permet l'addition d'un lipide, dans ce cas-ci l'acide gras saturé palmitate, à une protéine. La plupart des réactions de lipidation sont irréversibles, à l'exception de la palmitoylation sur les résidus cystéines qui peuvent être dépalmitoylés par après (Ko & Dixon 2018). La modification prédite pour l'APOL6 correspond à ce cas puisqu'elle est localisée sur une cystéine (Tableau 6). Une fonction importante de la palmitoylation parmi d'autres est l'association avec des membranes. En effet, l'ajout d'acides gras augmente l'hydrophobicité de la protéine et surtout lui permet de s'ancrer dans une

membrane, le palmitate pouvant s'insérer entre les phospholipides (Jiang et al. 2018). Ceci pourrait être particulièrement pertinent dans le cadre de l'APOL6 puisque la palmitoylation est une des méthodes d'ancrage des protéines à la surface des LD (Kory et al. 2016).

La phosphorylation, l'ubiquitination et la sumoylation sont des modifications post-traductionnelles très répandues permettant de réguler entre autres la localisation, l'activité et les interactions des protéines modifiées (Humphrey et al. 2015; Han, Z. J. et al. 2018; Ovaa & Vertegaal 2018). Dès lors, il n'est pas particulièrement surprenant de retrouver dans la séquence de l'APOL6 des sites potentiellement ciblés par de telles modifications.

Modification post-traductionnelle	Outil de prédiction	Site de la modification (a.a.)
Acétylation	NetAcet 1.0	-
Sulfonation	Sulfinator	Y17
Phosphorylation	NetPhos 2.0	T6, T13, Y17, S30, S46, S81, S147, T159, S209, S294, S301, S312, S313, S314 et T315
Ubiquitination	UbPred	K27, K155, K158 et K306
Palmitoylation	CSS-Palm	C285
Sumoylation	Sumosp	K155
Myristoylation	Myristoylator	-
N-glycosylation	NetNGlyc 1.0	N261
O-glycosylation	NetOGlyc 4.0	T6, T8, S10, T13, S46, T125, S131, T196, S197, T204, S209, S301, T308 et S312

**Tableau 6 : Prédictions de différentes modifications post-traductionnelles courantes.** L'outil de prédictions bioinformatiques utilisé est donné pour chaque modification. Les sites de modifications sont donnés avec l'acide aminé impliqué suivi du numéro de cet acide aminé dans la séquence de la protéine.

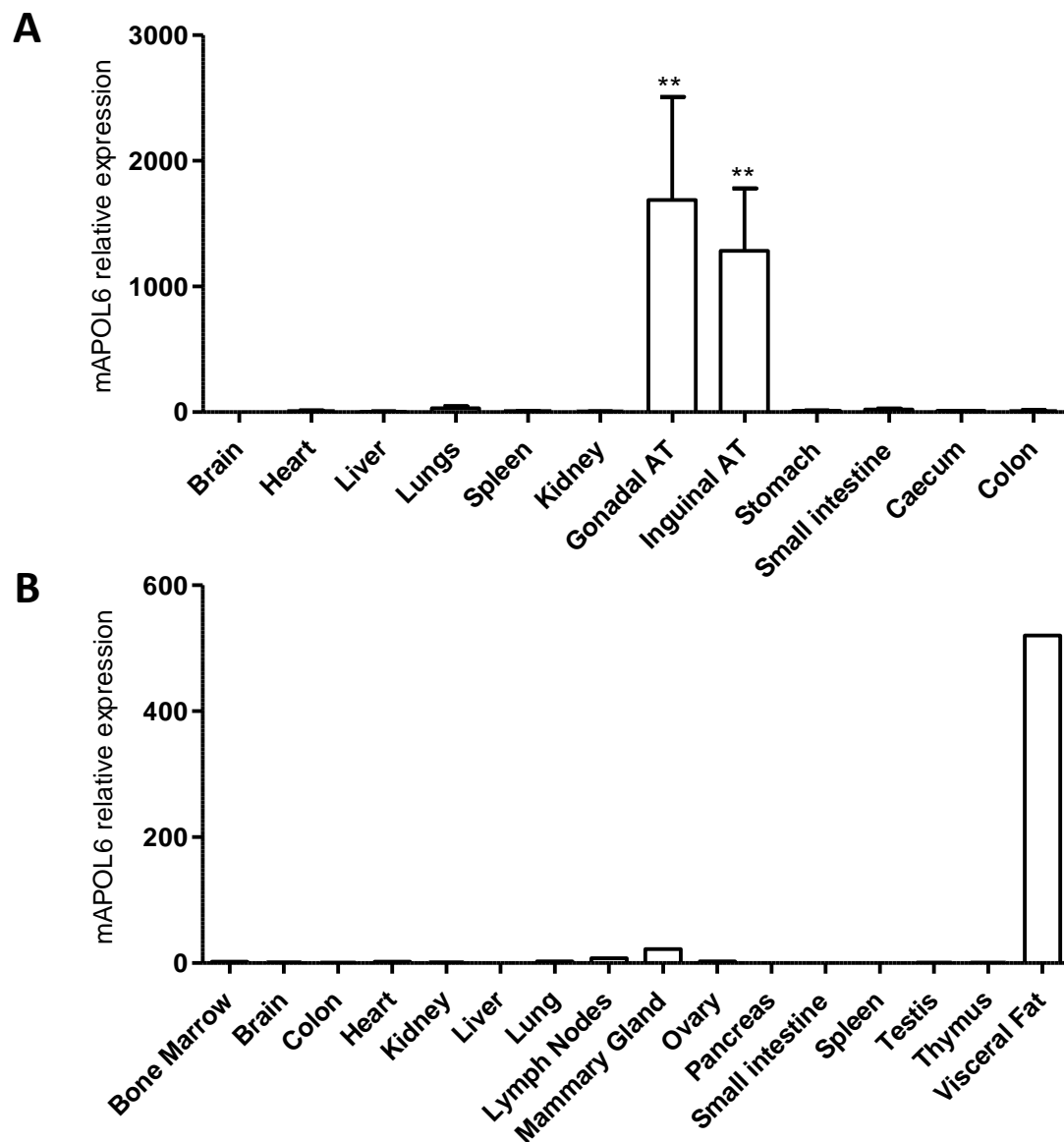
## 4.2. L'APOL6 murine est spécifiquement exprimée par les adipocytes

Une première étape dans l'étude de l'APOL6 murine était de déterminer au sein de quel(s) organe(s) celle-ci est exprimée. Pour ce faire, des souris ont été sacrifiées, leurs organes ont été isolés, et l'ARN de ces organes a été extrait. Une transcription inverse a été effectuée sur l'ARN et une qRT-PCR a permis de mesurer le profil d'expression de l'APOL6. Comme le montre la Figure 36A, l'expression de l'APOL6 était 1700 fois plus élevée dans le TA gonadal que dans le cerveau, utilisé ici comme référence. Les autres organes ont affiché une expression allant de 1 (le cerveau, la plus faible expression observée), à 30 (les poumons, l'expression la plus élevée en dehors du TA). L'expression d'APOL6 dans l'autre dépôt de TA étudié ici, le TA inguinal, était légèrement plus faible que dans le TA gonadal, avec un facteur 1300 fois plus élevé que dans le cerveau.

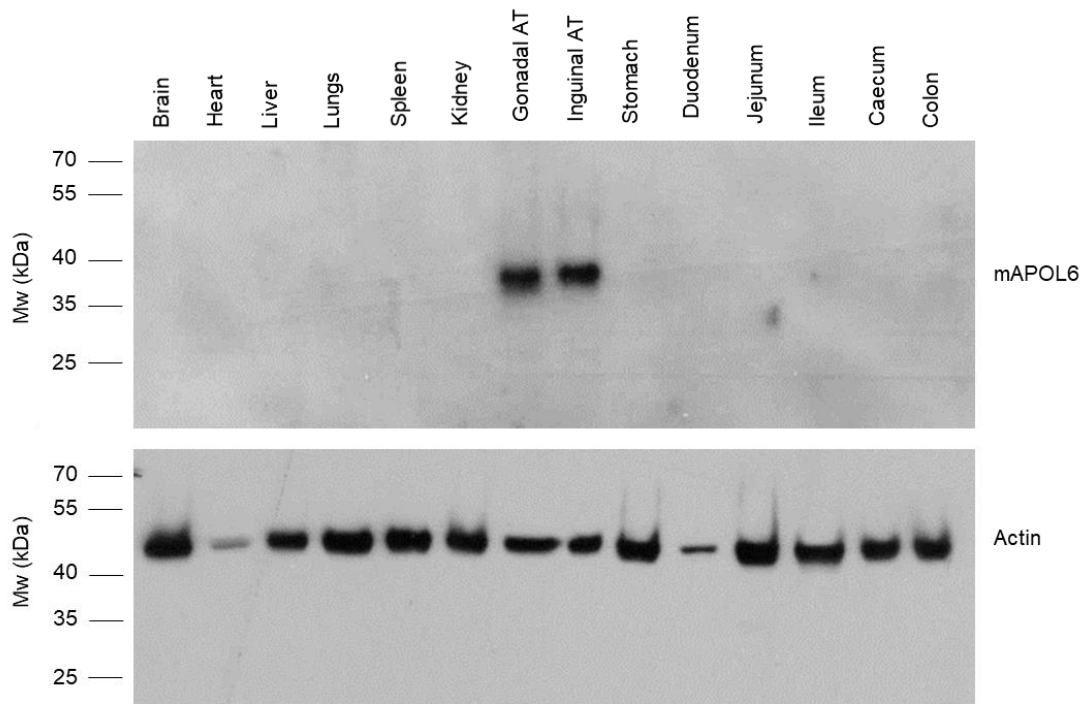
Afin de confirmer ce résultat avec de l'ARN provenant d'autres organes non échantillonnés, nous avons refait l'expérience de qRT-PCR en utilisant de l'ARN commercial d'organes de souris. Celui-ci comprenait notamment de l'ARN d'organes absents de nos prélèvements, à savoir les testicules, les glandes mammaires, les ovaires, le pancréas, le thymus, la moëlle osseuse et les ganglions lymphatiques. Au total, ce sont donc 19 organes qui ont été testés. Ces résultats additionnels ont bien confirmé que l'APOL6 est la plus exprimée dans le TA, à hauteur de 520 fois son expression dans le cerveau, à nouveau utilisé comme référence (Figure 36B). Parmi les organes du panel commercial, celui dans lequel l'APOL6 était la plus exprimée après le TA était les glandes mammaires (22 fois l'expression du cerveau). Ceci pourrait être facilement explicable par le fait que les glandes mammaires contiennent elles-mêmes une proportion importante de TA (Hassiotou & Geddes 2013).

Ces résultats montrent que le gène *APOL6* est transcrit dans le TA, mais ne prouvent pas encore que la protéine APOL6 est bien présente dans ces tissus. Pour vérifier cela au niveau protéique, nous avons réalisé un Western blot. Les protéines des organes ont été extraites dans du tampon RIPA, puis un Western blot a été réalisé avec nos anticorps anti-APOL6. Le résultat obtenu, visible sur la figure 37, confirme les observations faites par qRT-PCR. En effet, aucun signal APOL6 n'a été détecté dans la plupart des organes testés, à l'exception du TA gonadal et du TA inguinal, chacun présentant une bande aux environs de 40 kDa (Figure 37). La taille attendue pour les isoformes 1 et 2 de l'APOL6 est de 35 kDa et 36 kDa respectivement. La

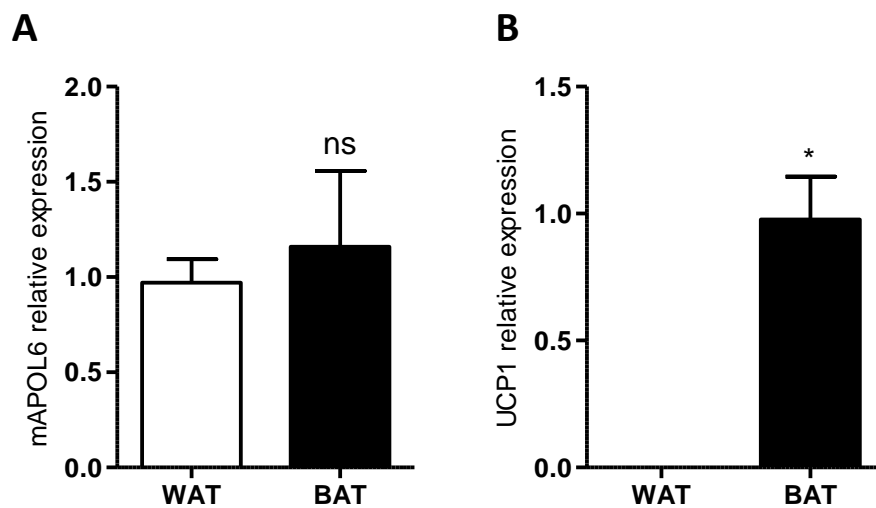
bande observée correspondait donc à un poids moléculaire légèrement plus élevé, ce qui peut s'expliquer par la présence éventuelle de modifications post-traductionnelles.



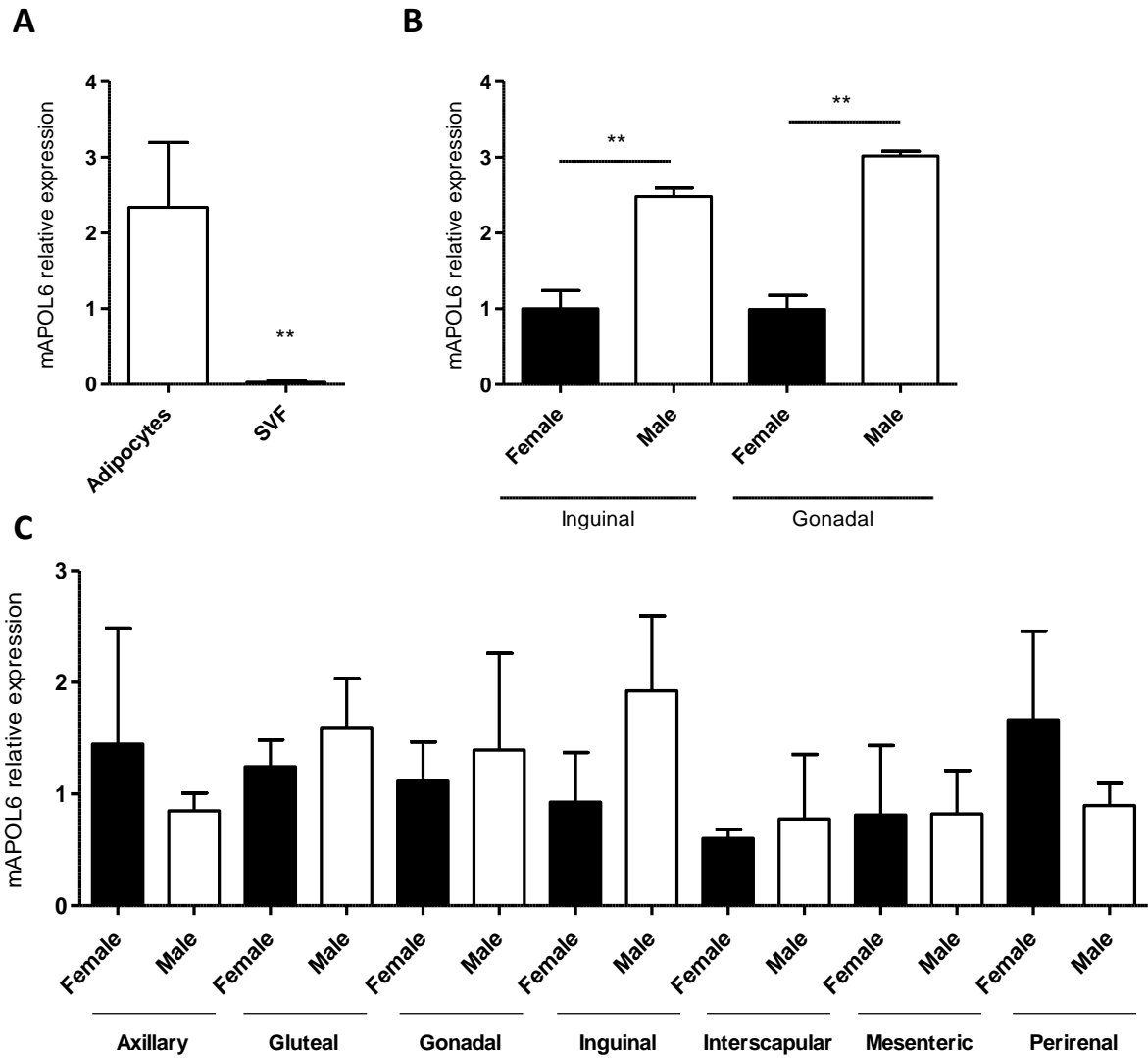
**Figure 36 : Localisation de l'APOL6 au sein de différents organes de la souris, expression mesurée par qRT-PCR.** Normalisation de la qRT-PCR par rapport au cerveau et aux gènes de référence RPLP0, HPRT et PPIA.  
**A** : organes prélevés manuellement au laboratoire (n=4). Test statistique : Kruskal-Wallis suivi de Dunns.  
**B** : échantillons d'ARN commercial (n=1).



**Figure 37 : Localisation de l'APOL6 au sein de différents organes de la souris par Western blot.** Il s'agit des organes prélevés au laboratoire qui ont fait l'objet de la qRT-PCR présentée à la figure 36A. L'actine est présentée comme contrôle.



**Figure 38 : Expression mesurée par qRT-PCR de l'APOL6 (A) et de UCP1 (B) dans le tissu adipeux blanc (WAT) et dans le tissu adipeux brun (BAT).** Normalisation par rapport au WAT et aux gènes de référence RPLP0, HPRT et PPIA. (n=5). Test statistique : Mann-Whitney.



**Figure 39 : Expression de l'APOL6 mesurée par qRT-PCR. A :** Dans la fraction adipocytaire (Adipocytes) et la fraction stromale vasculaire (SVF) (n=7). **B :** Dans le tissu adipeux gonadal et inguinal de souris mâles et femelles (n=3). **C :** Dans 7 dépôts de tissus adipeux différents de souris mâles et femelles (n=3). Tests statistiques : Mann-Whitney. Normalisation par rapport aux gènes de référence RPLP0, HPRT et PPIA.



Le fait qu'aucune autre bande n'ait été observée et le fait que ce résultat coïncide parfaitement avec le résultat obtenu par qRT-PCR renforcent notre conviction que cette bande corresponde bien à de l'APOL6.

Le TA blanc, largement majoritaire dans l'organisme, et le TA brun, présent principalement dans un seul petit dépôt chez l'adulte (Sacks & Symonds 2013), sont fonctionnellement différents. Alors que le premier assure les fonctions principales du TA, à savoir le stockage d'énergie ainsi que ses fonctions endocrines récemment découvertes, le second assure une fonction de thermogénèse (Ikeda et al. 2018). Pour y parvenir, les adipocytes bruns expriment le gène UCP1, dont la protéine a pour effet de dissiper le gradient de protons entre l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale. Ceci a comme conséquence de découpler la respiration de la production d'ATP, dissipant ainsi l'énergie en chaleur (Ikeda et al. 2018). Afin de déterminer si l'expression d'APOL6 observée dans deux dépôts de TA blanc (gonadal et inguinal) était aussi présente dans le TA brun, nous avons extrait celui-ci de plusieurs souris et nous y avons mesuré l'expression d'APOL6 par qRT-PCR. Aucune différence significative n'a été observée (Figure 38A). Afin de vérifier que l'échantillonnage des tissus a été correctement réalisé, nous avons mesuré l'expression d'UCP1 dans ces deux tissus. Comme attendu, UCP1 n'était exprimé que dans le TA brun (Figure 38B).

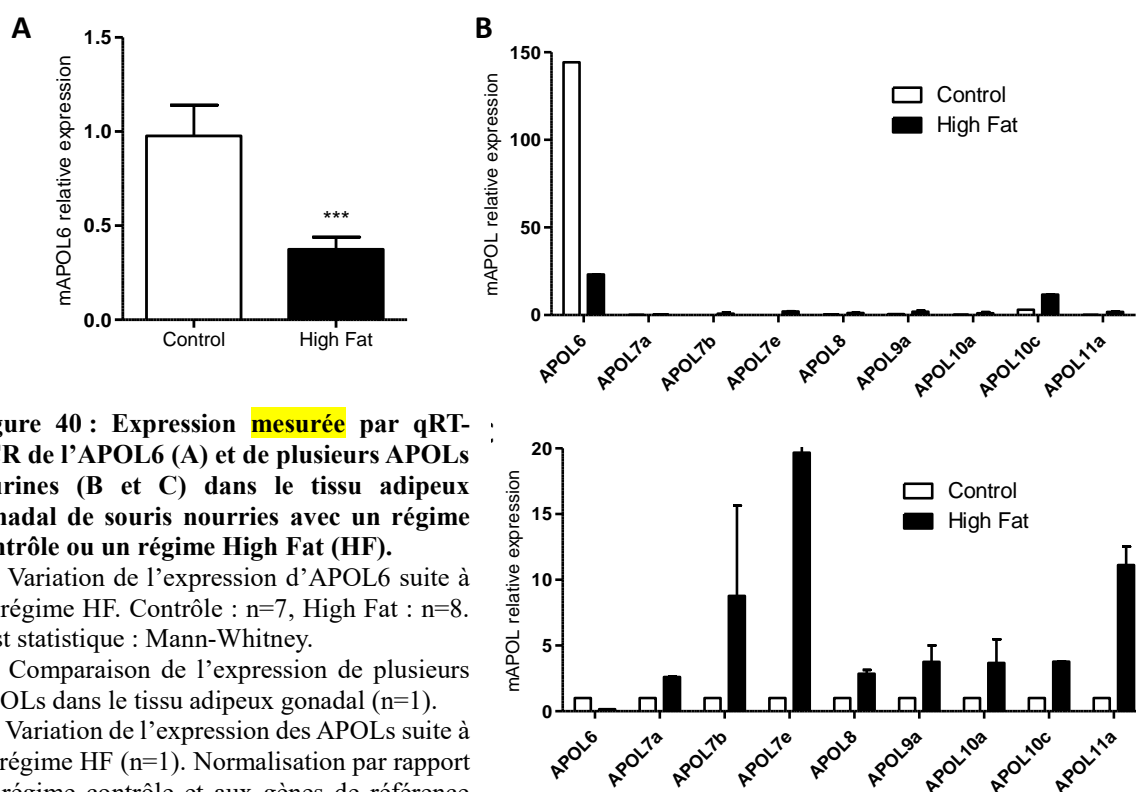
Le type cellulaire le plus abondant dans le TA sont les adipocytes. Néanmoins, le TA comporte d'autres cellules, telles que des cellules immunes (macrophages, lymphocytes, éosinophiles, mastocytes, etc.), des pré-adipocytes, des cellules souches mésenchymateuses, des vaisseaux sanguins, etc, regroupées sous le nom de fraction stromale vasculaire (SVF). Afin de déterminer quel type cellulaire était responsable de l'expression d'APOL6 au sein du TA, nous avons séparé la fraction adipocytaire de la SVF par centrifugation, puis mesuré l'expression d'APOL6 par qRT-PCR. Celle-ci était présente dans la fraction contenant les adipocytes, de l'ordre de 2 fois plus que dans le TA total, alors que dans la SVF, l'expression était 35 fois plus faible que dans le TA total (Figure 39A). Cela suggère que les adipocytes sont les cellules responsables de la plus grande partie de l'expression d'APOL6 dans le TA, et que leur expression, plus élevée que la moyenne du tissu, se retrouve diluée par l'expression plus faible des autres cellules. Toutefois, nous n'avons pas subdivisé la fraction SVF en ses différents composants cellulaires, et il est possible que certains types cellulaires minoritaires expriment plus d'APOL6 que d'autres dans la SVF mais, au vu de la différence d'expression observée, il semble raisonnable de conclure que l'expression d'APOL6 du TA est majoritairement due aux adipocytes.

Lors de cette expérience visant à examiner l'expression d'APOL6 au sein des différentes cellules du TA, deux dépôts de tissu adipeux ont été prélevés : le dépôt gonadal (aussi appelé épидидymal), situé dans l'abdomen autour des gonades, et le dépôt inguinal, situé sous la peau au niveau du bas ventre et des flancs. Ces dépôts de TA ont été prélevés chez des souris mâles et des souris femelles. L'expression d'APOL6 n'était pas significativement différente entre les deux dépôts étudiés (Figure 39B). Par contre, son expression était significativement plus élevée chez les souris mâles que chez les souris femelles, et ce quel que soit le dépôt observé. Afin de vérifier si cette différence d'expression entre les deux sexes se confirmait sur un plus grand nombre de souris, différents dépôts de tissu adipeux ont été prélevés chez des souris mâles et des souris femelles. L'expression d'APOL6 a été mesurée dans chacun de ceux-ci et n'a abouti à aucune différence statistiquement significative en raison de la variabilité observée (Figure 39C). Notons toutefois que des petites différences, bien que non statistiquement significatives, étaient observables. Il semblerait que les dépôts glutéal, inguinal et gonadal présentent une expression d'APOL6 plus élevée chez le mâle que la femelle, ce qui rejoint l'observation faite à la figure 39B. Néanmoins, d'autres dépôts montrent une différence dans l'autre sens, avec une expression d'APOL6 plus élevée chez la femelle dans les dépôts axillaire et périrénal. Il se pourrait donc que les mâles et femelles expriment l'APOL6 différemment selon les dépôts de tissu adipeux. Ceci serait intéressant puisqu'il est connu que les femmes et les hommes ont des différences quant à la distribution des graisses au sein de ces dépôts (Karastergiou et al. 2012). L'activité de stockage et l'activité lipolytique varient aussi selon le dépôt de tissu adipeux entre hommes et femmes (Wang, X. et al. 2011; Varlamov et al. 2014). Par conséquent, le fait que l'APOL6 pourrait être différemment exprimée selon le dépôt et selon le sexe n'est pas improbable. Néanmoins, la variabilité entre les souris était trop élevée et le nombre d'échantillons trop faible pour pouvoir conclure à ce sujet en l'état. Il serait intéressant de répliquer l'expérience avec un plus grand nombre de souris afin de vérifier si cette tendance devient significative ou s'il s'agit uniquement de différences de bruit de fond.

### 4.3. L'expression de l'APOL6 diminue suite à un régime gras

Une fonction essentielle des adipocytes étant de stocker les acides gras au sein de gouttelettes lipidiques, il était intéressant d'investiguer l'effet d'un régime gras (High Fat, HF), composé de 60 % de matières grasses, sur l'expression d'APOL6 au sein des adipocytes. Pour ce faire, des adipocytes extraits de souris nourries au régime HF ou par un régime contrôle (Low Fat, LF) ont été utilisés pour déterminer l'expression d'APOL6 par qRT-PCR. Cette expérience montre une expression plus faible de l'APOL6 dans les adipocytes sous conditions HF (Figure 40A), par rapport aux souris contrôles nourries au régime LF.

L'expression de plusieurs autres APOLs a été mesurée dans les adipocytes LF ou HF. Il en ressort qu'en comparaison avec l'APOL6, celles-ci sont relativement peu exprimées par les adipocytes (Figure 40B). Même lorsque l'expression d'APOL6 est faible suite au traitement HF, elle demeure l'APOL la plus exprimée par les adipocytes, l'APOL10c étant l'APOL la plus exprimée ensuite (Figure 40B). Par contre, lorsqu'on compare l'expression relative des APOL murines en régime HF par rapport aux conditions LF, on observe que l'APOL6 est la seule à diminuer, tandis que toutes les autres APOL murines sont surexprimées par rapport aux conditions contrôles (Figure 40C). Par conséquent, l'APOL6, en plus d'être l'APOL murine la plus exprimée dans le tissu adipeux, est donc aussi unique par le fait d'être sous-exprimée en conditions d'obésité.

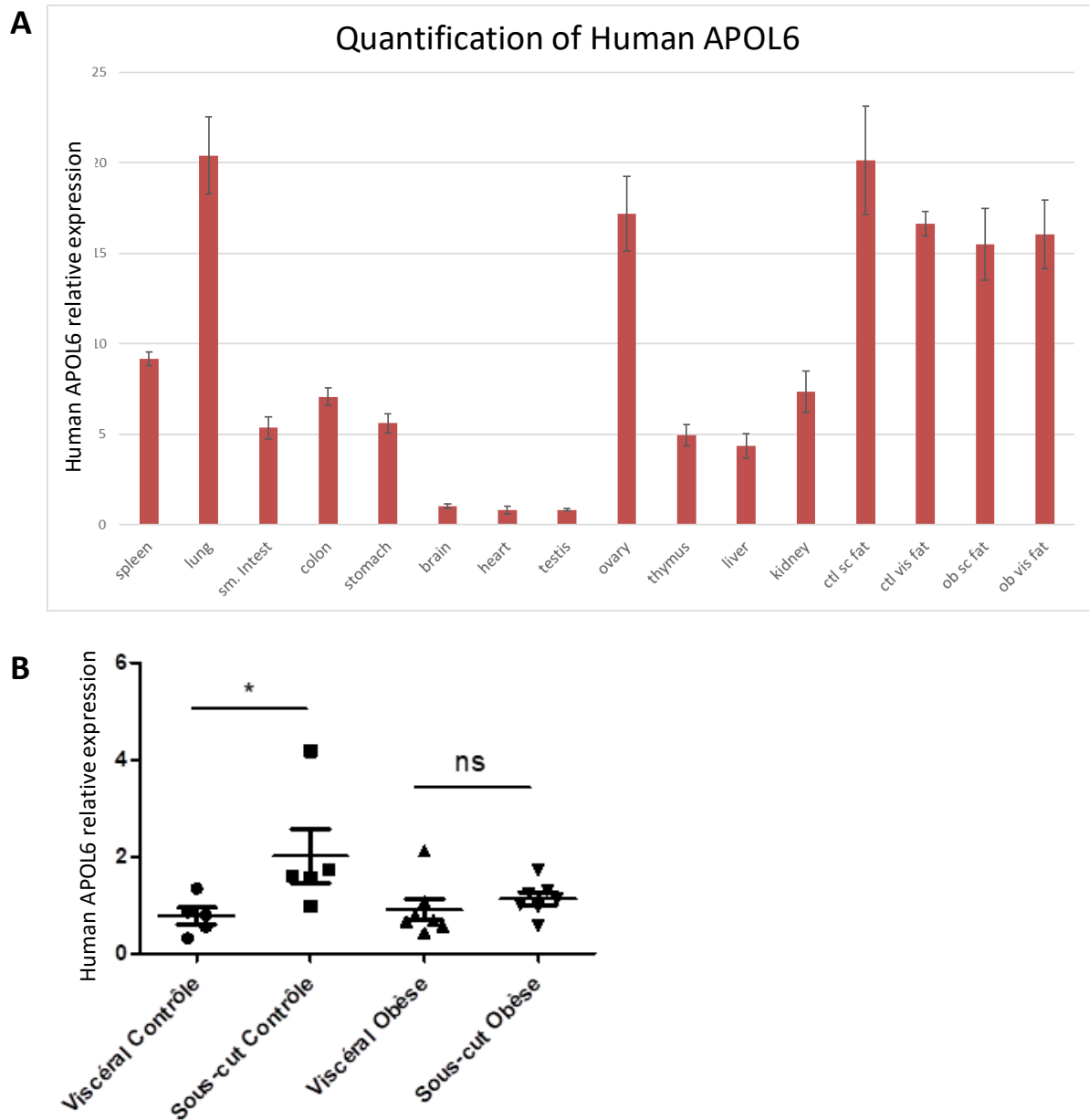


**Figure 40 : Expression mesurée par qRT-PCR de l'APOL6 (A) et de plusieurs APOLs murines (B et C) dans le tissu adipeux gonadal de souris nourries avec un régime contrôle ou un régime High Fat (HF).**

**A :** Variation de l'expression d'APOL6 suite à un régime HF. Contrôle : n=7, High Fat : n=8. Test statistique : Mann-Whitney.

**B :** Comparaison de l'expression de plusieurs APOLs dans le tissu adipeux gonadal (n=1).

**C :** Variation de l'expression des APOLs suite à un régime HF (n=1). Normalisation par rapport au régime contrôle et aux gènes de référence RPLP0, HPRT et PPIA.



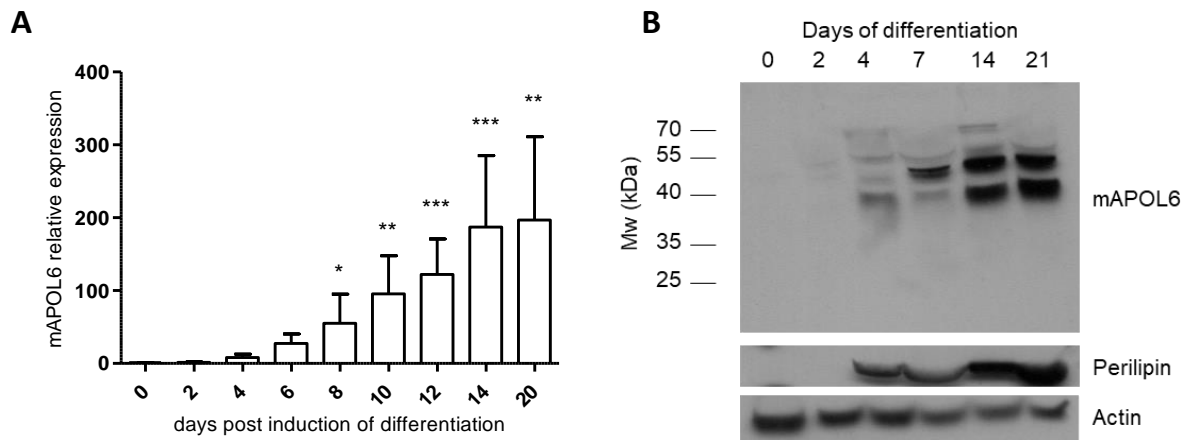
**Figure 41 : Expression de l'APOL6 humaine dans différents organes et dans le tissu adipeux. A :** Profil d'expression établi par qRT-PCR de l'APOL6 humaine au sein de plusieurs organes à partir d'ARN commercial (n=1-). **B :** Expression mesurée par qRT-PCR de l'APOL6 humaine dans les tissus adipeux viscéral et sous-cutané de patients contrôles (n=5) et de patients obèses (n=7). Test statistique : Mann-Whitney. Figures assemblées par Erard Schelstraete dans le cadre de son mémoire.

#### **4.4. Le profil d'expression de l'APOL6 humaine diffère de celui de la souris**

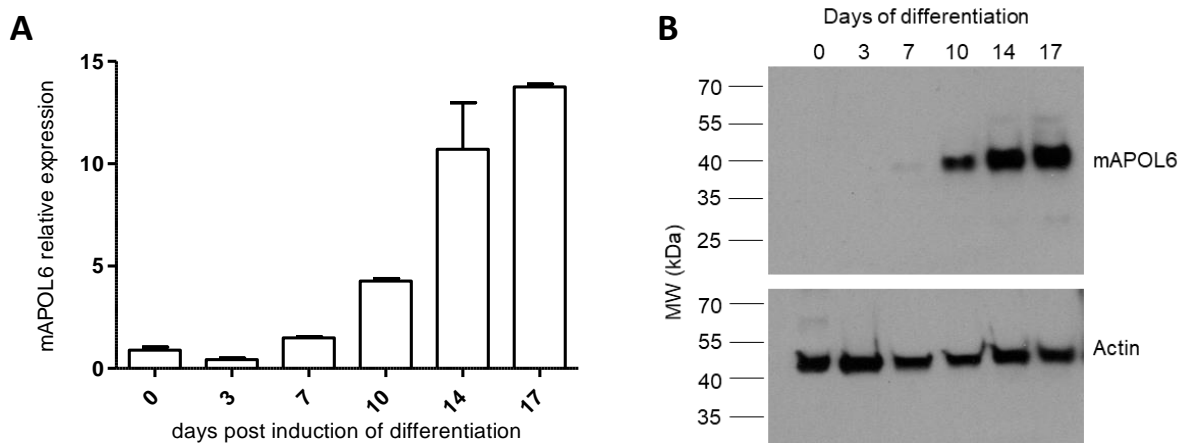
Dans le cadre du mémoire d'Erard Schelstraete, nous avons voulu comparer le profil d'expression de l'APOL6 humaine avec celui de l'APOL6 murine. Ces deux protéines sont les seules APOLs orthologues entre les deux espèces. Elles affichent une identité de séquence nucléique de 63 % et de séquence protéique de 41 %, ce qui est relativement faible pour des protéines considérées comme orthologues. Afin de mesurer l'expression d'APOL6 dans des organes humains, nous avons commandé des échantillons d'ARN total de plusieurs organes. Pour le TA, nous avons obtenu des biopsies provenant de patients consentants de l'hôpital Vésale, à partir desquelles nous avons extrait l'ARN.

Les expériences de qRT-PCR réalisées sur ces différents échantillons ont montré que l'APOL6 humaine est principalement exprimée dans les poumons, les ovaires et le TA (Figure 41A). Nous voyons donc que l'APOL6 humaine, comme l'APOL6 murine, est exprimée dans le TA. Toutefois, l'échelle d'expression est différente, celle-ci atteignant une valeur de 15 à 20 fois plus que le cerveau chez l'humain, contre 1300 à 1700 fois plus que le cerveau chez la souris. Malheureusement, ce résultat ayant été obtenu à partir d'ARN commercial, nous n'avons pas bénéficié de plus d'échantillons permettant de répéter l'expérience. Nous n'avons donc pas pu faire de statistiques pour évaluer la validité de ce résultat. De ce fait, la conclusion principale est que l'APOL6 humaine est exprimée dans le tissu adipeux, mais pas dans une magnitude comparable à celle de l'APOL6 murine.

Au sein des échantillons de TA, nous avons comparé l'expression de l'APOL6 entre le dépôt viscéral et le dépôt sous-cutané, et entre patients sains et patients obèses (Figure 41B). Chez les patients sains, l'expression d'APOL6 était plus élevée dans le TA sous-cutané que dans le TA viscéral, différence qui n'a pas été observée chez les patients obèses. Une telle différence d'expression de l'APOL6 entre dépôts de TA n'a pas été observée chez les souris (Figure 39B-C). Néanmoins, la figure 39C laisse la porte entrouverte à cette possibilité. En effet, bien que les résultats soient statistiquement non significatifs, il est possible que des différences se manifestent avec un plus grand nombre de souris. Finalement, aucune corrélation significative entre l'expression d'APOL6 et leur âge, sexe, taille ou indice de masse corporelle n'a été observée.



**Figure 42 : Expression de l'APOL6 pendant la différenciation de cellules 3T3-L1 en adipocytes mesurée par qRT-PCR (A) (n=3 à 9 selon les points) et par Western blot (B) (n=1). Normalisation de la qRT-PCR par rapport au point 0 et aux gènes de référence RPLP0, HPRT et PPIA. Test statistique : Kruskal-Wallis suivi de Dunns. Pour le Western blot, l'actine est utilisée comme contrôle de charge et la périlipine comme contrôle de la différenciation.**



**Figure 43 : Expression de l'APOL6 pendant la différenciation de cellules souches mésenchymateuses du tissu adipeux (ATMSC) en adipocytes mesurée par qRT-PCR (A) (n=2) et par Western blot (B) (n=1). Normalisation de la qRT-PCR par rapport au point 0 et aux gènes de référence RPLP0, HPRT et PPIA. Pour le Western blot, l'actine est présentée comme contrôle de charge.**

#### 4.5. L'expression d'APOL6 est induite pendant l'adipogénèse

Le modèle prévalant pour étudier les adipocytes *in vitro* est la lignée de cellules 3T3-L1. Il s'agit d'une lignée de cellules établie en 1974 par Green et Meuth (Green & Meuth 1974), dérivées des cellules NIH3T3, lignée elle-même établie en 1963 par Todaro et Green à partir de fibroblastes d'embryons de souris Swiss albino (Todaro & Green 1963). Les cellules de la lignée 3T3-L1 ont aussi une apparence de fibroblastes et se cultivent comme tels, mais peuvent enclencher un programme de différenciation en adipocytes. Lorsque ces cellules sont soumises à un cocktail de différenciation composé de dexaméthasone, d'insuline et de 3-isobutyl-1-méthylxanthine (IBMX), elles entament le processus d'adipogénèse. Cela se traduit par des changements morphologiques importants, comprenant l'arrondissement des cellules, et l'apparition puis la croissance des LD. Les cellules expriment alors les principaux facteurs de transcription qui régulent l'adipogénèse tels que CEBP $\beta$ , PPAR $\gamma$ , et CEBP $\alpha$  (Tang & Lane 2012). Ces facteurs de transcription induisent alors des changements métaboliques, avec l'expression de tous les enzymes nécessaires à la lipogénèse et à la lipolyse (Tang & Lane 2012). Le résultat est une cellule qui se comporte comme un adipocyte, d'où son utilisation continue depuis plus de 40 ans comme modèle en la matière.

L'APOL6 est majoritairement exprimée dans les adipocytes *in vivo*. Afin de pouvoir utiliser la lignée 3T3-L1 comme modèle *in vitro*, il a d'abord fallu s'assurer que ces cellules expriment aussi l'APOL6. Pour ce faire, l'expression d'APOL6 a été mesurée à intervalles réguliers au cours de la différenciation de 3T3-L1 en adipocytes, et nous avons observé que celle-ci augmentait pendant les deux premières semaines de différenciation, jusqu'à atteindre un plateau se situant entre 100 et 300 fois l'expression de départ (Figure 42A). Cette même cinétique était visible au niveau protéique par Western blot. L'APOL6 était indétectable au jour 0, au moment de l'ajout du cocktail de différenciation dans le milieu, puis une bande apparaissait au jour 4 et augmentait en intensité jusqu'au jour 14 (Figure 42B). Nous pouvons voir sur ce résultat de Western blot la présence d'une bande environ 10 kDa plus lourde que la bande correspondant à l'APOL6. De façon intéressante, cette bande apparaît aussi au cours de la différenciation, suivant une cinétique comparable à celle de l'APOL6, bien qu'au jour 7 elle soit un peu plus intense. Nous ne savons pas de quelle protéine il s'agit. Il se pourrait que ce soit une version modifiée de l'APOL6, par exemple suite à une sumoylation, mais nous n'en avons pas la preuve, si ce n'est que l'APOL6 présente un site de sumoylation sur la lysine 155 et que le poids moléculaire pourrait correspondre. En parallèle, la périlipine, une protéine entourant la LD et donc produite dans les adipocytes, augmentait de façon similaire, visible à partir du jour 4 et

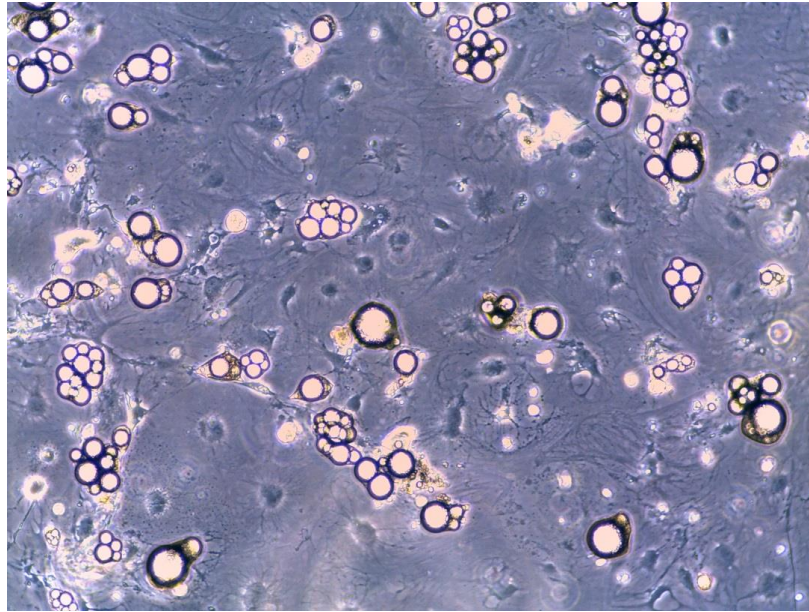
atteignant un plateau au jour 14.

Afin de reproduire ces résultats dans un autre modèle cellulaire, nous avons extrait des cellules souches de TA : des ATMSC. Par rapport à la lignée 3T3-L1, les ATMSC ont l'avantage d'être directement issus du TA de souris. Ils sont donc plus proches du modèle *in vivo* que des cellules en culture depuis plusieurs décennies. Ils peuvent aussi être prélevés de différentes souris transgéniques, et donc être eux-mêmes transgéniques. Leur principal inconvénient est que, étant une culture primaire, ils sont plus difficiles à cultiver et ne peuvent se cultiver que sur un nombre limité de passages. De plus, leur efficacité à se multiplier et à se différencier est très variable d'une souris à l'autre, contrastant avec la fiabilité de la lignée 3T3-L1. Nous avons différencié ces ATMSC *in vitro* de la même manière que les 3T3-L1, et à nouveau, l'expression d'APOL6 augmentait au cours de l'adipogénèse, tant au niveau de l'ARNm estimé par qRT-PCR qu'au niveau protéique par Western blot (Figures 43A et 43B). Bien que cette augmentation d'expression d'APOL6 se retrouvait dans les deux modèles *in vitro*, l'intensité de cette induction était plus faible dans les ATMSC, celle-ci atteignant un facteur 15 contre un facteur 100-300 dans les 3T3-L1. Par Western blot, la bande correspondant à l'APOL6 n'apparaissait qu'après 7 jours au lieu de 4 dans les 3T3-L1. Ceci est vraisemblablement dû au fait que le rendement de différenciation était plus faible dans les ATMSC que dans les 3T3-L1. En effet, alors que la grande majorité des 3T3-L1 se différenciaient, il s'agissait d'un pourcentage inférieur chez les ATMSC (Figure 44).

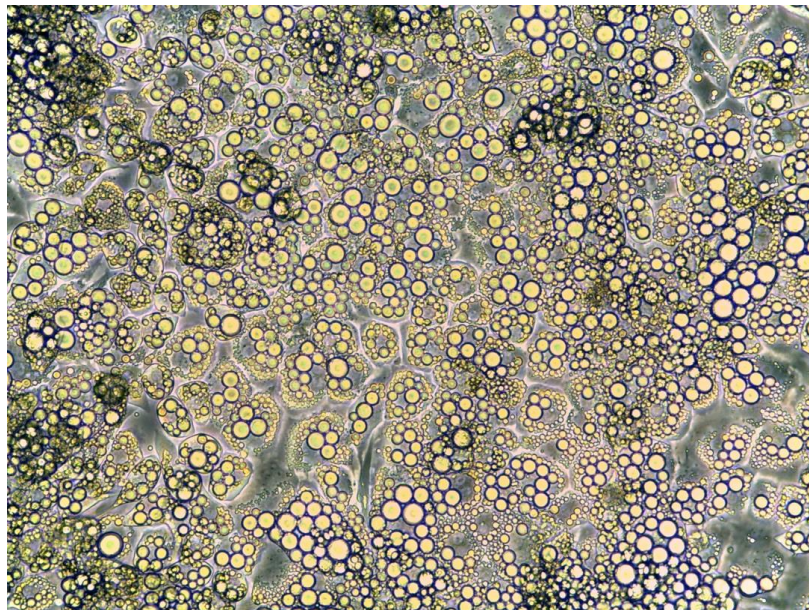
Bien que l'efficacité de différenciation des ATMSC ait été plus faible que celle des 3TL-L1, les deux types de cellules modèles ont pu se différencier en adipocytes. Dans les deux cas, l'expression d'APOL6 a fortement augmenté au cours de cette différenciation, tant au niveau de l'ARNm qu'au niveau de la protéine. Cela confirme et renforce l'observation *in vivo* que les adipocytes sont le type cellulaire principalement responsable de l'expression d'APOL6. Cela établit aussi que ces modèles de culture cellulaire *in vitro* sont appropriés pour l'étude de l'APOL6 dans les adipocytes.



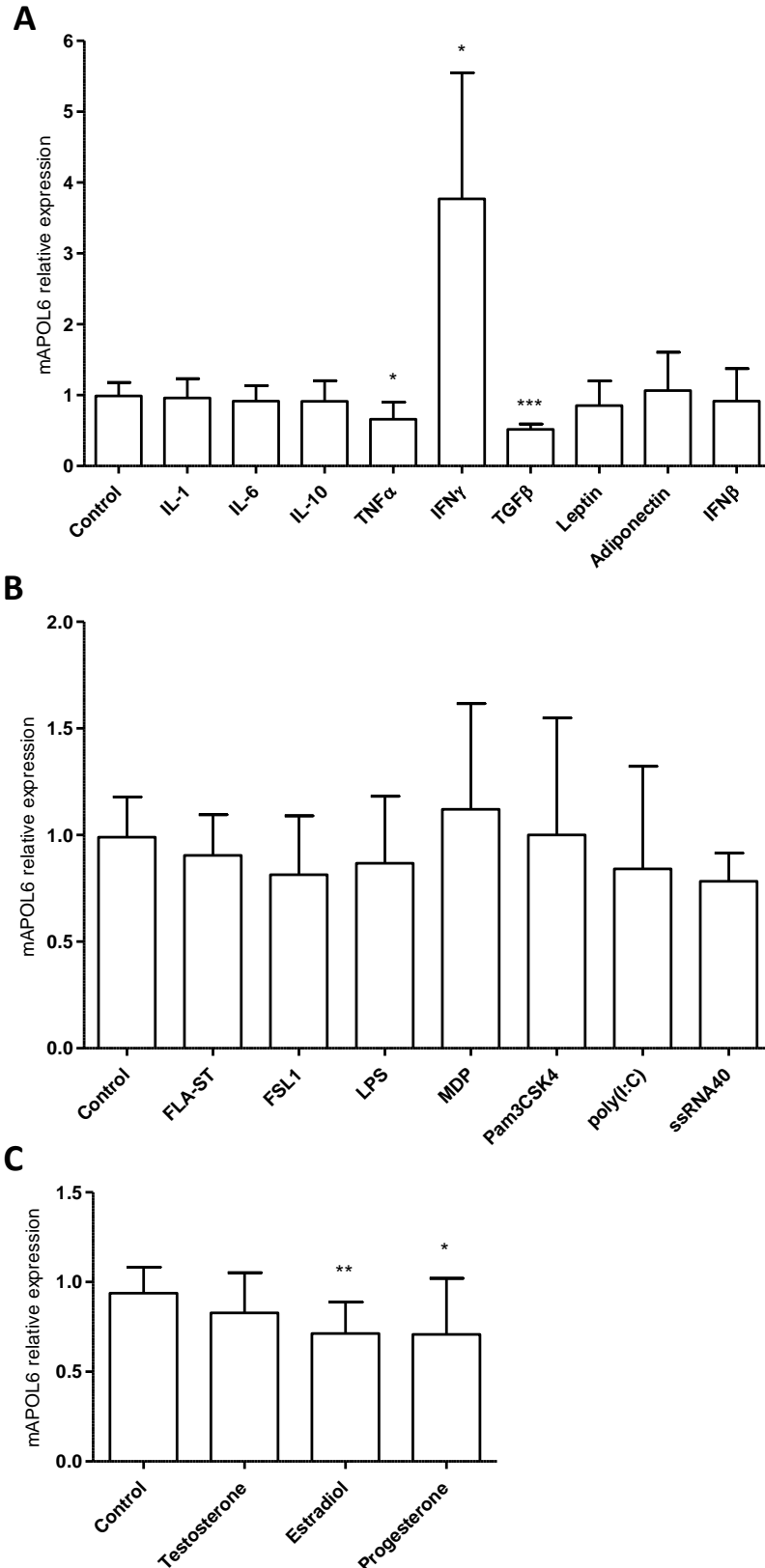
**A** ATMSC



**B** 3T3-L1



**Figure 44 : Images représentatives d'ATMSC (A) et de 3T3-L1 (B) différenciés en adipocytes. Images obtenues au microscope optique Leica au grossissement 100x.**



**Figure 45 : Expression mesurée par qRT-PCR de l'APOL6 dans des cultures de 3T3-L1 différenciées après stimulation pendant 24h de cytokines (A), d'agonistes TLR (B) et d'hormones sexuelles (C). Normalisation par rapport au contrôle et aux gènes de référence RPLP0, HPRT et PPIA. Test statistique : Mann-Whitney entre chaque traitement et le contrôle correspondant.**

#### **4.6. L'expression d'APOL6 ne dépend pas de stimuli inflammatoires à part IFN $\gamma$ et TGF $\beta$**

Une des caractéristiques connues de la famille des APOL est qu'elles sont induites par des stimuli inflammatoires, notamment par des cytokines telles que le TNF $\alpha$  (Monajemi et al. 2002), l'IFN $\alpha$  (Hayashi et al. 2005), l'IFN $\beta$  (Stojdl et al. 2003) et l'IFN $\gamma$  (Sana et al. 2005; Zhaorigetu et al. 2011, 2008; Liao et al. 2011) ou par l'activation de TLR (Uzureau, S. et al. 2016). Ces dernières années, de nombreuses études ont démontré l'importance des interactions entre les adipocytes et le système immunitaire, notamment dans le cadre de l'inflammation de bas grade qui s'établit dans le TA en cas d'obésité (Harford et al. 2011; Apostolopoulos et al. 2016). Les adipocytes sont capables de répondre aux stimuli inflammatoires et de sécréter eux-mêmes différentes cytokines et chémokines (Rodríguez et al. 2015; Schaffler & Scholmerich 2010). De plus, il a été montré que les adipocytes et les préadipocytes expriment une large gamme de TLRs, que ce soit *in vivo* ou *in vitro* avec un modèle de 3T3-L1 (Ballak et al. 2015; Franchini et al. 2010; Yu et al. 2014; Schaffler & Scholmerich 2010). Le profil d'expression des TLRs dépend de l'espèce observée, du type cellulaire utilisé comme modèle et du stade de différenciation des adipocytes. Ainsi, les adipocytes murins WT expriment tous les TLRs à l'exception du TLR7 et du TLR8, tandis que les préadipocytes expriment aussi le TLR7 (Schaffler & Scholmerich 2010). Les préadipocytes de la lignée 3T3-L1 expriment les TLRs 1, 2, 3, 4 et 6, mais lorsqu'ils sont différenciés en adipocytes, ils expriment aussi le TLR9 (Schaffler & Scholmerich 2010). Les adipocytes sont capables de se comporter en cellules présentatrices d'antigènes non professionnelles en présentant des lipides endogènes ou exogènes sur des molécules CD1d, reconnues par le TCR des cellules iNKT (Xiao et al. 2016; Schipper 2012; Huh et al. 2013; Rakhshandehroo et al. 2014).

Au vu de ces nombreuses interactions entre le système immunitaire et les adipocytes, nous avons voulu déterminer si l'expression de l'APOL6 murine pouvait être modulée par la présence de cytokines ou de stimuli TLR dans le milieu. Nous avons donc soumis des cellules 3T3-L1 différenciées à plusieurs stimuli, comprenant des cytokines pro- ou anti-inflammatoires et des agonistes des TLR. De toutes les cytokines testées, seul l'IFN $\gamma$  a augmenté l'expression d'APOL6, en moyenne d'un facteur 4 (de 2 à 6 selon les expériences), tandis que le TNF  $\alpha$  et le TGF $\beta$  ont diminué son expression (Figure 45A). Ce résultat est partiellement en accord avec ce qui est connu des APOLs. En effet, l'IFN $\gamma$  est une cytokine pro-inflammatoire alors que le TGF $\beta$  est anti-inflammatoire. Cela correspond donc bien aux observations que les APOLs sont induites par des conditions d'inflammation. Il est plus étonnant que le TNF $\alpha$  ait pour effet de

diminuer l'expression d'APOL6, alors qu'il s'agit d'un des inducteurs les plus efficaces d'autres APOLs. Néanmoins, il convient de garder à l'esprit qu'il s'agit de l'expression d'APOL6 24 heures après la stimulation des cellules par une concentration spécifique de cytokine. Ainsi, il est possible que ces résultats varient en fonction de la concentration utilisée et de la fenêtre d'observation choisie au cours de la cinétique. De plus, il a été montré que le TNF $\alpha$  inhibe l'adipogénèse et est même capable de dédifférencier les adipocytes (Cawthorn et al. 2007; Xing et al. 1997; Tejerina et al. 2009). L'expression de l'APOL6, au contraire, augmente avec l'adipogénèse (Figures 42 et 43). Il est donc possible que cet effet du TNF $\alpha$  spécifique aux adipocytes prenne le dessus sur la simple stimulation inflammatoire observée sur l'autres APOLs dans d'autres tissus, résultant en une diminution de l'expression d'APOL6.

Aucun des stimuli TLR testés n'a eu d'effet sur l'expression d'APOL6 (Figure 45B). Il a pourtant été montré au laboratoire que plusieurs APOL murines sont activées par des agonistes des TLR, principalement via le TLR3 (Uzureau, S. et al. 2016). Ces observations ont toutefois été réalisées dans des cellules dendritiques, qui sont des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles et qui expriment un niveau élevé de TLR (Kawai & Akira 2011). Bien qu'ils soient capables d'exprimer des TLR et de présenter certains types d'antigènes, les adipocytes ne sont pas autant spécialisés dans ce domaine et il n'est dès lors pas surprenant de ne pas voir de réponse suite à l'ajout d'agonistes des TLR.

#### **4.7. L'expression d'APOL6 est diminuée par l'œstradiol et la progestérone**

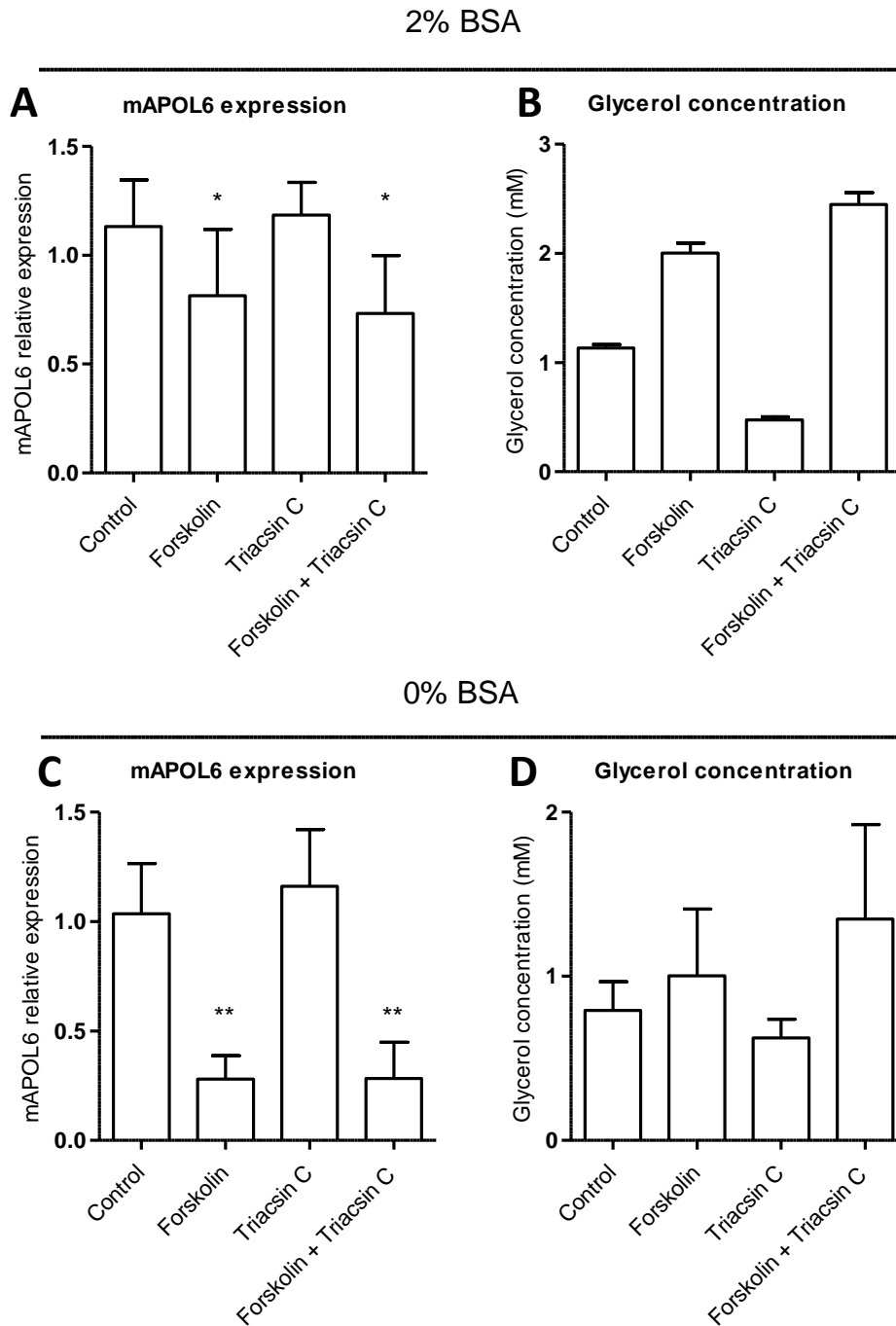
En plus des stimuli inflammatoires et des agonistes des TLRs, nous avons soumis les adipocytes 3T3-L1 différenciés à des hormones sexuelles. En effet, il existe d'importantes différences entre mâles et femelles quant au métabolisme et à la prise de poids (Karastergiou et al. 2012; Varlamov et al. 2014; Polotsky & Polotsky 2010). Ces différences ne sont pas imputables à une cause unique, mais il ne fait pas de doute que les hormones sexuelles y jouent un rôle prépondérant (Jelenik & Roden 2013; Varlamov et al. 2014; Law et al. 2014). Ces hormones agissent à plusieurs niveaux, dont les adipocytes eux-mêmes qui expriment les récepteurs pour la testostérone, la progestérone et les œstrogènes (Law et al. 2014). Par exemple les œstrogènes agissent sur le système nerveux central, le foie, le pancréas, les muscles, le réseau vasculaire et les adipocytes (Jelenik & Roden 2013).

Dans le but d'investiguer si les hormones sexuelles avaient un impact sur l'expression d'APOL6 au sein des adipocytes, nous avons traité ceux-ci avec de la progestérone, de la

testostérone et du  $17\beta$ -œstradiol. Le traitement par testostérone n'a pas abouti à une différence statistiquement significative, mais la progestérone et l'œstradiol ont provoqué une diminution moyenne de 30% de l'expression d'APOL6 (Figure 45C).

La progestérone et l'œstradiol sont des hormones sexuelles femelles produites principalement par les ovaires, mais sont aussi produites par d'autres tissus et aussi présentes chez l'homme en plus faibles quantités. La progestérone induit l'augmentation de masse du TA et l'induction de l'expression d'enzymes lipogéniques chez la femme (Stelmanska & Swierczynski 2013). Les œstrogènes, au contraire, ont un effet inhibiteur sur la lipogénèse et induisent l'expression de la HSL, promouvant ainsi la lipolyse (Jelenik & Roden 2013). De façon générale, ils ont amélioré la sensibilité à l'insuline, promeuvent la réponse anti-inflammatoire du système immunitaire dans la TA, et favorisent une distribution sous-cutanée des graisses (Law et al. 2014; Jelenik & Roden 2013; Varlamov et al. 2014).

Le fait que la progestérone et l'œstradiol, aux effets parfois opposés sur le métabolisme, aient un effet similaire sur l'APOL6 est un peu difficile à expliquer. Alors que la progestérone promeut le stockage de graisses, les œstrogènes favorisent la lipolyse. Nous savons que l'expression d'APOL6 augmente avec l'adipogénèse, une phase d'accumulation de lipides. Le fait que l'expression d'APOL6 diminue suite à l'ajout d'œstrogènes pourrait donc s'expliquer par le fait qu'ils ont un effet antagoniste avec cette phase. L'effet observé pourrait aussi ne pas avoir de lien direct avec leurs actions dans le TA. Par exemple, puisqu'il s'agit d'hormones sexuelles femelles, cela pourrait indiquer le fait que l'APOL6 est moins exprimé chez les souris femelles que chez les souris mâles. Nous avons vu à la figure 39B-C que c'était le cas dans les dépôts de TA inguinal et gonadal, mais que cela ne se reproduisait pas nécessairement dans d'autres dépôts de TA. Sans données supplémentaires, il n'est actuellement pas possible de conclure sur ce sujet.



**Figure 46 : Expression d'APOL6 et concentration en glycérol du milieu de culture après simulation de la lipolyse dans des adipocytes 3T3-L1.**

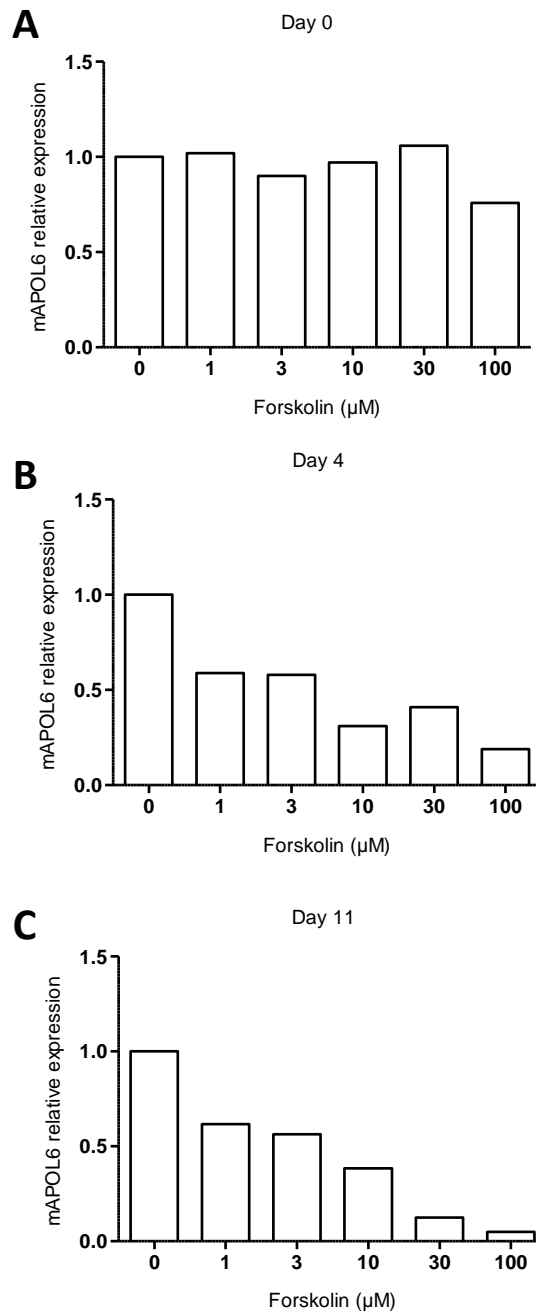
**A et C :** Expression mesurée par qRT-PCR de l'APOL6 dans des cultures de 3T3-L1 différenciées après stimulation pendant 24 h de Forskoline, de Triacsin C, ou des deux, avec ou sans BSA dans le milieu (A et C respectivement). N=8 répartis sur 3 expériences indépendantes. Normalisation par rapport au contrôle et aux gènes de référence RPLP0, HPRT et PPIA. Test statistique : Mann Whitney par rapport au contrôle.

**B et D :** Concentration de glycérol dans le milieu de culture de 3T3-L1 différenciées après stimulation pendant 24h de Forskoline, de Triacsin C, ou des deux, avec ou sans BSA dans le milieu (B et D respectivement). N=2.

#### **4.8. L'expression d'APOL6 est inhibée en présence d'AMPc**

Les adipocytes sont capables d'hydrolyser les lipides présents dans leurs LD pour relâcher des acides gras dans la circulation. Ce processus, connu sous le nom de lipolyse, est essentiel à la biologie des adipocytes. Nous avons voulu déterminer si la lipolyse pouvait affecter l'expression d'APOL6. Pour cela, les adipocytes 3T3-L1 ont été soumis à de la forskoline, une molécule capable d'augmenter l'AMPc en stimulant l'adénylate cyclase. L'AMPc active ensuite les voies de signalisation aboutissant au recrutement de lipases à la surface de la LD (Nielsen et al. 2014). De l'albumine de sérum bovin dépourvue d'acides gras (FA-free BSA), ainsi que de la triacine C (un inhibiteur de la Acyl-coenzyme A synthétase) ont été ajoutées au milieu dans le but respectivement d'aider à la libération des acides gras dans le milieu et d'empêcher leur réintégration ultérieure sous forme de TG dans la cellule (Paar et al. 2012). La concentration en glycérol a été utilisée comme détecteur de l'activité lipolytique des cellules. En effet, pour chaque TG hydrolysé, une molécule de glycérol et 3 acides gras sont libérés.

Comme attendu, la forskoline a déclenché la lipolyse, augmentant la concentration en glycérol du milieu d'un facteur 2,5 (Figure 46B). L'expression d'APOL6, elle, a diminué d'environ 30 % (Figure 46A). Par contre, en l'absence de BSA dans le milieu, l'expression d'APOL6 a été diminuée de 75 % (Figure 46C), tandis que la concentration en glycérol n'a que peu augmenté, indiquant une lipolyse peu efficace (Figure 46D). Par conséquent, l'expression d'APOL6 ne semble pas être influencée directement par la lipolyse. En effet, son expression était fortement diminuée lorsque la lipolyse était faible, et faiblement diminuée lorsque la lipolyse était forte. Ce découplage entre l'expression observée d'APOL6 et l'activité lipolytique indique que la baisse d'expression d'APOL6 n'est pas directement due à la lipolyse. Notre hypothèse est donc que l'expression d'APOL6 est inhibée par la présence de forskoline, particulièrement en l'absence de BSA, et non pas par la lipolyse.



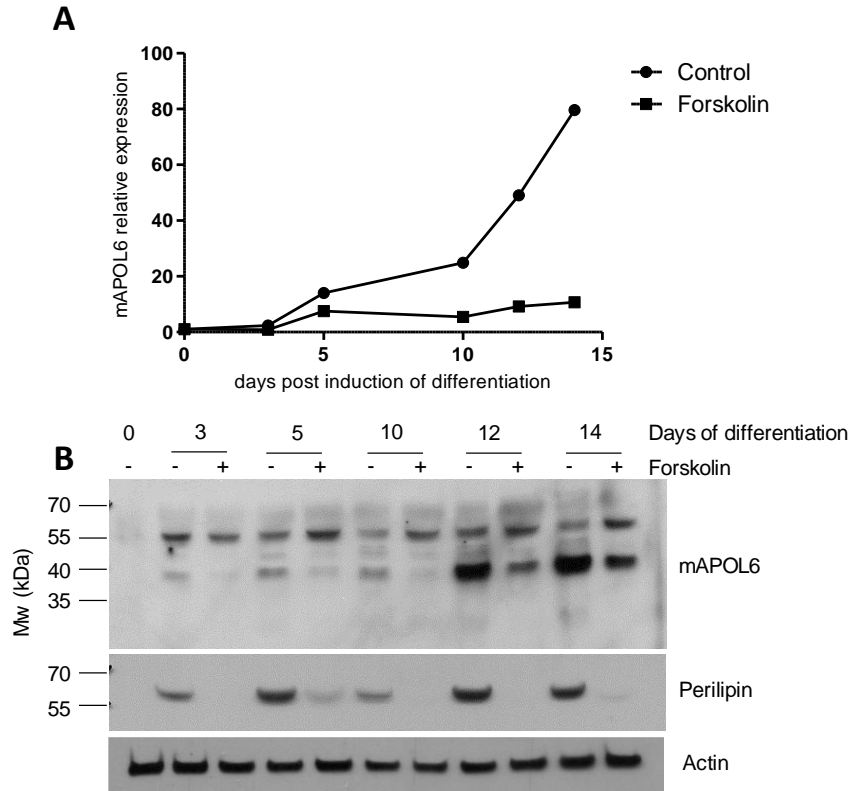
**Figure 47 : Expression mesurée par qRT-PCR de l'APOL6 dans des cultures de 3T3-L1 différenciées pendant 0 (A), 4 (B) et 11 (C) jours, après stimulation pendant 24h par de la Forskoline à différentes concentrations. Normalisation par rapport à la concentration 0  $\mu\text{M}$  et aux gènes de référence RPLP0, HPRT et PPIA. N=1.**



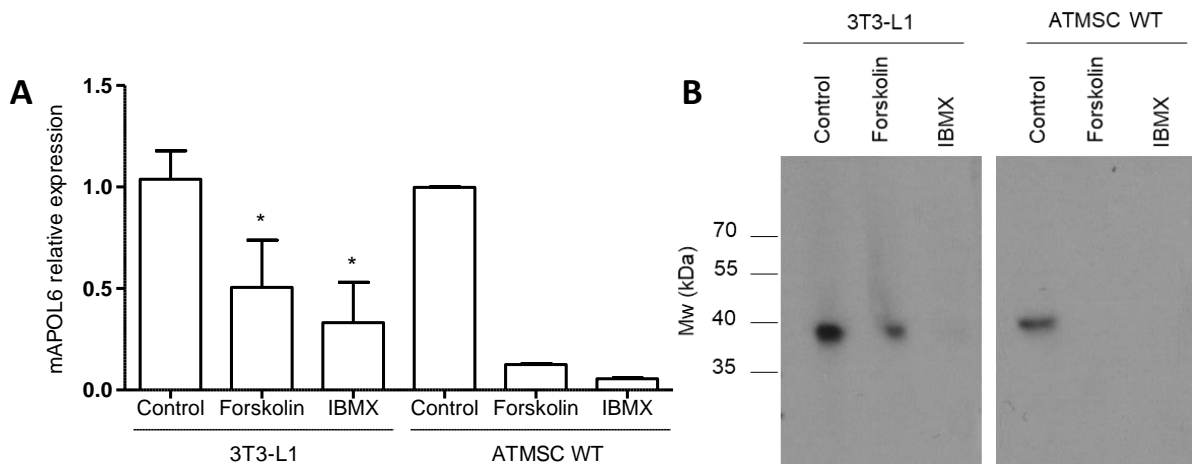
Afin de vérifier cette hypothèse, la forskoline a été ajoutée seule au milieu des 3T3-L1, à différentes concentrations et à différents stades de différenciation des cellules en adipocytes. Dans les 3T3-L1 non différenciés, l'expression d'APOL6 n'a pas été affectée, tandis qu'elle a été diminuée d'une manière dose-dépendante dans les cellules en différenciation (Figure 47). Cette expérience montre que l'expression basale d'APOL6 n'est pas affectée, mais que l'expression induite par la différenciation en adipocytes est inhibée. Pour vérifier cela, nous avons ajouté la forskoline au milieu de culture pendant toute la durée de la différenciation. Avec la forskoline présente en permanence dans le milieu, l'expression d'APOL6 n'a augmenté que d'un facteur 10, contre un facteur 80 pour les cellules différenciées en l'absence de forskoline (Figure 48A et B). Cela confirme donc que la forskoline inhibe l'expression de l'APOL6 induite pendant la différenciation. Il est toutefois nécessaire de noter que les cellules en présence de forskoline se sont moins bien différenciées que les cellules contrôles. Ceci est en accord avec certaines études montrant que l'AMPc, bien que nécessaire dans les phases initiales de l'adipogénèse, inhibe celle-ci s'il est présent dans les phases ultérieures (Rogne & Taskén 2014). Cette relative inhibition de la différenciation pourrait elle-aussi expliquer la plus faible hausse d'expression d'APOL6. Il est aussi possible que le résultat observé soit dû à ces deux effets conjointement.

Afin de confirmer ce résultat indépendamment de la forskoline, nous avons soumis les adipocytes 3T3-L1 à de l'IBMX, une molécule utilisée dans le cocktail de différenciation qui augmente la concentration d'AMPc en inhibant l'activité ces phosphodiésterases (Weishaar et al. 1985). Suite à cette stimulation, l'expression d'APOL6 a diminué, et ce de façon encore plus marquée qu'avec la forskoline (Figure 49A et B).

De ces différentes expériences, nous pouvons conclure que l'inhibition de l'expression d'APOL6 suite à l'ajout de forskoline, ou d'IBMX, dans le milieu est causée par l'augmentation de l'AMPc intracellulaire.

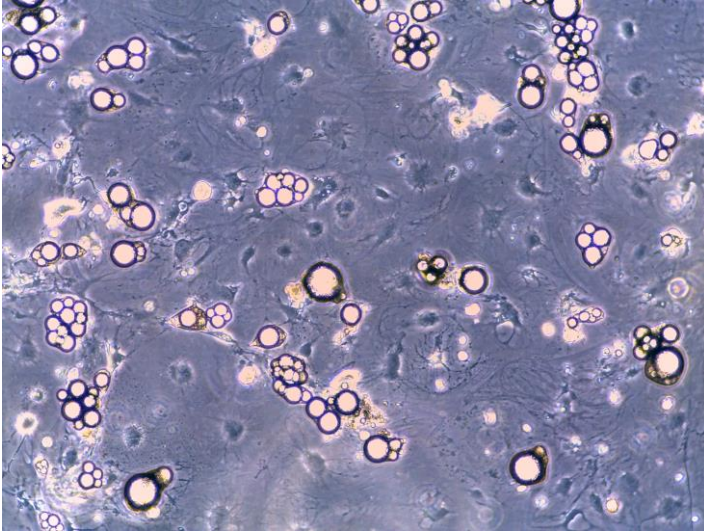


**Figure 48 : Expression de l'APOL6 pendant la différenciation de cellules 3T3-L1 en adipocytes en présence ou non de Forskoline mesurée par qRT-PCR (A) et par Western blot (B).** Les protéines des puits - proviennent de cellules n'ayant pas été en contact avec de la Forskoline, tandis que celles des puits + proviennent de cellules ayant été différenciées en présence constante de Forskoline. Normalisation de la qRT-PCR par rapport au point 0 et aux gènes de référence RPLP0, HPRT et PPIA. Pour le Western blot, la périlipine est présentée comme contrôle. N=1.

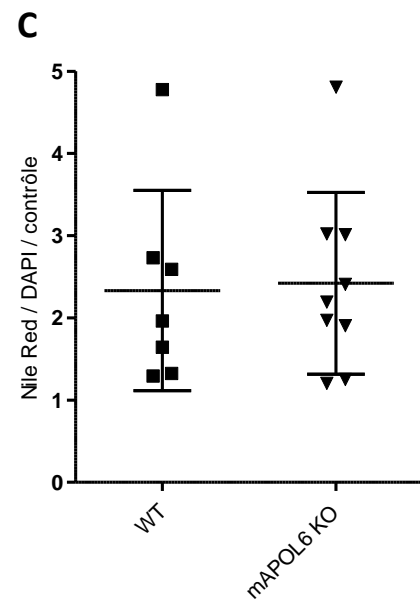
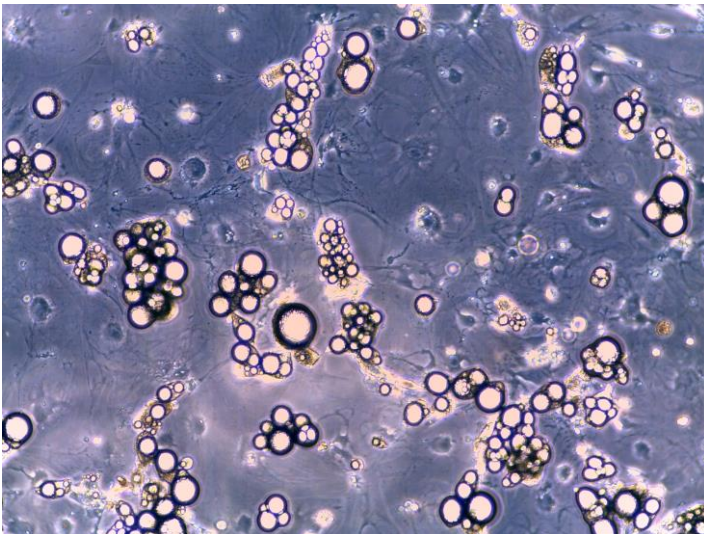


**Figure 49 : Expression de l'APOL6 dans des cellules 3T3-L1 et ATMSC différenciées, après 24h de stimulation par de la Forskoline ou de l'IBMX mesurée par qRT-PCR (A) et par Western blot (B).** Normalisation de la qRT-PCR par rapport au contrôle et aux gènes de référence RPLP0, HPRT et PPIA. 3T3-L1 : n=4. ATMSC : n=2. Test statistique pour les groupes 3T3-L1 : Mann-Whitney par rapport au contrôle.

### A ATMSCs WT



### B ATMSCs APOL6 KO

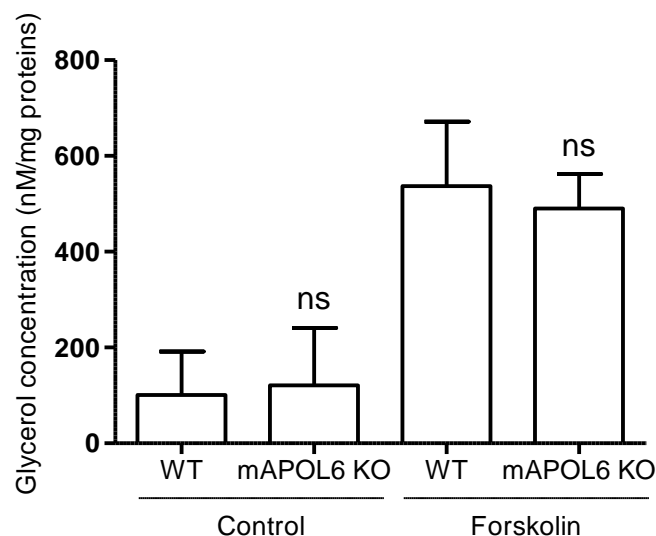


**Figure 50 : Comparaison du potentiel de différenciation des ATMSC WT et APOL6 KO.**

Images représentatives d'ATMSC WT (A) et APOL6 KO (B) différenciés en adipocytes. Images obtenues au microscope optique Leica au grossissement 100x. C : Quantification de l'adipogénèse des ATMSC WT et APOL6 KO par mesure de la fluorescence Nile Red émise par les lipides des gouttelettes lipidiques, normalisée par la fluorescence DAPI émise par les noyaux. Sur les 5 expériences réalisées (n=12), les points n'atteignant pas 1.2 ont été éliminés car les adipocytes ont été considérés comme étant non différenciés. Les points restants donnent n=7 pour les WT et n=9 pour les KO.

#### 4.9. L'APOL6 n'est pas nécessaire à l'adipogénèse

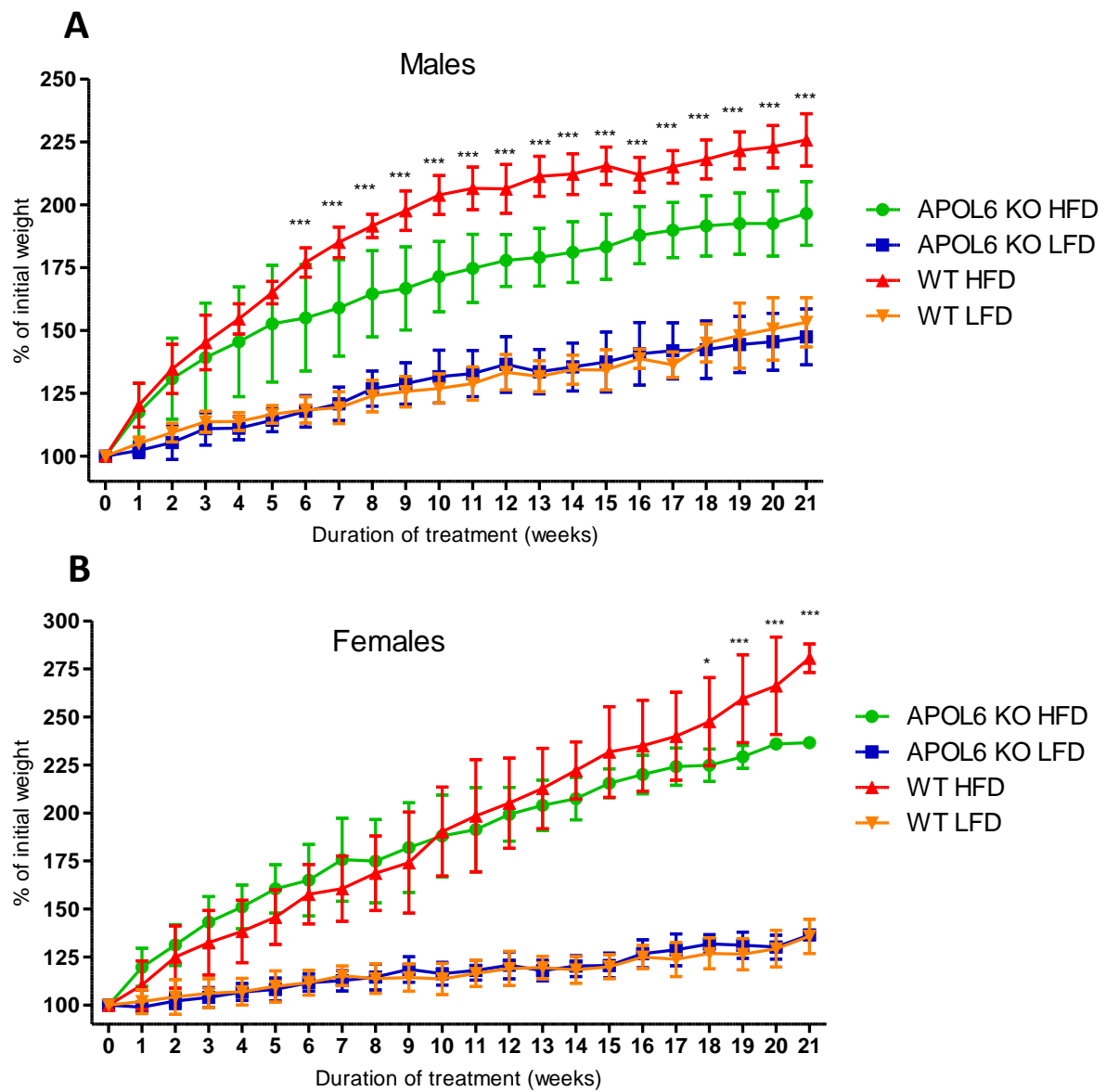
Comme il a été décrit à la section 3.4, des souris *APOL6* KO ont été générées par inversion de l'exon 3 du gène *APOL6* (Figure 28), résultant en un ARNm dépourvu d'exon 3 et donc sans codon start. L'absence de transcrits et de protéine *APOL6* a été constatée par qRT-PCR et par Western blot (Figures 29 et 30). Ces souris se développaient normalement et ne présentaient pas de phénotype particulier au premier abord, leur TA semblant morphologiquement normal. Des ATMSC ont été prélevés du TA de ces souris et cultivés *in vitro*. Lorsque soumis au cocktail de différenciation, ils se sont différenciés en adipocytes, comme c'est le cas pour les ATMSC provenant de souris WT (Figure 50A et B). Nous avons aussi extrait les protéines d'ATMSC WT et *APOL6* KO en cours de différenciation, puis réalisé un Western blot avec des anticorps anti-pérlipine et anti-*APOL6*. Nous observons sur la figure 30 que, bien que l'*APOL6* soit absente des ATMSC *APOL6* KO, la pérlipine a augmenté au cours du traitement, ce qui constitue une marque de différenciation. Afin de quantifier l'adipogénèse de ces cellules, nous les avons fixées puis coloré au Nile Red, un composé fluorescent qui se lie aux lipides. Le Nile Red peut se lier aux lipides neutres, tels que ceux présents dans les LD, ou aux phospholipides présents dans les membranes. Son spectre d'excitation et d'émission de fluorescence étant différent pour chacun de ces deux cas, il est possible de ne mesurer que la fluorescence du Nile Red associé aux lipides neutres, qui nous intéressent ici. L'intensité de la fluorescence émise par le Nile Red a été normalisée avec la fluorescence émise par le DAPI, qui se lie à l'ADN et marque donc les noyaux. Cela a permis de normaliser la fluorescence des lipides par rapport au nombre de noyaux, et donc de cellules. Une seconde normalisation a aussi été faite par rapport à des cellules contrôles non différenciées. La fluorescence associée au Nile Red était similaire entre souris WT et souris *APOL6* KO, bien que la variabilité soit très élevée au sein des deux groupes (Figure 50C). En effet, les ATMSC provenant de certaines souris, qu'elles soient WT ou *APOL6* KO, ne se sont pas différenciés efficacement, voire pas du tout, tandis que d'autres ont atteint un bon niveau de différenciation. Ainsi, des ATMSC provenant de souris d'une même portée pouvaient présenter d'importantes variations tant en potentiel de prolifération qu'en potentiel de différenciation. Nous avons choisi ici de ne présenter que les points supérieurs à 1.2, représentant donc une différenciation 20 % plus efficace que les contrôles négatifs. Ceci élimine donc les ATMSC ne s'étant pas différenciés du tout, dont la valeur tournait donc autour de 1. Malgré cette variabilité importante dans la différenciation des ATMSC, l'ensemble de ces résultats indique que la présence d'*APOL6* n'est pas une condition nécessaire à l'adipogénèse, puisque les souris *APOL6* KO ont pu produire des adipocytes différenciés.



**Figure 51 : Mesure de la lipolyse dans le tissu adipeux de souris WT et de souris APOL6 KO par la quantification de la concentration en glycérol du milieu.** Contrôle : quantification de la lipolyse en conditions basales. Forskolin : quantification de la lipolyse stimulée par l'ajout de Forskoline. N=3. Test statistique : Mann-Whitney entre WT et APOL6 KO.

#### 4.10. L'APOL6 n'est pas nécessaire à la lipolyse

Nous avons montré plus haut que la relation entre la lipolyse et l'expression d'APOL6 était complexe, mais que celles-ci ne semblaient pas être couplées (Figure 46). Nous avons alors voulu voir si l'absence d'APOL6 pouvait influencer la lipolyse. Pour cela, nous avons prélevé des morceaux de TA gonadal de 3 souris WT et de 3 souris *APOL6* KO. Ceux-ci ont ensuite été placés dans une plaque 96 puits dans du milieu de culture, puis nous les avons soumis à un traitement forskoline-triacsine C-BSA dans le but de stimuler la lipolyse (Schweiger et al. 2014). Nous avons ensuite mesuré la concentration en glycérol dans le milieu pour évaluer l'activité lipolytique des tissus (Figure 51). La stimulation a été efficace puisque la concentration en glycérol dans le milieu a augmenté d'un facteur 4 à 5. Toutefois, aucune différence significative n'a été observée entre tissus provenant de souris WT et *APOL6* KO. L'absence d'APOL6 n'altère donc pas la lipolyse dans le TA, que ce soit la lipolyse basale (en l'absence de stimulus de forskoline) ou la lipolyse induite par la forskoline. Cette observation, conjointement à celle faite au point précédent, montre que l'APOL6 n'est nécessaire ni à l'adipogénèse, ni à la lipolyse.



**Figure 52 : Courbes de mesures hebdomadaires du poids de souris mâles (A) ou femelles (B), WT ou APOL6 KO, nourries avec un régime pauvre (LFD) ou riche (HFD) en graisses.** La semaine 0 représente le début du traitement, correspondant à un âge de 8 semaines. Les souris étaient groupées par génotype dans des cages ventilées individuellement avec accès à volonté à l'eau et à la nourriture. A : n=11, 12 ou 13. B : n=7 ou 8. Test statistique : Kruskal-Wallis suivi de Dunns par rapport à la semaine 0.

#### **4.11. Dans les souris *APOL6* KO, l'augmentation de poids due à un régime riche en graisses est limitée**

Le TA et les adipocytes sont impliqués dans une des pathologies les plus prévalentes dans le monde : l'obésité. Afin d'investiguer l'effet de la suppression de l'*APOL6* sur la prise de poids, nous avons soumis des souris WT et des souris *APOL6* KO, mâles ou femelles, à un régime riche en graisses (High Fat, HF) comprenant 60 % de matières grasses, ou à un régime pauvre en graisses (Low Fat, LF) comprenant 10 % de matières grasses. Les souris ont été pesées chaque semaine pendant les 21 semaines de traitement, à partir de l'âge de 8 semaines. Comme attendu, les souris nourries au régime HF ont pris plus de poids que les souris nourries au régime LF, et ce dès la première semaine (Figure 52A et B). Les groupes de souris mâles HF ont suivi la même courbe de prise de poids pendant les 5 premières semaines (Figure 52A). Néanmoins, à partir de la semaine 6, la prise de poids des mâles du groupe *APOL6* KO a ralenti et un écart avec les souris WT est apparu, écart qui s'est agrandi jusqu'à la semaine 10 environ, pour rester stable ensuite. Les souris nourries au régime LF n'ont pas présenté de différence entre groupes WT et *APOL6* KO. Chez les femelles HF, la prise de poids est restée semblable entre groupes WT et *APOL6* KO pendant une plus longue durée. Toutefois, ici aussi les souris *APOL6* KO ont fini par prendre moins de poids en fin d'expérience, l'écart devenant significatif à partir de la semaine 18, bien que moins important que chez les mâles (Figure 52B). À nouveau, aucune différence n'a été observée entre les groupes de souris nourries au régime LF. Ces résultats suggèrent que l'*APOL6* est impliquée dans la prise de poids découlant d'un régime riche en graisses, et ce particulièrement chez les souris mâles.

La différence de comportement de prise de poids entre les souris mâles et les souris femelles pourrait être explicable par le fait que mâles et femelles accumulent et consomment les graisses de façon différente, comme cela a été décrit dans l'introduction. Un point supplémentaire à garder à l'esprit ici est l'observation que l'expression de l'*APOL6* de cellules 3T3-L1 différenciées en adipocytes était diminuée en présence d'hormones sexuelles femelles, à savoir la progestérone et l'œstradiol (Figure 45C). L'influence de l'*APOL6* au sein du TA femelle pourrait être de façon générale plus faible que dans le TA de souris mâles. Ceci impliquerait donc que son absence dans les souris *APOL6* KO femelles pourrait avoir moins d'impact que dans les souris *APOL6* KO mâles.

Pour expliquer l'origine même de cette différence de poids entre souris WT et souris *APOL6* KO, il faut se rappeler que la balance de poids revient, *in fine*, à un équilibre entre l'accumulation des graisses et la consommation de celles-ci. S'il y a plus d'accumulation que de consommation, il y aura une prise de poids. À l'inverse, si la consommation est supérieure à l'accumulation, alors le poids diminuera. Nous avons vu plus haut que, *in vitro*, l'*APOL6* n'était pas nécessaire ni à l'adipogénèse, ni à la lipolyse, les deux mécanismes principaux de stockage ou de libération de graisses par les adipocytes. De ce fait, le phénotype observé montrant une différence de prise de poids entre souris WT et souris *APOL6* KO semble en contradiction avec ces résultats. La solution réside probablement dans le fait qu'à l'échelle de l'organisme, la balance de poids telle que décrite ci-dessus est également influencée par un grand nombre d'autres paramètres. Parmi ceux-ci, l'un des plus importants est le système immunitaire. En effet, l'état inflammatoire du TA et les interactions entre des cellules immunes et les adipocytes sont déterminants dans la façon dont des derniers se comportent (Lumeng et al. 2007; Harford et al. 2011). Il est donc possible que le phénotype observé soit dû à un effet se produisant au niveau du système immunitaire, comme par exemple le développement de l'inflammation de bas grade dans le TA.

#### **4.12. La taille des adipocytes de souris *APOL6* KO est limitée**

Suite à l'observation du phénotype de prise de poids des souris *APOL6* KO, nous avons voulu observer la morphologie de leur TA. Pour cela, les TA gonadal et inguinal de souris WT ou *APOL6* KO mâles ou femelles, soumises à un régime LF ou HF pendant 21 semaines ont été extraits, fixés et enrobés dans de la paraffine. Des coupes de 4  $\mu\text{m}$  et une coloration à l'hématoxyline et à l'éosine ont été réalisées. Les coupes ont été scannées grâce au NanoZoomer 2.0 HT (Hamamatsu) et observées au moyen du programme NDP viewer (Hamamatsu).

Les figures 53 à 59 montrent différentes images obtenues ainsi de ces coupes de TA de souris mâles. La figure 53 montre une image d'une coupe de TA gonadal obtenue à partir d'une souris mâle WT LF. On peut observer majoritairement des adipocytes blancs, constitués d'une LD unique. Les adipocytes n'apparaissent pas tous de taille similaire à cause de la technique utilisée. En effet, les adipocytes pouvant être assimilés à des sphères, leur diamètre varie selon la hauteur de la coupe sur l'axe z. Au plus la coupe a été faite proche de leur centre, au plus leur diamètre apparent sera grand, tandis que si la coupe a été faite plus proche de la base ou du

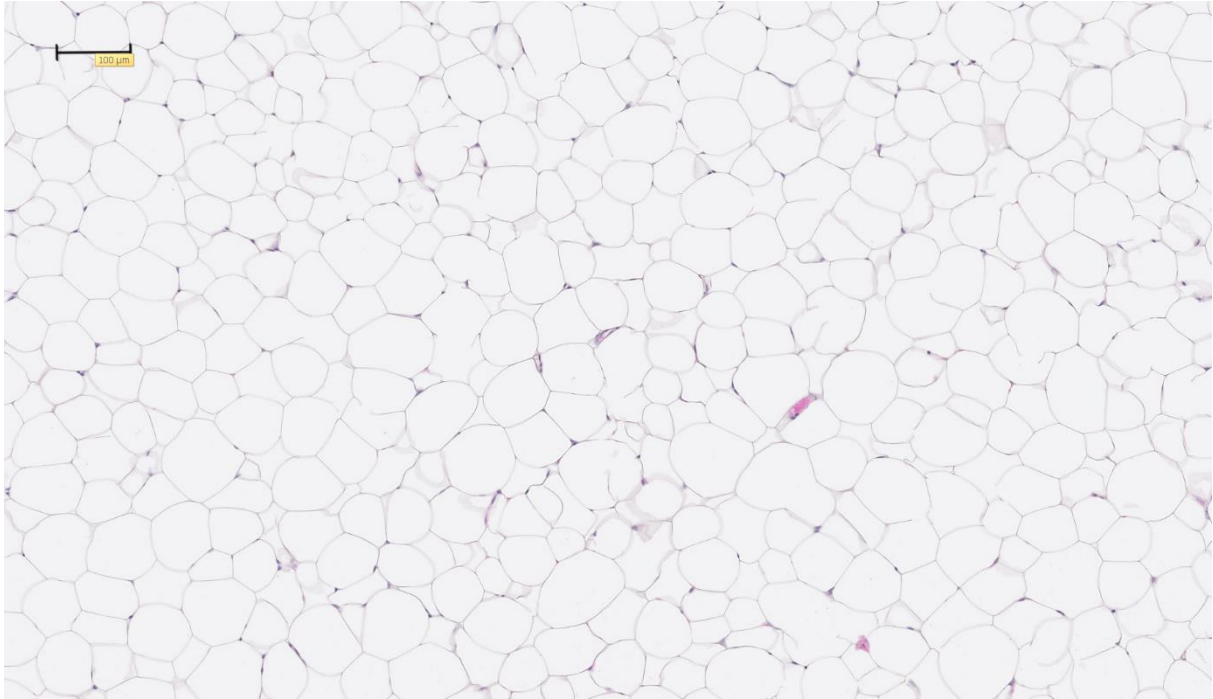


sommet de l'adipocyte, leur diamètre apparaîtra beaucoup plus petit. Outre les adipocytes, bien que ce ne soit pas visible sur cette image, le TA contenait aussi quelques vaisseaux sanguins, et des cellules immunes pouvaient être observées. La figure 54 présente une image similaire obtenue sur une coupe provenant d'une souris mâle *APOL6* KO LF. Celle-ci ressemble fortement à la figure 53, aucune différence notable n'ayant été observée.

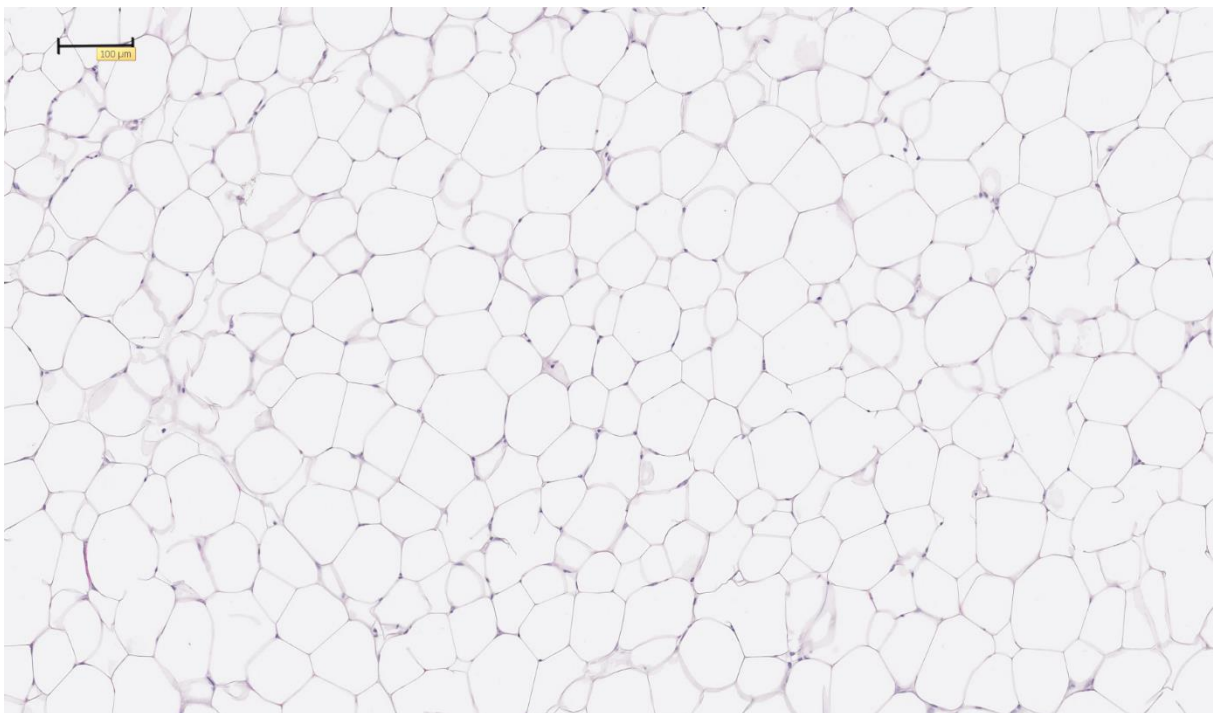
Alors que les figures 53 et 54 montraient des images représentatives des coupes dans leur ensemble, les figures 55 et 56, prises sur du TA inguinal de mâles WT, se focalisent sur des points plus particuliers qui ont été observés. La figure 55 représente une zone de la coupe en bordure du ganglion lymphatique présent dans le TA inguinal. Des vaisseaux sanguins contenant des globules rouges sont aussi observables. La figure 56 représente une zone contenant des adipocytes multiloculaires qui correspondent probablement des adipocytes beiges (Ikeda et al. 2018).

Les figures 57 et 58 montrent des images représentatives de coupes provenant de TA gonadal de souris mâles (WT et *APOL6* KO respectivement) ayant été nourries avec un régime HF. En comparaison avec les images présentées sur les figures 53 et 54, on peut observer deux différences majeures. Premièrement, leurs adipocytes sont dans l'ensemble plus gros que chez les souris WT. Ensuite, des cellules du système immunitaire ont infiltré le tissu, comme on peut le déduire la coloration bleue présente entre les adipocytes. Ceci est une manifestation de l'inflammation de bas grade qui se développe dans le TA suite à l'obésité (Hill et al. 2014; Brestoff & Artis 2015).

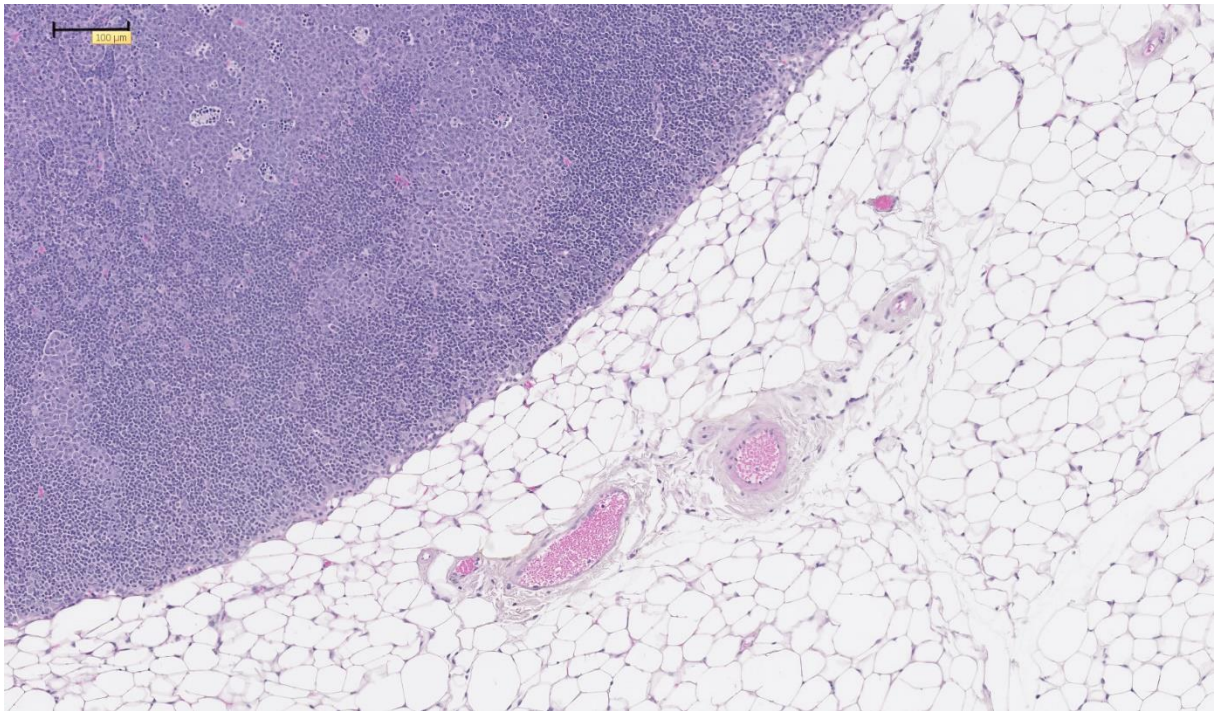
Finalement, la figure 59 représente une zone particulièrement infiltrée de cellules immunes, observée sur une coupe de TA gonadal de souris *APOL6* KO HF. De telles zones ont été observées uniquement chez les souris nourries au régime HF, de façon sporadique, tant chez les souris WT que chez les souris *APOL6* KO.



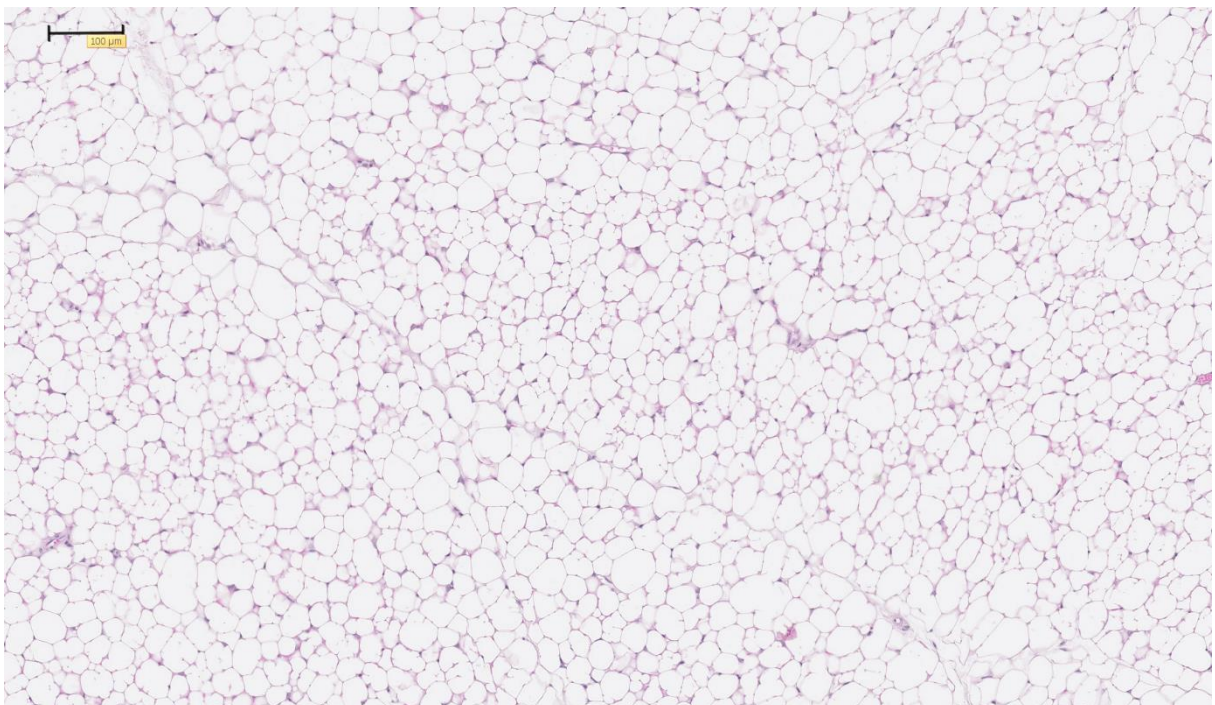
**Figure 53 : Image représentative d'une coupe de tissu adipeux gonadal provenant d'une souris mâle WT nourrie au régime LF.** Le tissu a été fixé à la PFA 4%, et enrobé de paraffine. La coupe de 4  $\mu\text{m}$  d'épaisseur a été colorée à l'hématoxyline-éosine puis digitalisée avec le NanoZoomer 2.0 HT (Hamamatsu). Observation avec le programme NDP viewer (Hamamatsu). La barre d'échelle représente 100  $\mu\text{m}$ .



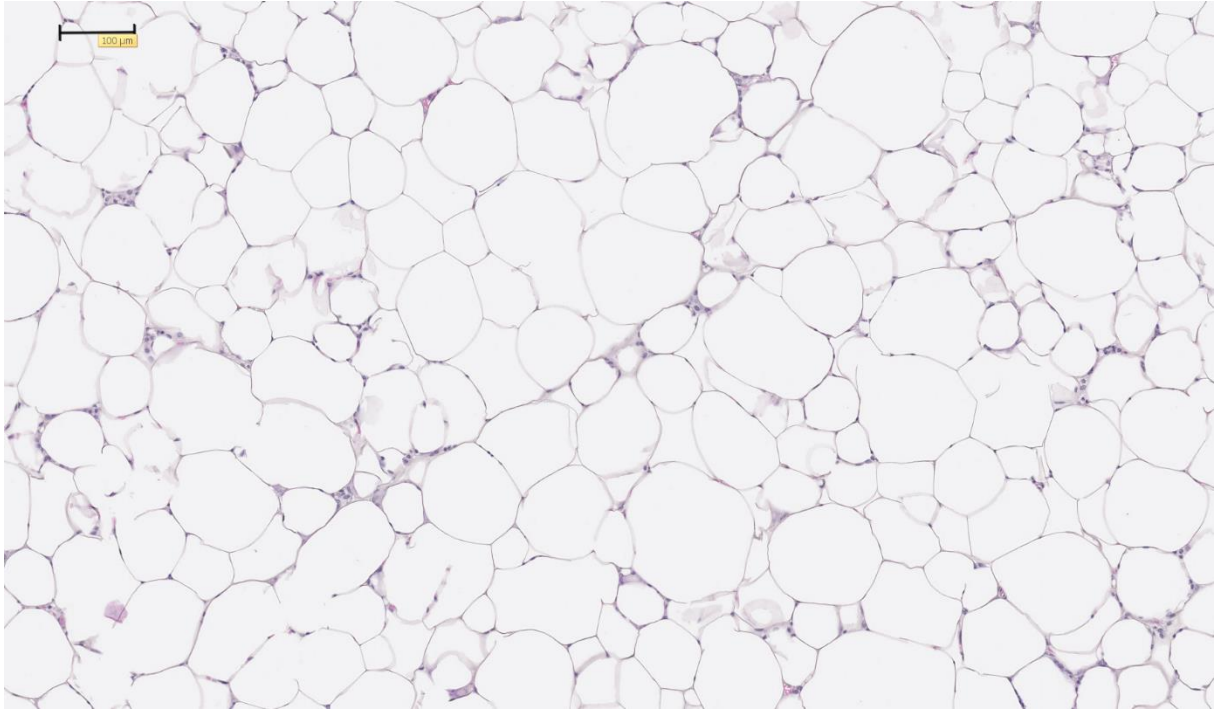
**Figure 54 : Image représentative d'une coupe de tissu adipeux gonadal provenant d'une souris mâle APOL6 KO nourrie au régime LF.** Le tissu a été fixé à la PFA 4%, et enrobé de paraffine. La coupe de 4  $\mu\text{m}$  d'épaisseur a été colorée à l'hématoxyline-éosine puis digitalisée avec le NanoZoomer 2.0 HT (Hamamatsu). Observation avec le programme NDP viewer (Hamamatsu). La barre d'échelle représente 100  $\mu\text{m}$ .



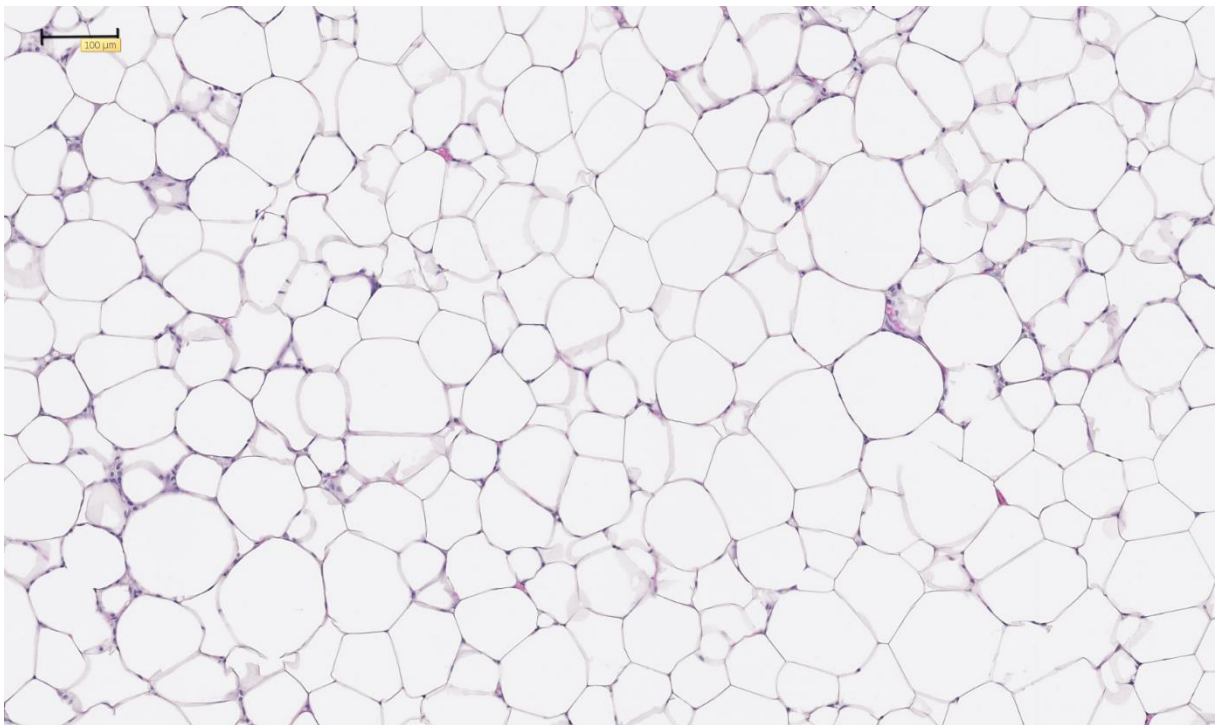
**Figure 55 : Image montrant une partie du ganglion lymphatique et des vaisseaux sanguins d'une coupe de tissu adipeux inguinal provenant d'une souris mâle WT nourrie au régime LF.** Le tissu a été fixé à la PFA 4%, et enrobé de paraffine. La coupe de 4 μm d'épaisseur a été colorée à l'hématoxyline-éosine puis digitalisée avec le NanoZoomer 2.0 HT (Hamamatsu). Observation avec le programme NDP viewer (Hamamatsu). La barre d'échelle représente 100 μm.



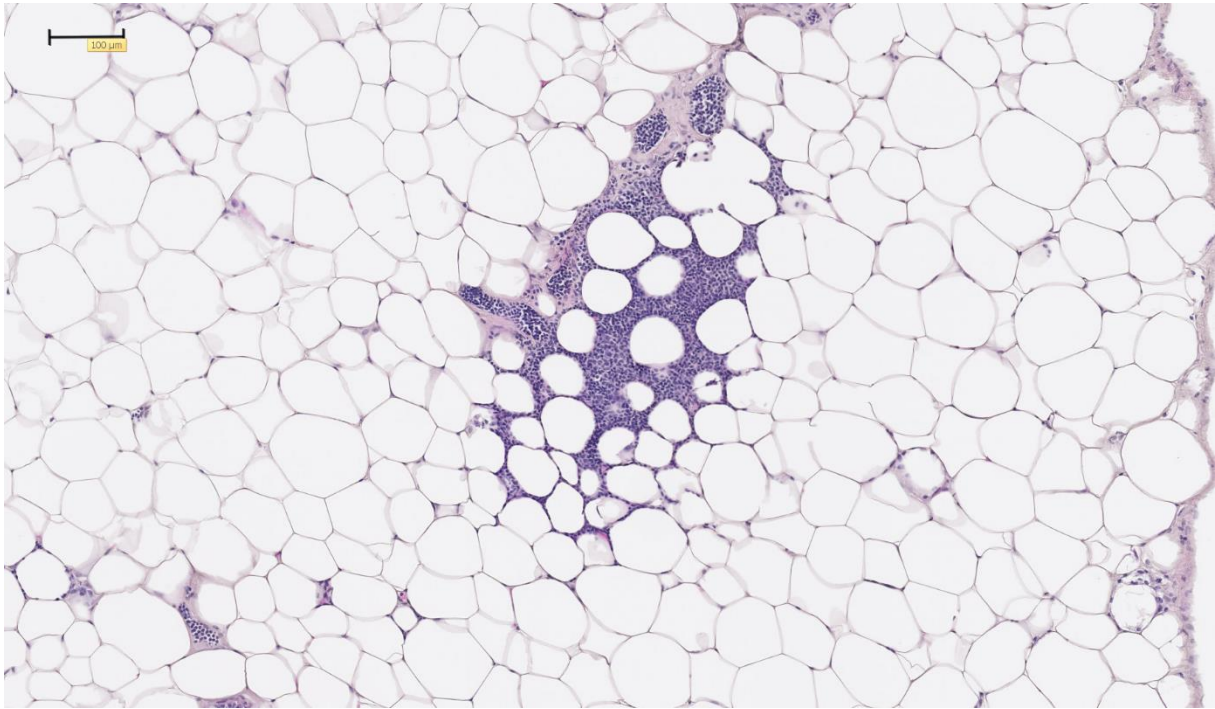
**Figure 56 : Image montrant une zone contenant des adipocytes beiges d'une coupe de tissu adipeux inguinal provenant d'une souris mâle WT nourrie au régime LF.** Le tissu a été fixé à la PFA 4%, et enrobé de paraffine. La coupe de 4 μm d'épaisseur a été colorée à l'hématoxyline-éosine puis digitalisée avec le NanoZoomer 2.0 HT (Hamamatsu). Observation avec le programme NDP viewer (Hamamatsu). La barre d'échelle représente 100 μm.



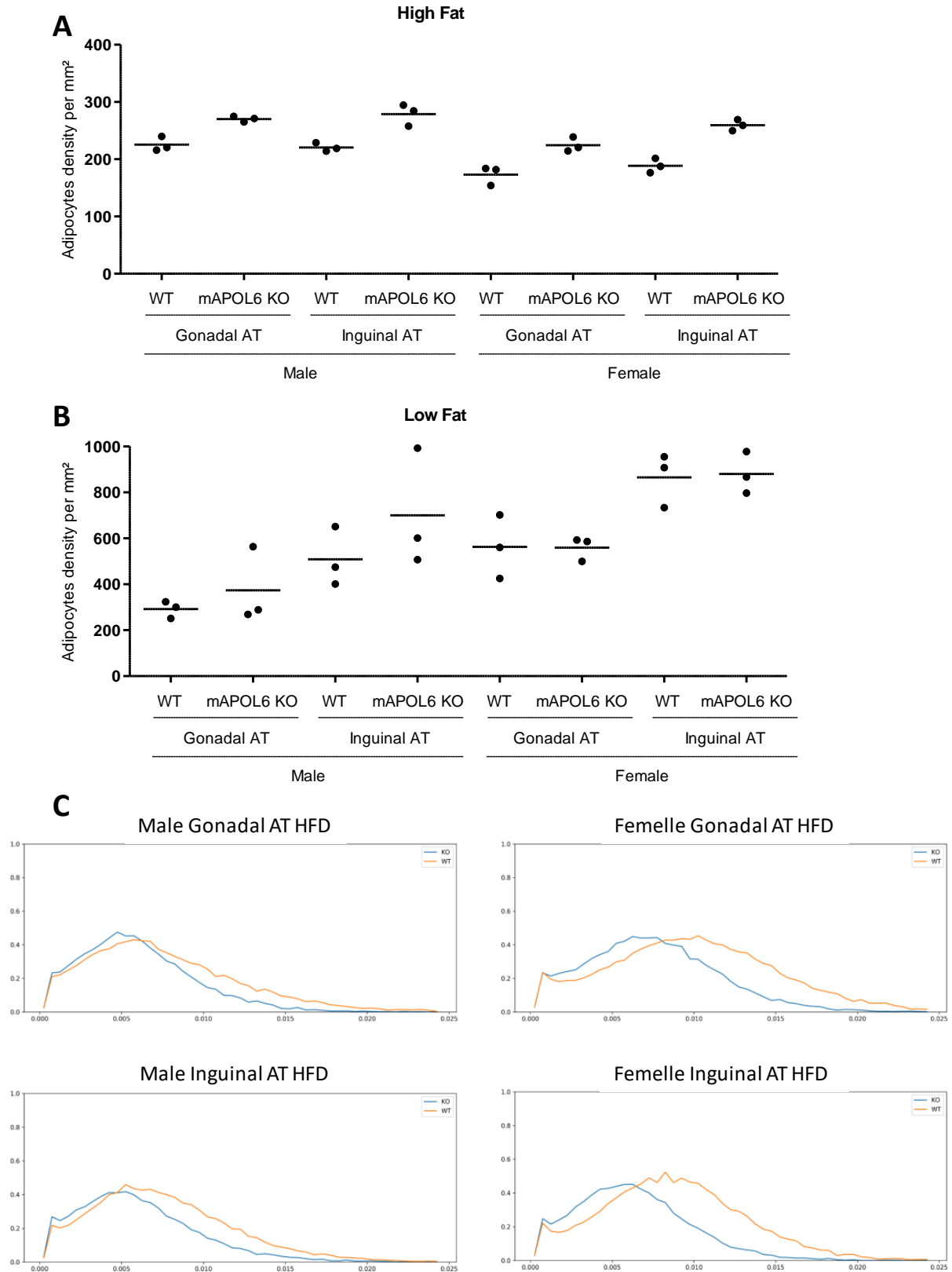
**Figure 57 : Image représentative d'une coupe de tissu adipeux gonadal provenant d'une souris mâle WT nourrie au régime HF.** Le tissu a été fixé à la PFA 4%, et enrobé de paraffine. La coupe de 4  $\mu\text{m}$  d'épaisseur a été colorée à l'hématoxyline-éosine puis digitalisée avec le NanoZoomer 2.0 HT (Hamamatsu). Observation avec le programme NDP viewer (Hamamatsu). La barre d'échelle représente 100  $\mu\text{m}$ .



**Figure 58 : Image représentative d'une coupe de tissu adipeux gonadal provenant d'une souris mâle APOL6 KO nourrie au régime HF.** Le tissu a été fixé à la PFA 4%, et enrobé de paraffine. La coupe de 4  $\mu\text{m}$  d'épaisseur a été colorée à l'hématoxyline-éosine puis digitalisée avec le NanoZoomer 2.0 HT (Hamamatsu). Observation avec le programme NDP viewer (Hamamatsu). La barre d'échelle représente 100  $\mu\text{m}$ .



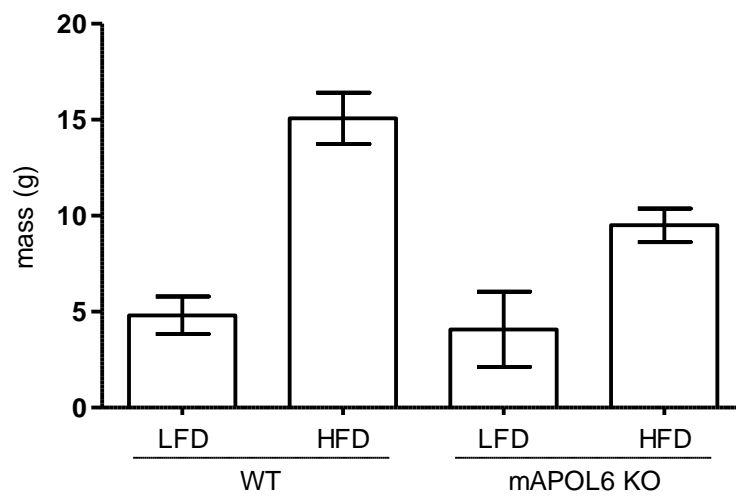
**Figure 59 : Image d'une zone particulièrement riche en macrophages d'une coupe de tissu adipeux gonadal provenant d'une souris mâle *APOL6* KO nourrie au régime HF. Le tissu a été fixé à la PFA 4%, et enrobé de paraffine. La coupe de 4 μm d'épaisseur a été colorée à l'hématoxyline-éosine puis digitalisée avec le NanoZoomer 2.0 HT (Hamamatsu). Observation avec le programme NDP viewer (Hamamatsu). La barre d'échelle représente 100 μm.**



**Figure 60 : Densité des adipocytes au sein de tissus adipeux gonadal et inguinal de souris mâles et femelles, WT ou APOL6 KO, nourries au régime HFD ou LFD. A : Régime HFD. B : Régime LFD. C : Distributions des surfaces d'adipocytes dans les tissus adipeux gonadal et inguinal de souris mâles et femelles nourries au régimes HFD. Courbe orange : WT. Courbe bleue : APOL6 KO. N=3.**

Compte tenu de la différence de poids entre les groupes de souris WT et *APOL6* KO, nous avons voulu savoir si les adipocytes eux-mêmes présentaient une différence de taille. En effet, deux phénomènes peuvent contribuer à l'expansion du TA : l'hypertrophie et l'hyperplasie des adipocytes. L'hypertrophie correspond à l'augmentation de taille des adipocytes tandis que l'hyperplasie correspond à la multiplication de ceux-ci. Les images ont donc été analysées numériquement pour déterminer le nombre et la surface des adipocytes dans chacune des coupes de tissus. Le nombre d'adipocytes par unité de surface était plus élevé dans les coupes de tissus *APOL6* KO HF que dans les tissus WT HF (Figure 60A). Par conséquent, nous pouvons en déduire que la taille moyenne des adipocytes *APOL6* KO HF était plus petite que celle des adipocytes WT HF. Ceci a été observé tant chez les mâles que chez les femelles, et tant dans le TA gonadal que dans le TA inguinal. Chez les souris LF, aucune tendance n'a été observée (Figure 60B). Notons aussi que les adipocytes du dépôt de TA inguinal étaient plus petits que ceux du TA gonadal, ce qui est en accord avec les observations faites sur les TA viscéraux et sous-cutanés humains (Lafontan 2012). La Figure 60C montre la distribution des tailles d'adipocytes de souris HF, qui confirment le fait que les adipocytes de souris *APOL6* KO étaient plus petits. En effet, on peut observer un déplacement des distributions vers les tailles plus faibles, avec donc plus d'adipocytes petits et moins d'adipocytes grands que dans les souris WT (Figure 60C).

En complément à ces observations, la masse de TA des souris mâles *APOL6* KO HF était plus faible que dans les souris mâles WT HF (Figure 61). La différence de masse entre les TA (5.57 g en moyenne) ne suffit pas à expliquer seule la différence de masse observée entre les souris (9.43 g en moyenne), ce qui met en lumière le fait que d'autres organes sont aussi impliqués dans la prise de poids. Le foie est un exemple d'organe qui stocke aussi des graisses, pouvant aller jusqu'à une stéatose ou à une cirrhose en cas d'excès. Ces différentes observations montrent que les souris WT nourries à un régime HF ont accumulé plus de masse globalement, ainsi que plus de masse de TA spécifiquement, et que les adipocytes de leur TA étaient plus gros que chez les souris *APOL6* KO.



**Figure 61 : Masses de tissus adipeux totaux prélevés sur des souris mâles WT ou APOL6 KO, nourries au régime LFD ou HFD. N=3.**



#### **4.13. Les anticorps anti-APOL6 immunoprécipitent des composants du cytosquelette d'actine**

Dans le but d'obtenir des informations quant à la fonction de l'APOL6, nous avons voulu déterminer quelles protéines étaient capables d'interagir avec elle. Pour cela, nos anticorps anti-APOL6 ont été utilisés pour immunoprécipiter des extraits de protéines des ATMSC WT et *APOL6* KO comme contrôle. Les protéines immunoprécipitées ont ensuite été digérées, et les peptides obtenus ont été analysés par spectrométrie de masse dans le but d'identifier les protéines desquelles ils ont été issus.

Avant de présenter ces résultats, il est nécessaire de noter que la plupart des protéines détectées dans les échantillons d'ATMSC WT ont aussi été détectés dans les ATMSC *APOL6* KO et parfois même dans les échantillons contrôles sans anticorps. Il est toujours problématique de retrouver du signal dans un contrôle négatif, mais il convient de comparer de façon critique les chiffres observés. Par exemple, dans un cas comme celui de la dihydrolipoamide acetyltransférase, pour laquelle nous avons détecté 17 peptides dans les ATMSC WT, 17 dans les ATMSC KO et 3 dans le contrôle sans anticorps, il est évident que ce résultat correspond à du bruit de fond. Par contre, dans le cas de MYH9, avec 130 peptides dans l'échantillon WT, contre 42 dans les contrôles négatifs, la différence est importante et on peut raisonnablement supposer que ce surcroît d'abondance n'est pas dû au hasard. Néanmoins, ces résultats sont à prendre avec précaution en l'attente de confirmation par d'autres méthodes.

Les protéines qui ont ainsi été détectées sont majoritairement des composants du cytosquelette ou des protéines interagissant directement avec celui-ci. Plus précisément, il s'agit principalement de composants du cytosquelette d'actine. Ainsi, ces protéines comprennent, par ordre d'abondance dans les ATMSC WT, les myosines non musculaires de type II A et B, la filamine A, la myosine non conventionnelle Ic, la vimentine, et la gelsoline.

On retrouve aussi la plectine, des tropomyosines, l'alpha-actinine, la tropomoduline, des composants du complexe arp2/3 et de la drebrine. La liste complète est présentée dans le tableau 7. Les valeurs présentées dans le tableau représentent le nombre de peptides uniques et exclusifs détectés par la spectrométrie de masse. Par exclusif, on entend que ces peptides ne correspondent qu'à la protéine mentionnée (ce qui a été vérifié par BLAST manuellement). Par unique, on entend que les peptides sont tous différents les uns des autres, que les doublons n'ont pas été comptés. Par exemple, dans le cas de MYH9, cela signifie que 130 peptides différents provenant de la MYH9 ont été détectés. Ce nombre est assez élevé et correspond, dans ce cas-

ci, à un taux de recouvrement de la protéine de plus de 90 %. Si on compte les doublons, ce sont un total de plus de 2700 peptides qui ont été identifiés pour MYH 9.

Protein	Molecular weight	Accession number	ATMSC WT	ATMSC KO	Control
Myosin heavy chain 9	226 kDa	Q8VDD5	130	42	42
Myosin heavy chain 10	229 kDa	Q61879	42	12	4
Filamin A	281 kDa	Q8BTM8	41	17	1
Unconventional Myosin Ic	122 kDa	Q9WTI7	38	5	4
Vimentin	54 kDa	Q3TFD9	30	14	23
Gelsolin	81 kDa	Q6PAC1	26	4	7
Long-chain-specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	71 kDa	P50544	17	9	9
Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	77 kDa	P21981	16	2	2
Clathrin heavy chain	192 kDa	Q5SXR6	15	8	2
Sec23A	83 kDa	E9Q1S3	15	5	7
Tropomyosin alpha-1 chain	33 kDa	E9Q454	13		
Drebrin	77 kDa	Q9QX56	12		1
Tubulin alpha	50 kDa	P68369	12	2	11
ATP synthase subunit alpha	60 kDa	Q03265	11	5	12
Myosin heavy chain 11	227 kDa	O08638	10		
Arp2	45 kDa	P61161	10		
Fibulin 2	132 kDa	P37889	9		1
Alpha actinin 4	105 kDa	Q3UDJ7	8		1
Myosin light polypeptide 6	17 kDa	A0A1W2P6F6	7	4	5
Filamin B	278 kDa	Q80X90	7		
Unconventional Myosin Ib	126 kDa	E9Q580	7		
Tropomyosin alpha-3 chain	33 kDa	P21107	7		
Tropomyosin beta chain	33 kDa	P58774	7		
Myosin regulatory light chain 12B isoform X2	20 kDa	Q3THE2	6		
Beta Actin	42 kDa	Q3U804	5	1	1
Alpha actinin 1a	103 kDa	A1BN54	5		
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	37 kDa	O88569	4		4
Sec23B	86 kDa	Q3TAW4	3	1	1
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	35 kDa	A2AL12	3		3
Alpha Actin, alpha skeletal muscle	42 kDa	P68134	2		1
ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH	80 kDa	O88967	2		
Gamma Actin	42 kDa	P63260	2		
Myosin heavy chain 13	224 kDa	B1AR69	1		1

**Tableau 7 : Protéines identifiées par immunoprécipitation de lysats d'ATMSC WT ou APOL6 KO à l'aide d'anticorps anti-APOL6.** Les colonnes représentent, en partant de la gauche : le nom de la protéine, son poids moléculaire, le numéro d'accèsion dans la base de données UniProt, le nombre de peptides uniques et exclusifs identifiés pour chaque protéine dans l'échantillon ATMSC WT, ATMSC APOL6 KO, et dans le contrôle négatif, respectivement.

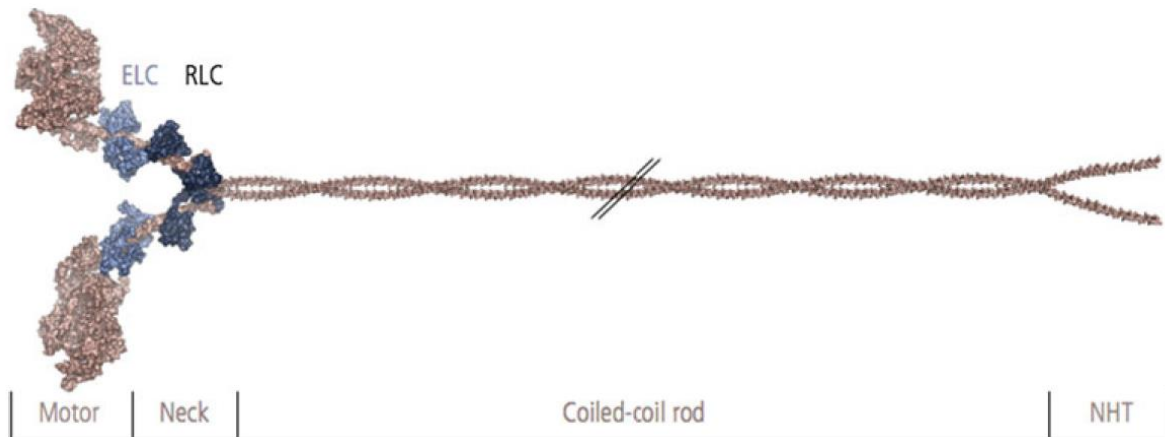
Pour tenter d'apporter une explication à la question de la présence de nombreux peptides dans les échantillons contrôles, il est possible que, lorsque certains peptides sont particulièrement abondants, quelques-uns peuvent rester bloqués, ou migrer plus lentement lors de la chromatographie et se retrouver dans l'échantillon suivant. Une protéine importante était pourtant absente de ces résultats : l'APOL6 elle-même. La raison de son absence n'est pas claire et on ne peut faire que des suppositions. Son absence totale de l'échantillon ou sa très faible expression sont peu probables, compte tenu des différences importantes en nombre de peptides entre échantillons WT et *APOL6* KO qui sont, à priori, attribuables à l'APOL6. De même, son masquage par d'autres protéines est aussi peu probable car l'échantillon utilisé est peu complexe et que le gel a été découpé en bandes, ce qui le décomplexifie encore plus. Il est possible que l'élution n'ait pas été assez forte et que l'APOL6 soit restée accrochée aux anticorps et donc aux billes.

Malgré l'absence d'APOL6 et la présence de peptides dans les contrôles négatifs, une telle similitude entre les protéines détectées semble significative. La grande proportion de protéines en lien avec le cytosquelette d'actine rejoint parfaitement les résultats obtenus par Sophie Uzureau sur les interactions de l'APOL1 humaine dans les podocytes (manuscrit en préparation). Dans ses résultats, on retrouve les mêmes protéines, principalement des myosines, la tropomyosine, la gelsoline ou la drebrine.

Analysons plus en détail les protéines détectées par le plus grand nombre de peptides et qui nous semblent les plus pertinentes (Tableau 7).

La protéine pour laquelle le plus de peptides ont été détectés est MYH9, c'est-à-dire la chaîne lourde de la myosine non musculaire NMIIA. Sur un total de 2793 peptides détectés dans l'échantillon WT, 130 étaient uniques et exclusifs, couvrant environ 90% de la séquence de la protéine. NMIIA fait partie de la superfamille des myosines, des protéines motrices qui peuvent se déplacer ou créer une tension sur des fibres d'actine, en tirant leur énergie de l'hydrolyse d'ATP (Figure 62) (Preller & Manstein 2013). Les myosines non musculaires de type II sont présentes dans tous les types cellulaires et jouent un rôle dans diverses fonctions cellulaires telles que la division, l'adhésion, la réponse aux forces extracellulaires, le mouvement, et la migration, notamment en agissant au niveau des lamellipodes et des points d'adhésion (Vicente-Manzanares et al. 2009; Heissler & Manstein 2013). En raison de son rôle dans la migration cellulaire, NMIIA a été notamment impliquée dans la propagation de cellules cancéreuses (Du et al. 2016). Outre leurs fonctions motrices et mécanosensibles, les protéines NMII sont impliquées dans la fission du Golgi, dans le transport de vésicules du Trans-Golgi vers

différents compartiments ainsi que dans le transport rétrograde vers le ER (Heissler & Manstein 2013).



**Figure 62 : Structure d'une myosine non musculaire de type II (NMII).** NMII est constituée majoritairement d'une grande sous-unité lourde. Celle-ci est divisée en plusieurs domaines : une tête motrice (Motor), une région intermédiaire régulatrice (neck) et une queue composée d'un long domaine hélicoïdal (coiled-coil rod) et d'une région terminale non hélicoïdale (NHT). La tête motrice permet de lier l'actine F et arbore l'activité enzymatique ATPase qui permet de développer la force motrice. Le neck est le lieu de fixation des deux sous-unités légères : essential (ELC) et regulatory (RLC) light chains. Le domaine hélicoïdal permet l'association de deux chaînes lourdes pour former un homodimère. Figure adaptée de Heissler et Manstein, 2013.

Après MYH9, la protéine la plus détectée dans notre analyse est MYH10. Quarante-deux peptides uniques et exclusifs ont été détectés dans l'échantillon WT. Comme MYH9 est la chaîne lourde de NMIIA, MYH10 est la chaîne lourde de NMIIB. Les protéines de la famille NMII partagent la plupart de leurs caractéristiques et fonctions décrites dans la section ci-dessus. Ces protéines, bien que présentant une identité de séquence d'acides aminés de 60 à 80%, ne sont toutefois pas totalement redondantes. En effet, on observe une spécialisation de fonctions, différentes cinétiques, et même une localisation distincte au sein de certaines cellules (Heissler & Manstein 2013). Par exemple, l'activité enzymatique ATPase de NMIIA est beaucoup plus élevée que celle de NMIIB, ce qui se traduit par une grande vitesse de mouvement le long des fibres d'actine. À l'inverse, NMIIB a une affinité plus élevée pour l'ADP et semble plus spécialisée pour appliquer une force de tension pendant de plus longues périodes en consommant moins d'énergie (Vicente-Manzanares et al. 2009).

La filamine A a été détectée à hauteur de 41 peptides dans l'échantillon WT. La filamine A forme un homodimère adoptant une forme en V et est capable de se lier à deux fibres d'actines

se croisant et sert ainsi d'agent de réticulation (« crosslinker ») entre ces deux fibres (Modarres & Mofrad 2014). Elle se lie également aux intégrines, des protéines transmembranaires qui interagissent avec la matrice extracellulaire, et fait donc partie du complexe protéique permettant la liaison de l'actine aux intégrines au niveau des jonctions d'adhésion focales. De ce fait, elle joue un rôle dans l'adhérence, la migration cellulaire et les mécanismes de réponse aux stimuli mécaniques extérieurs (Modarres & Mofrad 2014). La filamine B, qui a un rôle similaire, a aussi été détectée, à hauteur de 7 peptides.

Vingt-huit peptides ont été détectés comme provenant de MYO1C, la myosine non conventionnelle Ic et 7 peptides provenant de la myosine non conventionnelle Ib. Ces myosines font partie des myosines I et, comme celles de la famille NMII, interagissent avec l'actine en exerçant une force se traduisant en mouvement le long des fibres (Soldati 2003). Les myosines I se localisent au niveau de l'actine corticale et sont impliquées dans les protrusions cytoplasmiques nécessaires au mouvement cellulaire, à la phagocytose ou à la macropinocytose (Soldati 2003).

La protéine suivante par ordre de peptides recensés dans l'échantillon WT est la vimentine, avec 30 peptides. Notons que 23 peptides ont été identifiés dans le contrôle négatif et 14 dans le contrôle *APOL6* KO, donc la différence avec l'échantillon WT n'est pas si grande et ce résultat est à prendre avec critique. La vimentine est la composante des filaments intermédiaires du cytosquelette la plus représentée chez les adipocytes. Comme la plupart des filaments intermédiaires, la vimentine assure un rôle de structure et de résistance mécanique à la cellule (Dey et al. 2014). La vimentine est aussi impliquée dans le transport de vésicules au sein de la cellule (Styers et al. 2005). Cette protéine a également plusieurs fonctions spécifiques chez les adipocytes. Lors de l'adipogénèse, le réseau de vimentine est remodelé et s'organise sous forme de cage autour de la LD, en interaction avec la périlipine (Franke et al. 1987; Heid et al. 2014). Plus largement, plusieurs études ont montré que la vimentine fournit l'échafaudage nécessaire à la fonction de plusieurs protéines. Sans que la vimentine ne soit directement impliquée dans leurs fonctions mêmes, elle leur fournit un point d'attache au cytosquelette et une façon de se localiser au bon endroit dans la cellule. Ainsi, il a été montré que chez les adipocytes, la vimentine est impliquée dans le transport des vésicules contenant GLUT4 à la membrane en les maintenant en contact avec le cytosquelette grâce à son interaction avec IRAP (« *insulin-reponsive aminopeptidase* ») (Hirata et al. 2011). Finalement, la vimentine est importante pour la lipolyse en interagissant avec la lipase HSL et le récepteur  $\beta$ 3-adrénérgique (Shen et al. 2010; Kumar et al. 2007). Ces deux études ont montré une diminution de la taille des adipocytes et

du taux de lipolyse de 40 % suite à la délétion ou à l'inhibition de l'expression du gène de la vimentine, ou suite à la perturbation des fibres de vimentine par l'ajout de  $\beta,\beta'$ -iminodipropionitrile, tandis que l'inhibition de l'actine ou des microtubules, par la cytochalasine D et le nocodazole respectivement, n'a pas d'effet (Shen et al. 2010; Kumar et al. 2007).

La gelsoline, représentée par 26 peptides dans notre échantillon WT, est une protéine dont l'activité principale est de couper les fibres d'actine. Elle est composée de six domaines qui, lorsqu'elle est activée par le  $Ca^{2+}$ , entourent la fibre d'actine et la coupent (Burtnick et al. 1997). Une fois la fibre coupée, la gelsoline reste attachée à son extrémité pour empêcher son extension (Burtnick et al. 1997). Une étude a montré l'inhibition de la gelsoline par interférence ARN dans des préadipocytes inhibe l'adipogénèse (Kawaji et al. 2010). L'expression de PPAR $\gamma$  et de C/EBP $\alpha$  est réduite et la phase d'expansion clonale mitotique est fortement inhibée (Kawaji et al. 2010).

Collectivement, trois tropomyosines ont fourni 27 peptides. Comme il a été mentionné dans l'introduction sur le cytosquelette, les tropomyosines forment une famille de plus de 40 membres chez les mammifères. Leur rôle principal est de stabiliser les fibres d'actine, mais elles ont également un important rôle de régulation en masquant le sillon interactif de l'actine. De plus en raison de leur grande diversité comparée au peu d'isoformes d'actines, ce sont en réalité les tropomyosines qui donnent leurs caractéristiques et leurs spécificités aux filaments d'actine (Gunning et al. 2015).

Finalement, l'actine elle-même est aussi représentée dans nos résultats. Cinq peptides ont été identifiés à partir de l'actine  $\beta$ , 2 à partir de l'actine  $\alpha$  et 2 à partir de l'actine  $\gamma$ . Ces nombres peuvent paraître petits, mais il s'agit bien ici de peptides uniques. Un grand nombre de chacun de ces peptides a été identifié, portant le nombre total de peptides à 1043 pour l'actine  $\beta$ .

# Discussion et Perspectives





## 5. Discussion et perspectives

À l'entame de ce travail, peu de choses étaient connues sur l'APOL6 murine. Cette protéine n'avait fait l'objet d'aucune publication et les données dont nous disposions au laboratoire quant à son profil d'expression étaient incomplètes. Ceci était dû d'une part au fait que le TA n'avait pas été inclus dans l'analyse, et d'autre part au fait que les amorces utilisées n'amplifiaient pas tous les transcrits APOL6 possibles. Au final, ceci nous avait fait croire que l'APOL6 était majoritairement exprimée dans l'intestin grêle et dans le colon, organes sur lesquels nous nous sommes penchés pendant 2 ans pratiquement en vain. Deux événements ont été déterminants et nous ont permis de relancer ce projet. Tout d'abord, l'inclusion d'échantillons provenant du TA dans les organes observés, de façon concomitante avec la réalisation de nouvelles amorces qui prenaient en compte toutes les isoformes de l'APOL6. Ensuite, un an plus tard, l'obtention d'anticorps anti-APOL6 efficaces qui ont enfin permis de confirmer avec certitude l'absence d'APOL6 de nos souris *APOL6* KO. Sans ces outils, malheureusement obtenus relativement tard dans le déroulement de cette thèse, les résultats qui ont été présentés n'auraient pas été possibles.

Une fois ces différents outils en main, nous avons pu montrer que l'APOL6 murine était en réalité largement plus exprimée dans le TA que dans n'importe quel organe testé, y compris l'intestin. En approfondissant ce résultat, nous avons pu déterminer que les adipocytes étaient le type cellulaire responsable de la majorité de l'expression d'APOL6 dans le TA, et que cette expression était plus faible lorsque les souris étaient obèses. Ensuite, des modèles *in vitro* ont permis de montrer que l'expression d'APOL6 était induite par l'IFN $\gamma$ , et inhibée par le TGF $\beta$  et l'AMPc. Un modèle de souris *APOL6* KO a montré que celles-ci avaient un TA d'apparence normale, mais que lorsque ces souris étaient nourries avec un régime HF, elles prenaient moins de poids et présentaient des adipocytes plus petits que leurs contrôles WT. La cinétique de prise de poids laissait sous-entendre un rôle du système immunitaire, la différence de poids apparaissant de façon concomitante avec la transition des macrophages du TA d'un phénotype M2 vers un phénotype M1. Finalement, une expérience d'immunoprécipitation a montré que les protéines interagissant potentiellement avec l'APOL6 étaient principalement des protéines du cytosquelette d'actine.

Le point de départ de ce travail est donc que l'APOL6 est principalement exprimée dans le TA. Ceci est avant tout justifié par nos résultats, mais correspond également à ce qui est observé dans les bases de données d'expression consultables librement en ligne. Par exemple, selon les

données obtenues par le consortium « *The Mouse ENCODE Consortium* », le gène codant pour l'APOL6 murine est exprimé principalement dans le TA sous-cutané, puis dans le TA gonadal, et finalement dans les glandes mammaires (Yue et al. 2014), des résultats très proches de ceux obtenus lors de ce travail. Une autre base de données, GeneAtlas (basée sur la publication (Su et al. 2004)), indique que l'expression d'APOL6 est la plus élevée dans le TA brun, puis dans le TA blanc, et ensuite dans les glandes mammaires, à nouveau confirmant nos propres résultats. Par contre, quant à la question des types cellulaires impliqués dans l'expression de l'APOL6, les résultats sont moins clairs. Nous avons séparé les adipocytes des cellules de la fraction stromale vasculaire et avons observé que les premiers exprimaient davantage d'APOL6 que les secondes. Par contre, il n'est pas impossible qu'un type cellulaire présent en faible proportion dans la SVF exprime lui aussi l'APOL6 en grande quantité, caché par l'expression très faible des autres cellules composant cette fraction. En regardant du côté des bases de données, les résultats sont moins clairs qu'avec la localisation tissulaire. Selon la base de données Expression Atlas du « *European Bioinformatics Institute* », parmi 6 études ayant analysé l'expression cellulaire d'APOL6, seule une (le FANTOM5 Project) a inclus les adipocytes dans les types cellulaires investigués, mais n'y a pas détecté d'expression. Selon cette base de données, les types cellulaires présentant le plus d'expression d'APOL6 étaient des cellules souches embryonnaires, des cellules souches mésenchymateuses, des fibroblastes embryonnaires, des cardiomyocytes, des cellules musculaires, ainsi que des cellules du système immunitaire telles que des lymphocytes T régulateurs, des lymphocytes Th17, des macrophages spléniques ou des cellules de Kupffer. Malgré cela, l'expression d'APOL6 détectée dans ces types cellulaires était caractérisée comme faible. Il convient de noter qu'aucune de ces études n'a inclus le TA parmi les organes étudiés, ce qui peut expliquer le fait d'être passé à côté des adipocytes. Quoi qu'il en soit, selon nos résultats, les adipocytes expriment l'APOL6, bien qu'il ne soit pas clair s'ils sont les seules cellules à le faire ou pas. Ceci est renforcé par le fait que nous avons observé un phénotype en lien avec la prise de poids chez les souris APOL6 KO. Afin de confirmer que ce phénotype soit bien dû à l'expression d'APOL6 dans les adipocytes et pas dans d'autres types cellulaires, nous avons mis au point une lignée de souris APOL6 KO en utilisant une recombinaison CRE sous le contrôle du promoteur de l'adiponectine, une adipokine. Ces souris, à présent disponibles, seront utilisées pour reproduire les expériences de prise de poids. Si le même phénotype était observé, cela confirmerait que les adipocytes sont les cellules clé. Sinon, cela signifierait que d'autres cellules sont impliquées, et remettrait en cause le fait que l'expression d'APOL6 soit principalement confinée aux adipocytes.

Qu'il s'agisse de la localisation tissulaire ou cellulaire, nous avons à chaque fois cherché à mesurer l'expression d'APOL6 totale. Cependant, nous savons que la protéine peut se trouver sous deux isoformes différentes. Bien qu'elles aient 292 acides aminés en commun (sur 321 et 329 acides aminés totaux pour les isoformes 1 et 2 respectivement), la distinction n'est peut-être pas sans conséquence. En effet, dans la queue C-terminale qui les distingue, l'isoforme 2 présente un motif transmembranaire fort (selon la prédiction de l'outil TMHMM, voir figure 35) absent de l'isoforme 1. Si cette différence prédite *in silico* est avérée dans la protéine *in vivo*, cela pourrait se traduire en une localisation, une fonction, ou une régulation différente de la protéine par exemple. Ainsi, afin d'approfondir l'étude de l'APOL6, il sera indispensable d'évaluer le rôle et la participation relative de chaque isoforme à l'expression totale de l'APOL6 et au phénotype observé dans les souris *APOL6* KO. Pour cela, nous avons des amorces capables d'amplifier par qRT-PCR l'ADN complémentaire de chaque isoforme individuellement. Par contre, au niveau protéique, les anticorps anti-APOL6 dont nous disposons ont été produits par immunisation d'un peptide antigénique provenant de la région N-terminale de l'APOL6, commune aux deux isoformes. Par conséquent, il faudrait produire de nouveaux anticorps à partir des portions C-terminales des deux isoformes de l'APOL6, ce qui pourrait s'avérer difficile dans le cas de l'isoforme 2 si cette région est effectivement transmembranaire.

Une donnée importante qui nous échappe encore est la localisation intracellulaire de la protéine. Pour obtenir des informations sur celle-ci, l'outil de choix est la microscopie. Nous avons fait de nombreux essais d'immunomarquage de l'APOL6 en vue de faire de la microscopie à fluorescence pour déterminer sa localisation dans la cellule, mais les résultats ont été décevants. Il semble que nos anticorps qui sont bien adaptés au Western blot ne fonctionnent pas en immunofluorescence. Nous avons obtenu à deux reprises des images à priori convaincantes de marquage APOL6, mais celles-ci n'ont plus jamais été reproduites par la suite. Par conséquent, nous ne les avons pas incluses dans ce travail. Notons toutefois que le marquage semblait principalement se trouver en périphérie des LD, sans colocaliser parfaitement avec celles-ci. Des expériences de fractionnement d'adipocytes différenciés *in vitro* ont aussi été réalisées, montrant que l'APOL6 avait tendance à se trouver sous forme soluble ou associée à des membranes légères dans la cellule. Néanmoins, en l'absence de certains contrôles nécessaires, ces résultats ont aussi été écartés de ce manuscrit.

Nous avons vu que l'expression d'APOL6 était diminuée en présence de forskoline et d'IBMX, des facteurs augmentant la concentration d'AMPc dans la cellule. L'AMPc est impliqué dans

de nombreuses cascades de signalisation cellulaire. Dans les adipocytes plus spécifiquement, l'AMPc est impliqué dans l'adipogénèse et dans la lipolyse (Rogne & Taskén 2014; Nielsen et al. 2014). L'action de l'AMPc au sein de l'adipogénèse est double. D'une part, l'AMPc permet l'activation de la transcription de PPAR $\gamma$  et de C/EBP $\beta$  par le facteur de transcription CREB, lui-même phosphorylé et activé par la PKA (Rogne & Taskén 2014). D'autre part, l'AMPc, à travers l'action de la PKA et des Rho-GTPases, induit la phosphorylation et l'inactivation de YAP, un membre de la voie de signalisation Hippo qui inhibe l'adipogénèse (Rogne & Taskén 2014). Ces actions de l'AMPc expliquent la présence d'IBMX au sein du cocktail de différenciation des adipocytes *in vitro*. Par contre, plus tard dans la différenciation, la présence d'AMPc devient inhibitrice pour l'adipogénèse. En effet, son activité activatrice de la lipolyse devient prépondérante au détriment de la lipogénèse qui caractérise l'adipogénèse (Rogne & Taskén 2014). L'expression d'APOL6 étant diminuée par l'AMPc mais augmentée lors de la différenciation en adipocytes, a-t-elle un rôle dans l'adipogénèse ? D'après nos observations, il semble évident que la présence d'APOL6 n'est pas une condition nécessaire au déroulement de l'adipogénèse, puisque les souris *APOL6* KO ont des adipocytes matures et que les ATMSC *APOL6* KO se sont différenciés *in vitro*. À l'inverse, il semble clair que l'adipogénèse influence l'expression de l'APOL6, celle-ci augmentant d'un facteur 100 à 300 selon les expériences de différenciation. Lorsque de la forskoline était ajoutée en permanence au milieu de culture, l'expression d'APOL6 n'a augmenté que d'un facteur 15. L'APOL6 pourrait-elle donc avoir un rôle dans l'adipogénèse en lien avec l'AMPc ? Au vu de son interaction potentielle avec différentes protéines du cytosquelette d'actine, elle pourrait participer au remodelage de celui-ci pendant l'adipogénèse. En effet, lorsque les préadipocytes se différencient, les fibres d'actine sont largement dépolymérisées et l'actine s'organise sous forme d'actine corticale (Kanzaki & Pessin 2001). Nous n'avons pas de données permettant de confirmer cette hypothèse. Au contraire, le fait que l'adipogénèse se déroule bien en l'absence d'APOL6 serait plutôt de nature à infirmer ce modèle. Il semble plus probable que *l'APOL6* soit un gène exprimé par les adipocytes et que cette hausse d'expression soit une conséquence de l'adipogénèse plus qu'une cause. Une façon de tester ceci dans le futur serait par exemple de refaire une cinétique de différenciation des adipocytes mais de se concentrer sur les premiers instants après l'ajout du cocktail de différenciation. En effet, les gènes régulant l'adipogénèse sont induits dans les premières heures suivant le déclenchement de celle-ci. Notre premier point étant situé à 2 jours, cela ne permet pas de voir quand l'expression de l'APOL6 est réellement activée. Quant à un éventuel rôle dans le remodelage de l'actine, des images de microscopie à fluorescence montrant une colocalisation entre l'APOL6 et l'actine au cours de la différenciation

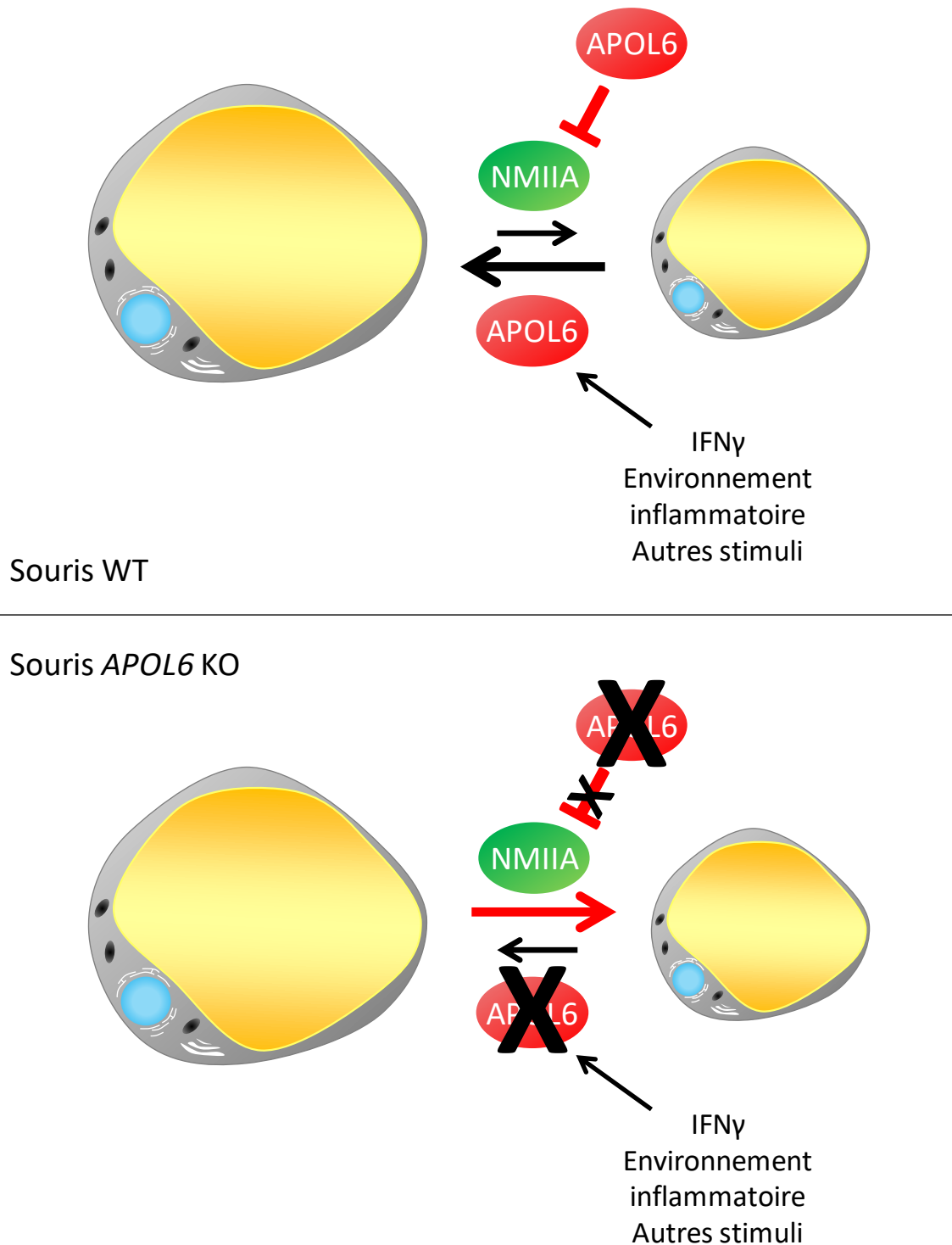
permettraient de supporter l'hypothèse.

Dans le cadre de la lipolyse, la fonction principale de l'AMPC est d'activer la PKA, qui ensuite phosphoryle entre autres HSL et la périlipine, permettant l'activation de la lipolyse (Nielsen et al. 2014). L'APOL6 est-elle impliquée dans la lipolyse ? Il est difficile d'apporter une réponse définitive avec les résultats à disposition. Ce qui semble clair, c'est qu'en l'absence d'APOL6, les adipocytes sont capables d'effectuer de la lipolyse, puisque ceci a été observé sur des échantillons de TA provenant de souris *APOL6* KO. À l'inverse, le résultat de l'influence de la lipolyse sur l'expression d'APOL6 est plus compliqué à interpréter. En effet, nous avons vu que le déclenchement de la lipolyse par l'ajout de forskoline (augmentant l'AMPC), de triacine C (bloquant la lipogénèse) et de BSA (absorbant les acides gras dans le milieu) provoquait une diminution de l'expression d'APOL6. Néanmoins, lorsque la BSA n'était pas ajoutée au milieu et que la lipolyse était moins efficacement déclenchée, l'expression d'APOL6 était encore plus fortement diminuée. Ceci nous a conduit à conclure que la diminution d'expression de l'APOL6 constatée suite à l'augmentation de la concentration d'AMPC n'est pas due à la lipolyse elle-même. En raison du rôle de la BSA dans ce résultat, nous pouvons émettre l'hypothèse que la raison de la diminution d'expression de l'APOL6 est plutôt à rechercher du côté des acides gras. En effet, la BSA ajoutée au milieu est dépourvue d'acides gras et sert, en quelque sorte, d'éponge permettant de les absorber. Elle est donc utilisée pour faciliter la sécrétion des acides gras par les adipocytes. En l'absence de BSA, il est probable que le flux d'acides gras sortants soit diminué, ce qui résulte en une lipolyse plus faible, comme observé. Il est possible que les acides gras produits par la lipolyse soient donc plus concentrés dans la cellule elle-même, ce qui peut aboutir à un stress cellulaire. Ce stress pourrait avoir comme conséquence de diminuer l'expression d'APOL6. Néanmoins, il est aussi possible que la concentration en acides gras libres dans le milieu (non associés à la BSA) soit elle-aussi plus élevée, ce qui pourrait entraîner une réponse de l'adipocyte, en les détectant par exemple *via* le TLR4. Malheureusement, notre choix d'évaluer la lipolyse en dosant le glycérol et non les acides gras nous a empêché de vérifier cette hypothèse. Dans les deux cas, l'hypothèse que l'augmentation de concentration d'acides gras (dans les adipocytes ou hors de ceux-ci) soit à l'origine de la diminution d'expression d'APOL6 est supportée par le fait que les adipocytes de souris HF, donc en présence de beaucoup d'acides gras, expriment eux-aussi moins d'APOL6. Afin de vérifier cette hypothèse, il convient de mesurer la concentration d'acides gras dans ces conditions, ainsi que de suivre l'expression d'APOL6 en présence d'une plus grande concentration d'acides gras. Ce dernier point a déjà été testé par l'ajout de palmitate au milieu de culture des adipocytes,

mais aucune différence d'expression n'a été observée. Néanmoins, l'expérience devrait être répétée, et d'autres acides gras ou mélanges d'acides gras devraient être testés.

Un des résultats les plus marquants de ce travail est probablement l'observation que les souris *APOL6* KO mâles (et dans une moindre mesure les souris femelles) prenaient moins de poids en régime HF que les souris WT. Afin de pouvoir interpréter ce phénotype, deux questions se posent : « comment l'*APOL6* pourrait-elle avoir une incidence sur le poids des souris HF ? » et « comment ce phénotype est-il déclenché et pourquoi apparaît-il à ce moment-là ? ».

Pour répondre à la première question, tout en gardant à l'esprit une fonction éventuellement liée au cytosquelette d'actine, nous pouvons nous baser sur une étude publiée récemment par Pfisterer et al. Dans ce travail, les auteurs démontrent que la myosine NMIIA, en association avec la formine FMNL1, est impliquée dans la dissociation des LD (Pfisterer et al. 2017). Les LD sont des organites dynamiques qui peuvent migrer, grandir, faire de la fusion ou de la fission, et transférer des lipides de l'une à l'autre (Wilfling, Haas, et al. 2014). Certaines LD peuvent s'assembler en clusters et se dissocier de ceux-ci. Après avoir identifié ces deux protéines dans le protéome associé aux LD, Pfisterer et al. ont montré que l'inhibition de l'expression de NMIIA par interférence ARN diminue l'hydrolyse des triglycérides, diminue les épisodes de fission des LD et aboutit à des LD plus grandes (Pfisterer et al. 2017). Le modèle qu'ils proposent est que FMNL1 permet l'assemblage de filaments d'actine qui facilitent la dissociation des LD grâce à la force motrice produite par NMIIA. Les résultats de cette étude sont particulièrement intéressants dans le cadre de notre projet sur l'*APOL6*. En effet, NMIIA (*via* sa sous-unité MYH9) est la protéine qui est ressortie le plus dans nos résultats d'immunoprécipitation, avec 130 peptides uniques et exclusifs, couvrant plus de 90 % de la séquence de la protéine. Il semble donc vraisemblable que NMIIA interagisse avec *APOL6* dans les ATMSC *in vitro*. De plus, nous avons observé que les adipocytes présents dans le TA des souris *APOL6* KO HF étaient plus petits que ceux des souris WT HF. Or, *in vivo*, la taille des adipocytes est principalement définie par la taille de leur unique LD, celle-ci occupant plus de 90 % du cytoplasme. De ce fait, si la taille de la LD est diminuée par l'action de NMIIA comme dans l'article présenté ci-dessus, la taille des adipocytes devrait aussi diminuer, ce qui correspond au phénotype observé.

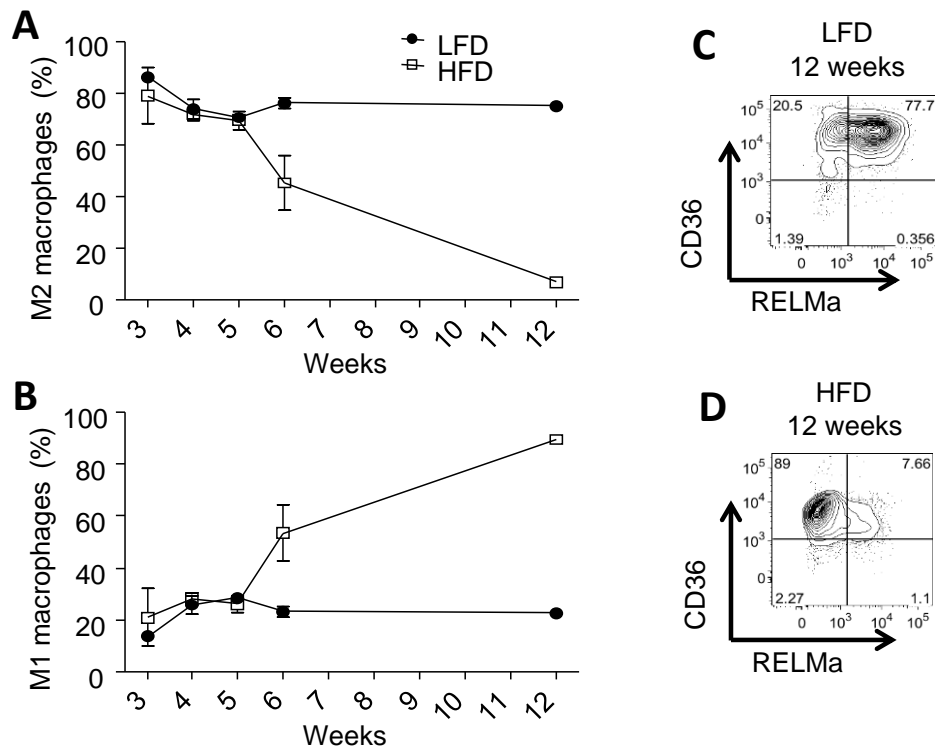


**Figure 63 : Modèle ayant pour but d'expliquer le phénotype des souris *APOL6* KO compte tenu des différents résultats obtenus lors de ce travail.** Les LD, constituant environ 90% du volume des adipocytes, peuvent augmenter ou diminuer de taille selon plusieurs mécanismes. Selon Pfisterer et al., la myosine NMIIA participe à la dissociation des clusters de LD et favorise ainsi l'émergence de LD plus petites. Selon notre hypothèse, l'*APOL6* va à l'encontre de ce phénomène et permet l'émergence de grandes LD, soit en favorisant une action opposée à celle de NMIIA, soit en inhibant directement celle-ci. L'action de l'*APOL6* serait notamment activée par l'environnement pro-inflammatoire du TA. Dans les souris *APOL6* KO, l'action de NMIIA ne serait pas contrée, ce qui aboutirait à des LD plus petites.

L'hypothèse pour expliquer le phénotype de nos souris, schématisée à la figure 63, est donc que l'APOL6 aurait une action opposée à NMIIA et permettrait aux LD d'être plus grandes. Ceci va de pair avec l'augmentation d'expression de l'APOL6 pendant l'adipogénèse, période durant laquelle le phénotype le plus marquant des adipocytes est l'apparition et le grossissement des LD. L'action de l'APOL6 pourrait passer par une interaction inhibitrice avec NMIIA, mais elle pourrait aussi être indépendante de la myosine en promouvant le rapprochement des LD et leur fusion. Dans les souris *APOL6* KO, l'inhibition de NMIIA par l'APOL6 serait levée, et NMIIA augmenterait les épisodes de dissociation des LD. Dans l'hypothèse d'une APOL6 promouvant la fusion des LD, il pourrait s'agir d'une balance entre l'action de l'APOL6 et celle de NMIIA, et en l'absence d'APOL6, la dissociation promue par NMIIA prendrait le dessus. *In fine*, les adipocytes étant plus petits dans les souris *APOL6* KO, ceux-ci seraient moins capables de stocker des graisses qui seraient alors plus facilement éliminées sous forme d'acides gras libres dans la circulation. Le résultat final serait des souris prenant moins de poids que les souris WT. Pourquoi et comment ce phénotype se déclenche-t-il de façon répétée à la 6<sup>ème</sup> semaine de traitement HF chez les souris mâles ? Notre hypothèse principale est que l'environnement pro-inflammatoire induirait l'expression d'APOL6 *via* l'IFN $\gamma$ , comme observé sur notre modèle *in vitro* de 3T3-L1. Ce serait donc au moment de l'établissement de l'inflammation de bas grade dans le TA que l'expression de l'APOL6 serait particulièrement induite pour permettre aux adipocytes d'emmagasiner plus de lipides. Dans les souris *APOL6* KO, l'ARNm ne pouvant pas être traduit en protéine APOL6, les adipocytes ne pourraient pas augmenter la taille de leurs LD autant que dans les souris WT.

Une des caractéristiques de l'inflammation de bas grade dans le TA est le remplacement des macrophages de type M2 présents dans le TA en conditions normales par des macrophages pro-inflammatoires de type M1. Afin de déterminer à quel moment ce switch M2→M1 se déroule, Guillaume Oldenhove, du laboratoire d'immunobiologie de l'ULB, a soumis des souris à un régime HF et a mesuré chaque semaine les proportions des différentes populations de cellules immunitaires dans le TA. Ses observations montrent que le switch M2→M1 se situe environ à la semaine 6 (Figure 64). Ce résultat indique donc que la différence de prise de poids entre les mâles WT et les mâles *APOL6* KO soumis à un régime HF commence à apparaître au moment où l'inflammation se met en place dans le tissu. La mise en place de l'inflammation s'accompagne d'une série de changements dans le tissu, ce qui rend plausible l'apparition d'un phénotype à ce moment.





**Figure 64 : Proportions de macrophages M2 et M1 parmi la population de macrophages du tissu adipeux gonadal de souris mâles nourries d'un régime LFD ou HFD, déterminées par cytométrie en flux.**

**A** : Macrophages M2. **B** : Macrophages M1. **C** et **D** : Proportions de macrophages M2 (panneaux supérieurs à droite, cellules positives pour CD36 et RELMa) et M1 (panneaux supérieurs à gauche, cellules positives pour CD36 et négatives pour RELMa) après 12 semaines de traitement LFD (**C**) ou HFD (**D**). Figure fournie par Guillaume Oldenhove.

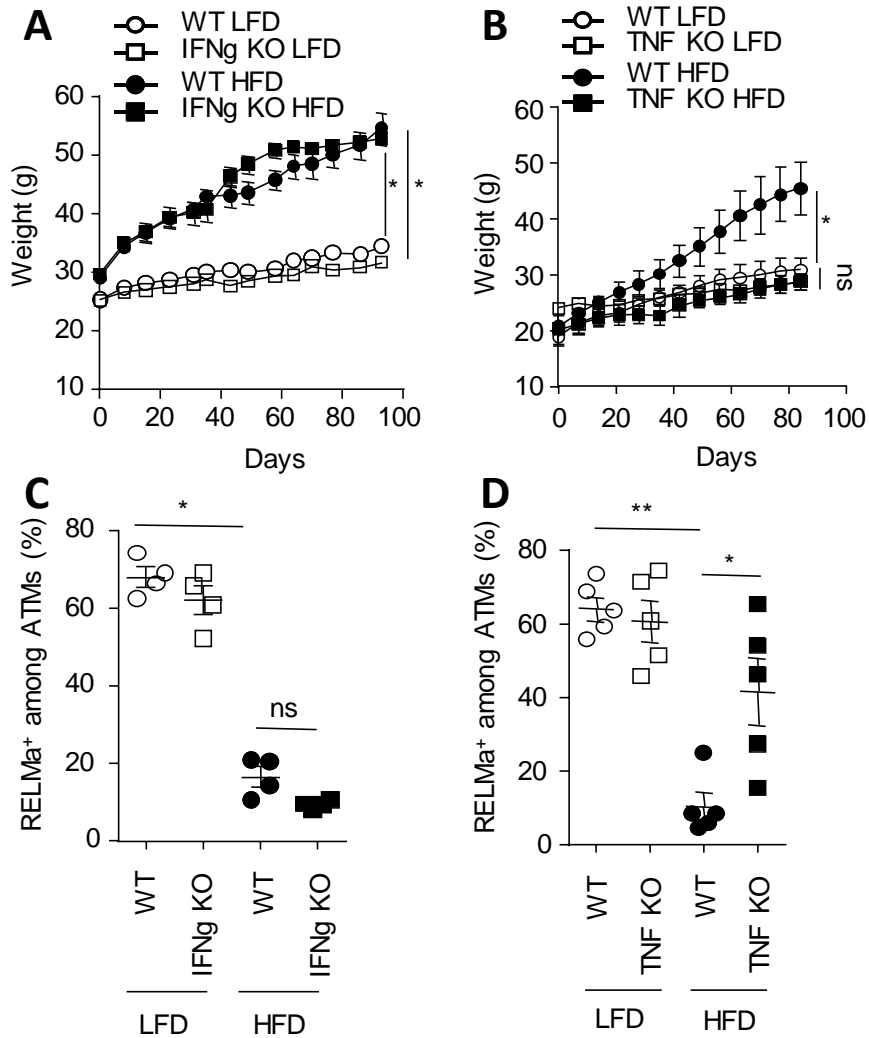
Comme il a été expliqué dans l'introduction, les APOLs ont été associées à des phénomènes de mort cellulaire (Liu, Z. et al. 2005; Zhaorigetu et al. 2011; Uzureau, S. et al. 2016). Or, l'inflammation de bas grade dans le TA s'accompagne d'une augmentation de la mort cellulaire des adipocytes, notamment causée par les macrophages infiltrants (Keuper et al. 2011). Il est donc possible que l'APOL6 soit impliquée dans la régulation de la mort des adipocytes. Au moment où les conditions deviennent plus inflammatoires, les adipocytes des souris *APOL6* KO entreraient plus rapidement en apoptose, limitant ainsi leur nombre et donc la prise de poids.

Une autre hypothèse pourrait être plus directement due à l'environnement pro-inflammatoire dans lequel les adipocytes se trouvent à ce moment de la cinétique. Nous avons en effet vu que les membres de la famille des APOLs sont généralement activés par des conditions pro-inflammatoires, notamment par les cytokines TNF $\alpha$  (Monajemi et al. 2002), IFN $\alpha$  (Hayashi et al. 2005), IFN $\beta$  (Stojdl et al. 2003) et IFN $\gamma$  (Sana et al. 2005; Zhaorigetu et al. 2011, 2008; Liao

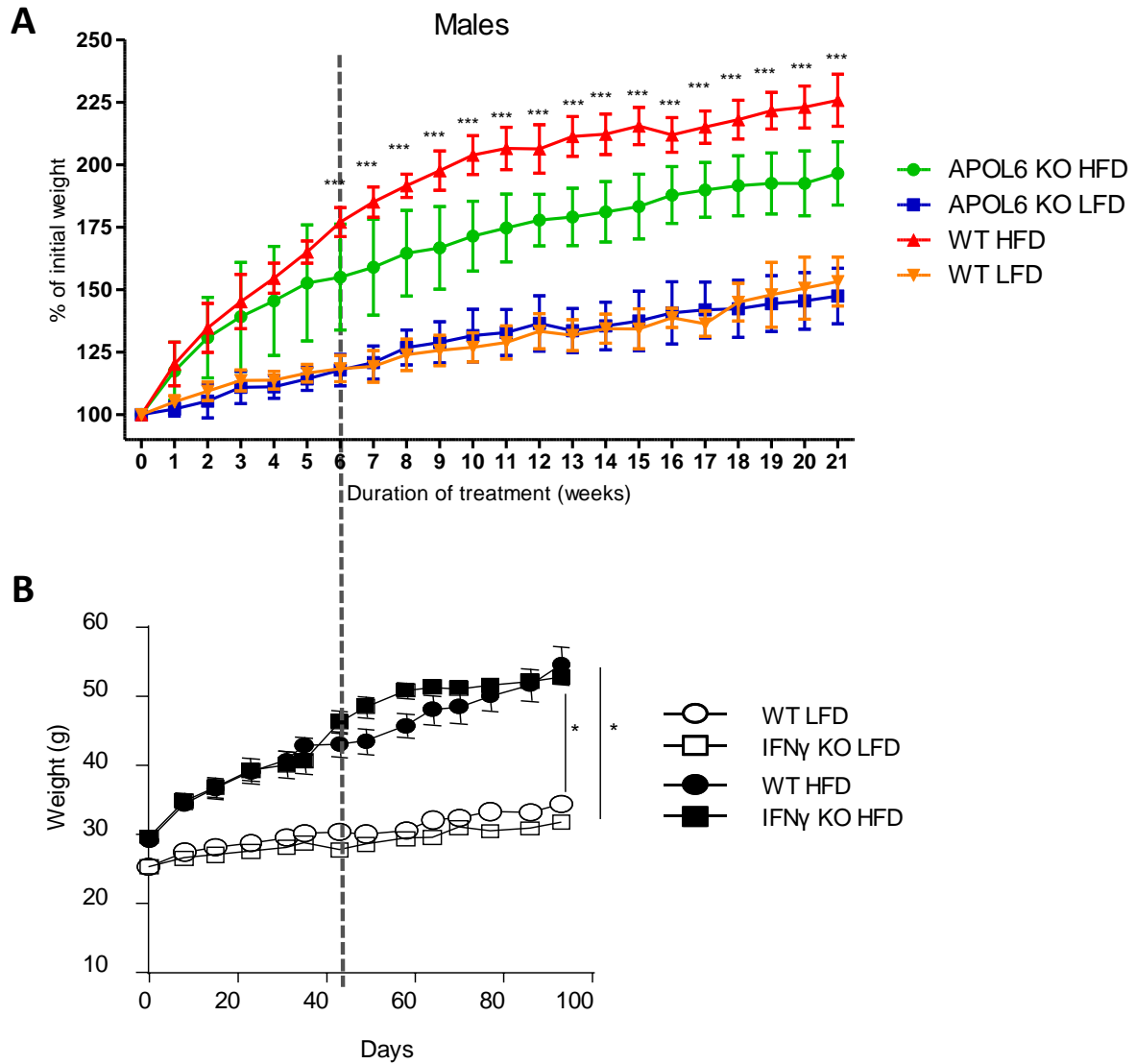
et al. 2011). La présence plus abondante de ces cytokines pourrait causer l'activation de l'APOL6 dans les souris WT, ce qui ne serait pas possible dans les souris *APOL6* KO et donc causerait le phénotype. Ceci pourrait être particulièrement pertinent pour l'IFN $\gamma$  puisque nous avons vu qu'il s'agissait de la seule cytokine capable d'augmenter l'expression de l'APOL6 murine dans des cultures d'adipocytes 3T3-L1 *in vitro* dans les conditions utilisées, c'est-à-dire après 24 heures de stimulation (Figure 45A). Lors de ses expériences de cinétique, Guillaume Oldenhove n'a pas observé de différence de prise de poids ni de différence de population de macrophages en bout de course entre les souris WT et les souris IFN $\gamma$  KO (Figure 65A et C) (Oldenhove et al. 2018). Néanmoins, on observe qu'entre la semaine 6 et les semaines 10-12, les souris IFN $\gamma$  KO HF ont pris plus de poids que les souris WT HF, avant que ces dernières ne les rattrapent à la fin de l'expérience. Il est intéressant de noter que cette cinétique correspond à la période à laquelle l'écart de poids entre souris WT HF et souris *APOL6* KO HF se creuse (Figure 66). Elle correspond donc aussi au moment où l'inflammation s'installe dans le tissu, ce qui pourrait être significatif.

Les souris TNF $\alpha$  KO, au contraire, ont présenté un phénotype beaucoup plus évident, en prenant beaucoup moins de poids que leurs homologues WT (Figure 65B) (Oldenhove et al. 2018). Leur courbe de poids se confond avec celles des souris nourries avec de la nourriture LF, alors qu'elles ont été nourries avec de la nourriture HF (Figure 65B). Ceci peut s'expliquer par le fait que le TNF $\alpha$  est une des cytokines pro-inflammatoires les plus importantes dans le développement de l'inflammation de bas grade dans le TA. Le TNF $\alpha$  est notamment produit par les macrophages M1, ce qui stimule la production d'adipokines pro-inflammatoires par les adipocytes, donnant lieu à une boucle de rétroaction positive renforçant l'inflammation (Suganami & Ogawa 2010).

Cela est illustré par le fait que, dans les souris TNF $\alpha$  KO, la proportion de macrophages M2 (représentée par la proportion de macrophages positifs pour le RELM $\alpha$ ) était aussi plus élevée que dans les souris WT HF, même si la variabilité était élevée (Figure 65D). Cela suggère que le remplacement des M2 par les M1 était incomplet, dénotant d'une plus faible inflammation. Néanmoins, ce phénotype semble bien distinct de ce qui est observé avec les souris *APOL6* KO, et ne permet donc pas de l'expliquer.



**Figure 65 : Courbes de mesures du poids de souris mâles WT et IFN $\gamma$  KO (A) ou TNF $\alpha$  KO (B), nourries avec un régime pauvre (LFD) ou riche (HFD) en graisses. Les proportions de macrophages M2 (positifs au RELM $\alpha$ ) parmi la population totale de macrophages sont représentées sur les panneaux C et D pour les souris IFN $\gamma$  KO et TNF $\alpha$  KO respectivement. ATMs : Adipose Tissue Macrophages (Macrophages du TA). Figure fournie par Guillaume Oldenhove, faisant partie du travail publié dans (Oldenhove et al. 2018).**



**Figure 66 : Comparaison par alignement des courbes de poids des souris APOL6 KO (A) et des souris IFN $\gamma$  KO (B) nourries au régime LFD ou HFD. La ligne discontinue verticale représente le point correspondant à 6 semaines de traitement.**

Ce modèle est cohérent avec la plupart des résultats obtenus lors de ce travail, à l'exception du fait que l'expression d'APOL6 est diminuée dans les adipocytes des souris HF par rapport aux souris LF. L'environnement du TA étant plus inflammatoire dans les souris HF, on devrait s'attendre à une expression plus élevée de l'APOL6. Une piste d'explication pourrait être à chercher du côté de la cinétique. En effet, nous avons vu que l'inflammation se déclenche vers la semaine 6, ce qui provoque sans doute la différence de poids observée entre les souris HF APOL6 KO et HF WT. L'écart se creuse ensuite jusqu'aux environs de la semaine 10. Nous observons un écart de poids similaire entre les souris IFN $\gamma$  KO et WT dans cette même période allant des semaines 6 à 10. Or, les mesures d'expression d'APOL6 dans les adipocytes ont été

réalisées en bout de course, c'est-à-dire au-delà de 14 semaines (et jusqu'à 21 semaines selon les expériences). Il est possible que l'expression d'APOL6 soit activée pendant les premières semaines de l'établissement de l'inflammation de bas grade, mais soit inhibée par la suite (formant une boucle de rétrocontrôle négatif), afin d'empêcher les adipocytes d'excéder un certain seuil qui pourrait causer un stress trop important menant à l'apoptose.

Ce modèle n'est pas sans défauts. Tout d'abord, il part du principe que le phénotype observé dérive de l'absence d'expression d'APOL6 dans les adipocytes eux-mêmes. Ceci est supporté par l'observation que l'APOL6 est fortement exprimée par les adipocytes. Néanmoins, il n'est pas exclu que d'autres cellules l'expriment aussi. Ceci pourra être vérifié par l'utilisation de souris *APOL6* KO uniquement dans les adipocytes. Ensuite, il se base essentiellement sur les conclusions de Pfisterer et al. qui sont basées sur l'étude de LD de cellules qui ne sont pas des adipocytes. Néanmoins, d'autres travaux récents sur des adipocytes ont montré que des protéines du cytosquelette étaient capables de moduler la taille des LD. Ainsi, l'inhibition de l'expression de la syntrophine  $\beta 2$  ou de l'utrophine résultait en des LD plus grandes que dans les adipocytes contrôles (Krautbauer et al. 2018). Finalement, il est possible que d'autres interprétations soient cohérentes avec nos résultats et avec la littérature. Afin de tester la validité de ce modèle et d'aller de l'avant dans ce travail, un certain nombre d'expériences semble requis.

Une grande partie de notre raisonnement se base sur l'interaction présumée entre l'APOL6 et différentes protéines du cytosquelette d'actine, au premier rang desquelles la myosine NMIIA. Cette interaction, détectée par immunoprécipitation, devrait idéalement être confirmée par d'autres techniques, par exemple telles que le split-ubiquitine, le FRET, ou la complémentation de fluorescence bimoléculaire. Un moyen de confirmer l'expérience d'immunoprécipitation elle-même serait d'immunoprécipiter MYH9 (ou tout autre protéine apparaissant dans le tableau 7) et de vérifier si on retrouve l'APOL6 parmi les protéines éluées. Dans le cadre de son travail, Sophie Uzureau a réalisé une immunoprécipitation de l'APOL1 dans les podocytes humains et a obtenu des résultats fortement similaires à ceux-ci, avec également MYH9 comme protéine la plus représentée. Le fait que deux APOLs différentes, dans deux types cellulaires différents et dans deux organismes différents, immunoprécipitent les mêmes protéines tend à nous rassurer quant à la validité des résultats.

Ensuite, une donnée essentielle concernant l'APOL6 en général est sa localisation cellulaire, que nous ignorons à l'heure actuelle. Les prédictions bioinformatiques indiquent une localisation différente selon l'isoforme de l'APOL1. L'isoforme 1 serait soit nucléaire, soit

cytoplasmique ou mitochondriale, tandis que l'isoforme 2 serait soit dans le ER, soit à la membrane plasmique. Néanmoins, une observation expérimentale est nécessaire pour pouvoir tirer une quelconque conclusion. La technique qui permettrait de répondre idéalement à nos attentes serait la microscopie à immunofluorescence. Malheureusement, nos essais avec l'APOL6 ont été jusqu'ici décevants. Comme mentionné plus haut, nous avons obtenu un marquage ponctué en périphérie des LD, mais nous ne sommes pas parvenus à le reproduire par la suite. De nouveaux essais devraient être tentés, peut-être en essayant différentes stratégies de démasquage des épitopes, voire avec de nouveaux anticorps si ceux-ci s'avèrent impropres à cette technique.

Un autre point qui devrait être vérifié est que les adipocytes *APOL6* KO ont des LD plus petites que les adipocytes WT. Nous avons observé que ceci était vrai *in vivo* dans des coupes de TA provenant de souris nourries au régime HF. Néanmoins, ceci pourrait être une simple conséquence du fait que les souris WT HF ont pris plus de poids que les souris *APOL6* KO HF, et donc que leurs adipocytes étaient aussi proportionnellement plus gros. Afin de vérifier l'hypothèse comme quoi la déficience d'APOL6 est à l'origine de la plus petite taille des adipocytes, il est nécessaire de tester cela *in vitro* sur des ATMSC *APOL6* KO. De plus, puisqu'il est postulé que NMIIA agit de façon opposée à l'APOL6, l'ajout de blebbistatine, permettant d'inhiber NMIIA, ou l'utilisation d'interférence ARN visant NMIIA, permettraient de mettre ce phénomène en évidence. Dans l'hypothèse que l'APOL6 agirait en inhibant NMIIA, le siRNA visant NMIIA ou la blebbistatine devraient rétablir le phénotype. Si on observe que les ATMSC *APOL6* KO ont des LD plus petites que les WT et que ce phénomène est annulé lorsque NMIIA est inhibé, cela permettrait de confirmer cette partie du modèle.

Une autre piste d'investigation s'est ouverte au laboratoire suite à des résultats récents sur l'étude des APOLs dans les podocytes humains. Les hypothèses les plus récentes sont que l'APOL3 agirait en tant que canal à ions  $K^+$  au niveau du ER et de l'appareil de Golgi pour permettre un contre-courant de cations nécessaire à l'équilibre des charges positives suite à l'efflux d'ions  $Ca^{2+}$ . Les ions  $Ca^{2+}$  sont impliqués dans plusieurs fonctions vitales dans la cellule, telles que la motilité, la contraction, la sécrétion de vésicules, la transcription de gènes, la prolifération et la mort cellulaire (Greka & Mundel 2012; Tsai et al. 2015). Ils sont stockés principalement dans le ER et leur localisation est régulée par différents canaux membranaires, comprenant des canaux échangeurs d'ions et des pompes dépendantes de l'utilisation d'ATP (Greka & Mundel 2012). L'action du calcium sur le cytosquelette est omniprésente. En lien avec notre sujet, le  $Ca^{2+}$  provoque la contraction de la myosine II en promouvant la

phosphorylation des chaînes légères régulatrices (Tsai et al. 2015). De plus, le  $\text{Ca}^{2+}$  est nécessaire à la production de PI4P, qui contrôle également l'activité de NMIIA. Le  $\text{Ca}^{2+}$  affecte aussi la dynamique de l'actine en provoquant l'activation de plusieurs kinases, en régulant les Rho GTPases, ainsi que plusieurs protéines coupant l'actine telles que la cofiline ou la gelsoline (Tsai et al. 2015). Il est établi que les APOLs sont capables de créer des pores ioniques dans les membranes, comme l'APOL1 dans la membrane lysosomiale du trypanosome ou dans des membranes bactériennes (Perez-Morga et al. 2005). Par conséquent, cette nouvelle piste supposant un rôle des APOLs dans la régulation du cytosquelette en contrôlant les flux de cations au travers du ER et de l'appareil de Golgi semble prometteuse. Aucun travail n'ayant encore été fait sur l'APOL6 à ce sujet, il serait intéressant de déterminer si les résultats obtenus dans les podocytes humains sont transposables dans les adipocytes murins. Il est possible qu'en cas de déficience pour l'APOL6, les flux de  $\text{Ca}^{2+}$  soient perturbés, provoquant une modulation de l'activité de NMIIA. Ceci pourrait donc fournir une piste pour expliquer une éventuelle inhibition de NMIIA par l'APOL6.

Très récemment, une étude a montré qu'un micro ARN, miR-10b-5p, a pour cible le gène *APOL6* et influence l'adipogénèse (Tan et al. 2018). Celui-ci est exprimé dans les adipocytes et que son expression est plus faible chez les individus obèses, chez l'humain comme chez la souris. Dans le modèle *in vitro* d'adipocytes murins 3T3-L1, l'expression de miR-10b-5p augmente fortement pendant la différenciation en adipocytes. Lorsque l'expression de celui-ci est inhibée, l'adipogénèse est plus efficace (marqueurs d'adipocytes plus élevés, augmentation des gouttelettes lipidiques...). À l'inverse, lorsque les cellules sont traitées avec un imitateur de miR-10b-5p, l'expression de gènes habituellement surexprimés pendant l'adipogénèse est réduite. Les auteurs ont ensuite montré que parmi les cibles de miR-10b-5p, l'APOL6 exhibe un profil d'expression inverse à celui du micro ARN durant l'adipogénèse, diminuant au cours de celle-ci. Selon leurs résultats, miR-10b-5p pourrait lier l'ARNm de l'APOL6 dans sa région 3'-UTR et inhiber sa traduction. Finalement, les auteurs ont établi une corrélation entre l'expression d'APOL6 et l'incidence de certains cancers associés à l'obésité. Ainsi, une recherche dans la base de données The Cancer Genome Atlas a montré que l'APOL6 est significativement surexprimée dans l'adénocarcinome pancréatique. De même, une expression élevée d'APOL6 est associée à un plus haut taux de mortalité chez les patients atteints de cancer colorectal.

Ces résultats confirment que l'APOL6 est impliquée dans l'adipogénèse dans les cellules 3T3-L1 (Tan et al. 2018), une conclusion à laquelle nous étions aussi parvenus. De plus, cela apporte

de nouvelles données sur l'APOL6, comme par exemple le fait que sa traduction soit inhibée par miR-10b-5p. Par contre, leurs données indiquent que l'expression d'APOL6 diminue au cours de l'adipogénèse, ce qui va totalement à l'encontre de nos résultats. Étrangement, les amorces utilisées pour amplifier l'ADNc de l'APOL6 par qPCR ne sont pas communiquées, ce qui rend impossible la vérification de leur spécificité. De plus, tout au long de l'article, une confusion semble être faite entre APOL6 humaine et APOL6 murine. Aucune distinction n'est faite entre les deux protéines et certains résultats sont obtenus sur des échantillons de souris (par exemple sur les cellules 3T3-L1) tandis que d'autres proviennent de banques de données humaines, à savoir les associations entre APOL6 et cancers humains. Par conséquent, il est difficile de tirer une conclusion sur l'intérêt réel de cette étude et sur sa pertinence par rapport à notre propre travail.

En conclusion, si la question de la fonction de l'APOL6 n'est pas encore élucidée, nos résultats suggèrent que celle-ci joue un rôle dans la prise de poids des souris, que son action se situe au niveau des adipocytes, et qu'elle soit déclenchée par la mise en place d'un environnement inflammatoire de bas grade dans le tissu adipeux. Néanmoins, de nombreuses questions restent encore en suspens. Quelle est la localisation intracellulaire de l'APOL6 ? Par quel mécanisme pourrait-elle influencer la taille de la gouttelette lipidique et de l'adipocyte ? A-t-elle uniquement un impact sur les adipocytes ou agit-elle également au sein d'autres cellules du tissu ? Qu'en est-il de l'APOL6 humaine ? Ce ne sont que quelques exemples de questions parmi d'autres, et beaucoup de travail est encore nécessaire afin de tenter de leur apporter une réponse.



# Références

## 6. Références

- Ahn Woong Shick, Su Mi Bae, Joon Mo Lee, Sung Eun Namkoong, Sei-jun Han, Young Lae Cho, Gye Hyun Nam, Jeong-sun Seo, Chong Kook Kim, Yong-wan Kim. 2004. "Searching for Pathogenic Gene Functions to Cervical Cancer." *Gynecologic Oncology* 93: 41–48.
- Albert Timothy S E, Philippe N Duchateau, Samir S Deeb, Clive R Pullinger, Min H Cho, David C Heilbron, Mary J Malloy, John P Kane, B Greg Brown. 2005. "Apolipoprotein L-I Is Positively Associated with Hyperglycemia and Plasma Triglycerides in CAD Patients with Low HDL." *Journal of Lipid Research* 46 (3): 469–74.
- Alkhoury Naim, Agnieszka Gornicka, Michael P. Berk, Samjhana Thapaliya, Laura J. Dixon, Sangeeta Kashyap, Philip R. Schauer, Ariel E. Feldstein. 2010. "Adipocyte Apoptosis, a Link between Obesity, Insulin Resistance, and Hepatic Steatosis." *Journal of Biological Chemistry* 285 (5): 3428–38.
- Altshuler-Keylin Svetlana, Kosaku Shinoda, Yutaka Hasegawa, Kenji Ikeda, Haemin Hong, Qianqian Kang, Yangyu Yang, Rushika M. Perera, Jayanta Debnath, Shingo Kajimura. 2016. "Beige Adipocyte Maintenance Is Regulated by Autophagy-Induced Mitochondrial Clearance." *Cell Metabolism* 24 (3): 402–19.
- Amano Shinya U., Jessica L. Cohen, Pranitha Vangala, Michaela Tencerova, Sarah M. Nicoloso, Joseph C. Yawe, Yuefei Shen, Michael P. Czech, Myriam Aouadi. 2014. "Local Proliferation of Macrophages Contributes to Obesity-Associated Adipose Tissue Inflammation." *Cell Metabolism* 19 (1): 162–71.
- Apostolopoulos Vasso, Maximilian P.J. de Courten, Lily Stojanovska, Gregory L. Blatch, Kathy Tangelakis, Barbora de Courten. 2016. "The Complex Immunological and Inflammatory Network of Adipose Tissue in Obesity." *Molecular Nutrition and Food Research* 60 (1): 43–57.
- Ballak Dov B., Edwin J.P. Van Asseldonk, Janna A. Van Diepen, Henry Jansen, Anneke Hijmans, Leo A.B. Joosten, Cees J. Tack, Mihai G. Netea, Rinke Stienstra. 2015. "TLR-3 Is Present in Human Adipocytes, but Its Signalling Is Not Required for Obesity- Induced Inflammation in Adipose Tissue in Vivo." *PLoS ONE* 10 (4): 1–14.
- Barbatelli G., I. Murano, L. Madsen, Q. Hao, M. Jimenez, K. Kristiansen, J. P. Giacobino, R. De Matteis, S. Cinti. 2010. "The Emergence of Cold-Induced Brown Adipocytes in Mouse White Fat Depots Is Determined Predominantly by White to Brown Adipocyte Transdifferentiation." *AJP: Endocrinology and Metabolism* 298 (6): E1244–53.
- Barbosa Antonio Daniel, David B Savage, Symeon Siniosoglou. 2015. "Lipid Droplet – Organelle

- Interactions: Emerging Roles in Lipid Metabolism." *Current Opinion in Cell Biology* 35: 91–97.
- Beckerman Pazit, Jing Bi-Karchin, Ae Seo Deok Park, Chengxiang Qiu, Patrick D. Dummer, Irfana Soomro, Carine M. Boustany-Kari, et al. 2017. "Transgenic Expression of Human APOL1 Risk Variants in Podocytes Induces Kidney Disease in Mice." *Nature Medicine* 23 (4): 429–38.
- Bedi Deepa, John C. Dennis, Edward E. Morrison, Tim D. Braden, Robert L. Judd. 2017. "Regulation of Intracellular Trafficking and Secretion of Adiponectin by Myosin II." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 490 (2): 202–8.
- Bhat Hina F., Marvin E. Adams, Firdous A. Khanday. 2013. "Syntrophin Proteins as Santa Claus: Role(s) in Cell Signal Transduction." *Cellular and Molecular Life Sciences* 70 (14): 2533–54.
- Bjørndal Bodil, Lena Burri, Vidar Staalesen, Jon Skorve, Rolf K. Berge. 2011. "Different Adipose Depots: Their Role in the Development of Metabolic Syndrome and Mitochondrial Response to Hypolipidemic Agents." *Journal of Obesity* 2011.
- Björntorp Per, Lars Sjöström. 1971. "Number and Size of Adipose Tissue Fat Cells in Relation to Metabolism in Human Obesity." *Metabolism* 20 (7): 703–13.
- Blaza S. 1983. "Brown Adipose Tissue in Man: A Review." *Journal of the Royal Society of Medicine* 76 (3): 213–16.
- Blüher Matthias. 2013. "Adipose Tissue Dysfunction Contributes to Obesity Related Metabolic Diseases." *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism* 27 (2): 163–77.
- Borato D. C.K., G. C. Parabocz, J. T. Ribas, H. P. Netto, F. C. Erdmann, L. D. Wiecheteck, F. A. Manente, et al. 2016. "Biomarkers in Obesity: Serum Myeloperoxidase and Traditional Cardiac Risk Parameters." *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes* 124 (1): 49–54.
- Boschi Federico, Vanni Rizzatti, Mauro Zamboni, Andrea Sbarbati. 2015. "Models of Lipid Droplets Growth and Fission in Adipocyte Cells." *Experimental Cell Research* 336 (2): 253–62.
- Boström Pontus, Linda Andersson, Mikael Rutberg, Jeanna Perman, Ulf Lidberg, Bengt R Johansson, Julia Fernandez-rodriguez, et al. 2007. "SNARE Proteins Mediate Fusion between Cytosolic Lipid Droplets and Are Implicated in Insulin Sensitivity." *Nature Cell Biology* 9 (11): 1–10.
- Bowers Robert R., M. Daniel Lane. 2008. "Wnt Signaling and Adipocyte Lineage Commitment." *Cell Cycle* 7 (9): 1191–96.
- Bowers Robert R, Jae Woo Kim, Tamara C Otto, M Daniel Lane. 2006. "Stable Stem Cell Commitment to the Adipocyte Lineage by Inhibition of DNA Methylation: Role of the BMP-4 Gene." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (35):

13022–27.

- Brasaemle Dawn L., Georgia Dolios, Lawrence Shapiro, Rong Wang. 2004. "Proteomic Analysis of Proteins Associated with Lipid Droplets of Basal and Lipolytically Stimulated 3T3-L1 Adipocytes." *Journal of Biological Chemistry* 279 (45): 46835–42.
- Brestoff Jonathan R., David Artis. 2015. "Immune Regulation of Metabolic Homeostasis in Health and Disease." *Cell* 161 (1): 146–60.
- Brestoff Jonathan R., Brian S. Kim, Steven A. Saenz, Rachel R. Stine, Laurel A. Monticelli, Gregory F. Sonnenberg, Joseph J. Thome, et al. 2015. "Group 2 Innate Lymphoid Cells Promote Beiging of White Adipose Tissue and Limit Obesity." *Nature* 519 (7542): 242–46.
- Bruggeman L. A., Z. Wu, L. Luo, S. M. Madhavan, M. Konieczkowski, P. E. Drawz, D. B. Thomas, L. Barisoni, J. R. Sedor, J. F. O'Toole. 2016. "APOL1-G0 or APOL1-G2 Transgenic Models Develop Preeclampsia but Not Kidney Disease." *Journal of the American Society of Nephrology* 27 (12): 3600–3610.
- Burtneck Leslie D, Edward K Koepf, Jonathan Grimes, E Yvonne Jones, David I Stuart, Paul J Mclaughlin, Robert C Robinson. 1997. "The Crystal Structure of Plasma Gelsolin: Implications for Actin Severing, Capping, and Nucleation." *Cell* 90: 661–70.
- Byrne Dominic P, Yong Li, Pawin Ngamlert, Krithika Ramakrishnan, Claire E Eyers, David H Drewry, William J Zuercher, Neil G Berry, David G Fernig, A Patrick. 2018. "New Tools for Evaluating Protein Tyrosine Sulphation : Tyrosyl Protein Sulphotransferases ( TPSTs ) Are Novel Targets for RAF Protein Kinase Inhibitors."
- Capewell Paul, Anneli Cooper, Caroline Clucas, William Weir, Annette MacLeod. 2015. "A Co-Evolutionary Arms Race: Trypanosomes Shaping the Human Genome, Humans Shaping the Trypanosome Genome." *Parasitology* 142 (2015): S108–19.
- Cawthorn W. P., F. Heyd, K. Hegyi, J. K. Sethi. 2007. "Tumour Necrosis Factor- $\alpha$  Inhibits Adipogenesis via a  $\beta$ -Catenin/TCF4(TCF7L2)-Dependent Pathway." *Cell Death and Differentiation* 14 (7): 1361–73.
- Cedikova Miroslava, Michaela Kripnerová, Jana Dvorakova, Pavel Pitule, Martina Grundmanova, Vaclav Babuska, Dana Mullerova, Jitka Kuncova. 2016. "Mitochondria in White, Brown, and Beige Adipocytes." *Stem Cells International* 2016.
- Chang Ta-yuan, Catherine C Y Chang, Nobutaka Ohgami, Yoshio Yamauchi. 2006. "Cholesterol Sensing , Trafficking , and Esterification." *Annual Review of Cell Development Biology* 22: 129–57.

- Chidiac Mounia, Mohammad Fayyad-Kazan, Jalil Daher, Philippe Poelvoorde, Isabelle Bar, Carine Maenhaut, Paul Delrée, Bassam Badran, Luc Vanhamme. 2016. "ApolipoproteinL1 Is Expressed in Papillary Thyroid Carcinomas." *Pathology Research and Practice* 212 (7): 631–35.
- Christodoulides Constantinos, Claire Lagathu, Jaswinder K Sethi, Antonio Vidal-Puig. 2009. "Adipogenesis and WNT Signalling." *Trends in Endocrinology and Metabolism* 20 (1): 16–24.
- Christy R.J., K.H. Kaestner, D.E. Geiman, M. Daniel Lane. 1991. "CCAAT/Enhancer Binding Protein Gene Promoter: Binding of Nuclear Factors during Differentiation of 3T3-L1 Preadipocytes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (6): 2593–97.
- Chung Kyoung Jin, Antonios Chatzigeorgiou, Matina Economopoulou, Ruben Garcia-Martin, Vasileia I. Alexaki, Ioannis Mitroulis, Marina Nati, et al. 2017. "A Self-Sustained Loop of Inflammation-Driven Inhibition of Beige Adipogenesis in Obesity." *Nature Immunology* 18 (6): 654–64.
- Chung Kyoung Jin, Marina Nati, Triantafyllos Chavakis, Antonios Chatzigeorgiou. 2018. "Innate Immune Cells in the Adipose Tissue." *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 1–10.
- Cinti. 2009. "Transdifferentiation Properties of Adipocytes in the Adipose Organ." *AJP: Endocrinology and Metabolism* 297 (5): E977–86.
- Cinti Saverio, Grant Mitchell, Giorgio Barbatelli, Incoronata Murano, Enzo Ceresi, Emanuela Faloia, Shupe Wang, Melanie Fortier, Andrew S. Greenberg, Martin S. Obin. 2005. "Adipocyte Death Defines Macrophage Localization and Function in Adipose Tissue of Obese Mice and Humans." *Journal of Lipid Research* 46 (11): 2347–55.
- Demerath Ellen W., Shumei S. Sun, Nikki Rogers, Miryoung Lee, Derek Reed, Audrey C. Choh, William Couch, et al. 2007. "Anatomical Patterning of Visceral Adipose Tissue: Race, Sex, and Age Variation." *Obesity* 15 (12): 2984–93.
- Dey Pranab, Jyoti Togra, Suvradeep Mitra. 2014. "Intermediate Filament: Structure, Function, and Applications in Cytology" 42 (7): 628–35.
- Ding Yubo, Yibo Wu, Rong Zeng, Kan Liao. 2012. "Proteomic Profiling of Lipid Droplet-Associated Proteins in Primary Adipocytes of Normal and Obese Mouse." *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 44 (5): 394–406.
- Divoux A, K Clément. 2011. "Architecture and the Extracellular Matrix: The Still Unappreciated Components of the Adipose Tissue." *Obesity Reviews* 12: 494–503.
- Dombkowski Alan A, Daniela Cukovic, Raymond F Novak. 2006. "Secretome Analysis of Microarray

- Data Reveals Extracellular Events Associated with Proliferative Potential in a Cell Line Model of Breast Disease." *Cancer Letters* 241: 49–58.
- Dostou J., J. Gerich. 2001. "Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus." *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 109: 149–56.
- Du Hongzhi, Yue Huang, Xiaoyin Hou, Xiaowen Yu, Sensen Lin, Xiaohui Wei, Ruiming Li, Ghulam Jilany Khan, Shengtao Yuan, Li Sun. 2016. "DT-13 Inhibits Cancer Cell Migration by Regulating NMIIA Indirectly in the Tumor Microenvironment." *Oncology Reports* 36 (2): 721–28.
- Duchateau Philippe N., Clive R. Pullinger, Roberto E. Orellana, Steven T. Kunitake, Josefina Naya-Vigne, Patricia M. O'Connor, Mary J. Malloy, John P. Kane. 1997. "Apolipoprotein L, a New Human High Density Lipoprotein Apolipoprotein Expressed by the Pancreas. Identification, Cloning, Characterization, and Plasma Distribution of Apolipoprotein L." *Journal of Biological Chemistry* 272 (41): 25576–82.
- Duchateau Philippe N, Irina Movsesyan, Shizuya Yamashita, Naohiko Sakai, Ken-Ichi Hirano, Samantha A Schoenhaus, Patricia M O'Connor-Kearns, et al. 2000. "Plasma Apolipoprotein L Concentrations Correlate with Plasma Triglycerides and Cholesterol Levels in Normolipidemic, Hyperlipidemic, and Diabetic Subjects." *Journal of Lipid Research* 41 (8): 1231–36.
- Duchateau Philippe N, Clive R Pullinger, Min H Cho, Celeste Eng, John P Kane. 2001. "Apolipoprotein L Gene Family: Tissue-Specific Expression, Splicing, Promoter Regions; Discovery of a New Gene." *Journal of Lipid Research* 42 (4): 620–30.
- Fang Gang, Qing Huai Zhang, Qianqian Tang, Zuling Jiang, Shasha Xing, Jianying Li, Yuzhou Pang. 2018. "Comprehensive Analysis of Gene Expression and DNA Methylation Datasets Identify Valuable Biomarkers for Rheumatoid Arthritis Progression." *Oncotarget* 9 (3): 2977–83.
- Farmer Stephen R. 2006. "Transcriptional Control of Adipocyte Formation." *Cell Metabolism* 4 (4): 263–73.
- Fleischmann E, A Kurz, M Niedermayr, K Schebesta, O Kimberger, D I Sessler, B Kabon, G Prager. 2005. "Tissue Oxygenation in Obese and Non-Obese Patients during Laparoscopy." *Obes.Surg.* 15 (0960–8923 (Print)): 813–19.
- Fontaine Frédéric, Laurence Lecordier, Gilles Vanwalleghem, Pierrick Uzureau, Nick Van Reet, Martina Fontaine, Patricia Tebabi, et al. 2017. "APOLs with Low PH Dependence Can Kill All African Trypanosomes." *Nature Microbiology* 2 (11): 1500–1506.
- Franchini M., E. Monnais, D. Seboek, T. Radimerski, E. Zini, K. Kaufmann, T. Lutz, et al. 2010. "Insulin Resistance and Increased Lipolysis in Bone Marrow Derived Adipocytes Stimulated with

- Agonists of Toll-like Receptors." *Hormone and Metabolic Research* 42 (10): 703–9.
- Franke Werner W, Michaela Hergt, Christine Grund. 1987. "Rearrangement of the Vimentin Cytoskeleton during Adipose Conversion : Formation of an Intermediate Filament Cage around Lipid Globules." *Cell* 49: 131–41.
- Galindo-Moreno J., R. Iurlaro, N. El Mjiyad, J. Díez-Pérez, T. Gabaldón, C. Muñoz-Pinedo. 2014. "Apolipoprotein L2 Contains a BH3-like Domain but It Does Not Behave as a BH3-Only Protein." *Cell Death and Disease* 5 (6): 1–8.
- Gao Guangang, Feng-jung Chen, Linkang Zhou, Lu Su, Dijin Xu, Li Xu, Peng Li. 2017. "Control of Lipid Droplet Fusion and Growth by CIDE Family Proteins Guangang." *Molecular and Cellular Biology of Lipids* 1862 (10, Part B): 1197–1204.
- Garnier J, D J Osguthorpe, B Robson. 1978. "Analysis of the Accuracy and Implications of Simple Methods for Predicting the Secondary Structure of Globular Proteins." *Journal of Molecular Biology* 120: 1–24.
- Genovese Giulio, David J Friedman, Michael D Ross, Laurence Lecordier, Pierrick Uzureau, Barry I Freedman, Donald W Bowden, et al. 2010. "Association of Trypanolytic ApoL1 Variants with Kidney Disease in African-Americans." *Science* 329 (5993): 841–45.
- Gong Jingyi, Zhiqi Sun, Lizhen Wu, Wenyi Xu, Nicole Schieber, Dijin Xu, Guanghou Shui, Hongyuan Yang, Robert G Parton, Peng Li. 2011. "Fsp27 Promotes Lipid Droplet Growth by Lipid Exchange and Transfer at Lipid Droplet Contact Sites." *Journal of Cell Biology* 195 (6): 953–63.
- Govers Roland. 2014. "Cellular Regulation of Glucose Uptake by Glucose Transporter GLUT4." In *Advances in Clinical Chemistry*, 1st ed., 66:173–240.
- Granneman James G, Hsiao-ping H Moore, Rukmani Krishnamoorthy, Miloni Rathod. 2009. "Perilipin Controls Lipolysis by Regulating the Interactions of AB-Hydrolase Containing 5 (Abhd5) and Adipose Triglyceride." *The Journal of Biological Chemistry* 284 (50): 34538–44.
- Green H, M Meuth. 1974. "An Established Pre-Adipose Cell Line and It's Differentiation in Culture." *Cell* 3 (2): 127–33.
- Greka Anna, Peter Mundel. 2012. "Calcium Regulates Podocyte Actin Dynamics." *Seminars in Nephrology* 32 (4): 319–26.
- Gunning P. W., E. C. Hardeman, P. Lappalainen, D. P. Mulvihill. 2015. "Tropomyosin - Master Regulator of Actin Filament Function in the Cytoskeleton." *Journal of Cell Science* 128 (16): 2965–74.

- Han Hye Sook, Geon Kang, Jun Seok Kim, Byeong Hoon Choi, Seung Hoi Koo. 2016. "Regulation of Glucose Metabolism from a Liver-Centric Perspective." *Experimental and Molecular Medicine* 48 (3): e218-10.
- Han Zhi Jian, Yan Hu Feng, Bao Hong Gu, Yu Min Li, Hao Chen. 2018. "The Post-Translational Modification, SUMOylation, and Cancer." *International Journal of Oncology* 52 (4): 1081–94.
- Hao Ning Bo, Mu Han Lü, Ya Han Fan, Ya Ling Cao, Zhi Ren Zhang, Shi Ming Yang. 2012. "Macrophages in Tumor Microenvironments and the Progression of Tumors." *Clinical and Developmental Immunology* 2012.
- Harford Karen A., Clare M. Reynolds, Fiona C. McGillicuddy, Helen M. Roche. 2011. "Fats, Inflammation and Insulin Resistance: Insights to the Role of Macrophage and T-Cell Accumulation in Adipose Tissue." *Proceedings of the Nutrition Society* 70 (4): 408–17.
- Hassiotou Foteini, Donna Geddes. 2013. "Anatomy of the Human Mammary Gland: Current Status of Knowledge." *Clinical Anatomy* 26 (1): 29–48.
- Hayashi Junpei, Radka Stoyanova, Christoph Seeger. 2005. "The Transcriptome of HCV Replicon Expressing Cell Lines in the Presence of Alpha Interferon." *Virology* 335 (2): 264–75.
- Hayek Salim S., Kwi Hye Koh, Morgan E. Grams, Changli Wei, Yi An Ko, Jing Li, Beata Samelko, et al. 2017. "A Tripartite Complex of SuPAR, APOL1 Risk Variants and  $\alpha v \beta 3$  Integrin on Podocytes Mediates Chronic Kidney Disease." *Nature Medicine* 23 (8): 945–56.
- Heid Hans, Steffen Rickelt, Ralf Zimbelmann, Stefanie Winter, Heiderose Schumacher, Caecilia Kuhn, Werner W Franke. 2014. "On the Formation of Lipid Droplets in Human Adipocytes: The Organization of the Perilipin – Vimentin Cortex." *PLoS ONE* 9 (2).
- Heissler Sarah M, Dietmar J Manstein. 2013. "Nonmuscle Myosin-2: Mix and Match." *Cell Mol Life Sci*, 1–21.
- Hill Andrea A., W. Reid Bolus, Alyssa H. Hasty. 2014. "A Decade of Progress in Adipose Tissue Macrophage Biology." *Immunological Reviews* 262 (1): 134–52.
- Hirata Yohko, Toshio Hosaka, Takeo Iwata, Chung T K Le, Bayasgalan Jambaldorj. 2011. "Vimentin Binds IRAP and Is Involved in GLUT4 Vesicle Trafficking." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 405 (1): 96–101.
- Hollander Wouter J. Den, Linda Broer, Claudia Schurmann, David Meyre, Caroline M. Den Hoed, Julia Mayerle, Albert Hofman, et al. 2017. "Helicobacter Pylori Colonization and Obesity - A Mendelian Randomization Study." *Scientific Reports* 7 (1): 1–7.



- Horton J D. 2002. "Sterol Regulatory Element-Binding Proteins: Transcriptional Activators of Lipid Synthesis." *Biochemical Society Transactions* 30: 1091–95.
- Huang Haiyan, Tan-Jing Song, Xi Li, Lingling Hu, Qun He, Mei Liu, M. Daniel Lane, Qi-Qun Tang. 2009. "BMP Signaling Pathway Is Required for Commitment of C3H10T1/2 Pluripotent Stem Cells to the Adipocyte Lineage." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (31): 12670–75.
- Huh J. Y., J. I. Kim, Y. J. Park, I. J. Hwang, Y. S. Lee, J. H. Sohn, S. K. Lee, et al. 2013. "A Novel Function of Adipocytes in Lipid Antigen Presentation to INKT Cells." *Molecular and Cellular Biology* 33 (2): 328–39.
- Humphrey Sean J., David E. James, Matthias Mann. 2015. "Protein Phosphorylation: A Major Switch Mechanism for Metabolic Regulation." *Trends in Endocrinology and Metabolism* 26 (12): 676–87.
- Ikeda Kenji, Pema Maretich, Shingo Kajimura. 2018. "The Common and Distinct Features of Brown and Beige Adipocytes." *Trends in Endocrinology and Metabolism* 29 (3): 191–200.
- Ingelmo-Torres Mercedes, Elena González-Moreno, Adam Kassan, Michael Hanzal-Bayer, Francesc Tebar, Albert Herms, Thomas Grewal, et al. 2009. "Hydrophobic and Basic Domains Target Proteins to Lipid Droplets." *Traffic* 10 (12): 1785–1801.
- Ito Kaoru, Alexander G. Bick, Jason Flannick, David J. Friedman, Giulio Genovese, Michael G. Parfenov, Steven R. Depalma, et al. 2014. "Increased Burden of Cardiovascular Disease in Carriers of APOL1 Genetic Variants." *Circulation Research* 114 (5): 845–50.
- Jacquier Nicolas, Vineet Choudhary, Muriel Mari, Alexandre Toulmay, Fulvio Reggiori, Roger Schneider. 2011. "Lipid Droplets Are Functionally Connected to the Endoplasmic Reticulum in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Journal of Cell Science* 124: 2424–37.
- Jelenik Tomas, Michael Roden. 2013. "How Estrogens Prevent from Lipid-Induced Insulin Resistance." *Endocrinology* 154 (3): 989–92.
- Jiang Hong, Xiaoyu Zhang, Xiao Chen, Pornpun Aramsangtienchai, Zhen Tong, Hening Lin. 2018. "Protein Lipidation: Occurrence, Mechanisms, Biological Functions, and Enabling Technologies." *Chemical Reviews* 118 (3): 919–88.
- Johnstone Duncan B., Vijay Shegokar, Deepak Nihalani, Yogendra Singh Rathore, Leena Mallik, Ashish, Vasant Zare, H. Omer Ikizler, Rajaram Powar, Lawrence B. Holzman. 2012. "APOL1 Null Alleles from a Rural Village in India Do Not Correlate with Glomerulosclerosis." *PLoS ONE* 7 (12).
- Joshi Amit S, Hong Zhang, William A Prinz. 2017. "Organelle Biogenesis in the Endoplasmic

- Reticulum." *Nature Cell Biology* 19 (8): 876–82.
- Judith Lynes. 2016. "The Actin Cytoskeleton during Adipocyte Formation."
- Kanda Hajime, Sanshiro Tateya, Yoshikazu Tamori, Ko Kotani, Ken Ichi Hiasa, Riko Kitazawa, Sohei Kitazawa, et al. 2006. "MCP-1 Contributes to Macrophage Infiltration into Adipose Tissue, Insulin Resistance, and Hepatic Steatosis in Obesity." *Journal of Clinical Investigation* 116 (6): 1494–1505.
- Kang Sona, Christina N. Bennett, Isabelle Gerin, Lauren A. Rapp, Kurt D. Hankenson, Ormond A. MacDougald. 2007. "Wnt Signaling Stimulates Osteoblastogenesis of Mesenchymal Precursors by Suppressing CCAAT/ Enhancer-Binding Protein  $\alpha$  and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$ ." *Journal of Biological Chemistry* 282 (19): 14515–24.
- Kanzaki Makoto, Jeffrey E. Pessin. 2001. "Insulin-Stimulated GLUT4 Translocation in Adipocytes Is Dependent upon Cortical Actin Remodeling." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (45): 42436–44.
- Karastergiou Kalypso, Steven R. Smith, Andrew S. Greenberg, Susan K. Fried. 2012. "Sex Differences in Human Adipose Tissues—the Biology of Pear Shape." *Biology of Sex Differences* 3 (13): 1–12.
- Kawai Taro, Shizuo Akira. 2011. "Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity." *Immunity* 34 (5): 637–50.
- Kawaji Atsuko, Yuki Ohnaka, Shigehiro Osada, Makoto Nishizuka, Masayoshi Imagawa. 2010. "Gelsolin, an Actin Regulatory Protein, Is Required for Differentiation of Mouse 3T3-L1 Cells into Adipocytes." *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 33 (5): 773–79.
- Kee Anthony J., Lingyan Yang, Christine A. Lucas, Michael J. Greenberg, Nick Martel, Gary M. Leong, William E. Hughes, et al. 2015. "An Actin Filament Population Defined by the Tropomyosin Tpm3.1 Regulates Glucose Uptake." *Traffic* 16 (7): 691–711.
- Keuper Michaela, Matthias Blüher, Michael R. Schön, Peter Möller, Anna Dzyakanchuk, Kurt Amrein, Klaus Michael Debatin, Martin Wabitsch, Pamela Fischer-Posovszky. 2011. "An Inflammatory Micro-Environment Promotes Human Adipocyte Apoptosis." *Molecular and Cellular Endocrinology* 339 (1–2): 105–13.
- Khan Shahzad, Chang Hua Wang. 2014. "ER Stress in Adipocytes and Insulin Resistance: Mechanisms and Significance." *Molecular Medicine Reports* 10 (5): 2234–40.
- Khandelia Himanshu, Lars Duelund, Kirsi I Pakkanen, John H Ipsen. 2010. "Triglyceride Blisters in Lipid Bilayers: Implications for Lipid Droplet Biogenesis and the Mobile Lipid Signal in Cancer Cell

- Membranes." *PLoS ONE* 5 (9): 1–8.
- Kimmel Alan R., Carole Sztalryd. 2016. "The Perilipins: Major Cytosolic Lipid Droplet–Associated Proteins and Their Roles in Cellular Lipid Storage, Mobilization, and Systemic Homeostasis." *Annual Review of Nutrition* 36 (1): 471–509.
- Klötting Nora, Matthias Blüher. 2014. "Adipocyte Dysfunction, Inflammation and Metabolic Syndrome." *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 15 (4): 277–87.
- Ko Pin-joe, Scott J Dixon. 2018. "Protein Palmitoylation and Cancer." *EMBO Reports*, 1–14.
- Kopp J. B., G. W. Nelson, K. Sampath, R. C. Johnson, G. Genovese, P. An, D. Friedman, et al. 2011. "APOL1 Genetic Variants in Focal Segmental Glomerulosclerosis and HIV-Associated Nephropathy." *Journal of the American Society of Nephrology* 22 (11): 2129–37.
- Kory Nora, Robert V. Farese, Tobias C. Walther. 2016. "Targeting Fat: Mechanisms of Protein Localization to Lipid Droplets." *Trends in Cell Biology* 26 (7): 535–46.
- Kory Nora, Abdou Rachid Thiam, Robert V Farese, Tobias C Walther. 2015. "Protein Crowding Is a Determinant of Lipid Droplet Protein Composition." *Developmental Cell* 34 (3): 351–63.
- Krautbauer Sabrina, Markus Neumeier, Elisabeth M. Haberl, Rebekka Pohl, Susanne Feder, Kristina Eisinger, Lisa Rein-Fischboeck, Christa Buechler. 2018. "The Utrophin–beta 2 Syntrophin Complex Regulates Adipocyte Lipid Droplet Size Independent of Adipogenesis." *Molecular and Cellular Biochemistry*, 1–11.
- Kreit Marguerite, Sophie Paul, Laurent Knoops, Aurélie De Cock, Frédéric Sorgeloos, Thomas Michiels. 2014. "Inefficient Type I Interferon-Mediated Antiviral Protection of Primary Mouse Neurons Is Associated with the Lack of Apolipoprotein L9 Expression." *Journal of Virology* 88 (7): 3874–84.
- Kruzel-Davila Etty, Walter G. Wasser, Sharon Aviram, Karl Skorecki. 2016. "APOL1 Nephropathy: From Gene to Mechanisms of Kidney Injury." *Nephrology Dialysis Transplantation* 31 (3): 349–58.
- Kumar Naresh, Jacques Robidoux, Kiefer W Daniel, Gabriel Guzman, Lisa M Floering, Sheila Collins, North Carolina. 2007. "Requirement of Vimentin Filament Assembly for B3-Adrenergic Receptor Activation of ERK MAP Kinase and Lipolysis." *The Journal of Biological Chemistry* 282 (12): 9244–50.
- Lafontan M. 2012. "Historical Perspectives in Fat Cell Biology: The Fat Cell as a Model for the Investigation of Hormonal and Metabolic Pathways." *AJP: Cell Physiology* 302 (2): C327–59.
- Lan X., A. Jhaveri, K. Cheng, H. Wen, M. A. Saleem, P. W. Mathieson, J. Mikulak, et al. 2014. "APOL1

- Risk Variants Enhance Podocyte Necrosis through Compromising Lysosomal Membrane Permeability." *AJP: Renal Physiology* 307 (3): F326–36.
- Law James, Ian Bloor, Helen Budge, Michael E. Symonds. 2014. "The Influence of Sex Steroids on Adipose Tissue Growth and Function." *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation* 19 (1): 13–24.
- Lee B. T., V. Kumar, T. A. Williams, R. Abdi, A. Bernhardt, C. Dyer, S. Conte, et al. 2012. "The APOL1 Genotype of African American Kidney Transplant Recipients Does Not Impact 5-Year Allograft Survival." *American Journal of Transplantation* 12 (7): 1924–28.
- Liao Wupeng, Fera Y. Goh, Richard J. Betts, D. Michael Kemeny, John Tam, Boon Huat Bay, W. S Fred Wong. 2011. "A Novel Anti-Apoptotic Role for Apolipoprotein L2 in IFN- $\gamma$ -Induced Cytotoxicity in Human Bronchial Epithelial Cells." *Journal of Cellular Physiology* 226 (2): 397–406.
- Lieber Jonathan G, Robert M Evans. 1996. "Disruption of the Vimentin Intermediate Filament System during Adipose Conversion of 3T3-L1 Cells Inhibits Lipid Droplet Accumulation." *Journal of Cell Science* 109: 3047–58.
- Lin Fang-Tsyr, M Daniel Lane. 1994. "CCAAT/Enhancer Binding Protein  $\alpha$  Is Sufficient Program 3T3-L1 Adipocyte Differentiation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 8757–61.
- Liu F., H. Wang, W. Feng, X. Ye, X. Sun, C. Jiang, X. Chu, et al. 2018. "Type 1 Innate Lymphoid Cells Are Associated with Type 2 Diabetes." *Diabetes & Metabolism*, 6–11.
- Liu Zhihe, Huimei Lu, Zeyu Jiang, Andrzej Pastuszyn, Chien-an A Hu, A. Hu Chien-an. 2005. "Apolipoprotein L6, a Novel Proapoptotic Bcl-2 Homology 3-Only Protein, Induces Mitochondria-Mediated Apoptosis in Cancer Cells." *Mol Cancer Res* 3 (1): 21–31.
- Lumeng Carey N., Stephanie M. Deyoung, Alan R. Saltiel. 2007. "Macrophages Block Insulin Action in Adipocytes by Altering Expression of Signaling and Glucose Transport Proteins." *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 292 (1): E166–74.
- Ma Zuheng, Tina Wirström, L. A Håkan Borg, Gerd Larsson-Nyrén, Ingrid Hals, John Bondo Hansen, Valdemar Grill, Anneli Björklund. 2012. "Diabetes Reduces  $\beta$ -Cell Mitochondria and Induces Distinct Morphological Abnormalities, Which Are Reproducible by High Glucose in Vitro with Attendant Dysfunction." *Islets* 4 (3): 233–42.
- Manolopoulos K. N., F. Karpe, K. N. Frayn. 2010. "Gluteofemoral Body Fat as a Determinant of Metabolic Health." *International Journal of Obesity* 34 (6): 949–59.

- Martinez F. O., S. Gordon, M. Locati, A. Mantovani. 2006. "Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression." *The Journal of Immunology* 177 (10): 7303–11.
- McLaren Paul J., Ali Gawanbacht, Nitisha Pyndiah, Christian Krapp, Dominik Hotter, Silvia F. Kluge, Nicola Götz, et al. 2015. "Identification of Potential HIV Restriction Factors by Combining Evolutionary Genomic Signatures with Functional Analyses." *Retrovirology* 12 (1): 1–15.
- Mimmack M. L., M. Ryan, H. Baba, J. Navarro-Ruiz, S. Iritani, R. L. M. Faull, P. J. McKenna, et al. 2002. "Gene Expression Analysis in Schizophrenia: Reproducible up-Regulation of Several Members of the Apolipoprotein L Family Located in a High-Susceptibility Locus for Schizophrenia on Chromosome 22." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (7): 4680–85.
- Modarres Hassan P, Mohammad R K Mofrad. 2014. "Filamin: A Structural and Functional Biomolecule with Important Roles in Cell Biology, Signaling and Mechanics" 11 (1): 39–65.
- Molofsky Ari B., Frédéric Van Gool, Hong Erh Liang, Steven J. Van Dyken, Jesse C. Nussbaum, Jinwoo Lee, Jeffrey A. Bluestone, Richard M. Locksley. 2015. "Interleukin-33 And Interferon- $\gamma$  Counter-Regulate Group 2 Innate Lymphoid Cell Activation During Immune Perturbation." *Immunity* 43 (1): 161–74.
- Molofsky Ari B., Jesse C. Nussbaum, Hong-Erh Liang, Steven J. Van Dyken, Laurence E. Cheng, Alexander Mohapatra, Ajay Chawla, Richard M. Locksley. 2013. "Innate Lymphoid Type 2 Cells Sustain Visceral Adipose Tissue Eosinophils and Alternatively Activated Macrophages." *The Journal of Experimental Medicine* 210 (3): 535–49.
- Monajemi Houshang, Ruud D. Fontijn, Hans Pannekoek, Anton J.G. Horrevoets. 2002. "The Apolipoprotein L Gene Cluster Has Emerged Recently in Evolution and Is Expressed in Human Vascular Tissue." *Genomics* 79 (4): 539–46.
- Mor-Yossef Moldovan Lisa, Maayan Lustig, Alex Naftaly, Mariya Mardamshina, Tamar Geiger, Amit Gefen, Dafna Benayahu. 2018. "Cell Shape Alteration during Adipogenesis Is Associated with Coordinated Matrix Cues." *Journal of Cellular Physiology*, no. July: 1–14.
- Moreno-Navarrete José Maria, José Manuel Fernandez-Real. 2012. "Adipocyte Differentiation." In *Adipose Tissue Biology*, 17–38.
- Nagaraj Shreeranga, Angad V. Raghavan, Sudha N. Rao, Uma V. Manjappara. 2014. "Obestatin and Nt8U Influence Glycerolipid Metabolism and PPAR Gamma Signaling in Mice." *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 53: 414–22.
- Nielsen Thomas Svava, Niels Jessen, J. O. L. Jorgensen, N. Moller, Sten Lund, Jens Otto L. Jørgensen,

- Niels Møller, Sten Lund. 2014. "Dissecting Adipose Tissue Lipolysis: Molecular Regulation and Implications for Metabolic Disease." *Journal of Molecular Endocrinology* 52 (3): R199–222.
- O'Sullivan Timothy E., Moritz Rapp, Xiyang Fan, Orr El Weizman, Priya Bhardwaj, Nicholas M. Adams, Thierry Walzer, Andrew J. Dannenberg, Joseph C. Sun. 2016. "Adipose-Resident Group 1 Innate Lymphoid Cells Promote Obesity-Associated Insulin Resistance." *Immunity* 45 (2): 428–41.
- Ohsaki Yuki, Jinglei Cheng, Michitaka Suzuki, Yuki Shinohara, Akikazu Fujita, Toyoshi Fujimoto. 2009. "Biogenesis of Cytoplasmic Lipid Droplets: From the Lipid Ester Globule in the Membrane to the Visible Structure." *Biochimica et Biophysica Acta*. Elsevier B.V.
- Oldenhove Guillaume, Elodie Boucquey, Anaëlle Taquin, Kevin Englebert, Louis Boon, Muriel Moser, Lynn Bonetti, et al. 2018. "PD-1 Is Involved in the Dysregulation of Type 2 Innate Lymphoid Cells in a Murine Model of Obesity Report PD-1 Is Involved in the Dysregulation of Type 2 Innate Lymphoid Cells in a Murine Model of Obesity." *Cell Reports* 25: 2053–60.
- Olofsson Sven-olof, Pontus Boström, Jens Lagerstedt, Linda Andersson, Martin Adiels, Jeanna Perman, Mikael Rutberg, Lu Li, Jan Borén. 2009. "The Lipid Droplet: A Dynamic Organelle, Not Only Involved in the Storage and Turnover of Lipids." In *Cellular Lipid Metabolism*, 1–26.
- Otto Tamara C., M. Daniel Lane. 2005. "Adipose Development: From Stem Cell to Adipocyte." *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 40 (4): 229–42.
- Ouchi Noriyuki, Jennifer L Parker, Jesse J Lugas, Kenneth Walsh. 2011. "Adipokines in Inflammation and Metabolic Disease." *Nat Rev Immunol* 11 (2): 85–97.
- Ovaa Huib, Alfred C O Vertegaal. 2018. "Probing Ubiquitin and SUMO Conjugation and Deconjugation." *Biochemical Society Transactions* 46 (2): 423–36.
- Paar Margret, Christian Jüngst, Noemi A. Steiner, Christoph Magnes, Frank Sinner, Dagmar Kolb, Achim Lass, et al. 2012. "Remodeling of Lipid Droplets during Lipolysis and Growth in Adipocytes." *Journal of Biological Chemistry* 287 (14): 11164–73.
- Page Nigel M., David J. Butlin, Khomsorn Lomthaisong, Philip J. Lowry. 2001. "The Human Apolipoprotein L Gene Cluster: Identification, Classification, and Sites of Distribution." *Genomics* 74 (1): 71–78.
- Papeta Natalia, Krzysztof Kiryluk, Ami Patel, Roel Sterken, Nilgun Kacak, Holly J Snyder, Phil H Imus, et al. 2011. "APOL1 Variants Increase Risk for FSGS and HIVAN but Not IgA Nephropathy." *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 22 (11): 1991–96.
- Paul Sophie, Céline Ricour, Caroline Sommereyns, Frédéric Sorgeloos, Thomas Michiels. 2007. "Type I

- Interferon Response in the Central Nervous System." *Biochimie* 89 (6–7): 770–78.
- Pays Etienne, Benoit Vanhollebeke, Pierrick Uzureau, Laurence Lecordier, David Pérez-Morga. 2014. "The Molecular Arms Race between African Trypanosomes and Humans." *Nature Reviews Microbiology* 12 (8): 575–84.
- Pays Etienne, Benoit Vanhollebeke, Luc Vanhamme, Françoise Paturiaux-Hanocq, Derek P. Nolan, David Pérez-Morga. 2006. "The Trypanolytic Factor of Human Serum." *Nature Reviews Microbiology* 4: 477–86.
- Perez-Morga D., Benoit Vanhollebeke, Françoise Paturiaux-Hanocq, Derek P. Nolan, Laurence Lins, Fabrice Homblé, Luc Vanhamme, et al. 2005. "Apolipoprotein L-I Promotes Trypanosome Lysis by Forming Pores in Lysosomal Membranes." *Science* 309 (5733): 469–72.
- Pfisterer Simon G., Gergana Gateva, Peter Horvath, Juho Pirhonen, Veijo T. Salo, Leena Karhinen, Markku Varjosalo, Samppa J. Ryhänen, Pekka Lappalainen, Elina Ikonen. 2017. "Role for Formin-like 1-Dependent Acto-Myosin Assembly in Lipid Droplet Dynamics and Lipid Storage." *Nature Communications* 8 (14858): 1–14.
- Polotsky Hanah N., Alex J. Polotsky. 2010. "Metabolic Implications of Menopause." *Seminars in Reproductive Medicine* 28 (5): 426–34.
- Poulos Sylvia P., Michael V. Dodson, Melinda F. Culver, Gary J. Hausman. 2016. "The Increasingly Complex Regulation of Adipocyte Differentiation." *Experimental Biology and Medicine* 241 (5): 449–56.
- Preller Matthias, Dietmar J Manstein. 2013. "Myosin Structure, Allostery, and Mechano-Chemistry." *Structure/Folding and Design* 21 (11): 1911–22.
- Proenca A R, R A Sertie, A C Oliveira, A B Campana, R O Caminhotto, P Chimin, F B Lima. 2014. "New Concepts in White Adipose Tissue Physiology." *Braz J Med Biol Res* 47 (3): 192–205.
- Puri Vishwajeet, Silvana Konda, Srijana Ranjit, Myriam Aouadi, Anil Chawla, My Chouinard, Abhijit Chakladar, Michael P Czech. 2007. "Fat-Specific Protein 27, a Novel Lipid Droplet Protein That Enhances Triglyceride Storage." *The Journal of Biological Chemistry* 282 (47): 34213–18.
- Qiu Yifu, Khoa D. Nguyen, Justin I. Odegaard, Xiaojin Cui, Xiaoyu Tian, Richard M. Locksley, Richard D. Palmiter, Ajay Chawla. 2014. "Eosinophils and Type 2 Cytokine Signaling in Macrophages Orchestrate Development of Functional Beige Fat." *Cell* 157 (6): 1292–1308.
- Rakhshandehroo Maryam, Sanne M.W. Gijzel, Rasmus Siersbæk, Marjoleine F. Broekema, Colin De Haar, Henk S. Schipper, Marianne Boes, Susanne Mandrup, Eric Kalkhoven. 2014. "CD1d-

- Mediated Presentation of Endogenous Lipid Antigens by Adipocytes Requires Microsomal Triglyceride Transfer Protein." *Journal of Biological Chemistry* 289 (32): 22128–39.
- Rastelli Marialetizia, Claude Knauf, Patrice D. Cani. 2018. "Gut Microbes and Health: A Focus on the Mechanisms Linking Microbes, Obesity, and Related Disorders." *Obesity* 26 (5): 792–800.
- Reeves-Daniel A. M., J. A. Depalma, A. J. Bleyer, M. V. Rocco, M. Murea, P. L. Adams, C. D. Langefeld, et al. 2011. "The APOL1 Gene and Allograft Survival after Kidney Transplantation." *American Journal of Transplantation* 11 (5): 1025–30.
- Rehnmark S., M. Nechad, D. Herron, B. Cannon, J. Nedergaard. 1990. "A- and B-Adrenergic Induction of the Expression of the Uncoupling Protein Thermogenin in Brown Adipocytes Differentiated in Culture." *Journal of Biological Chemistry* 265 (27): 16464–71.
- Reya T., H. Clevers. 2005. "Wnt Signalling in Stem Cells and Cancer." *Nature* 434 (7035): 843–50.
- Robidoux Jacques, Tonya L Martin, Sheila Collins. 2004. "β-Adrenergic Receptors and Regulation of Energy Expenditure: A Family Affair." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 44: 297–323.
- Rodríguez Amaia, Silvia Ezquerro, Leire Méndez-Giménez, Sara Becerril, Gema Frühbeck. 2015. "Revisiting the Adipocyte: A Model for Integration of Cytokine Signaling in the Regulation of Energy Metabolism." *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* 309 (8): 691-E714.
- Rogne M., K. Taskén. 2014. "Compartmentalization of cAMP Signaling in Adipogenesis, Lipogenesis, and Lipolysis." *Hormone and Metabolic Research* 46 (12): 833–40.
- Romo-Yáñez José, Cecilia Montañez, Luis A. Salazar-Olivo. 2011. "Dystrophins and DAPs Are Expressed in Adipose Tissue and Are Regulated by Adipogenesis and Extracellular Matrix." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 404 (2): 717–22.
- Rosenwald Matthias, Alikei Perdikari, Thomas Rülcke, Christian Wolfrum. 2013. "Bi-Directional Interconversion of Brown and White Adipocytes." *Nature Cell Biology* 15 (6): 659–67.
- Rudich Assaf, Hannah Kanety, Nava Bashan. 2007. "Adipose Stress-Sensing Kinases: Linking Obesity to Malfunction." *Trends in Endocrinology and Metabolism* 18 (8): 291–99.
- Rybakova Inna N., Jitandrakumar R. Patel, Kay E. Davies, Peter D. Yurchenco, James M. Ervasti. 2002. "Utrophin Binds Laterally along Actin Filaments and Can Couple Costameric Actin with Sarcolemma When Overexpressed in Dystrophin-Deficient Muscle." *Molecular Biology of the Cell* 13: 1512–21.



- Sacks Harold, Michael E. Symonds. 2013. "Anatomical Locations of Human Brown Adipose Tissue: Functional Relevance and Implications in Obesity and Type 2 Diabetes." *Diabetes* 62 (6): 1783–90.
- Saetang Jirakrit, Surasak Sangkhathat. 2018. "Role of Innate Lymphoid Cells in Obesity and Metabolic Disease." *Molecular Medicine Reports* 17 (1): 1403–12.
- Samson Susan L., Alan J. Garber. 2014. "Metabolic Syndrome." *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 43 (1): 1–23.
- Sana Theodore R., Mary J. Janatpour, Manjiri Sathe, Leslie M. McEvoy, Terrill K. McClanahan. 2005. "Microarray Analysis of Primary Endothelial Cells Challenged with Different Inflammatory and Immune Cytokines." *Cytokine* 29 (6): 256–69.
- Sanchez-Gurmaches Joan, David A. Guertin. 2014. "Adipocyte Lineages: Tracing Back the Origins of Fat." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1842 (3): 340–51.
- Santosa Sylvia, Michael D. Jensen. 2015. "The Sexual Dimorphism of Lipid Kinetics in Humans." *Frontiers in Endocrinology* 6 (July): 1–6.
- Schaffler A., J. Scholmerich. 2010. "Adaptive Immunity and Adipose Tissue Biology." *Trends in Immunology* 31 (10): 384–90.
- Schipper Hs. 2012. "Natural Killer T Cells in Adipose Tissue Prevent Insulin Resistance." *The Journal of Clinical Investigation* 22 (9): 3343–54.
- Schoggins John W., Sam J. Wilson, Maryline Panis, Mary Y. Murphy, Christopher T. Jones, Paul Bieniasz, Charles M. Rice. 2011. "A Diverse Range of Gene Products Are Effectors of the Type I Interferon Antiviral Response." *Nature* 472 (7344): 481–85.
- Schweiger Martina, Thomas O. Eichmann, Ulrike Taschler, Robert Zimmermann, Rudolf Zechner, Achim Lass. 2014. "Measurement of Lipolysis." *Methods in Enzymology* 538: 171–93.
- Sengenès Coralie, Anne Bouloumié, Hans Hauner, Michel Berlan, Rudi Busse, Max Lafontan, Jean Galitzky. 2003. "Involvement of a cGMP-Dependent Pathway in the Natriuretic in Human Adipocytes." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (49): 48617–26.
- Shen Wen-jun, Shailja Patel, John E Eriksson, Fredric B Kraemer. 2010. "Vimentin Is a Functional Partner of Hormone Sensitive Lipase And Facilitates Lipolysis Research Articles." *Journal of Proteome Research* 9: 1786–94.
- Shieh Perry B. 2018. "Emerging Strategies in the Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy."
- Simarro Pere P., Abdoulaye Diarra, Jose A Ruiz Postigo, José R. Franco, Jean G. Jannin. 2011. "The

- Human African Trypanosomiasis Control and Surveillance Programme of the World Health Organization 2000-2009: The Way Forward." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5 (2).
- Smith Anne J, Brian R Thompson, Mark A Sanders, David A Bernlohr. 2007. "Interaction of the Adipocyte Fatty Acid-Binding Protein with the Hormone-Sensitive Lipase: Regulation by Fatty Acids and Phosphorylation." *Journal of Biological Chemistry* 282 (44): 32424–32.
- Smith Eric E., Harmit S. Malik. 2009. "The Apolipoprotein L Family of Programmed Cell Death and Immunity Genes Rapidly Evolved in Primates at Discrete Sites of Host-Pathogen Interactions." *Genome Research* 19 (5): 850–58.
- Smith Steven J, Sylvaine Cases, Dalan R Jensen, Hubert C Chen, Eric Sande, Bryan Tow, David A Sanan, Jacob Raber, Robert H Eckel, Robert V. Farese Jr. 2000. "Obesity Resistance and Multiple Mechanisms of Triglyceride Synthesis in Mice Lacking Dgat." *Nature Genetics* 25 (1): 87–90.
- Soldati Thierry. 2003. "Unconventional Myosins, Actin Dynamics and Endocytosis: A Ménage à Trois?" 4: 358–66.
- Spalding Kirsty L., Erik Arner, Pål O. Westermark, Samuel Bernard, Bruce A. Buchholz, Olaf Bergmann, Lennart Blomqvist, et al. 2008. "Dynamics of Fat Cell Turnover in Humans." *Nature* 453 (7196): 783–87.
- Spiegelman Bruce M., Carol A. Ginty. 1983. "Fibronectin Modulation of Cell Shape and Lipogenic Gene Expression in 3t3-Adipocytes." *Cell* 35 (3 PART 2): 657–66.
- Stall Richard, Joseph Ramos, F. Kent Fulcher, Yashomati M. Patel. 2014. "Regulation of Myosin IIA and Filamentous Actin during Insulin-Stimulated Glucose Uptake in 3T3-L1 Adipocytes." *Experimental Cell Research* 322 (1): 81–88.
- Steimle Paul A, F Kent Fulcher, Yashomati M Patel. 2005. "A Novel Role for Myosin II in Insulin-Stimulated Glucose Uptake in 3T3-L1 Adipocytes." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 331: 1560–65.
- Stelmanska Ewa, Julian Swierczynski. 2013. "Up-Regulation of Lipogenic Enzyme Genes Expression in Inguinal White Adipose Tissue of Female Rats by Progesterone." *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 134 (1): 37–44.
- Stojdl David F., Brian D. Lichty, Benjamin R. TenOever, Jennifer M. Paterson, Anthony T. Power, Shane Knowles, Ricardo Marius, et al. 2003. "VSV Strains with Defects in Their Ability to Shutdown Innate Immunity Are Potent Systemic Anti-Cancer Agents." *Cancer Cell* 4 (4): 263–75.
- Styers Melanie L, Andrew P Kowalczyk, Victor Faundez. 2005. "Intermediate Filaments and Vesicular

- Membrane Traffic : The Odd Couple ' s First Dance ?" *Traffic* 6: 359–65.
- Su A. I., T. Wiltshire, S. Batalov, H. Lapp, K. A. Ching, D. Block, J. Zhang, et al. 2004. "A Gene Atlas of the Mouse and Human Protein-Encoding Transcriptomes." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (16): 6062–67.
- Suganami T., Y. Ogawa. 2010. "Adipose Tissue Macrophages: Their Role in Adipose Tissue Remodeling." *Journal of Leukocyte Biology* 88 (1): 33–39.
- Sun Zhiqi, Jingyi Gong, Han Wu, Wenyi Xu, Lizhen Wu, Dijin Xu, Jinlan Gao, et al. 2013. "Perilipin1 Promotes Unilocular Lipid Droplet Formation through the Activation of Fsp27 in Adipocytes." *Nature Communications* 4: 1514–94.
- Talukdar Saswata, Da Young Oh, Gautam Bandyopadhyay, Dongmei Li, Jianfeng Xu, Joanne McNelis, Min Lu, et al. 2012. "Neutrophils Mediate Insulin Resistance in Mice Fed a High-Fat Diet through Secreted Elastase." *Nature Medicine* 18 (9): 1407–12.
- Tan Ya, Mailin Gan, Yuan Fan, Liang Li, Zhijun Zhong, Xuwei Li, Lin Bai, et al. 2018. "MiR-10b-5p Regulates 3T3-L1 Cells Differentiation by Targeting Apol6." *Gene*.
- Tang Qi-Qun, Mads Grønberg, Haiyan Huang, Jae-Woo Kim, Tamara C Otto, Akhilesh Pandey, M Daniel Lane. 2005. "Sequential Phosphorylation of CCAAT Enhancer-Binding Protein Beta by MAPK and Glycogen Synthase Kinase 3beta Is Required for Adipogenesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (28): 9766–71.
- Tang Qi-Qun, M. Daniel Lane. 2012. "Adipogenesis: From Stem Cell to Adipocyte." *Annual Review of Biochemistry* 81 (1): 715–36.
- Tang Qi-Qun, Tamara C. Otto, M. Daniel Lane. 2003. "Mitotic Clonal Expansion: A Synchronous Process Required for Adipogenesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (1): 44–49.
- Taylor H. E., A. K. Khatua, W. Popik. 2014. "The Innate Immune Factor Apolipoprotein L1 Restricts HIV-1 Infection." *Journal of Virology* 88 (1): 592–603.
- Tejerina S., A. De Pauw, S. Vankoningsloo, A. Houbion, P. Renard, F. De Longueville, M. Raes, T. Arnould. 2009. "Mild Mitochondrial Uncoupling Induces 3T3-L1 Adipocyte de-Differentiation by a PPAR -Independent Mechanism, Whereas TNF -Induced de-Differentiation Is PPAR Dependent." *Journal of Cell Science* 122 (1): 145–55.
- Thomson R., G. Genovese, C. Canon, D. Kovacsics, M. K. Higgins, M. Carrington, C. A. Winkler, et al. 2014. "Evolution of the Primate Trypanolytic Factor APOL1." *Proceedings of the National*

*Academy of Sciences* 111 (20): E2130–39.

Todaró George J., Howard Green. 1963. "Quantitative Studies of the Growth of Mouse Embryo Cells in Culture and Their Development into Established Lines." *Journal of Cell Biology* 17 (2): 299–313.

Tsai F C, G H Kuo, S W Chang, P J Tsai. 2015. "Ca<sup>2+</sup> Signaling in Cytoskeletal Reorganization, Cell Migration, and Cancer Metastasis." *Biomed Res Int* 2015: 409245.

Uski Juuso. 2008. "The Expression of the Human Apolipoprotein Genes and Their Regulation by PPARs."

Uzureau Pierrick, Sophie Uzureau, Laurence Lecordier, Frédéric Fontaine, Patricia Tebabi, Fabrice Homblé, Axelle Grélard, et al. 2013. "Mechanism of Trypanosoma Brucei Gambiense Resistance to Human Serum." *Nature* 501 (7467): 430–34.

Uzureau Sophie, Caroline Coquerelle, Corentin Vermeiren, Pierrick Uzureau, Annette Van Acker, Luc Pilotte, Daniel Monteyne, et al. 2016. "Apolipoproteins L Control Cell Death Triggered by TLR3/TRIF Signaling in Dendritic Cells." *European Journal of Immunology* 46 (8).

Vanhamme Luc, Françoise Paturiaux-Hanocq, Philippe Poelvoorde, Derek P. Nolan, Laurence Lins, Jan Van Den Abbeele, Annette Pays, et al. 2003. "Apolipoprotein L-1 Is the Trypanosome Lytic Factor of Human Serum." *Nature* 422 (March): 83–87.

Vanhollebeke B., E. Pays. 2006. "The Function of Apolipoproteins L." *Cellular and Molecular Life Sciences* 63 (17): 1937–44.

Vanhollebeke Benoit, Laurence Lecordier, David Perez-Morga, Amelia Amiguet-Vercher, Etienne Pays. 2007. "Human Serum Lyses Trypanosoma Brucei by Triggering Uncontrolled Swelling of the Parasite Lysosome." *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 54 (5): 448–51.

Vanhollebeke Benoit, Philippe Truc, Philippe Poelvoorde, Annette Pays, Prashant P Joshi, Ravindra Katti, Jean G Jannin, Etienne Pays. 2006. "Human Trypanosoma Evansi Infection Linked to a Lack of Apolipoprotein L-I." *The New England Journal of Medicine* 355: 2752–56.

Vanni Stefano. 2017. "Intracellular Lipid Droplets: From Structure to Function." *Lipid Insights* 10: 14–16.

Vanwalleghem Gilles, Frédéric Fontaine, Laurence Lecordier, Patricia Tebabi, Kristoffer Klewe, Derek P. Nolan, Yoshiki Yamaryo-Botté, et al. 2015. "Coupling of Lysosomal and Mitochondrial Membrane Permeabilization in Trypanolysis by APOL1." *Nature Communications* 6 (8078): 1–10.

Varlamov Oleg, Cynthia L. Bethea, Charles T. Roberts. 2014. "Sex-Specific Differences in Lipid and

- Glucose Metabolism." *Frontiers in Endocrinology* 5 (DEC): 1–7.
- Vicente-Manzanares Miguel, Xuefei Ma, Robert S. Adelstein, Alan Rick Horwitz. 2009. "Non-Muscle Myosin II Takes Centre Stage in Cell Adhesion and Migration." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10 (11): 778–90.
- Vieira Potter Victoria J., Katherine J. Strissel, Chen Xie, Eugene Chang, Grace Bennett, Jason Defuria, Martin S. Obin, Andrew S. Greenberg. 2012. "Adipose Tissue Inflammation and Reduced Insulin Sensitivity in Ovariectomized Mice Occurs in the Absence of Increased Adiposity." *Endocrinology* 153 (9): 4266–77.
- Wan Guanghua, Siqin Zhaorigetu, Zhihe Liu, Ramesh Kaini, Zeyu Jiang, Chien An A. Hu. 2008. "Apolipoprotein L1, a Novel Bcl-2 Homology Domain 3-Only Lipid-Binding Protein, Induces Autophagic Cell Death." *Journal of Biological Chemistry* 283 (31): 21540–49.
- Wang Qiong A., Caroline Tao, Rana K. Gupta, Philipp E. Scherer. 2013. "Tracking Adipogenesis during White Adipose Tissue Development, Expansion and Regeneration." *Nature Medicine* 19 (10): 1338–44.
- Wang Xuewen, Faidon Magkos, Bettina Mittendorfer. 2011. "Sex Differences in Lipid and Lipoprotein Metabolism: It's Not Just about Sex Hormones." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 96 (4): 885–93.
- Wasser Walter G., Shay Tzur, Dawit Wolday, Dwomoa Adu, Donald Baumstein, Saharon Rosset, Karl Skorecki. 2012. "Population Genetics of Chronic Kidney Disease: The Evolving Story of APOL1." *Journal of Nephrology* 25 (5): 603–18.
- Weisberg SP, D McCann, M Desai, M Rosenbaum, RL Leibel, AW Ferrante Jr. 2003. "Obesity Is Associated with Macrophage Accumulation in Adipose Tissue." *Journal of Clinical Investigation* 112 (12): 1796–1808.
- Weishaar Ronald E., Micheal H. Cain, James A. Bristol. 1985. "A New Generation of Phosphodiesterase Inhibitors: Multiple Molecular Forms of Phosphodiesterase and the Potential for Drug Selectivity." *J Med Chem* 28 (5): 537–45.
- Wilfling Florian, Joel T. Haas, Tobias C. Walther, Robert V Farese Jr. 2014. "Lipid Droplet Biogenesis." *Current Opinion in Cell Biology* 29 (1): 39–45.
- Wilfling Florian, Abdou Rachid Thiam, Maria Jesus Olarte, Jing Wang, Rainer Beck, Travis J Gould, Edward S Allgeyer, et al. 2014. "Arf1/COPI Machinery Acts Directly on Lipid Droplets and Enables Their Connection to the ER for Protein Targeting." *ELife* 3: 1–20.

- Wronska A, Z Kmiec. 2012. "Structural and Biochemical Characteristics of Various White Adipose Tissue Depots." *Acta Physiologica* 205 (2): 194–208.
- Wu L., V. V. Parekh, C. L. Gabriel, D. P. Bracy, P. A. Marks-Shulman, R. A. Tamboli, S. Kim, et al. 2012. "Activation of Invariant Natural Killer T Cells by Lipid Excess Promotes Tissue Inflammation, Insulin Resistance, and Hepatic Steatosis in Obese Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (19): E1143–52.
- Wu Xiaopeng, Hailong Wang, Lu Bai, Yang Yu, Zeyu Sun, Yan Yan, Jiyong Zhou. 2013. "Mitochondrial Proteomic Analysis of Human Host Cells Infected with H3N2 Swine Influenza Virus." *Journal of Proteomics* 91: 136–50.
- Xiao L., X. Yang, Y. Lin, S. Li, J. Jiang, S. Qian, Q. Tang, R. He, X. Li. 2016. "Large Adipocytes Function as Antigen-Presenting Cells to Activate CD4 + T Cells via Upregulating MHCII in Obesity." *International Journal of Obesity* 40 (1): 112–20.
- Xing H., Jeffrey P. Northrop, J. Russell Grove, Katherine E. Kilpatrick, Jui-Lan Su, Gordon M. Ringold. 1997. "TNF $\alpha$ -Mediated Inhibition and Reversal of Adipocyte Differentiation Is Accompanied by Suppressed Expression of PPAR without Effects on Pref-1 Expression." *Endocrinology* 138 (7): 2776–83.
- Xong Hoang, Luc Vanhamme, Mustapha Chamekh, Chibeka Evelyn Chimfwembe, Jan Van Den Abbeele, Annette Pays, Nestor Van Melvenne, et al. 1998. "A VSG Expression Site-Associated Gene Confers Resistance to Human Serum in Trypanosoma Rhodesiense." *Cell* 95 (6): 839–46.
- Yang Li, Yunfeng Ding, Yong Chen, Shuyan Zhang, Chaoxing Huo, Yang Wang, Jinhai Yu, et al. 2012. "The Proteomics of Lipid Droplets: Structure, Dynamics, and Functions of the Organelle Conserved from Bacteria to Humans." *Journal of Lipid Research* 53 (7): 1245–53.
- Yang Wulin, Xiangxiang Guo, Shermaine Thein, Feng Xu, Shigeki Sugii, W Peter, George K Radda, Weiping Han, Metabolic Disorders Program, Cell Biology. 2013. "Regulation of Adipogenesis by Cytoskeleton Remodelling Is Facilitated by Acetyltransferase MEC-17-Dependent Acetylation of  $\alpha$ -Tubulin." *Biochem J* 449 (3): 605–12.
- Yang Yuh Shyong, Chen Chu Wang, Bo Han Chen, You Hua Hou, Kuo Sheng Hung, Yi Chih Mao. 2015. "Tyrosine Sulfation as a Protein Post-Translational Modification." *Molecules* 20 (2): 2138–64.
- Ye Qing, Xu Zhao, Kang Xu, Qian Li, Jinluo Cheng, Yanqin Gao, Juan Du, Hui Shi, Ling Zhou. 2013. "Polymorphisms in Lipid Metabolism Related MiRNA Binding Sites and Risk of Metabolic Syndrome." *Gene* 528 (2): 132–38.
- Yim Jung-Eun, Stanley Heshka, Jeanine B. Albu, Steven Heymsfield, Dympna Gallagher. 2008.

- “Femoral-Gluteal Subcutaneous and Intermuscular Adipose Tissues Have Independent and Opposing Relationships with CVD Risk.” *Journal of Applied Physiology* 104 (3): 700–707.
- Yu Lili, Keqin Yan, Peng Liu, Nan Li, Zhenghui Liu, Weiwei Zhu, Yongmei Chen, Daishu Han. 2014. “Pattern Recognition Receptor-Initiated Innate Antiviral Response in Mouse Adipose Cells.” *Immunology and Cell Biology* 92 (2): 105–15.
- Yue Feng, Yong Cheng, Alessandra Breschi, Jeff Vierstra, Weisheng Wu, Tyrone Ryba, Richard Sandstrom, et al. 2014. “A Comparative Encyclopedia of DNA Elements in the Mouse Genome.” *Nature* 515 (7527): 355–64.
- Zehentner B K, U Leser, H Burtscher. 2000. “BMP-2 and Sonic Hedgehog Have Contrary Effects on Adipocyte-like Differentiation of C3H10T1/2 Cells.” *DNA and Cell Biology* 19 (5): 275–81.
- Zhang Congyan, Pingsheng Liu. 2018. “The New Face of the Lipid Droplet: Lipid Droplet Proteins.” *Proteomics*, 1700223.
- Zhang Jian V, Pei-gen Ren, Orna Avsian-Kretchmer, Ching-Wei Luo, Rami Rauch, Cynthia Klein, Aaron J. W. Hsueh. 2005. “Obestatin, a Peptide Encoded by the Ghrelin Gene, Opposes Ghrelin’s Effects on Food Intake.” *Science* 310: 996–99.
- Zhang Jiang Wen, Dwight J. Klemm, Charles Vinson, M. Daniel Lane. 2004. “Role of CREB in Transcriptional Regulation of CCAAT/Enhancer-Binding Protein  $\beta$  Gene during Adipogenesis.” *Journal of Biological Chemistry* 279 (6): 4471–78.
- Zhang Lei, Shiyun Ma, Huailiang Wang, Hang Su, Ke Su, Longjie Li. 2017. “Identification of Pathogenic Genes Related to Rheumatoid Arthritis through Integrated Analysis of DNA Methylation and Gene Expression Profiling.” *Gene* 634 (August): 62–67.
- Zhaorigetu Siqin, Guanghua Wan, Ramesh Kaini, Zeyu Jiang, Chien An A. Hu. 2008. “ApoL1, a BH3-Only Lipid-Binding Protein, Induces Autophagic Cell Death.” *Autophagy* 4 (8): 1079–82.
- Zhaorigetu Siqin, Zhaoqing Yang, Ian Toma, Timothy A. McCaffrey, Chien An A. Hu. 2011. “Apolipoprotein L6, Induced in Atherosclerotic Lesions, Promotes Apoptosis and Blocks Beclin 1-Dependent Autophagy in Atherosclerotic Cells.” *Journal of Biological Chemistry* 286 (31): 27389–98.