
Mécanismes de régulation de la lipolyse dans les adipocytes

Auteur : Wilmet, Nicolas

Promoteur(s) : Deroanne, Christophe

Faculté : Faculté des Sciences

Diplôme : Master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire, à finalité approfondie

Année académique : 2016-2017

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/3159>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

UNIVERSITÉ DE LIÈGE (ULG)
FACULTÉ DES SCIENCES
DÉPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

Mécanismes de régulation de la lipolyse dans les adipocytes

Mémoire présenté par Nicolas WILMET en vue de l'obtention du titre de
Master en Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire

PROMOTEUR : Christophe DEROANNE CO-PROMOTEUR : Marc MULLER

Année académique 2016-2017

Remerciements :

Avant tout, je tiens à remercier l'ensemble des personnes qui ont contribué à la réalisation de ce mémoire en ayant supervisé de près ou de loin sa rédaction.

J'exprime mon entière gratitude à Monsieur Christophe Deroanne qui a accepté d'être mon promoteur lors de ma dernière année de Master en Biochimie. Je le remercie pour le temps qu'il a consacré à m'apprendre les différentes manipulations et à la relecture attentive de ce mémoire.

Ma reconnaissance s'adresse également à Laura Brohée, aussi appelée « L'équipe », pour avoir pris de son temps à m'enseigner certaines techniques qu'elle maîtrise à la perfection ainsi que pour m'avoir prodigué ses conseils avisés de doctorante.

Je tiens à remercier l'ensemble du LBTC et plus particulièrement Monsieur Alain Colige, Directeur du Laboratoire, pour m'avoir accueilli durant cette année. L'excellente ambiance qui règne au sein de l'équipe participe à la réalisation d'un travail dans la bonne humeur.

J'associe également à ces remerciements mes amis Biologistes et Biochimistes pour l'ensemble des bons moments passés lors de ces années d'études et pour le soutien mutuel lors des périodes plus difficiles.

Pour terminer, j'exprime la plus grande reconnaissance à mes parents pour m'avoir permis de réaliser mes études et pour m'avoir toujours guidé vers ce que je suis devenu aujourd'hui !

Merci à tous !

Mécanismes de régulation de la lipolyse dans les adipocytes. WILMET Nicolas (Mémorant), DEROANNE Christophe (Promoteur), MULLER Marc (Co-promoteur), Laboratoire de Biologie des Tissus Conjonctifs (LBTC), 2017.

Les cellules cancéreuses sont connues pour être constamment en expansion et pour avoir besoin d'énormément d'énergie pour subvenir à la transformation et la prolifération tumorale. Les adipocytes, qui peuvent entourer des tumeurs, notamment au niveau du cancer prostatique ou du cancer du sein, représentent un apport non-négligeable de lipides aux cellules cancéreuses. La lipolyse permet la dégradation du triacylglycérol se trouvant au sein des gouttelettes lipidiques en 3 acides gras libres et en une molécule de glycérol. Ces acides gras représentent une source d'énergie et de messagers secondaires directement disponibles pour les cellules cancéreuses. La lipolyse est divisée en 3 étapes consistant chacune en l'hydrolyse d'un acide gras de la molécule de triacylglycérol. Nous nous sommes intéressés aux gènes régulant la première étape dite limitante (la lipase ATGL, son activateur CGI-58 et son inhibiteur GOS2) ainsi qu'au gène de l'enzyme de la seconde étape (HSL). Lors d'une première série d'expériences de co-cultures avec des pré-adipocytes et des cellules cancéreuses, nous avons remarqué que le gène GOS2 était relativement plus réprimé que les autres gènes de protéines régulatrices de la lipolyse à l'exception d'HSL. Nous nous sommes donc penchés sur les différents facteurs qui pouvaient altérer l'expression des gènes régulateurs de la lipolyse au niveau transcriptionnel et au niveau protéique. Nous avons remarqué que le milieu de culture était progressivement acidifié par les cellules cancéreuses. Or, il est bien établi que le microenvironnement tumoral est acide. Lors de la suite des manipulations, nous avons acidifié le milieu de culture des pré-adipocytes jusqu'à des valeurs de pH proches de celles rencontrées dans le microenvironnement tumoral. Nous avons analysé la régulation de l'expression des 4 gènes régulateurs de la lipolyse en fonction du pH. En parallèle, nous avons observé une augmentation considérable du taux de lipolyse dans les pré-adipocytes cultivés à un pH acide. Nous avons également noté un blocage de la glycolyse et une altération de la phosphorylation de la kinase Akt à pH acide. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques montre que le blocage de la glycolyse ou de la voie PI3K/Akt récapitule la plupart des régulations induites par la culture à pH acide. Afin de déterminer le rôle de GOS2 dans la régulation de la lipolyse à pH acide, nous avons tenté de créer des pré-adipocytes surexprimant GOS2 de façon inductible. Cependant, les clones que nous avons isolés ne présentaient pas les caractéristiques requises pour atteindre cet objectif. L'utilisation d'autres modèles de pré-adipocytes ou d'autres systèmes inductibles devra être envisagée pour finaliser cette partie du travail. L'ensemble des résultats de nos manipulations nous amène à penser que les cellules cancéreuses sont capables de modifier la lipolyse des adipocytes notamment en réprimant l'expression de GOS2 dans les adipocytes qui les entourent. Nos observations ouvrent la porte à de futures thérapies contre ces types de cancer où l'inhibition de GOS2 joue un grand rôle.

Abréviations :

- **2DG** : 2-déoxy-D-glucose
- **ADN** : acide désoxyribonucléique
- **ADNc** : ADN complémentaire
- **AMP** : adénosine monophosphate
- **ARN** : acide ribonucléique
- **ATGL** : adipose triglycéride lipase
- **ATP** : adénosine triphosphate
- **BSA** : serum albumin bovine
- **cAMP** : adénosine monophosphate cyclique
- **CGI-58** : comparative gene identification-58
- **CPT1C** : carnitine palmitoyltransférase
- **DAG** : diacylglycérol
- **dBcAMP** : dibutyryl-cAMP
- **DMSO** : diméthylsulfoxyde
- **ERK1/2** : extracellular signal-regulated kinase 1/2
- **FA** : acide gras (fatty acid)
- **FBS** : foetal bovine serum
- **G0S2** : G0/G1 Switch Gene 2
- **HRP** : horseradish peroxydase
- **HSL** : hormone sensitive lipase
- **L-LDH** : L-lactate déshydrogénase
- **MAG** : monoacylglycérol
- **MES** : acide 2-morpholinoéthanesulfonique monohydrate
- **MGL** : monoglycéride lipase
- **PDE** : phosphodiesterase
- **PKC**: protein kinase C
- **PKI** : protein kinase A inhibitor
- **RA** : acide rétinoïque
- **TAG** : triacylglycérol
- **WT**: wild type ou sauvage
- **RT** : room temperature ou température ambiante

Table des matières

1.	Introduction :	1
a.	Métabolisme et cancer :	1
b.	Lipolyse :	5
i.	Mécanisme général :	5
ii.	G0/G1 Switch Gene 2 (G0S2) :	6
2.	Objectifs :	12
3.	Matériel et méthodes	13
a.	Culture cellulaire	13
i.	Milieus de culture	13
ii.	Types cellulaires utilisés.	13
iii.	Passage cellulaire	14
iv.	Différenciation des 3T3-L1 en adipocytes	14
v.	Système de co-culture	15
vi.	Traitement des 3T3-L1 différenciées avec des milieux à différents pH.	15
vii.	Traitement des 3T3-L1 différenciées au 2DG	15
viii.	Traitement des 3T3-L1 différenciées au LY294	15
ix.	Traitement des 3T3-L1 différenciées au dBcAMP.	16
x.	Traitement des 3T3-L1 différenciées au PKI	16
xi.	Création de clones 3T3-L1 surexprimant mG0S2 de façon inductible.	16
xii.	Transfection des 3T3-L1 avec un plasmide.	17
xiii.	Marquage au Nile Red et au Bisbenzimidazole	17
b.	Analyses des protéines :	18
i.	Western Blotting.	18
ii.	Dosage protéique BCA.	20
c.	Autres dosages.	21
i.	Dosage lactate.	21
ii.	Dosage du glycérol libre.	21
d.	Analyse transcriptomique.	23
i.	Extraction de l'ARN.	23
ii.	Dosage de l'ARN	23
iii.	Synthèse de l'ADNc	24
iv.	RT-qPCR	24
e.	Analyses statistiques.	26
4.	Résultats	27

a.	Différenciation in vitro des 3T3-L1	27
b.	Co-culture d'adipocytes et de cellules cancéreuses.....	27
i.	Expression des gènes régulateurs de la lipolyse.....	27
c.	Etude de l'effet de la diminution du pH sur la lipolyse.....	29
i.	Expression des gènes régulateurs de la lipolyse après une diminution du pH	30
ii.	Effet de la diminution du pH sur l'expression protéique de G0S2.....	31
iii.	Dosage en glycérol libre après diminution du pH.....	31
d.	Estimation du taux de production de lactate après diminution du pH.....	32
e.	Effet du blocage de la glycolyse sur la lipolyse	33
i.	Expression des gènes régulateurs de la lipolyse après blocage de la glycolyse	33
ii.	Expression protéique de G0S2 après blocage de la glycolyse.....	35
f.	Mesure du taux de phosphorylation d'Akt après diminution du pH	35
g.	Etude de l'effet du blocage de la voie PI3K/Akt kinase sur la lipolyse	36
i.	Expression des gènes régulateurs de la lipolyse après blocage de la voie PI3K/Akt kinase .	36
ii.	Expression protéique de G0S2 après blocage de la voie PI3K/Akt kinase	37
h.	Etude de l'effet d'une diminution du rapport ATP/AMP sur l'expression de gènes régulant la lipolyse	38
i.	Expression des gènes régulateurs de la lipolyse.....	38
ii.	Expression protéique de G0S2	39
i.	Effet de l'inhibition de la protéine kinase A sur l'expression protéique de G0S2	40
j.	Création de clones de cellules 3T3-L1 surexprimant de façon inducible G0S2.....	41
i.	Création de clones de 3T3-L1 exprimant le répresseur sensible à la tétracycline.....	41
ii.	Création de clones exprimant de façon inducible mG0S2	43
5.	Discussion, perspectives et conclusions	46
a.	L'expression de G0S2 diminue progressivement dans les co-cultures et lors de l'acidification du milieu de culture.....	46
b.	Le blocage de la glycolyse entraîne une diminution de l'expression de G0S2	47
c.	Le blocage de la voie PI3K/Akt kinase entraîne une diminution de l'expression de G0S2	48
d.	Mutants 3T3-L1 TR mG0S2	48
6.	Références :	50

1. Introduction :

a. Métabolisme et cancer :

Des modifications de diverses voies métaboliques sont fréquemment observées dans les cellules cancéreuses pour pouvoir assurer leurs besoins accrus en énergie et en « blocs de construction ». Parmi celles-ci, la plus documentée est l'augmentation de la consommation de glucose via la glycolyse aérobie appelée «effet Warburg». Dans les cellules saines, le glucose en présence d'oxygène est métabolisé en pyruvate via la glycolyse qui est ensuite assimilé par les mitochondries où il alimente le cycle de Krebs. On observe un « effet Warburg » (Figure 1) dans les cellules cancéreuses où le glucose, même en présence d'oxygène, est transformé en pyruvate pour être ensuite transformé en lactate. C'est la fermentation du glucose en condition aérobie. Les cellules cancéreuses ont besoin d'énormément de glucose et vont utiliser les intermédiaires de la glycolyse pour fabriquer leurs autres composants cellulaires tels que les acides aminés et les acides nucléiques (1).

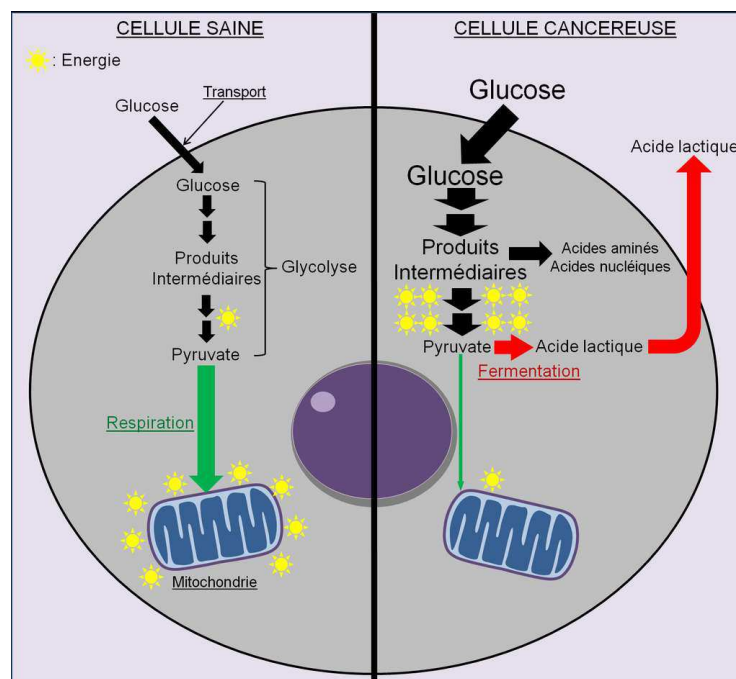


Figure 1 : effet Warburg¹. A gauche : cellule saine où le glucose est métabolisé en pyruvate par la glycolyse pour pouvoir ensuite subir le cycle de Krebs au sein de la mitochondrie. A droite : cellule cancéreuse où le pyruvate provenant du glucose est transformé en acide lactique et les produits intermédiaires de la glycolyse sont utilisés pour synthétiser les autres composants cellulaires.

¹ Image provenant du site <http://www.futura-sciences.com/sante/dossiers/medecine-cancer-mecanismes-biologiques-1453/page/12/>

D'autres processus métaboliques, tels que la biosynthèse des protéines, des acides nucléiques et des lipides sont également dérégulés dans les cellules cancéreuses (2). Pour les lipides, leur taux de synthèse se révèle critique car ceux-ci sont impliqués dans la néoformation et le renouvellement des diverses membranes cellulaires, dans l'apport d'énergie à l'organisme et peuvent aussi participer à la signalisation cellulaire en tant que messagers secondaires. Par ailleurs, l'addition de lipides sur des protéines peut être requise pour qu'elles effectuent leurs fonctions. Les lipides ont été directement impliqués dans des processus tels que l'angiogenèse, la migration et l'invasion qui contribuent au développement tumoral (3). Les lipides représentent donc une famille importante de composants cellulaires, que ce soit pour les cellules normales ou cancéreuses, de par les nombreux rôles qu'ils jouent au sein de ces cellules. Des études antérieures ont déjà démontré que l'inhibition de la synthèse des lipides grâce à des inhibiteurs spécifiques ou des ARN interférents entraînait une diminution de la prolifération ou la mort des cellules tumorales (4). La dérégulation de l'homéostasie des lipides est observée dans de nombreux types différents de cancer, mais elle est particulièrement critique dans le cancer de la prostate (8).

L'environnement entourant les cellules cancéreuses est en constante évolution. Du fait du développement des tumeurs et de la prolifération des cellules cancéreuses, celles-ci vivent dans un environnement où l'oxygène et les nutriments sont présents en faible quantité. Les tissus cancéreux présentent alors une plus grande plasticité métabolique que les tissus normaux (9, 10). Dans les tumeurs humaines, la phosphorylation oxydative mitochondriale et la glycolyse aérobie coexistent, leur part relative étant dépendante du fond génétique des tumeurs et de leur microenvironnement (11-13). En plus du glucose et de la glutamine, les acides gras représentent pour les cellules cancéreuses une source d'énergie importante grâce à la β -oxydation (14). La β -oxydation est en temps normal réalisée au sein de tissus consommant énormément d'énergie tels que le cœur ou les muscles squelettiques. Ce mécanisme particulier permet de sauver les cellules cancéreuses de la mort induite par la perte d'attachement à la matrice extracellulaire (15). En effet, lorsque les cellules se détachent de leur support, la consommation de glucose est inhibée, ce qui entraîne un déficit de production d'ATP qui peut alors être compensé par l'activation de l'oxydation des acides gras (16). Une étude récente concernant la leucémie a appuyé cette théorie (17). Il a été montré que la protéine promyélocytaire de la leucémie augmentait l'oxydation des acides gras et la survie des cellules cancéreuses lors de leur perte d'attachement (17). Des mécanismes similaires ont été observés pour le cancer du poumon où l'expression d'une isoforme de la carnitine

palmitoyltransférase 1, CPT1C promouvait l'oxydation des acides gras, augmentait la production d'ATP et la croissance tumorale en supprimant le stress métabolique des cellules (17). Il semblerait donc que différents types de cancer aient développé des mécanismes afin de pouvoir utiliser les acides gras comme source d'énergie supplémentaire. Mais attention, car l'augmentation de l'oxydation des acides gras n'est pas nécessairement mise en relation avec la production d'ATP dans toutes les lignées de cellules. Dans certaines leucémies, l'oxydation peut générer un découplage de la chaîne respiratoire mitochondriale pouvant amener à une incapacité de la cellule à produire de l'ATP (18).

Dans les tumeurs solides, les cellules cancéreuses sont en contact intime avec un microenvironnement consistant en cellules stromales, cellules immunitaires et un assortiment varié de protéines de la matrice extracellulaire. Les interactions entre les cellules cancéreuses et leur environnement peuvent favoriser la progression tumorale, c'est la raison pour laquelle de nombreuses études ont été dédiées aux cellules de l'environnement tumoral telles que les cellules endothéliales, inflammatoires ou encore les fibroblastes. Les adipocytes, quant à eux, ont reçu moins d'attention (19). Ils sont pourtant également capables de contribuer à la progression tumorale. Ils favorisent notamment la migration et l'invasion des cellules de cancers ovariens et mammaires en leur fournissant des acides gras et des cytokines (20-22). Cependant, les mécanismes moléculaires activés par les cellules cancéreuses dans les adipocytes sont encore peu caractérisés. Il a été démontré que les adipocytes entourant les tumeurs présentaient une perte de leur contenu en lipide notamment parce qu'ils étaient dans un état constamment activé avec un taux de lipolyse élevé et une surexpression de cytokines proinflammatoires (21). La même équipe a démontré que les adipocytes matures perdaient leur gouttelette lipidique et revenaient à un phénotype proche de celui de fibroblastes non-différenciés lors de co-cultures prolongées avec des cellules tumorales (Figure 2) (20).

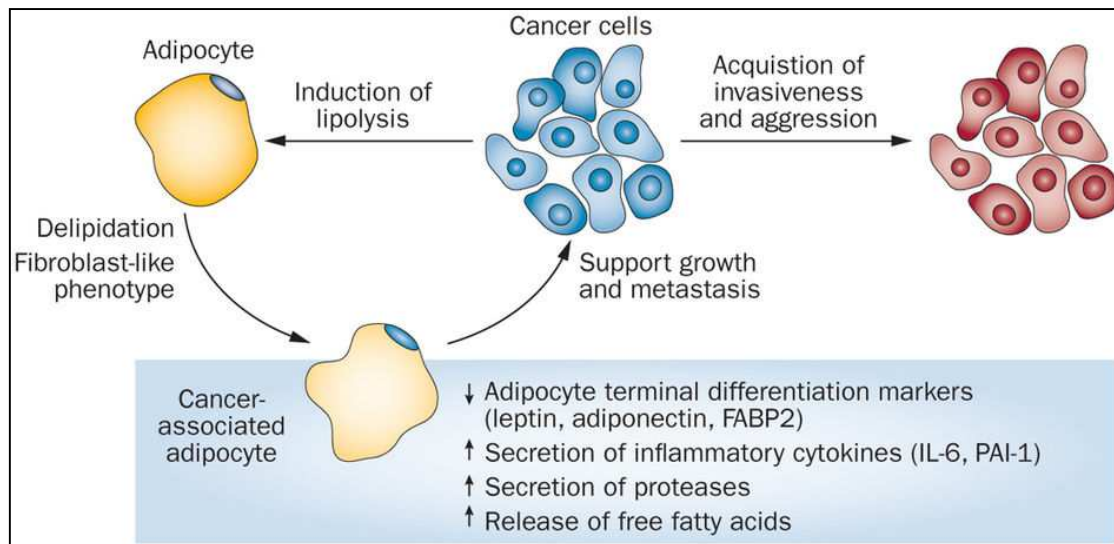


Figure 2 : métabolisme des adipocytes en présence de cellules cancéreuses². Les cellules cancéreuses vont induire la lipolyse au sein des adipocytes. Ceux-ci vont revenir à un phénotype proche de celui des fibroblastes en perdant leur gouttelette lipidique et en perdant leurs marqueurs spécifiques d'adipocytes. La perte des acides gras provenant de la gouttelette lipidique va permettre aux cellules cancéreuses d'obtenir plus d'énergie et de devenir plus agressives en acquérant un phénotype plus invasif.

Ces adipocytes perdant leur gouttelette lipidique libèrent dans le milieu extracellulaire des acides gras libres. Un transfert direct de ces acides gras entre les adipocytes et cellules cancéreuses a déjà été démontré que ce soit pour le cancer de la prostate (24) ou ovarien (22). Ce transfert direct de lipides fournirait l'énergie suffisante aux cellules cancéreuses pour pouvoir alimenter la croissance tumorale in vitro et in vivo (22). Cependant, le mécanisme reliant ces acides gras libres dérivés d'adipocytes et une progression tumorale accrue n'est pas entièrement élucidé. Le fait que les cellules cancéreuses ovariennes présentent néanmoins une activité d'oxydation des acides gras rehaussée en présence d'adipocytes prouve indirectement que les cellules cancéreuses utilisent les acides gras comme source d'énergie. Cependant lors de travaux de recherches récentes, il a été démontré que les adipocytes favorisent la prolifération des cellules cancéreuses du sein en transférant leurs acides gras aux cellules cancéreuses (25). Ceux-ci sont ensuite stockés dans des gouttelettes lipidiques au sein des cellules cancéreuses et soumis à une lipolyse dépendant de l'adipose triglycéride lipase (ATGL des cellules cancéreuses) et à une oxydation mitochondriale non couplée (25) lorsque les cellules tumorales en auront besoin. L'étude des mécanismes intervenant dans la lipolyse au sein des adipocytes se révèle donc comme particulièrement intéressantes du fait qu'une lipolyse plus importante mène à un phénotype plus agressif de la part des cellules cancéreuses. Une autre particularité de l'environnement tumoral est qu'il est généralement

² Park, J., Morley, T. S., Kim, M., Clegg, D. J., & Scherer, P. E. (2014). Obesity and cancer—mechanisms underlying tumour progression and recurrence. *Nature Reviews. Endocrinology*, 10(8), 455–465.

acide en raison de l'effet synergique de plusieurs facteurs incluant la piètre qualité du réseau vasculaire et l'hypoxie, l'inflammation chronique locale et l'activité métabolique des cellules cancéreuses qui utilisent généralement la glycolyse aérobie conduisant à la production de protons et de lactate qui sont exportés dans l'espace extracellulaire où ils s'accumulent et induisent une acidification progressive. Le pH peut être inférieur à 6.0 dans les tissus tumoraux (26) ce qui affecte le phénotype des cellules stromales et immunitaires qui y sont présentes. Dès lors, l'identification des mécanismes enclenchés par l'acidose est cruciale, notamment au niveau des cellules qui composent le microenvironnement tumoral, pour une vision globale de la biologie des tumeurs (27).

b. Lipolyse :

i. Mécanisme général :

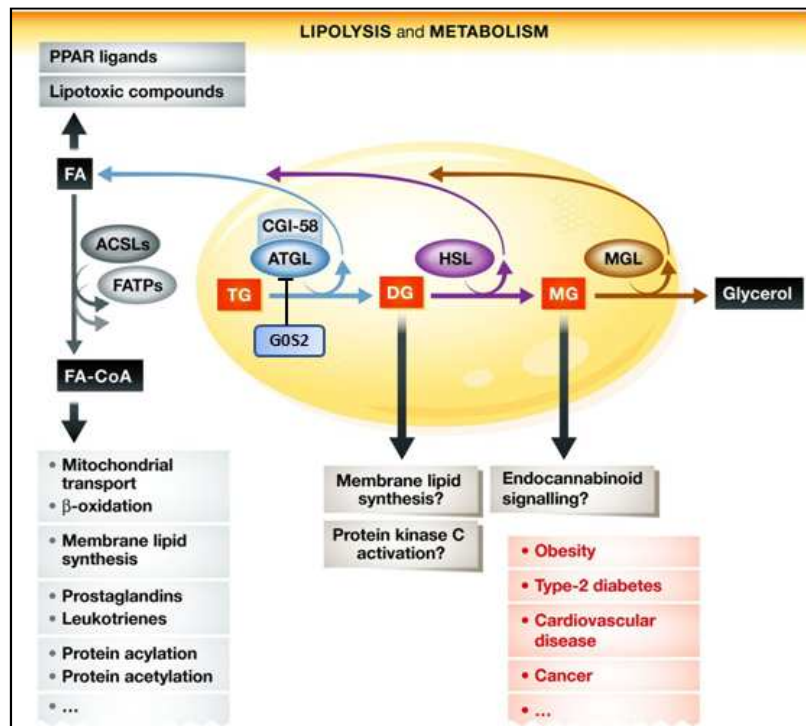


Figure 3 : modèle de la lipolyse³. Les 3 étapes de la lipolyse sont la dégradation du TAG en DAG par ATGL (activé par CGI-58 et inhibé par G0S2), la dégradation du DAG en MAG par HSL et la dégradation du MAG en glycérol par MGL. Chacune de ces étapes va libérer un acide gras (FA) qui pourra soit servir de ligands pour la communication cellulaire, soit apporter de l'énergie grâce à la β -oxydation. Les autres produits de la lipolyse peuvent aussi entrer dans d'autres processus cellulaires (synthèse de la membrane lipidique, activation de PKC,...).

Les acides gras non-estérifiés provenant de notre alimentation sont estérifiés après l'ajout d'un glycérol pour être stockés en triacylglycérols (TAG) neutres qui seront accumulés

³ Zechner, R. (2015). FAT FLUX: enzymes, regulators, and pathophysiology of intracellular lipolysis. *EMBO Molecular Medicine*, 7(4), 359–362.

dans les gouttelettes lipidiques présentes dans les adipocytes. Lorsque le corps a un besoin accru en énergie, notamment lors d'un effort important, les réserves de TAG sont mobilisées et hydrolysées afin de libérer leurs acides gras non-estérifiés. Ces acides gras entreront à leur tour dans les tissus périphériques grâce au système circulatoire où ils subiront la β -oxydation ce qui permettra de produire de l'ATP (28).

La concentration en acides gras non estérifiés est liée à un équilibre entre l'hydrolyse des TAG et l'estérification des acides gras sur une molécule de glycérol (29). Chacune des hydrolyses (Figure 3) pour les différents acides gras du TAG est réalisée par des lipases différentes. 3 enzymes interviennent donc pour pouvoir cliver chacun des acides gras. La première est ATGL qui va hydrolyser les TAG pour en faire des diacylglycérols (DAG) tout en générant un acide gras non estérifié (30). Cette enzyme est régulée positivement par CGI-58 (Comparative Gene Identification-58) et négativement par G0S2 (G0/G1 Switch Gene 2). Son activité est adaptée en fonction des besoins énergétiques de la cellule (31). Cette première étape de l'hydrolyse du TAG est aussi l'étape limitante. Ce mémoire s'intéressera fortement à l'expression de G0S2 car il semblerait que ce soit le frein principal à la lipolyse. La seconde étape est catalysée par l'Hormone-Sensitive Lipase ou HSL, aboutit au clivage d'un second acide gras et génère un monoacylglycérol (MAG) (32). Cette enzyme est capable d'hydrolyser les TAG, DAG et MAG mais il s'agit de l'enzyme principale pour l'hydrolyse des DAG générés après la première étape car le taux d'hydrolyse est plus élevé pour le DAG. Pour la dernière étape et l'hydrolyse du dernier acide gras présent sur le glycérol, une enzyme appelée monoglycéride lipase ou MGL clive le MAG en glycérol et acide gras non estérifié libre (33).

ii. *G0/G1 Switch Gene 2 (G0S2)* :

1. Découverte :

Le gène G0/G1 switch 2 (G0S2) a été découvert dans les années 90 lors d'expériences de cultures de lymphocytes humains visant à étudier l'effet de certains traitements sur le cycle cellulaire (34). Les auteurs avaient observé que le gène G0S2 comprenait de nombreux îlots CpG et que ce gène possédait des sites de fixation potentiels pour de nombreux facteurs de transcription (AP1, AP2, AP3, NFkB et TCE) situés dans la région promotrice. De plus, il a été observé que le gène G0S2 comprenait de nombreuses régions, notamment celles reconnues par les facteurs de transcription, ressemblant fortement à celles présentes sur des oncogènes tels que *ras*, *raf* et *mos*. Les séquences similaires pourraient jouer un rôle semblable à ceux observés chez les oncogènes dans la régulation de l'expression et G0S2

pourrait être assimilé à un oncogène (34). Depuis, le gène G0S2 n'a été identifié que chez les vertébrés. Il se situe sur le chromosome 1 dans les génomes humain et murin (35).

2. Structure :

Le gène G0S2 code pour une petite protéine basique de 103 acides aminés. Il y a un fort taux d'homologie entre les isoformes de l'homme et de la souris (jusqu'à 78% au niveau des acides aminés) (35). On ne peut distinguer aucune caractéristique frappante dans la structure secondaire ou tertiaire de la protéine qui nous permettrait de lui attribuer une première fonction directement. Selon la prédiction de la structure secondaire de la protéine, la protéine G0S2 contiendrait deux hélices α séparées par une séquence hydrophobe et se terminant par deux séquences ayant le potentiel de générer un feuillet β (Figure 4). En outre, on sait qu'il existe plusieurs sites putatifs de phosphorylation par la protéine kinase C (PKC) et la caséine kinase II dans la séquence de G0S2, bien qu'aucune preuve n'ait été obtenue que G0S2 est en fait une phosphoprotéine (35).

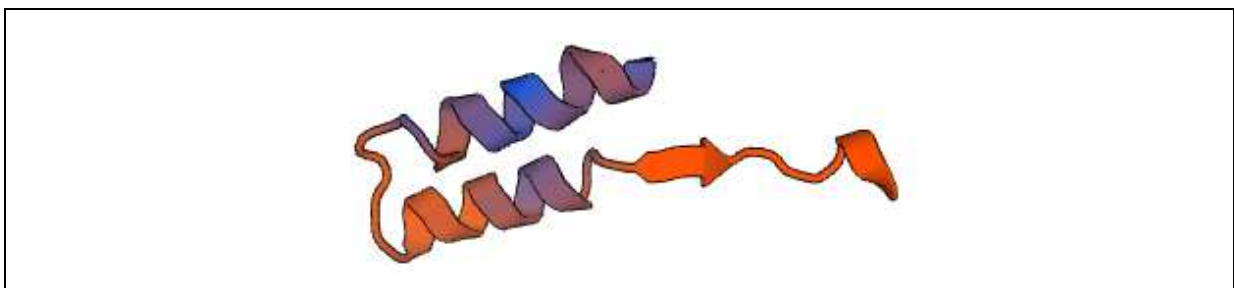


Figure 4 : Prédiction de la structure tertiaire à l'aide du programme Swiss-Model (36). La protéine est composée de 2 hélices α séparées par une séquence hydrophobe et se terminant par deux séquences ayant le potentiel de générer un feuillet β . Ce modèle a été construit sur Swiss-Model en reprenant la séquence FASTA de la protéine. Le programme se base sur des modèles préexistants d'autres protéines semblables afin de sortir un modèle hypothétique de la structure de la protéine.

3. Fonctions :

a. Développement du cancer :

L'hyperméthylation est un évènement qui se produit souvent lors de la carcinogenèse et qui permet de désactiver l'expression d'un gène. Cet évènement se produit notamment au niveau des îlots CpG, nombreux chez G0S2 (34). On a observé que le gène G0S2 était hyperméthylé dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses humaines ainsi que dans les cancers squameux de la tête, du cou et du poumon (37). Il a été démontré que l'hyperméthylation était directement en lien avec l'expression de G0S2 dans une série d'expériences en traitant des cellules avec du 5-Aza-2'-déoxycytidine qui est un inhibiteur

des méthyltransférases à l'origine de l'hyperméthylation. Les cellules ayant subi ce traitement ont montré par la suite un haut niveau d'expression de G0S2 (38).

Par ailleurs, il a également été démontré que G0S2 peut interagir avec Bcl-2 au niveau des mitochondries. G0S2 est capable d'interagir avec Bcl-2 même si G0S2 ne possède pas le domaine d'homologie généralement observé pour l'interaction avec Bcl-2. Ce complexe néoformé perturbe alors la formation du complexe hétérodimérique anti-apoptotique Bcl-2/Bax (40). La formation du complexe Bcl-2/G0S2 favorise indirectement l'apoptose.

L'ensemble de ces observations suggère que G0S2 est un gène suppresseur de tumeur. La suppression de l'expression de G0S2 favorise la progression tumorale et la transformation oncogène-induite et nous ferait donc penser que celui-ci n'est pas bénéfique au développement du cancer (40). Cependant, l'étude sur des cellules LC-1 d'un cancer des poumons n'appuie pas cette théorie. En effet, la surexpression de G0S2 au sein de ces cellules n'a eu aucun effet sur l'apoptose et a même entraîné une augmentation légère mais significative de la prolifération cellulaire (38). Le rôle de G0S2 dans le développement du cancer n'est donc pas encore clairement établi et pourrait dépendre du contexte.

Une autre étude concernant la régulation du gène G0S2 dans le développement du cancer a été menée sur des cellules de la leucémie promyélocytaire aigüe humaine (APL) en les traitant avec de l'acide rétinoïque (RA) (41), une molécule présentant des propriétés anti-cancéreuses. Les auteurs ont évalué l'effet que le traitement pouvait avoir sur l'expression de G0S2 *in vitro* ou *in vivo* dans des souris transgéniques (APL). Les analyses protéomiques et transcriptomiques ont révélé que l'expression de G0S2 se retrouvait augmentée que ce soit au niveau de l'ARNm ou de la protéine. Un autre élément important observé est la présence de sites de réponses au RA au sein du promoteur de G0S2. Lorsque des mutations sont induites au sein de ces sites, le RA ne provoque plus d'activation transcriptionnelle de G0S2 (41). L'ensemble de ces observations suggère que G0S2 serait bien un des éléments de réponse lors du traitement au RA mais son rôle dans la leucémie promyélocytaire reste encore à établir.

Une étude plus récente a permis de préciser le rôle que G0S2 pourrait jouer dans le développement tumoral (42). Les auteurs ont montré que G0S2 inhibe la transformation oncogène induite d'une façon indépendante d'ATGL chez des fibroblastes embryonnaires de souris. Les cellules où le gène G0S2 avait été éteint (G0S2-null) et qui avaient été transfectées avec un plasmide permettant l'expression du proto-oncogène HRAS ou de l'EGFR étaient capables de proliférer de façon plus importante que les cellules WT (42). Les cellules G0S2-

null surexprimaient un set de gènes impliqués dans la transformation et la prolifération tumorale. De plus, les auteurs ont démontré que la régulation par G0S2 de la transformation induite par les oncogènes était dépendante de MYC, un proto-oncogène surexprimé dans certains cancers humains (cancer ovarien, lymphome,...) (42). Finalement, l'expression de G0S2 dans les cancers du sein est généralement faible lorsque celui-ci est de nouveau exprimé, les taux de prolifération cellulaires sont en diminution (42).

b. Régulation du métabolisme des lipides et relation avec ATGL:

Il a été démontré en 2010 que l'activité hydrolytique d'ATGL peut être inhibée sélectivement par G0S2 (43). L'inhibition d'ATGL bloque la lipolyse et entraîne une accumulation de triglycérides si aucun mécanisme compensatoire n'est activé (telle que l'hydrolyse du TAG par HSL). Concernant la structure d'ATGL, la moitié N-terminale d'ATGL contient un pli prédictif d' α/β -hydrolase et un domaine semblable à un domaine patatin-like qui se chevauchent (44). Le site catalytique d'ATGL est situé dans le domaine patatin-like et caractérisé par une dyade catalytique non-conventionnelle composée d'une sérine et d'un acide aspartique comme il a déjà été observé dans certaines phospholipases humaines (cPLA2,...) (44). ATGL se lierait à la surface des gouttelettes lipidiques contenant des triglycérides grâce à une portion hydrophobe de 45 acides aminés se situant du côté C-terminal (46, 47). On sait maintenant que l'action enzymatique *in vivo* d'ATGL est fortement dépendante de sa localisation sur les gouttelettes lipidiques et de son interaction avec une protéine co-activatrice appelée CGI-58 (31). Les mutations de CGI-58 et d'ATGL chez l'Homme sont responsables de diverses maladies où les lipides s'accumulent à des endroits inhabituels tels que les tissus non adipeux (os, muscles,...) (48). Les maladies provoquées par les mutations de CGI-58 ou d'ATGL ne sont pas les mêmes. Les mutations CGI-58 conduisent à une variété de pathologies caractérisées par une ichtyose (49). Les phénotypes qui résultent des mutations ATGL sont le plus souvent associés aux myopathies des muscles squelettiques et cardiaques (51).

La capacité inhibitrice de G0S2 sur ATGL a été caractérisée dans plusieurs études (31). Des expériences de colocalisation par immunofluorescence dans des cellules HeLa ont démontré que G0S2 se situe à la surface des gouttelettes lipidiques (43). Les études utilisant des approches de coexpression ont montré que G0S2 est capable d'empêcher le turnover des gouttelettes lipidiques médié par ATGL. L'inhibition d'ATGL serait provoquée par l'interaction entre la portion hydrophobe de G0S2 et le domaine patatin-like d'ATGL. Cela a

été prouvé par des expériences où l'on a muté G0S2 pour supprimer le domaine hydrophobe et où il n'y avait plus d'interaction entre ATGL et G0S2 (31). G0S2 ne disposait plus de sa capacité d'inhibition et ATGL retrouvait sa fonction d'hydrolyse (31). Dans des cellules où G0S2 est surexprimé, le taux de lipolyse basale s'en retrouve fortement diminué. Parallèlement, dans des cellules où l'on avait inhibé l'expression de G0S2 à l'aide d'ARN interférant, le taux de lipolyse avait fortement augmenté par rapport aux cellules contrôles. Collectivement, ces études démontrent clairement que G0S2 est un inhibiteur sélectif d'ATGL et de la lipolyse catalysée par ATGL (43).

La lipolyse des adipocytes est stimulée par des signaux β -adrénergiques en conditions physiologiques normales. Dans les adipocytes blancs, ATGL est déplacé vers les gouttelettes lipidiques après stimulation β -adrénergique (43). Dans ces conditions, comme G0S2 est lié à ATGL, celui-ci se retrouve localisé à la surface des gouttelettes lipidiques et lorsque l'expression d'ATGL est inhibée par siRNA, G0S2 ne se retrouve plus à leur surface (43). Les mutants ATGL tronqués de la partie leur permettant de se lier à la surface des gouttelettes se déplacent quand même vers celles-ci lorsqu'ils sont liés à G0S2 (31). Les 2 protéines sont donc capables de se rendre à la surface des gouttelettes et influent directement sur la position de l'un et de l'autre. L'équipe de Yang et al. (43) propose un modèle intéressant (Figure 5) suite à la stimulation adrénérergique faisant intervenir G0S2. Les signaux β -adrénergiques vont permettre 2 événements. Le premier sera de lier les ATGL « libres » aux gouttelettes lipidiques et le second va séparer ATGL de G0S2 en réprimant son expression. L'ensemble de ces 2 mécanismes permet une lipolyse forte et continue lors d'une stimulation β -adrénergique (Figure 5) (43). Le facteur de nécrose tumorale TNF- α est un autre activateur au sein de la lipolyse dans les adipocytes (54). Celui-ci diminue fortement l'expression de G0S2 que ce soit au niveau transcriptomique ou protéique (55). D'autre part, la surexpression de G0S2 diminue considérablement la lipolyse au sein de cellules stimulées par le TNF- α . Ces observations suggèrent que la diminution de l'expression et l'extinction rapide du contenu de la cellule en protéines G0S2 augmentent la lipolyse induite par le TNF- α . Dans ce cas-ci, G0S2 permet de réguler la lipolyse afin de garder le phénotype normal des adipocytes.

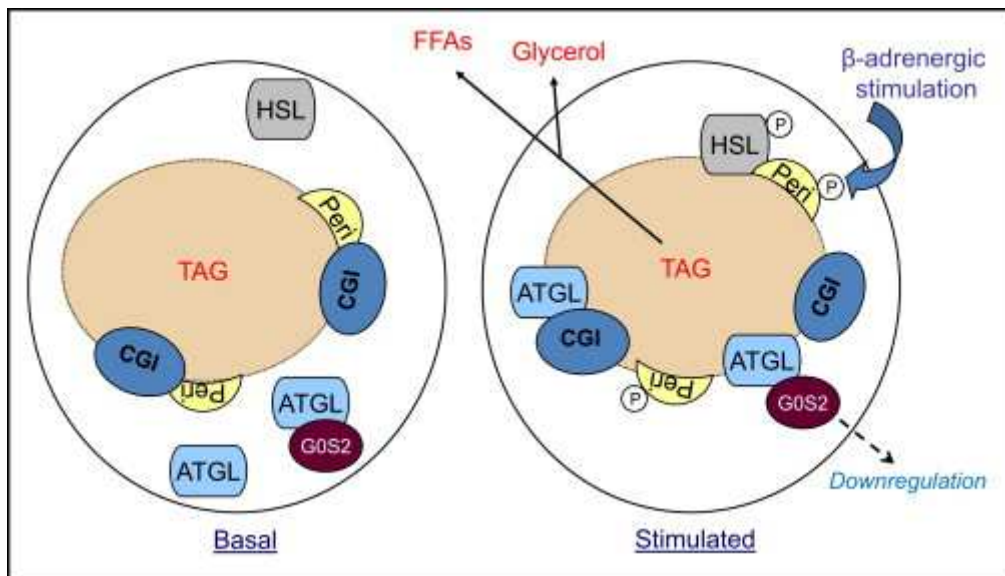


Figure 5 : modèle d'action de la lipolyse (43). A gauche, en temps normal sans stimulation β -adrénergique, ATGL n'est pas accroché à la gouttelette lipidique. A droite, après une stimulation β -adrénergique, l'expression de G0S2 est réprimée et sa concentration va diminuer progressivement au sein de la cellule. ATGL va pouvoir aller se lier à la gouttelette lipidique et initier la lipolyse. Il en résultera une libération d'acides gras libres et de glycérol lorsque les TAG auront été totalement dégradés par les enzymes suivant la première étape de la lipolyse.

2. Objectifs :

Parmi les cellules du microenvironnement tumoral, les adipocytes ont été moins caractérisés que d'autres cellules stromales tels que les fibroblastes et les cellules endothéliales. Si certaines études ont abordé les interactions entre cellules tumorales et adipocytes, il est évident que les altérations induites dans les adipocytes suite à leur interaction avec les cellules tumorales ne sont que peu caractérisées. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'expression des gènes régulateurs de la lipolyse au sein de co-cultures entre des cellules 3T3-L1 et des cellules cancéreuses PC3 afin de déterminer quels gènes dans les adipocytes sont les plus affectés par l'interaction avec les cellules cancéreuses. Une fois cela évalué, nous avons étudié les voies par lesquelles les cellules tumorales peuvent influencer le phénotype des adipocytes. Le changement le plus évident observé dans les co-cultures de 3T3-L1 et de cellules PC3 était l'acidification du milieu de culture. Or, les cellules cancéreuses acidifient généralement le microenvironnement tumoral, et il est reconnu dans la littérature qu'une compréhension globale de la physiologie tumorale nécessite une caractérisation précise des conséquences de l'acidification. C'est pourquoi nous avons poursuivi cette étude en analysant l'expression de gènes régulant la lipolyse et la lipolyse globale dans des 3T3-L1 cultivés à un pH proche de celui rencontré dans le microenvironnement tumoral.

Après s'être concerté et renseigné dans la littérature scientifique afin de savoir quels paramètres dans les 3T3-L1 pouvaient être altérés par l'acidification du milieu de culture et contribuer à la régulation de la lipolyse, nous avons décidé d'analyser l'expression de gènes régulant la lipolyse suite à :

- un blocage de la glycolyse par le 2-déoxy-glucose
- un blocage de la voie PI3K/Akt kinase par le LY294, un agent pharmacologique bloquant spécifiquement cette voie
- une diminution du rapport ATP/AMP induite en ajoutant du dBcAMP dans le milieu de culture

Pour la dernière partie de ce mémoire, nous essayerons de créer des clones inducibles 3T3-L1/TR/mG0S2 afin de pouvoir surexprimer la protéine G0S2 dans des conditions où son expression est diminuée et d'en étudier les effets sur les taux de lipolyse afin de voir si la réexpression de G0S2 est suffisante pour réduire la lipolyse à pH acide.

3. Matériel et méthodes

a. Culture cellulaire

i. Milieux de culture

Nom	Milieu	Sérum	Antibiotique
DMEM avec rouge phénol	DMEM 4.5g/L Glucose w/ UltraGlutamine I [BE12-604F/U1] (Lonza)	7%FBS [10270-106] (Gibco Thermofisher Scientific)	-1% d'un cocktail de pénicilline (10000 U/ml) et de streptomycine (10000 U/ml) [17- 602E] (Pen/Strep, Lonza)
DMEM sans rouge phénol	DMEM no phenol red [20163-029] (Gibco Thermofisher Scientific)		-1% d'amphotéricine B 250 µg/ml [17- 836R] (Lonza)
F12K	Ham's F-12K (Kaighn's) Medium [21127022] (Life Technologies)		

Tableau 1 : Milieux utilisés pour les manipulations du mémoire

La plupart des cultures ont été effectuées dans le milieu DMEM avec rouge phénol car celui-ci nous renseignait sur la nature acido-basique de notre culture. On pouvait dès lors constater s'il y avait eu une évolution pour les cultures dans les différentes conditions où nos cellules ont été testées. Le milieu sans rouge phénol a été utilisé lors des dosages en glycérol libre pour éviter des interférences avec la mesure d'absorbance.

ii. Types cellulaires utilisés

La lignée 3T3-L1 a été utilisée comme unique modèle d'adipocytes lors de l'ensemble des manipulations de ce mémoire. Les 3T3-L1 sont une lignée cellulaire dérivée de cellules de souris 3T3 utilisées dans la recherche biologique sur le tissu adipeux. Les cellules 3T3-L1 ont une morphologie de type fibroblaste, mais, dans des conditions appropriées, les cellules se différencient et présentent un phénotype adipocytaire. Les cellules 3T3-L1 avec une morphologie d'adipocytes augmentent la synthèse et l'accumulation de triglycérides sous forme de gouttelettes lipidiques caractéristiques des cellules adipeuses. Ces cellules sont également sensibles aux hormones et aux médicaments lipogéniques et lipolytiques, y compris l'épinéphrine, l'isoprotérénine et l'insuline. Cependant, les 3T3-L1 ne se différencient pas jusqu'au stade d'adipocyte mature, c'est pourquoi ces cellules sont considérées comme un modèle de pré-adipocytes.

Les 3T3-L1 sont cultivées en monocouche cellulaire dans des boîtes de culture (CELLSTAR, Sigma-Aldrich, St-Louis, Etats-Unis) à 37°C et 5% de CO₂ dans du milieu DMEM avec rouge phénol complet. Le milieu est changé 3 fois par semaine.

La lignée PC3 a été utilisée dans le cadre d'expériences de co-cultures avec les 3T3-L1. Ces cellules proviennent d'un adénocarcinome prostatique humain et sont largement utilisées dans la recherche sur le cancer de la prostate. Les PC3 ont été utilisées pour mimer *in vitro* les interactions entre cellules cancéreuses et adipocytes observées naturellement lors d'un cancer prostatique. Celles-ci sont cultivées dans du F12K (Life Technologies) comprenant 7% de FBS et les antibiotiques habituels.

iii. Passage cellulaire

Les cellules sont rincées 2 fois au Dulbecco [2.68 mM KCl, 1.46 mM KH₂PO₄, 136.89mM NaCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 5.55 mM glucose, pH 7.89]. On y ajoute ensuite 2 ml de trypsine-EDTA 0.1% par boîte de 10 cm de diamètre (CELLSTAR, Sigma-Aldrich). On retire l'excès de trypsine-EDTA 0.1% et on incube environ 2 minutes à 37°C pour détacher les cellules. Les cellules sont ensuite reprises et suspendues dans 12 ml de DMEM avec rouge phénol complet et sont réparties soit dans 3 nouvelles boîtes de 10 cm de culture, soit dans des plaques 6 puits si l'on veut différencier nos 3T3-L1 en adipocytes pour pouvoir les tester par la suite dans les différentes conditions. Généralement, l'opération est effectuée avec 3 boîtes de 10 cm de diamètre où l'une est répartie dans les 3 nouvelles boîtes et où les 2 dernières boîtes sont réparties dans 2 plaques 6 puits. L'opération est effectuée une fois tous les 2 à 3 jours. Les 3T3-L1 sont utilisées entre passage 3 et 10.

iv. Différenciation des 3T3-L1 en adipocytes

Cette opération s'effectue sur deux plaques 6 puits où les 3T3-L1 sont confluentes. La première étape consiste à ajouter dans 20 ml de milieu DMEM avec rouge phénol complet 400 µl de dexaméthasone (D4902, Sigma) à 20 µg/ml dans du DMEM sans sérum, 50 µl d'insuline (I6634, Sigma) à 2 mg/ml dans de l'acide acétique 1% et 75 µl de dBcAMP (D0627, Sigma) à 40 mg/ml dans de l'eau milliQ. On dépose 1.6 ml de ce milieu par puits et on place dans l'incubateur pendant 48h. La seconde étape consiste à renouveler le milieu : 20 ml de DMEM avec rouge phénol complet avec 50 µl d'insuline 2mg/ml sont préparés. On enlève le milieu de la première étape de chaque puits pour le remplacer par le milieu contenant seulement de l'insuline. Le milieu est alors renouvelé tous les 2 jours. Après

10 à 12 jours de culture dans ces conditions, les cellules sont considérées comme différenciées et peuvent être testées dans nos différentes conditions.

v. Système de co-culture

Les co-cultures se réalisent dans des plaques 6 puits en adipocytes. Au préalable, on ensemence des PC3 dans des inserts ThinCert™ (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Autriche). 250 000 cellules PC3 sont déposées sur ces inserts. Après 24 h, on dépose ces inserts sur les puits contenant des 3T3-L1 différenciées et on réalise différents temps de culture, un à 24 h et un à 72 h. Les deux types de cellules sont alors collectés séparément pour être analysés.

vi. Traitement des 3T3-L1 différenciées avec des milieux à différents pH

Cette opération s'effectue dans une plaque 6 puits. Nous rajoutons préalablement du MES (Acide 2-Morpholinoéthanesulfonique monohydraté, M-8250, Sigma) à la concentration de 20 mM dans le milieu de culture afin d'accroître son pouvoir tampon aux environs de pH 6.5. Nous ajustons ensuite le milieu au pH désiré avec HCl ou NaOH. Nous avons choisi de traiter nos cellules à pH 7.4 qui est un pH proche du milieu physiologique normal et à un pH environnant 6.5 qui est un pH proche de celui entourant les cellules tumorales afin de pouvoir mimer l'effet du pH du microenvironnement tumoral sur les 3T3-L1. Une fois le pH ajusté, il faut ensuite laisser le milieu s'équilibrer 3 heures à l'incubateur. Le pH est à nouveau mesuré et celui-ci sera noté sur les puits où le milieu filtré sera ajouté. Les cellules seront cultivées 24h dans ce milieu avant d'être récupérées.

vii. Traitement des 3T3-L1 différenciées au 2DG

Le 2-déoxy-D-glucose (2DG) est une molécule de glucose dans laquelle le groupe 2-hydroxyle a été remplacé par de l'hydrogène. Il inhibe de manière compétitive la production de glucose-6-Phosphate à partir du glucose au niveau de la phosphoglucoisomérase. De cette manière, la glycolyse se retrouve inhibée. Cette opération s'effectue dans des puits de plaques 6 puits. Après différenciation, les cellules sont cultivées pendant 24h en présence de 0, 2, 5 ou 10 mM de 2DG dans du milieu DMEM complet.

viii. Traitement des 3T3-L1 différenciées au LY294

Le LY294 est un inhibiteur spécifique de la voie PI3K / Akt kinase. Le LY294 est solubilisé et conservé dans du DMSO (solution stock à 50 mM) car il s'agit d'un composé lipophile. Le traitement des cellules s'effectue dans des puits de plaques 6 puits. Après

différenciation, les cellules sont cultivées pendant 24h en présence ou non de LY294. 2 ml de DMEM complet avec rouge phénol à différentes concentrations en LY294 seront déposés par puits. Les différentes concentrations testées seront de 0, 2, 5 et 10 μM . Les cellules sont récupérées 24h après traitement.

ix. Traitement des 3T3-L1 différenciées au dBcAMP

L'opération s'effectue sur une plaque 6 puits de 3T3-L1 différenciées. On prépare 6 ml de milieu DMEM avec rouge phénol à 0 mg/ml pour le contrôle et 6 ml à 0.5 mg/ml à partir d'une solution stock à 40 mg/ml pour le test. On dépose ensuite 2 ml par puits de chaque et on obtient 3 puits à 0 mg/ml et 3 puits à 0.5 mg/ml. On remet la plaque 24h à l'incubateur avant de récupérer les cellules.

x. Traitement des 3T3-L1 différenciées au PKI

Le PKI [n°476485, Merck Millipore, Overijse, Belgique] est un inhibiteur de la protéine kinase A ou encore protéine kinase cAMP-dépendante. La partie N-terminale a été myristoylée afin de faciliter sa pénétration au travers de la membrane plasmique. L'opération s'effectue sur une plaque 6 puits de 3T3-L1 différenciées. On prépare 2 solutions de DMEM avec rouge phénol + PKI. On en prépare une à 5 μM et une à 1 μM à partir d'une solution stock qui est à 500 μM . On dépose 2.5 ml par puits et on remet la plaque 24h à l'incubateur avant de récupérer les cellules.

xi. Création de clones 3T3-L1 surexprimant mG0S2 de façon inductible.

Afin de surexprimer G0S2 dans les 3T3-L1, nous avons préalablement créé un vecteur d'expression de mG0S2. La séquence a été amplifiée par PCR à partir d'ADNc de 3T3-L1 différenciées avec des amorces s'hybridant de part et d'autre de la séquence codante (5'-CAC-ACA-GGT-ACC-ACC-CAC-AGC-CCA-GAG-CTC-AGA-3' et 5'-CAC-ACA-CTC-GAG-CTT-CTC-TGT-CAG-TCA-CCG-GCC-3') et clonée dans les sites KpnI et XhoI du pcDNA4/T0 (Invitrogen). L'intégrité de la séquence clonée a été vérifiée par séquençage. Afin de créer des clones de cellules 3T3-L1 surexprimant de façon inductible mG0S2, des cellules 3T3-L1 ont préalablement été transfectées avec un vecteur permettant l'expression du répresseur sensible à la tétracycline (TR). 24h après transfection, les cellules ont été sélectionnées dans du milieu DMEM contenant 3 $\mu\text{g/ml}$ de Blastidicin. Un seul clone surexprimant le TR a pu être isolé (3T3-L1/TR). Les 3T3-L1/TR ont ensuite été transfectées avec le vecteur d'expression pcDNA4/T0/mG0S2. 24h après transfection, les cellules ont été

sélectionnées dans du DMEM complet contenant 3 µg/ml de Blastocidin et 250 µg/ml de Zéocin. 4 clones ont été isolés (3T3-L1/TR/mG0S2 1-4).

xii. Transfection des 3T3-L1 avec un plasmide

Cette opération s'effectue dans des boîtes de culture de 6 cm de 3T3-L1 à confluence comprise entre 50% et 80%. On retire le milieu DMEM avec rouge phénol de la boîte et on y rajoute 5 ml de milieu frais. On va diluer l'agent de transfection, le GeneJuice®, (Merck, Belgique, Overijse) dans du milieu DMEM ne contenant pas de sérum ni d'antibiotiques dans des proportions de 7.5 µl de GeneJuice® pour 250 µl de milieu. On met en contact 100 µl du mélange avec 1 µg du plasmide. Après 15min d'incubation, l'ADN s'est complexé avec l'agent de transfection et le mélange est déposé goutte à goutte sur les 3T3-L1.

xiii. Marquage au Nile Red et au Bisbenzimidazole

Cette opération s'effectue sur des 3T3-L1 différenciées sur lamelles de verre. Il s'agit d'une coloration au Nile Red (Molecular Probes, Eugene, USA) qui marque les gouttelettes lipidiques accumulées au cours de la différenciation des 3T3-L1 en pré-adipocytes. Les noyaux seront marqués au DAPI (Invitrogen) pour une meilleure visibilité lors de la prise de photos au microscope. Tout d'abord, on prépare la solution de Nile Red en préparant une solution stock à 1 mM de Nile Red dans du DMSO anhydre. Cette solution stock doit être utilisée rapidement sinon elle devra être conservée à -20°C. Les cellules cultivées sur les coverslips sont fixées à l'aide de 2 ml d'une solution de paraformaldéhyde 4 % (PAF) dans PBS 1X durant un quart d'heure à RT. Elles sont ensuite incubées pendant 10 minutes à 37°C avec du Nile Red à 500 nM dilué dans du PBS 1X à partir de la solution stock puis rincées 3 fois pendant 5 minutes avec du PBS 1X. Finalement, elles sont incubées pendant 5 minutes à RT dans une solution de DAPI diluée 1000 fois à partir d'une solution stock à 300 µM dans du PBS 1X et lavées 3 fois pendant 5 minutes avec du PBS 1X. Le montage sur lame se fait avec du Fluorescence Mounting Medium (S302380-2, DAKO). Les lames doivent ensuite sécher pour pouvoir être observées au microscope. Celles-ci peuvent être conservées à 4°C en chambre froide à l'abri de la lumière pour ne pas détruire les fluorochromes. La longueur d'onde d'excitation à utiliser au microscope pour le Nile Red se situe à 552 nm et celui-ci émet une lumière aux environs de 636 nm. La longueur d'onde d'excitation pour le DAPI se situe vers 355 nm et celui-ci émet une lumière bleue aux alentours de 460 nm.

b. Analyses des protéines :

i. Western Blotting

La technique de Western Blotting permet de détecter spécifiquement et de quantifier des protéines d'un échantillon biologique préalablement séparées sur un gel de polyacrylamide.

Les cellules sont reprises dans une solution de Laemmli 1X [Laemmli 3X : 3.78 g Glycérol, 0.75 g SDS, bleu de Bromophénol, 1.5 ml de β -mercaptoéthanol 98 %, 3 ml Tris-HCl 1M pH 6.8, amener à 10 ml avec de l'eau milliQ] pour les lyser. Afin de dénaturer totalement les protéines dans nos échantillons, ceux-ci sont chauffés 5 minutes à 95°C après la lyse. Un marqueur de poids moléculaire (SDS-PAGE Molecular Weight Standards Broad Range, BioRad, Hercules, Etats-Unis) et les échantillons protéiques sont ensuite déposés sur un gel de polyacrylamide (SDS-PAGE). Celui-ci se compose d'un gel de compression pour concentrer les protéines afin qu'elles entrent bien toutes en même temps sur le second gel nommé gel de séparation permettant de séparer les protéines en fonction de leur taille (Tableau 2). On dispose le montage dans une cuve BioRad© contenant du tampon de migration [24.76 mM Tris, 191.8 mM Glycine, SDS 0.1 %]. La migration commence à 80V. Une fois que le front de migration a bien dépassé la limite entre les 2 gels, on peut augmenter le voltage jusqu'à 120 Volts jusqu'à la fin de la migration.

Gel de compression		Gel de séparation		
Composant	Volume	Composant	Volume (Gel 13.75%)	Volume (Gel 8.5%)
H ₂ O milliQ	4.5 ml	H ₂ O milliQ	5.46 ml	6.79 ml
Compression A	750 μ l	Séparation A	1.33 ml	1.33 ml
Acrylamide	750 μ l	Acrylamide	3.66 ml	2.33 ml
SDS 10 %	75 μ l	SDS 10 %	133 μ l	133 μ l
Temed	7.5 μ l	Temed	6.7 μ l	6.7 μ l
APS	75 μ l	APS	67 μ l	67 μ l

Tableau 2 : Composition des gels d'électrophorèse de compression et de séparation. Compression A ; Tris-HCl 0.5 M pH 6.7, Séparation A ; Tris-HCl 3 M pH 8.7, acrylamide ; 40% Acrylamide/Bis Solution 29 : 1 [161-0146] (BioRad).

On active préalablement une membrane de difluorure de polyvinylidène (PVDF, NEF1002001, PerkinElmer, Waltham, Etats-Unis) en la trempant 1 minute dans du méthanol sur laquelle le gel est appliqué. On ne doit pas laisser une seule bulle d'air entre le gel et la membrane pour obtenir un transfert complet et homogène. Le transfert s'effectue dans du tampon de tranfert [24.76 mM Tris, 191.8 mM Glycine et 20% méthanol] pendant 1 heure et demi à 60 Volts dans le dispositif Mighty Small Transphor (GE Healthcare Life Sciences,

Chicago, Etats-Unis). Après le transfert, la membrane est colorée avec une solution d'Amido Black [40% méthanol, 10% acide acétique, 0.1% Amido Black]. Cette manipulation permet de s'assurer que les protéines ont bien été transférées uniformément sur toute la surface du gel et de positionner les standards de poids moléculaire. La membrane doit être décolorée afin d'enlever toute trace de colorant sur celle-ci afin que cela n'influe pas sur la réaction antigène-anticorps. La décoloration se fait soit dans de l'eau, soit dans du tampon de transfert. Une fois la membrane décolorée, on bloque celle-ci dans une solution de PBS-Tween 3% lait [3% de lait en poudre dans du PBS-Tween 20 (1.469 mM KH₂PO₄, 2.68 mM KCl, 20 mM Na₂HPO₄, 136.8 mM NaCl, 0.05% Tween-20)] pendant 1 heure à température ambiante afin de saturer les sites non spécifiques. Par après, la membrane est incubée avec l'anticorps primaire ciblant la protéine d'intérêt dilué dans la solution de PBS-Tween-lait 3% pendant un temps variant selon l'anticorps utilisé (voir Tableau 3). Trois lavages de 5 minutes dans une solution de PBS-Tween sont ensuite réalisés afin d'éliminer le surplus d'anticorps. La membrane est ensuite incubée pendant 1 heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire dilué dans le PBS-Tween-lait 3%. Cet anticorps est couplé à la « Horseradish peroxydase » (HRP, peroxydase de raifort) qui dégradera l'eau oxygénée lors de la révélation. Les différents anticorps utilisés lors de ce mémoire sont repris dans le Tableau 3. Ensuite, une nouvelle série de 3 lavages de 5 min dans du PBS-Tween est réalisée. Une solution d'ECL est préparée (Enhanced ChemiLuminescence) et composée de 3 solutions. Pour une membrane de 5.5X9cm, on mélange 1 ml de solution A [0.1M Tris/HCl à pH 8.6, Luminol à 0.4mg/ml], 100 µl de solution B [para-hydroxycouramine à 1.1mg/ml dans DMSO] et 0.4 µl d'eau oxygénée (30%). Celle-ci est alors déposée sur la membrane. Le luminol s'active et émet de la lumière lorsque l'eau oxygénée est dégradée par la HRP. Cette émission de lumière (chémiluminescence) est mesurée par la caméra CCD du Las4000© (GE Healthcare Life Sciences). Pour pouvoir mesurer le contrôle de charge après la révélation de notre protéine d'intérêt, on lave notre membrane 3 fois dans du PBS-Tween pendant 5 min. L'anticorps utilisé pour le contrôle de charge est dirigé contre une protéine ubiquitaire. Au cours de ce mémoire, la protéine ubiquitaire choisie était ERK1/2 (Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2). L'intensité de chaque bande est mesurée grâce au programme QuantityOne (BioRad). Le rapport de la bande de la protéine d'intérêt sur la bande de la protéine ubiquitaire est effectué pour chaque échantillon afin d'évaluer les quantités relatives des protéines présentes dans chacun de ces échantillons.

Anticorps primaire	Clonalité	Origine animale	Cible	Dilution	Source commerciale	Temps et température d'incubation
N13 sc-133424	Polyclonal	Lapin	G0S2	1/600	Santa Cruz Biotechnology	3 heures à RT
M5670	Polyclonal	Lapin	Erk1/2	1/5000	Sigma-Aldrich	1 nuit à 4°C
TET01	Polyclonal	Lapin	TetR	1/1000	MoBitec	3 heures à RT
9271	Polyclonal	Lapin	Phospho-Akt	1/2000	Cell Signaling	1 nuit à 4°C
Anticorps secondaire	Clonalité	Origine animale	Cible	Dilution	Source commerciale	Temps et température d'incubation
P0217	Polyclonal	Porc	Lapin	1/2500	Dako	1 heure à RT
7074	Monoclonal	Chèvre	Lapin	1/2000	Cell Signaling	1 heure à RT

Tableau 3 : Anticorps primaires et secondaires utilisés en Western Blotting. Les fabricants sont Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Etats-Unis), Sigma-Aldrich (St-Louis, Etats-Unis), MoBiTec (Göttingen, Allemagne), Dako (Glostrup, Danemark) et Cell Signaling (Danvers, Etats-Unis). RT : Room Température (température ambiante).

ii. Dosage protéique BCA

La concentration en protéines des extraits sera déterminée à l'aide du Micro BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology) qui utilise l'acide bicinchoninique comme détecteur du Cu^{1+} qui est formé quand le Cu^{2+} est réduit par les protéines en milieu alcalin. Ce kit est utilisé pour doser des protéines à des concentrations allant de 0.5 à 200 $\mu\text{g/ml}$. La première étape consiste en la préparation des standards et des réactifs. Ensuite, on réalise une échelle BSA qui nous servira de référence lors de l'analyse des mesures d'absorbance. Pour cela, à partir du stock de BSA à 2 mg/ml , on réalise une première solution de 500 μl de BSA à concentration de 200 $\mu\text{g/ml}$. A partir de cette première solution, on réalise des dilutions (500 μl) à 100 $\mu\text{g/ml}$; 50 $\mu\text{g/ml}$; 20 $\mu\text{g/ml}$; 10 $\mu\text{g/ml}$; 5 $\mu\text{g/ml}$; 2 $\mu\text{g/ml}$ et 0 $\mu\text{g/ml}$. L'ensemble de ces solutions sont préparée dans de l'eau milliQ. On prépare ensuite le réactif en mélangeant les solutions MA, MB et MC du kit aux proportions 25 : 24 : 1. Le mélange de réactifs préparé ici est stable pendant un jour dans un récipient fermé. La dernière étape est la procédure en plaque 96 puits. On pipette 100 μl de chaque standard ou échantillon en duplicat et on dépose dans un puits. On ajoute 100 μl de réactif à chaque puits et on agite la plaque 30 secondes. On incube la plaque 2 heures à 37°C. On ramène à température ambiante. La plaque est placée dans le spectrophotomètre FilterMax F5 (Molecular Devices, Sunnyvale, Etats-Unis) et l'absorbance est mesurée à 562 nm.

c. Autres dosages

i. Dosage lactate

Ce dosage est basé sur la réaction présentée à la Figure 4. La lactate déshydrogénase (LDH) catalyse la transformation de lactate en pyruvate avec en parallèle la réduction de NAD^+ en $\text{NADH} + \text{H}^+$. Afin que la réaction soit complète, on ajoute du N_2H_2 à la réaction et au lieu de pyruvate, il y a formation de pyruvate-hydrazone. Dans ces conditions, la quantité de NADH mesurée par absorbance à 340 nm est proportionnelle au lactate présent dans l'échantillon.

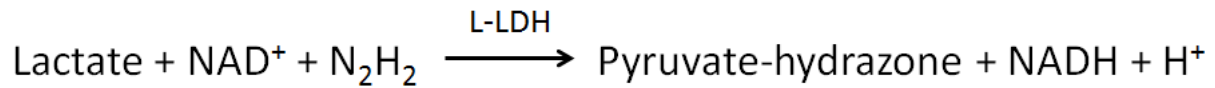


Figure 6 : Réaction permettant le dosage du lactate. Le lactate est transformé en pyruvate en même temps que le NAD^+ est réduit en $\text{NADH} + \text{H}^+$. Le pyruvate réagit avec le N_2H_2 où il y a formation de pyruvate-hydrazone. On mesure la quantité de NADH (qui est proportionnelle à la quantité de lactate) par absorbance à 340 nm.

Préparation du tampon de réaction. On met en solution 9.4g de glycine et 13g d'hydrazine que l'on ajuste à pH 9 avec du KOH 4N, puis on amène à 250ml. Ensuite, on prépare la solution de NAD^+ (N7004-1G, Sigma) en plaçant 17mg (suffisant pour 40 réactions) de NAD^+ dans 1 ml de tampon de réaction préparé au préalable. On réalise notre Mix de réaction en mélangeant 175 μl de tampon de réaction avec 25 μl de la solution de NAD^+ par réaction. Pour la courbe étalon, on prépare une solution stock de L-lactate (71718-10G, Sigma) à 200 mM en diluant 22.4 mg de L-lactate dans 1 ml de tampon de réaction. À partir de ce stock, on effectue des dilutions en série avec des solutions à 2.5 mM, 2 mM, 1.5 mM, 1 mM, 0.75 mM, 0.5 mM, 0.25 mM et 0 mM. Dans une plaque 96 puits, on dépose 200 μl de Mix de réaction. On ajoute 20 μl des dilutions de L-lactate pour la courbe étalon ou 20 μl d'échantillon par puits. On ajoute 20 μl d'une solution contenant 5 unités de L-lactate déshydrogénase [L-2500, Sigma] par puits. L'activité spécifique de la solution stock de L-LDH est de 200 unités/mg de protéines. La plaque est placée dans le spectrophotomètre FilterMax F5 et l'absorbance est lue toutes les 10 minutes pendant 30 minutes à 340 nm.

ii. Dosage du glycérol libre

Le « Glycerol Free Reagent kit » [F6428, Sigma] mesure le glycérol endogène libre en utilisant les mêmes réactions enzymatiques couplées sans l'hydrolyse initiale de la lipase. Le glycérol est phosphorylé par l'adénosine-5'-triphosphate (ATP) formant glycérol-1-phosphate (G-1-P) et l'adénosine-5'-diphosphate (ADP) dans la réaction catalysée par la glycérol kinase (GK). Le G-1-P est ensuite oxydé par la glycérol phosphate oxydase (GPO) en phosphate de dihydroxyacétone (DAP) et en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). La peroxydase (POD) catalyse la réaction de H₂O₂ avec la 4-aminoantipyrine (4-AAP) et la N-éthyl-N- (3-sulfopropyl) m-anisidine de sodium (ESPA) pour produire un colorant, la quinoneimine, qui présente un maximum d'absorbance à 540 nm.

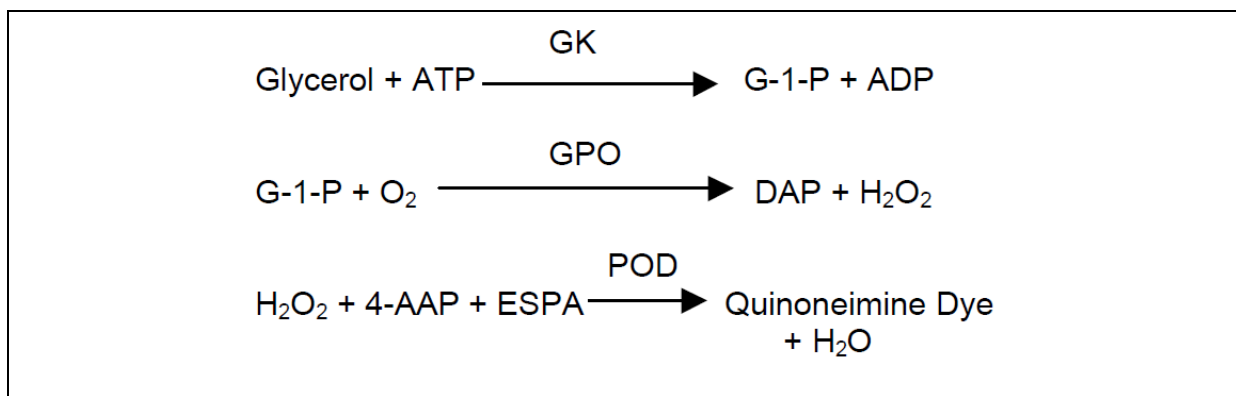


Figure 7 : réactions du Glycerol Free Assay (provenant de la data sheet du Glycerol Free Reagent de chez Sigma). Tous les composants sont fournis avec le kit à l'exception du glycérol.

Cette opération se déroule dans des plaques 6 puits de 3T3-L1 différenciées. On rince 2 fois les cellules par série de 3 puits maximum pour éviter le dessèchement avec 2 ml de DMEM sans rouge phénol. On doit pouvoir éliminer le rouge phénol car celui-ci interfère avec la mesure. Ensuite, on ajoute 500 µl par puits de DMEM sans rouge phénol + 0.2% de BSA [A3059, Sigma] et on laisse incuber pendant 1 heure à 37°C. On récupère les 500 µl de DMEM sans rouge phénol + 0.2% de BSA et on centrifuge 5 minutes à 5000 g. On récupère le surnageant et on congèle à -20°C si la mesure n'est pas faite directement. Il est préférable de filtrer le milieu DMEM sans rouge phénol + 0.2% de BSA afin d'éviter toute interférence de petites particules lors de la mesure d'absorbance. Ensuite, on réalise une échelle glycérol qui nous servira de standard lors de l'analyse des mesures d'absorbance. Pour cela, à partir du stock de glycérol à 2.8 mM, on réalise des solutions (100 µl) à 1 mM, 0.5 mM, 0.25 mM, 0.125 mM, 0.0625 mM, 0.03125 mM et 0 mM dans du milieu DMEM sans rouge phénol + 0.2% BSA. L'analyse s'effectuera en plaque 96 puits (Greiner Bio-One, Vilvoorde, Belgique). On dépose 10 µl par puits du blanc, des standards et des échantillons. On effectue ces mesures en duplicats. On ajoute ensuite 190 µL par puits du « Glycerol Free Reagent » reconstitué au préalable dans 40 ml d'eau milliQ. On laisse la plaque incuber 15 minutes à

température ambiante. On mesure ensuite l'absorbance dans le spectrophotomètre FilterMax F5 de chaque puits à 540 nm car la quinoneimine absorbe à cette longueur.

d. Analyse transcriptomique

i. Extraction de l'ARN

On utilise le kit High Pure RNA Isolation Kit (11828665001, Roche Molecular Biochemical) pour extraire l'ARN de nos cellules. Les cellules proviennent d'une plaque 6 puits ou d'un insert [657641] (CELLSTAR, Sigma-Aldrich) et un volume de 600 μ l d'une solution de lyse cellulaire [2/3 lysis/binding buffer du kit Roche et 1/3 PBS 1X] est ajouté dans chaque puits. Le kit contient des colonnes, sur lesquelles on dépose notre produit de lyse, qui sont capables de retenir les acides nucléiques. On centrifuge la colonne pendant 30 secondes à 8000g. Par après, on dépose un volume de 95 μ l d'une solution de DNase [90 μ l DNase I incubation buffer et 10 μ l DNase] sur la colonne et on laisse incuber pendant 15 minutes à RT afin de digérer l'ADN. Après, on effectue une série de 3 lavages. On dépose un volume de 500 μ l de « Wash Buffer I » sur la colonne et on la centrifuge 30 secondes à 8000 g pour le premier. Pour le second, on dépose un volume de 500 μ l de « Wash Buffer II » sur la colonne et on la centrifuge de nouveau pendant 30 secondes à 8000 g. On ajoute un volume de 200 μ l de « Wash Buffer II » pour terminer et on centrifuge la colonne pendant 2 minutes à 13000 g. Pour pouvoir décrocher l'ARN du filtre, on ajoute 60 à 100 μ l du tampon d'élution (H_2O désionisée pure et exempte d'enzymes dégradant l'ARN, appelée « RNase Free dH₂O ») sur la colonne et on centrifuge pendant 1 minute à 8000 g. L'ARN sera récupéré dans un eppendorf de 1.5 ml et conservé à -80°C. Le volume de tampon d'élution déposé dépend de la quantité d'ARN que l'on espère récupérer au final.

ii. Dosage de l'ARN

Le dosage de l'ARN en ng/ μ l est effectué en déposant 2 μ l de nos échantillons d'ARN sur le spectrophotomètre Nanodrop ND-1000 (ThermoFischer Scientific). Les acides nucléiques présentent un maximum d'absorbance à 260 nm tandis que les protéines et les carbohydrates présentent des maximums d'absorbance à 280 nm et 230 nm respectivement. Les 2 rapports DO260/DO280 et DO260/DO230 seront effectués pour pouvoir évaluer la pureté de nos échantillons et voir si ceux-ci ne contiennent pas de contamination extérieure. Le rapport DO260/DO280 nous indique une contamination en protéine et sa valeur pour une solution d'ARN pur doit être aux environs de 2. Le rapport DO260/230 nous indique une

contamination en carbohydrates et sa valeur pour une solution d'ARN pur doit être comprise entre 2 et 2.2. 2 µl de chaque échantillon doivent être déposés sur le spectrophotomètre pour pouvoir évaluer la quantité d'acides nucléiques après avoir fait une première mesure de blanc avec de l'eau désionisée et RNase free.

iii. Synthèse de l'ADNc

On utilise le kit PrimeScript™ RT Reagent Kit (Perfect Real Time) (RR037A, Clontech Laboratories, Inc., A Takara Bio Company, Kyoto, Japon) pour rétrotranscrire notre ARNm en ADNc afin de pouvoir étudier l'expression génique. Comme nos échantillons comprennent différentes concentrations en ARN, on a décidé d'utiliser une quantité d'1 µg d'ARN par échantillon à rétro-transcrire afin d'égaliser nos résultats. On dilue ce µg dans de l'eau RNase free pour arriver au final à 1 µg d'ARN dans un volume de 14 µl par échantillon. On y ajoute ensuite 2 µl d'une solution d'Oligo dT Primer (stock à 50 µM) pour arriver à une concentration finale de 5 µM. On y ajoute en plus 4 µl de 5X PrimeScript Buffer (for Real Time) contenant tous les éléments nécessaires à la rétro-transcription. Pour terminer, on ajoute 2 µl de PrimeScript RT Enzyme Mix I qui contient l'enzyme indispensable à la réaction. On installe nos tubes dans un thermocycleur (GeneAmp® PCRSystem 9700, Applied Biosystems, Foster City, Etats-Unis) et on effectue un programme qui consiste en une étape durant 15 min à 37°C pour la synthèse du brin d'ADNc par la polymérase, suivi d'une étape de 5 secondes à 85°C afin d'inactiver l'enzyme. Les tubes sont ensuite maintenus à 4°C en attendant d'être récupérés. L'ADNc est conservé à -20°C.

iv. RT-qPCR

Pour pouvoir quantifier l'expression d'un gène dans les différentes conditions de culture effectuées au cours de ce mémoire, la PCR en temps réel quantitative (RT-qPCR) a été utilisée. On utilise des amorces spécifiques de notre gène d'intérêt afin d'amplifier une partie de l'ADNc correspondant provenant des ADNc synthétisés lors de la dernière étape. On peut suivre l'amplification d'ADN double brin grâce un agent intercalant, le SYBR green, qui émet une fluorescence de longueur d'onde de 520 nm uniquement lorsqu'il se lie à de l'ADN double-brin. La fluorescence mesurée est proportionnelle à la quantité d'ADN double brin présente et donc à l'expression du gène d'intérêt. On mesure le nombre de cycles à partir duquel la courbe d'amplification des produits devient exponentielle (Ct ou « cycle threshold »). On a besoin d'un cycleur StepOne™ Real-Time PCR (Applied Biosystems) capable de mesurer l'émission de fluorescence pour la RT-qPCR. Pour une bonne

amplification de l'ADNc, il faut au préalable, pour chaque couple d'amorces utilisé, déterminer une concentration idéale en ADNc en effectuant une courbe de dilution en série. L'efficacité de l'amplification est calculée lors de cette expérience préliminaire par le programme et celle-ci doit être comprise entre 90 et 110 % avec une courbe de fusion correcte pour pouvoir valider les couples d'amorces. L'analyse de la courbe de fusion permet de détecter la présence de dimères d'amorces ou d'amplicons aspécifiques car la température de fusion (T_m) mesurée ici ne correspond pas à celle de la température de fusion pour les amplicons d'intérêt. De plus, lors de la représentation de la dérivée de la fluorescence en fonction de la température, on peut détecter de nombreux pics excédentaires généralement plus larges et présentant une T_m plus faible que la T_m attendue. On dilue nos échantillons dans de l'eau RNase free pour atteindre un volume final de 5 ng d'ADNc dans un volume de 2 μ l une fois les conditions établies. Le mix PCR est composé de 4 μ l d'eau RNase free, 10 μ l de MESA GREEN qPCR Master Mix Plus for SYBR[®] Assay I dTTP 2X (Eurogentec), 2 μ l de chaque amorce à une concentration finale de 100 nM chacune (stock à 1 μ M) et de nos 2 μ l d'ADNc. Les résultats reprenant les Ct's sont analysés par l'intermédiaire du programme StepOne[™] (ThermoFisher Scientific). On utilise un gène ubiquitaire dont l'expression ne varie pas entre les échantillons tel que le gène 36B4 aussi appelé RPLP0 Ribosomes pour pouvoir normaliser les résultats. La liste des amorces est reprise au Tableau 4.

Nom des amorces	Longueur (b)	Séquence		Quantité d'ADNc
		« Forward »	« Reverse »	
G0S2	59	TTC AAG GTG CCA CCG AAT	GTC CCA GAC CCC TTA GGT GA	5 ng
ATGL	62	GCC ATG ATG GTG CCC TAT ACT C	AAC AAG CGG ATG GTG AAG GA	5 ng
HSL	55	GGA GCA CTA CAA ACG CAA CGA	GGC CAC CGG TAA AGA GGG AAC	5 ng
36B4	189	GCA GAC AAC GTG GGC TCC AAG CAG AT	GGT CCT CCT TGG TGA ACA CGA AGC CC	5 ng
CGI-58 (ABHD5)	58	CGA TCC TGC ATA GAT GGC AAC	AGG ACT TCG GTC GCA GTG AC	5 ng

Tableau 4 : Amorces et quantités d'ADNc utilisées en fonction de chaque amorce en qRT-PCR

e. Analyses statistiques

Tous les tests statistiques de ce mémoire ont été réalisés grâce au programme Microsoft Office Excell 2007 (Microsoft, Redmond, Etats-Unis). Une analyse de la variance (ANOVA) nous a permis de comparer les différents échantillons non appariés. Une valeur de p inférieure à 0.05 est considérée comme statistiquement significative où $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$.

4. Résultats

a. Différenciation in vitro des 3T3-L1

Les photos prises au microscope à fluorescence de la Figure 8 ont été réalisées sur des cellules 3T3-L1 après 12 jours de différenciation dans une plaque 6 puits dans du milieu DMEM enrichi en dbcAMP, dexaméthasone et insuline lors des 2 premiers jours de différenciation et seulement en insuline lors des 10 derniers jours. Les cellules se différencient donc au stade de pré-adipocytes (couleur rouge Fig 8A et 8C) car celles-ci possèdent de nombreuses petites vacuoles lipidiques et non une seule grosse comme on pourrait l'observer sur des adipocytes matures. De plus, lorsque les adipocytes sont considérés comme matures, le noyau est repoussé en périphérie et écrasé par l'unique énorme gouttelette lipidique. Or ici, le noyau se trouve encore au centre des cellules (couleur bleue Fig 8B et 8C). Les cellules 3T3-L1 utilisées tout au long des manipulations de ce mémoire seront donc considérées comme un modèle de pré-adipocytes et non d'adipocytes matures.

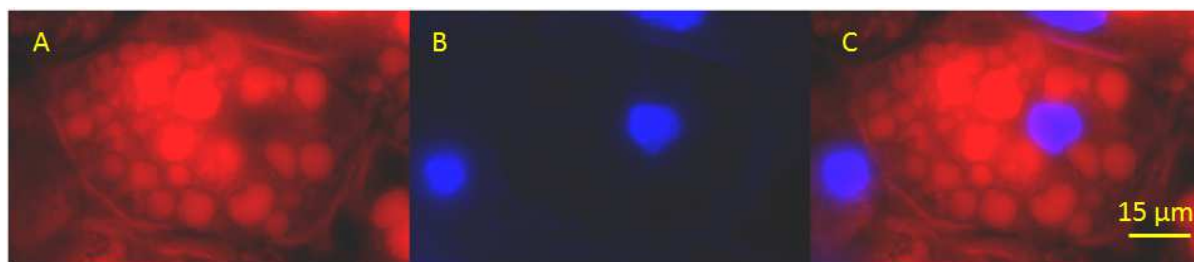


Figure 8 : photos au microscope à fluorescence de 3T3-L1 différenciées marqués au DAPI et au Nile Red. A : marquage au Nile Red des composés lipophiles. B : marquage des noyaux au DAPI. C : superposition des deux images. (grossissement 600X)

b. Co-culture d'adipocytes et de cellules cancéreuses

i. Expression des gènes régulateurs de la lipolyse

En premier, nous nous sommes intéressés à l'expression des gènes impliqués dans la lipolyse au niveau de cellules 3T3-L1 en co-culture avec des cellules PC3 (cellules humaines d'adénocarcinome prostatique) afin de mettre en évidence des mécanismes potentiels de régulation de la lipolyse chez les adipocytes interagissant avec des cellules tumorales. En effet, il a été rapporté dans la littérature que les taux de lipolyse observés dans des adipocytes proches des cellules tumorales sont plus élevés que dans des adipocytes entourés de tissus normaux. Les cellules 3T3-L1 ont été différenciées pendant 10 jours dans des plaques 6 puits

avant d'être co-cultivées pendant 24h ou 72h avec des cellules PC3 ensemencées dans un insert (Figure 9).

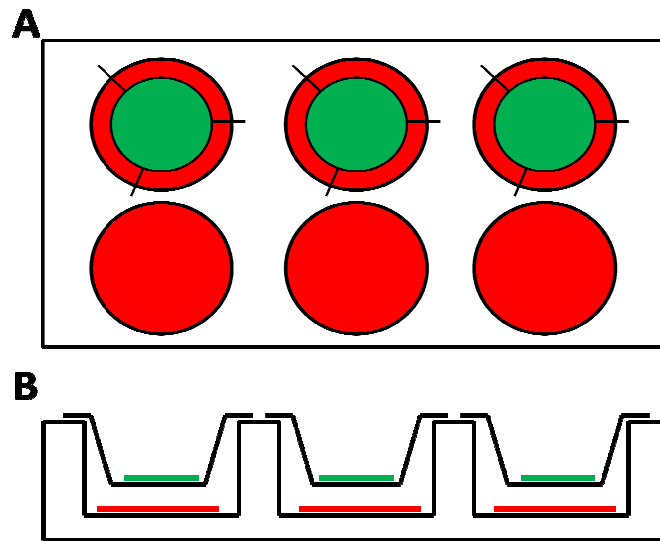


Figure 9 : Exemple de co-culture. **A** : vue aérienne d'une plaque 6 puits avec les inserts contenant les cellules PC3 (en vert) déposés sur les cellules 3T3-L1 (en rouge) au dessus et les cellules 3T3-L1 contrôles en dessous sans inserts. **B** : vue de face de la plaque 6 puits décrite au point A.

Une fois que l'ensemble des ARNs a été collecté et que leur ADNc a été synthétisé, nous avons analysé l'expression de 4 gènes: G0S2, ATGL, HSL et CGI-58 (Figure 10). L'expression du gène 36B4 nous sert de contrôle. L'expression de G0S2 représente 0.6 et moins de 0.2 fois son expression de base pour 24h et 72h de co-culture respectivement. L'expression d'ATGL représente 0.6 et 0.4 fois son expression de base pour 24h et 72h respectivement. L'expression de HSL représente 0.6 et 0.2 fois son expression de base pour 24h et 72h respectivement. L'expression de CGI-58 diminue dans des proportions assez semblables à celles d'ATGL. Pour la suite des manipulations, nous nous sommes penchés sur l'expression de ces gènes en différentes conditions mais nous nous sommes surtout attardés sur l'expression protéique de G0S2, car celui-ci verrouille la première étape de la dégradation du TAG qui en est aussi l'étape limitante.

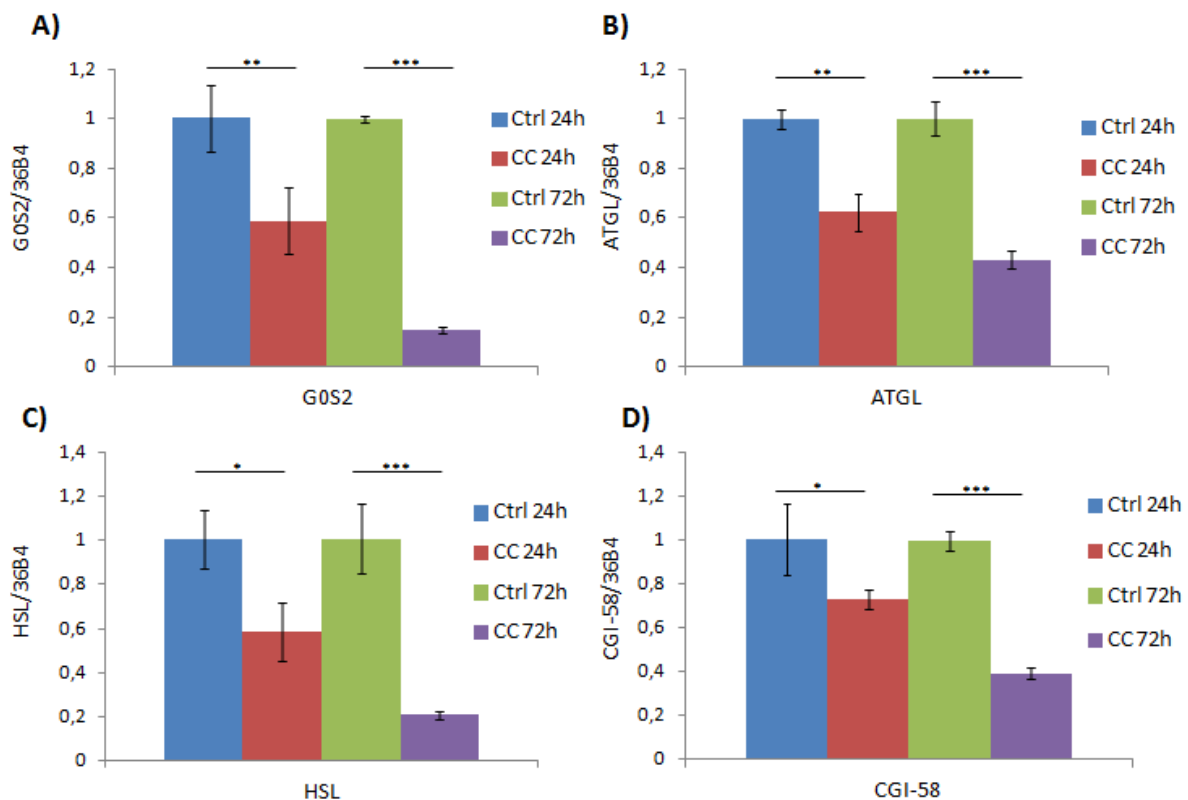


Figure 10 : Evaluation de l'expression des gènes régulateurs de la lipolyse par RT-qPCR dans des cellules 3T3-L1 en co-cultures avec des cellules PC3. A) Expression de GOS2, 24h $**p=0.0044$; 72h $***p<0.0001$. B) Expression d'ATGL, 24h $**p=0.0015$; 72h $***p=0.0002$. C) Expression de HSL, 24h $*p=0.0186$; 72h $***p=0.0009$. D) Expression de CGI-58, 24h $*p=0.0191$; 72h $***p<0.0001$. Les colonnes bleues et vertes représentent des cellules 3T3-L1 contrôles cultivées sans la présence de cellules PC3 et les colonnes rouges et mauves représentent les cellules mises en présence de cellules cancéreuses. Les temps d'incubation ont été réalisés sur 24h (sur la gauche des graphiques) et sur 72h (sur la droite des graphiques). La moyenne \pm l'écart-type est représentée. L'expression du gène 36B4 sert à effectuer les rapports gène d'intérêt/36B4 afin d'évaluer l'expression relative de nos différents gènes d'intérêt. Les différentes colonnes expriment le facteur d'induction par rapport au contrôle.

c. Etude de l'effet de la diminution du pH sur la lipolyse

Nous avons remarqué que le milieu de culture s'acidifiait beaucoup plus au cours de la co-culture. De plus, il est bien établi que le pH du microenvironnement tumoral est acide et peut atteindre des valeurs inférieures à 6. C'est pourquoi nous avons voulu étudier l'influence du pH sur l'expression de ces gènes. Nous avons donc décidé de cultiver des cellules 3T3-L1 en faisant varier le pH et d'analyser l'expression des mêmes gènes par qRT-PCR ainsi que l'expression de la protéine GOS2 par Western Blotting. Les cellules 3T3-L1 ont été différenciées en pré-adipocytes pendant 10 jours sur des plaques 6 puits, puis nous avons mis du milieu DMEM à différents pH (7.4 pour le contrôle et 6.5 pour mimer l'effet des cellules cancéreuses sur le milieu) et incubé pendant 24h.

i. Expression des gènes régulateurs de la lipolyse après une diminution du pH

La mesure de l'expression des ARNm dans des 3T3-L1 différenciées cultivées à pH acide nous a permis de mettre en évidence plusieurs points intéressants. Tout d'abord, en ce qui concerne l'expression de G0S2, celle-ci diminue fortement lorsque le pH s'acidifie en passant à environ un cinquième de sa valeur en condition contrôle comme illustré dans la Figure 11. L'acidification du milieu par les cellules cancéreuses PC3 pourrait donc expliquer cette diminution relative de l'expression de G0S2. Au contraire, nous remarquons que l'expression d'ATGL augmente avec l'acidification du milieu et passe de 1 à ± 1.3 . Ce résultat ne correspond pas aux mesures effectuées dans des 3T3-L1 co-cultivées avec des cellules cancéreuses et nous permet de dire que la diminution relative de l'expression d'ATGL lors des co-cultures n'est pas due uniquement à l'acidification du milieu mais implique probablement d'autres mécanismes. Pour l'expression de HSL, celle-ci diminue d'environ 50% lorsque le milieu s'acidifie. L'activateur CGI-58 tombe jusqu'à 40% de sa valeur initiale lorsque le pH s'acidifie. Ce résultat est en corrélation avec le résultat de la co-culture sur 24h. L'acidification du milieu pourrait donc être à la base de la diminution de l'expression relative de G0S2 et HSL mais pas à la base de la diminution d'ATGL comme nous l'avons observé lors des co-cultures sur 24 et 72h.

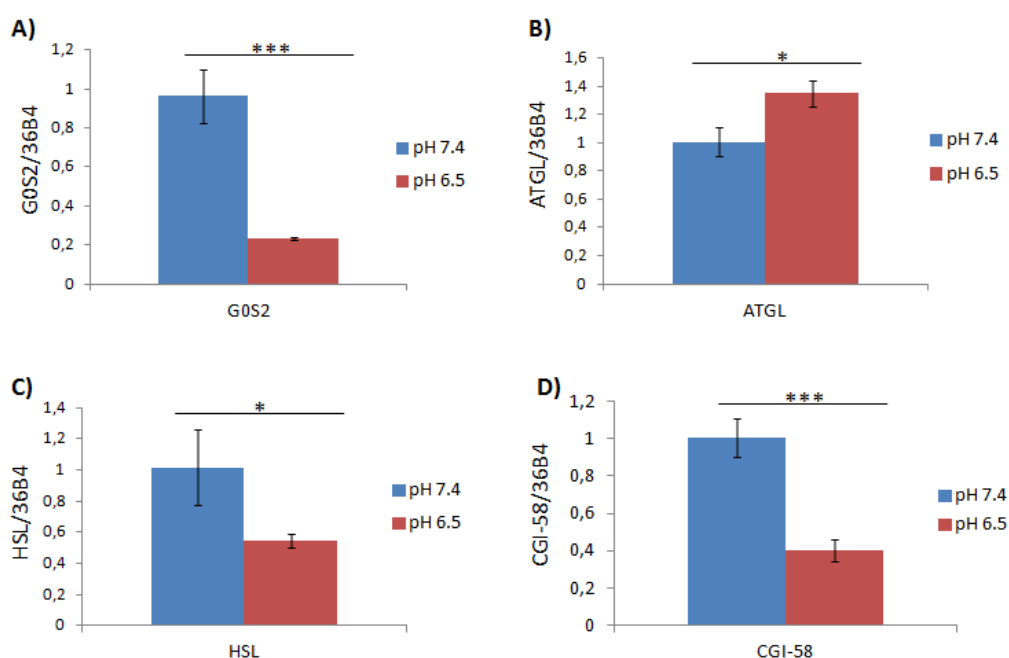


Figure 11 : Evaluation de l'expression des gènes régulateurs de la lipolyse par RT-qPCR dans des cellules 3T3-L1 cultivées à différents pH. A) Expression de G0S2, *** $p=0.0007$. **B)** Expression d'ATGL, * $p=0.0117$. **C)** Expression de HSL, * $p=0.0296$. **D)** Expression de CGI-58, *** $p=0.00099$. Les colonnes bleues représentent des cellules 3T3-L1 contrôles avec du DMEM à pH 7.4 et les colonnes rouges représentent les cellules cultivées avec du DMEM à pH 6.5. Les temps d'incubation ont été réalisés sur 24h. La moyenne \pm l'écart-type est représentée. L'expression du gène 36B4 sert à effectuer les rapports gène

d'intérêt/36B4 afin d'évaluer l'expression relative de nos différents gènes d'intérêt. Les différentes colonnes expriment le facteur d'induction par rapport au contrôle.

ii. Effet de la diminution du pH sur l'expression protéique de G0S2

Un Western Blotting a été effectué après avoir extrait les protéines des cellules 3T3-L1. L'anticorps anti-G0S2 révèle la protéine G0S2 qui a un poids moléculaire d'environ 11 kDa (Figure 12A). La protéine Erk1/2 est visualisée à 42 et 44 kDa et sert de contrôle de chargement. On peut voir que la culture 24h à pH 6.5 suffit déjà à diminuer fortement l'expression de la protéine G0S2 (Figure 12B). L'expression passe de 0.9 pour le contrôle à environ 0.25 pour le pH 6.5 sur une période de 24h. La diminution d'expression génique observée à pH acide est accompagnée d'une diminution de la concentration en protéine en corrélation avec les résultats de la qRT-PCR du point c.i.

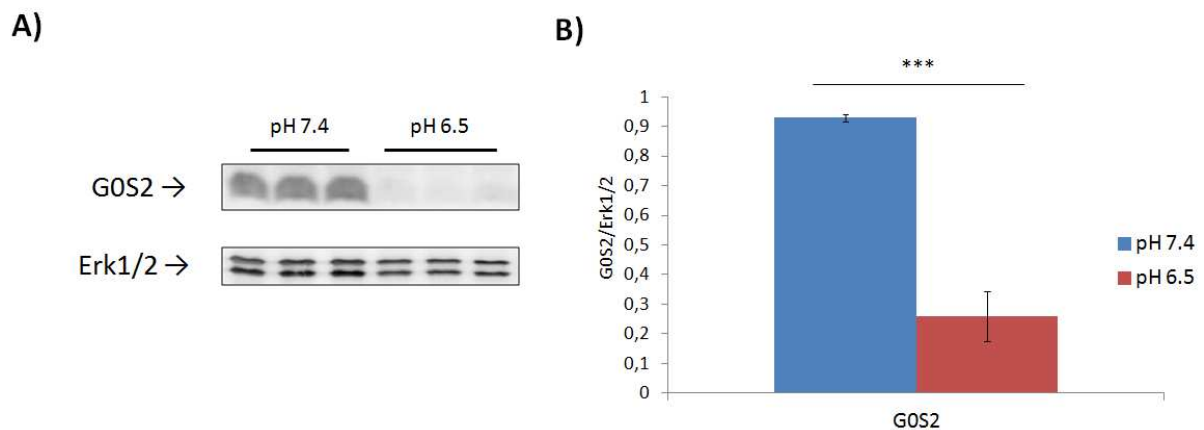


Figure 12 : Expression de G0S2 dans des cellules 3T3-L1 déterminée par Western Blotting à différents pH. A) Les cellules ont été traitées 24h avec du DMEM complet à différents pH (soit à pH 7.4 comme contrôle, soit à pH 6.5). La protéine Erk1/2 sert de contrôle de dépôt. **B)** Quantification de l'expression de G0S2 dans des cellules 3T3-L1 traitées comme au point A). La moyenne \pm l'écart-type est représentée. *** $p=0.00017$.

iii. Dosage en glycérol libre après diminution du pH

Le dosage en glycérol libre dans le milieu extracellulaire permet d'estimer le taux de lipolyse dans nos cultures de cellules. Lors d'études précédentes (19), il avait été montré que le taux de lipolyse augmentait lorsque des adipocytes étaient en contact avec le microenvironnement des cellules cancéreuses. Comme on a observé une diminution de l'inhibiteur G0S2 mais aussi de l'activateur CGI-58 lors de l'acidification du microenvironnement, nous avons décidé de mesurer l'effet global des régulations géniques en effectuant une mesure de la quantité d'un produit de la lipolyse dans le milieu de culture des cellules 3T3-L1 cultivées à pH acide. On mesure à l'aide d'un test enzymatique (détaillé dans le matériel et méthodes) la concentration de glycérol libre dans le milieu de culture que l'on a

laissé incubé pendant 1 heure sur des pré-adipocytes qui étaient cultivés dans des milieux DMEM à différents pH. Comme le montre la Figure 13, la concentration de glycérol, qui est directement proportionnelle au taux de lipolyse, est beaucoup plus élevée pour les cellules cultivées à pH acide. Cela pourrait s'expliquer par le fait que la protéine G0S2, inhibiteur spécifique d'ATGL, est fortement réprimée lorsque l'on se trouve à un pH plus acide (Figure 11).

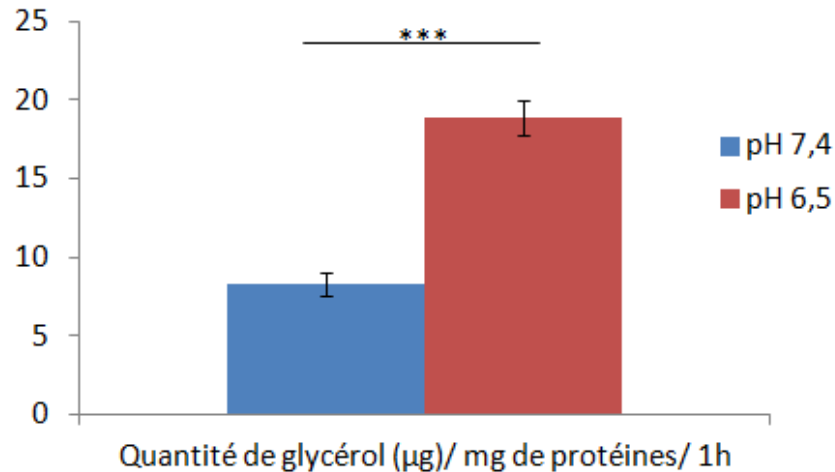


Figure 13 : Quantité de glycérol libre dans le milieu produit par les cellules 3T3-L1 cultivées à différents pH. Les cellules ont été traitées 24h avec du DMEM complet à différents pH (soit à pH 7.4 comme contrôle, soit à pH 6.5). Le taux de glycérol libre a ensuite été mesuré grâce à 500 µl de DMEM sans rouge phénol + 0.2% BSA déposé sur les cellules pendant 1h. La moyenne \pm l'écart-type est représentée. *** $p=0.0002$.

d. Estimation du taux de production de lactate après diminution du pH

Nous mesurons le taux de production de lactate pour pouvoir estimer le taux de glycolyse. Dans les cellules 3T3-L1, la glycolyse contribue à l'accumulation de TAG (56) car les cellules utilisent le glucose en partie pour pouvoir synthétiser leur stock d'acides gras notamment sous forme de TAG. Les cellules 3T3-L1 étant fortement glycolytiques, des taux de production de lactate assez élevés sont généralement observés (56). Le taux de lactate dans le milieu extracellulaire a été mesuré après que les cellules aient été incubées 24h dans des milieux DMEM à différents pH (Figure 14). La production de lactate passe d'environ 15 mg / mg de protéines sur 24h pour les cellules 3T3-L1 à pH 7.4 à 1.5 mg / mg de protéines sur 24h pour les cellules cultivées à pH 6.5. La quantité de lactate produit par les cellules en condition contrôle correspond à une concentration d'environ 1.5 mM. Le fait que la production de lactate soit autant réduite en condition acide s'expliquerait par un blocage pratiquement complet de la glycolyse avec la diminution du pH. Ce blocage de la glycolyse en condition

acide nous fait donc penser que le même phénomène devrait se produire lors de nos expériences de co-cultures et va donc nous amener à tester des inhibiteurs de la glycolyse pour vérifier si l'inhibition de la glycolyse mime les régulations observées à pH acide.

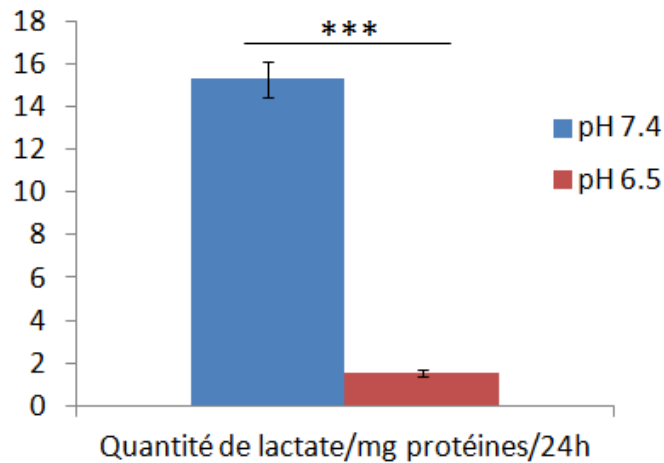


Figure 14 : Production de lactate dans des cellules 3T3-L1 cultivées à différents pH. Les cellules ont été traitées 24h avec du DMEM complet à différents pH (soit à pH 7.4 comme contrôle, soit à pH 6.5). Le taux de lactate a été mesuré par rapport à l'absorbance du milieu de culture recueilli après 24h d'incubation dans des milieux à différents pH. L'axe des ordonnées représente la quantité de lactate en mg. *** $p < 0.00001$.

e. Effet du blocage de la glycolyse sur la lipolyse

Le deuxième paramètre que nous avons voulu tester était le blocage de la glycolyse. Pour cela, nous avons utilisé des concentrations croissantes de 2DG (2-déoxy-D-glucose), une molécule analogue au glucose ayant le groupement 2-hydroxyle remplacé par un hydrogène et ne pouvant donc pas subir la glycolyse. Il s'agit d'un inhibiteur allostérique de l'hexokinase et d'un inhibiteur compétitif de la glucose-6-phosphate isomérase, 2 enzymes de la glycolyse.

i. Expression des gènes régulateurs de la lipolyse après blocage de la glycolyse

L'analyse des résultats de l'expression des ARNm des différentes protéines de la lipolyse est assez semblable à celle obtenue lors des expériences de co-cultures. Les concentrations de 2 mM, 5 mM et 10 mM induisent une diminution de l'expression de G0S2 en la faisant passer d'une valeur relative de 1 à 0.6, 0.2 et 0.1 respectivement (Figure 15). Pour ATGL, l'expression diminue en passant de 1 à 0.5, 0.35 et 0.35 pour des concentrations de 2, 5 et 10 mM. Ici, le blocage de la glycolyse induit bien une diminution de l'expression d'ATGL comme il avait été observé lors des expériences de co-cultures. Pour l'expression de HSL, celle-ci diminue aussi en passant de 1 à 0.6, 0.35 et 0.2 pour des concentrations de 2, 5 et 10 mM en 2DG. L'expression de CGI-58 diminue légèrement par rapport aux autres protéines mais cependant il semble y avoir un effet semblable à celui que

l'on peut observer avec la diminution de l'expression d'ATGL où on observe un effet maximal pour une concentration en 2DG comprise entre 2 et 5 mM. Le blocage de la glycolyse provoqué par le 2DG induit une diminution de l'expression relative des protéines de la lipolyse comme nous l'avons observé lors des expériences de co-cultures. En plus de diminuer l'expression de G0S2, HSL et CGI-58, ce blocage diminue aussi l'expression d'ATGL contrairement aux expériences où nous avons acidifié le milieu. La diminution de l'expression d'ATGL serait donc potentiellement due non pas à la diminution du pH ou au blocage de la glycolyse mais probablement à un autre effet provoqué par le 2DG. Celui-ci est capable d'affecter la n-glycosylation des protéines et donc d'empêcher la synthèse de glycoprotéines ce qui pourrait affecter l'expression d'ATGL.

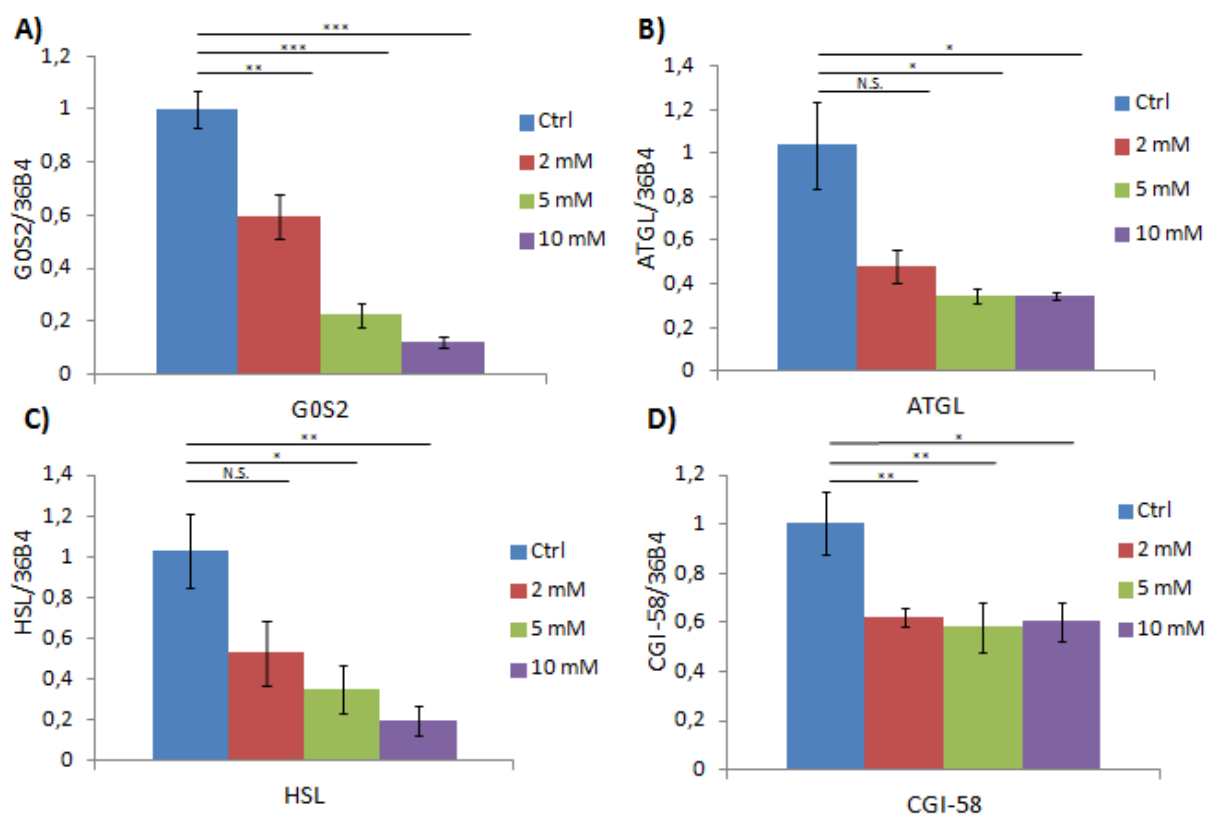


Figure 15 : Evaluation de l'expression des gènes régulateurs de la lipolyse par RT-qPCR dans des cellules 3T3-L1 cultivées à différentes concentrations en 2DG. A) Expression de G0S2, Ctrl vs 2mM $**p=0.0098$; Ctrl vs 5 mM $***p=0.0009$; Ctrl vs 10 mM $***p=0.0005$. **B)** Expression d'ATGL, Ctrl vs 2 mM N.S. ; Ctrl vs 5 mM $*p=0.0249$; Ctrl vs 10 mM $*p=0.0251$. **C)** Expression de HSL, Ctrl vs 2 mM N.S. ; Ctrl vs 5 mM $*p=0.0115$; Ctrl vs 10 mM $**p=0.0042$. **D)** Expression de CGI-58, Ctrl vs 2mM $**p=0.0071$; Ctrl vs 5 mM $**p=0.0063$; Ctrl vs 10 mM $*p=0.0119$. Les temps d'incubation ont été réalisés sur 24h. La moyenne \pm l'écart-type est représentée. L'expression du gène 36B4 sert à effectuer les rapports gène d'intérêt/36B4 afin d'évaluer l'expression relative de nos différents gènes d'intérêt. Les différentes colonnes expriment le facteur d'induction par rapport au contrôle.

ii. Expression protéique de G0S2 après blocage de la glycolyse

Comme l'expression de l'ARNm de G0S2 était fortement diminuée, nous avons décidé de vérifier par Western Blotting si son niveau protéique était régulé de la même façon avec des concentrations croissantes en 2DG (Figure 16). Une fois de plus, nous observons une diminution de l'expression de la protéine G0S2 où les ratios passent de 1.15 à 0.75, 0.5 et 0.2 pour des concentrations de 2, 5 et 10 mM de 2DG respectivement. Comme nous le suspicions, l'expression protéique est donc affectée par ce blocage de la glycolyse qui diminue l'expression relative de l'ARNm de G0S2.

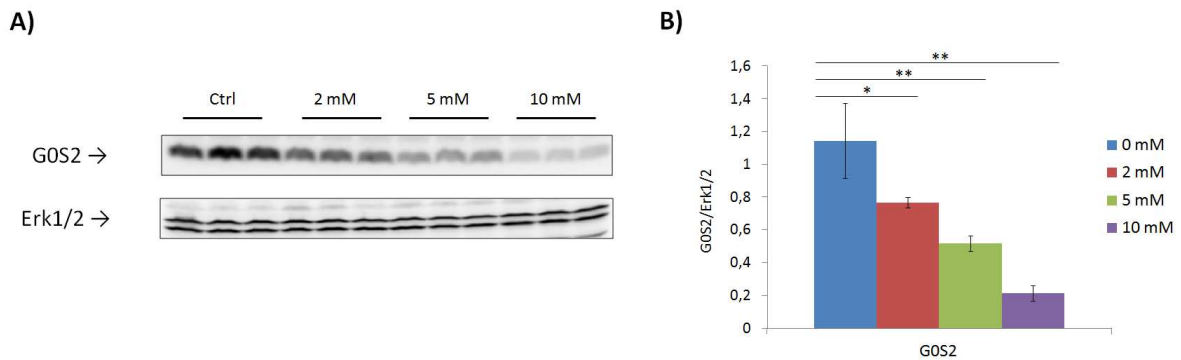


Figure 16 : Effet de l'inhibition de la glycolyse sur l'expression de la protéine G0S2 dans des cellules 3T3-L1. A) Les cellules ont été traitées 24h avec du DMEM complet sans 2DG (Ctrl) ou avec des concentrations croissantes en 2DG (2, 5 ou 10 mM). La protéine Erk1/2 sert de contrôle de dépôt. B) Quantification de l'expression de G0S2 dans des cellules 3T3-L1 traitées comme au point A). La moyenne \pm l'écart-type est représentée. Ctrl vs 2 mM $*p=0.0478$; Ctrl vs 5 mM $**p=0.0099$; Ctrl vs 10 mM $**p=0.0023$.

f. Mesure du taux de phosphorylation d'Akt après diminution du pH

La diminution de pH pourrait altérer la signalisation au niveau de la voie PI3K/Akt et empêcher l'inhibition du facteur FOXO1 qui peut réguler l'expression de G0S2 et ATGL (57). Si Akt n'est pas phosphorylé et activé, celui-ci ne pourra donc pas réguler FOXO1. Nous avons donc vérifié par Western Blotting si le taux de phosphorylation d'Akt pouvait être régulé par le pH (Figure 17). Une diminution de la phosphorylation d'Akt d'environ 50% a été observée lorsque le pH diminue, ce qui suggère un défaut d'activation d'Akt qui pourrait expliquer pourquoi l'expression de protéines tels que G0S2 s'éteint avec la diminution du pH.

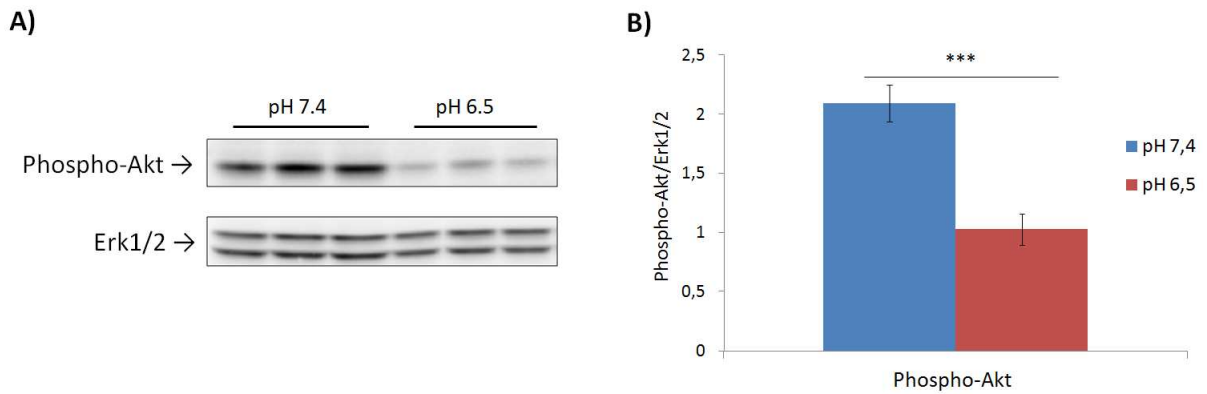


Figure 17 : Expression de phospho-Akt dans des cellules 3T3-L1 déterminée par Western Blotting à différents pH. A) Les cellules ont été traitées 24h avec du DMEM complet à différents pH (soit à pH 7.4 comme contrôle, soit à pH 6.5). La protéine Erk1/2 sert de contrôle de dépôt. **B)** Quantification de l'expression de phospho-Akt dans des cellules 3T3-L1 traitées comme au point A). La moyenne \pm l'écart-type est représentée. *** $p=0.0008$.

g. Etude de l'effet du blocage de la voie PI3K/Akt kinase sur la lipolyse

Afin d'évaluer directement l'implication de la voie PI3K/Akt kinase dans la régulation de G0S2, nous avons utilisé un inhibiteur pharmacologique spécifique de cette voie, le LY294. Des cultures de 3T3-L1 ont ensuite été réalisées avec des concentrations croissantes en LY294.

i. Expression des gènes régulateurs de la lipolyse après blocage de la voie PI3K/Akt kinase

Sur l'ensemble des gènes régulateurs de la lipolyse dont l'expression a été mesurée, seul G0S2 a présenté une diminution significative de son expression. Les 3 autres gènes, ATGL, HSL et CGI-58 ont tous présenté une légère diminution généralement non-significative avec l'augmentation de la concentration en LY294 dans le milieu. G0S2 est affecté par l'inhibition de la voie PI3K/Akt tandis que l'expression des autres gènes ne l'est pas significativement. Le blocage de la voie PI3K/Akt semble reproduire partiellement les effets induits par l'acidification du pH sur l'expression des gènes régulateurs de la lipolyse. Il faut seulement faire attention à ces résultats car certains écarts-types se révèlent assez importants (Figure 18).

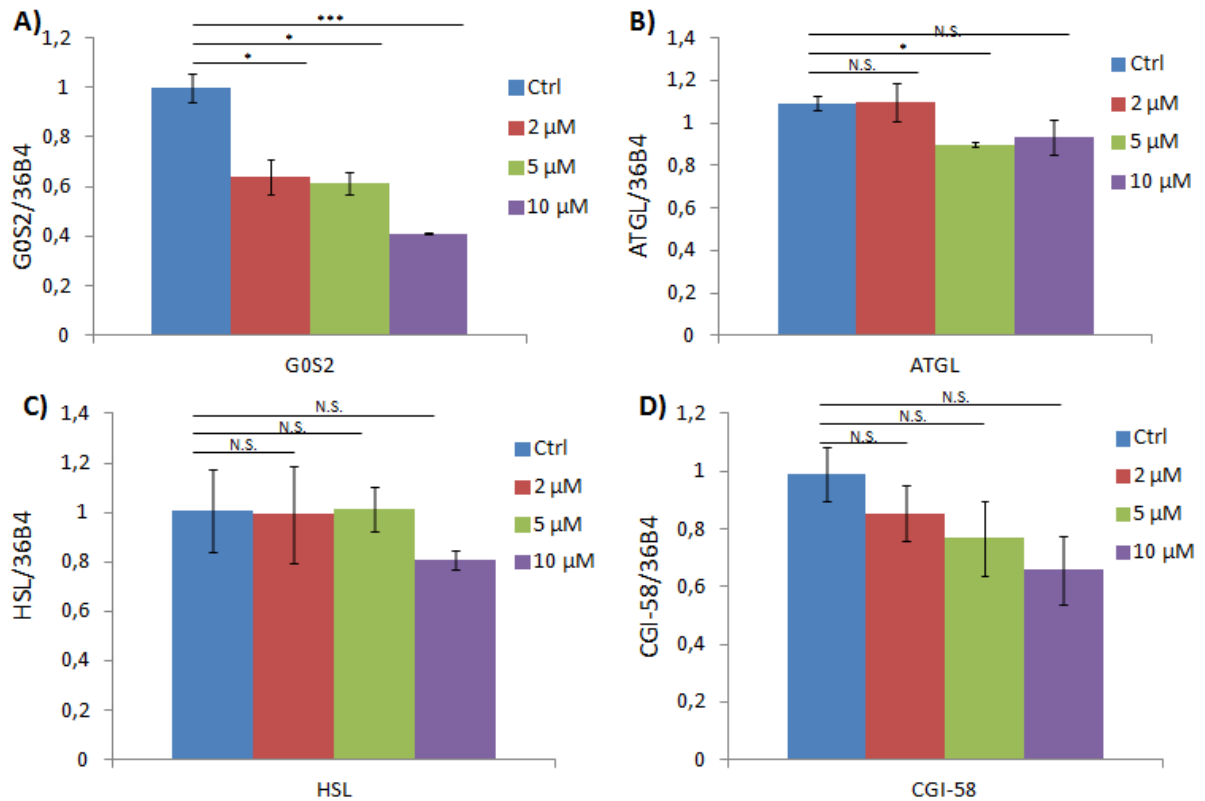


Figure 18 : Evaluation de l'expression des gènes régulateurs de la lipolyse par RT-qPCR dans des cellules 3T3-L1 cultivées à différentes concentrations en LY294. A) Expression de G0S2, Ctrl vs 2μM * $p=0.0376$; Ctrl vs 5 μM * $p=0.0175$; Ctrl vs 10 μM *** $p<0.0001$. **B)** Expression d'ATGL, Ctrl vs 2 μM N.S. ; Ctrl vs 5 μM * $p=0.0472$; Ctrl vs 10 μM N.S.. **C)** Expression de HSL, Ctrl vs 2 μM N.S. ; Ctrl vs 5 μM N.S.; Ctrl vs 10 μM N.S.. **D)** Expression de CGI-58, Ctrl vs 2μM N.S.; Ctrl vs 5 μM N.S.; Ctrl vs 10 μM N.S.. La moyenne \pm l'écart-type est représentée. L'expression du gène 36B4 sert à effectuer les rapports gène d'intérêt/36B4 afin d'évaluer l'expression relative de nos différents gènes d'intérêt. Les différentes colonnes expriment le facteur d'induction par rapport au contrôle.

ii. Expression protéique de G0S2 après blocage de la voie PI3K/Akt kinase

Les résultats ici nous montrent que l'augmentation de la concentration en LY294 dans le milieu engendre une diminution progressive de l'expression protéique de G0S2. L'expression protéique passe de 0.45 pour le contrôle à 0.35, 0.2 et 0.07 pour une concentration respective en LY294 de 2, 5 et 10 μM (Figure 19). L'inhibition de la voie PI3K/Akt est donc suffisante pour diminuer l'expression de G0S2.

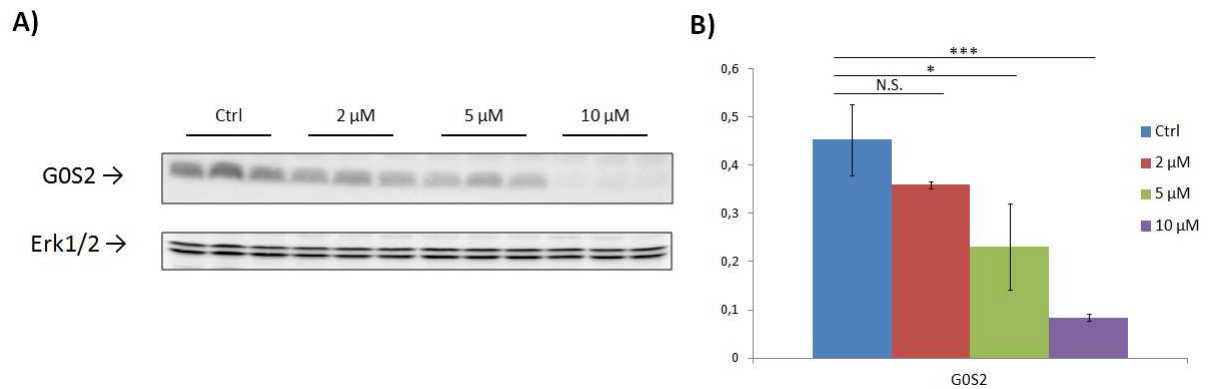


Figure 19 : Effet de l'inhibition de la voie PI3K/Akt sur l'expression de GOS2 dans des cellules 3T3-L1. A) Les cellules ont été traitées 24h avec du DMEM complet sans LY294 (Ctrl) ou avec une concentration croissante en LY294 (2, 5 ou 10 mM). Les cellules du Ctrl sont traitées avec du DMSO seul comme le LY294 est conservé dans du DMSO. La protéine Erk1/2 sert de contrôle de dépôt. **B)** Quantification de l'expression de GOS2 dans des cellules 3T3-L1 traitées comme au point A). La moyenne \pm l'écart-type est représentée. Ctrl vs 2 μ M N.S. ; Ctrl vs 5 μ M * $p=0.0291$; Ctrl vs 10 μ M *** $p=0.0009$.

h. Etude de l'effet d'une diminution du rapport ATP/AMP sur l'expression de gènes régulant la lipolyse

Le dBcAMP est un analogue de cAMP résistant aux phosphodiésterases (PDE1, 2, 3, 4, 7, 8, 10 et 11). L'intérêt d'un milieu supplémenté en dBcAMP est donc de maintenir une concentration plus élevée constante en cAMP dans les cellules. Étant donné que la glycolyse à pH acide est presque complètement bloquée et que les cellules 3T3-L1 sont fortement glycolytiques, la production d'ATP pourrait être diminuée et donc le rapport ATP/AMP diminuerait également. On simule donc un rapport ATP/AMP faible ici en rajoutant du dBcAMP.

i. Expression des gènes régulateurs de la lipolyse

L'ajout de dBcAMP dans le milieu induit des régulations d'expression de gènes proches de celles observées lors des cultures à pH acide. En effet, l'expression relative de l'ARNm de GOS2 passe de 1 dans le contrôle à environ 0.05 en présence de dBcAMP (Figure 20). Il s'agit du taux le plus bas que l'on ait pu observer jusqu'ici. Ensuite, pour l'expression de l'ARNm d'ATGL, on passe d'un taux relatif d'expression de 1 pour le contrôle à 0.35 en présence de dBcAMP ce qui est de nouveau une différence assez forte. L'expression de l'ARNm de HSL est également fortement diminuée et passe de 1 pour le contrôle à un peu plus de 0.2 pour 0.5 mg/ml. L'expression de CGI-58 ne semble pas autant affectée que l'expression des autres gènes avec une diminution d'environ 30% en présence de dBcAMP. Il

semble donc que l'abaissement du rapport ATP/AMP mime, au moins en partie, les régulations d'expression génique observée suite à l'acidification du milieu de culture.

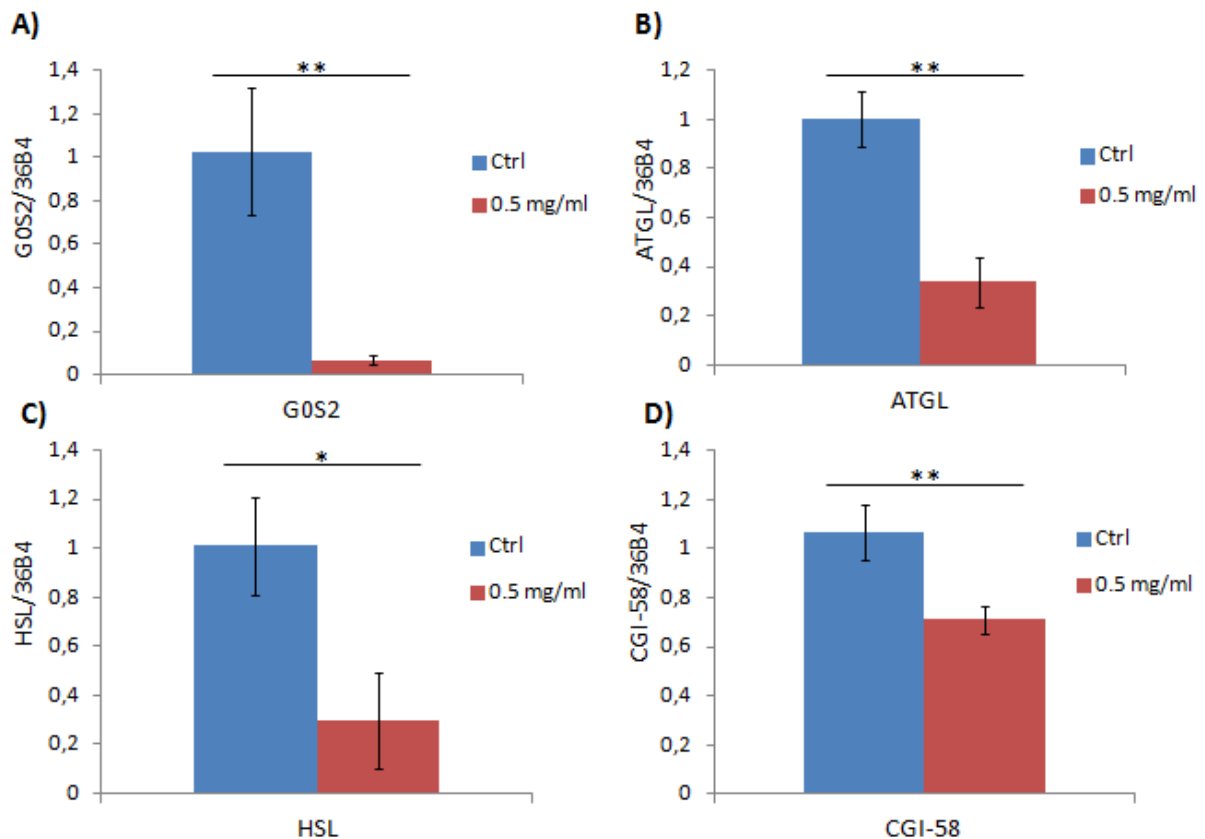


Figure 20 : Evaluation de l'expression des gènes régulateurs de la lipolyse par RT-qPCR dans des cellules 3T3-L1 cultivées à différentes concentration en dBcAMP. A) Expression de GOS2, ** $p=0.0049$. B) Expression d'ATGL, ** $p=0.0015$. C) Expression de HSL, * $p=0.0281$. D) Expression de CGI-58, ** $p=0.0083$. Les différentes concentrations en dBcAMP dans le milieu sont représentées par les différentes couleurs sur le graphique (bleu pour le contrôle ou 0 mg/ml, rouge pour 0.5 mg/ml). Les cellules ont été traitées durant 24h. La moyenne \pm l'écart-type est représentée. L'expression du gène 36B4 sert à effectuer les rapports gène d'intérêt/36B4 afin d'évaluer l'expression relative de nos différents gènes d'intérêt. Les différentes colonnes expriment le facteur d'induction par rapport au contrôle.

ii. Expression protéique de GOS2

Parallèlement à la diminution de l'expression de l'ARNm observée en présence de dBcAMP, nous avons également mis en évidence une forte diminution de l'expression protéique de GOS2. Celle-ci passe d'une valeur de 0.7 pour le contrôle à environ 0.35 pour une concentration de 0.5 mg/ml en dBcAMP (Figure 21).

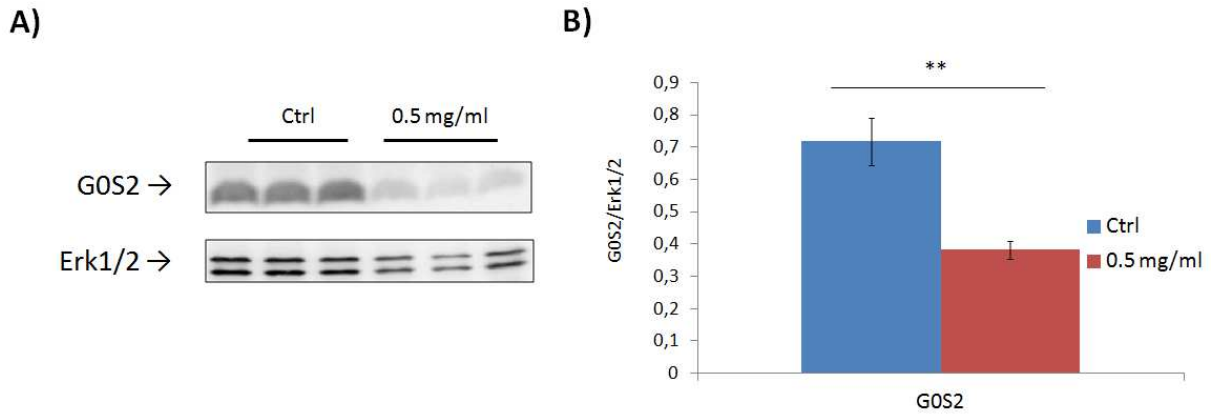


Figure 21 : Effet du dBcAMP sur l'expression protéique de G0S2 dans des cellules 3T3-L1. A) Les cellules ont été traitées 24h avec du DMEM complet comprenant soit 0 mg/ml (contrôle), soit 0.5mg/ml de dBcAMP. La protéine Erk1/2 sert de contrôle de dépôt. **B)** Quantification de l'expression de G0S2 dans des cellules 3T3-L1 traitées comme au point A). La moyenne \pm l'écart-type est représentée. ****** $p=0.0017$.

i. Effet de l'inhibition de la protéine kinase A sur l'expression protéique de G0S2

Dans les adipocytes, la protéine kinase A est connue pour réguler la lipolyse en stimulant les différentes lipases (59). Afin d'évaluer son rôle dans la régulation de G0S2, nous avons cultivés les 3T3-L1 avec des concentrations croissantes d'un inhibiteur spécifique : le PKI. L'expression de G0S2 ne semble pas être affectée en présence de concentrations croissantes en PKI. Il semblerait même que l'expression de la protéine augmente légèrement en présence de la concentration la plus forte de PKI dans le milieu DMEM à pH 7.4 bien que les différences ne soient pas statistiquement significatives (Figure 22). De même, aucune différence significative d'expression de G0S2 n'est observée lorsque le PKI est ajouté dans le milieu à pH 6.5. La protéine kinase A ne semble donc pas réguler significativement G0S2 dans nos conditions de culture.

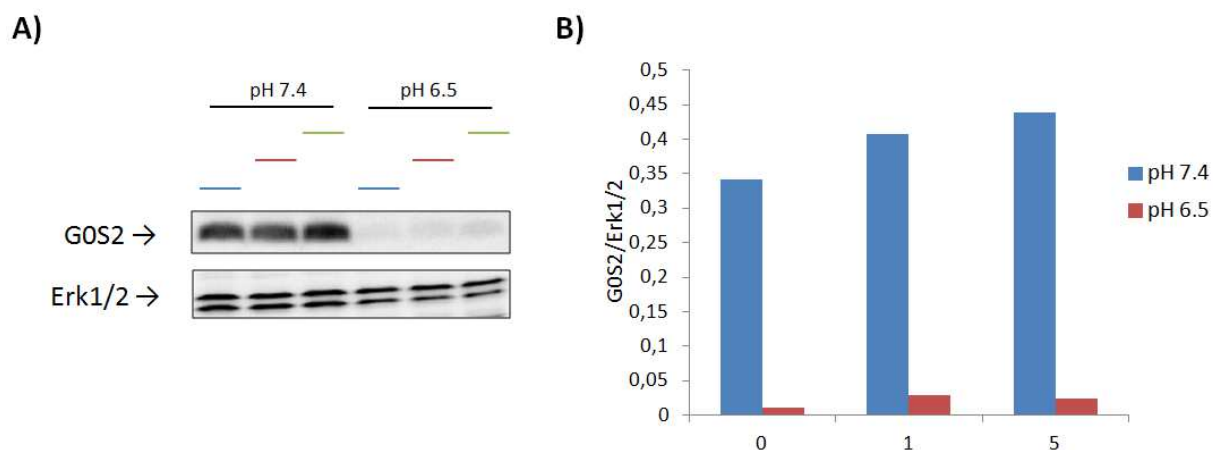


Figure 22 : Effet de l'inhibition de PKA sur l'expression protéique de de G0S2 dans des cellules 3T3-L1. A) Les cellules ont été traitées 24h avec du DMEM complet à différents pH (soit à pH 7.4, soit à pH 6.5) et à des concentrations différentes en PKI (en bleu : 0 mM, en rouge : 1 mM et en vert : 5 mM). La protéine Erk1/2 sert de contrôle de dépôt. **B)** Quantification de l'expression de G0S2 dans des cellules 3T3-L1 traitées comme au point A). La moyenne \pm l'écart-type est représentée.

j. Création de clones de cellules 3T3-L1 surexprimant de façon inducible G0S2

G0S2 est considéré comme un verrou qui bloque la première étape de la lipolyse et c'est probablement l'inhibition de son expression qui est responsable de l'augmentation de la lipolyse observée dans des 3T3-L1 cultivées à pH acide. La création de ces cellules a pour objectif de déterminer s'il est possible de bloquer la lipolyse induite dans des cellules 3T3-L1 cultivées à pH acide en maintenant le niveau de G0S2 à un niveau proche de celui observé dans des cellules cultivées à pH neutre. Ce modèle nous permettra de savoir si G0S2 est bien le régulateur principal de la lipolyse dans nos conditions comme nous le supposons.

i. Création de clones de 3T3-L1 exprimant le répresseur sensible à la tétracycline

Dans un premier temps, nous avons transfecté les cellules 3T3-L1 avec un premier vecteur plasmidique, le pcDNA6/TR, afin d'induire l'expression constitutive du répresseur sensible à la tétracycline. L'expression du répresseur à la tétracycline est sous la dépendance d'un promoteur fort de cytomégalovirus qui devrait assurer un niveau d'expression élevé. Comme illustré dans la figure 23, le plasmide pcDNA6/TR contient un gène de résistance à la blasticidine qui nous permettra d'isoler les clones ayant intégré le plasmide.

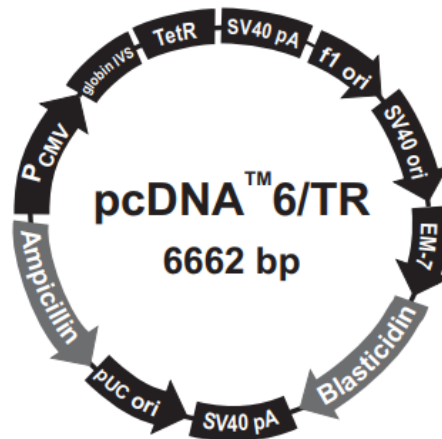


Figure 23 : pcDNA6/TR⁴ utilisé pour la première transfection afin d’induire l’expression du répresseur sensible à la tétracycline dans nos cellules. Celui-ci comprend notamment le promoteur P_{CMV} de cytomégalovirus pour assurer une expression élevée de la protéine, TetR étant le gène du répresseur à la tétracycline et Blastidicin, le gène de résistance à la blasticidine pour la sélection.

Après avoir isolé et cultivé les clones résistant à la blasticidine, nous avons effectué un Western Blotting afin de voir quels clones exprimaient effectivement le répresseur sensible à la tétracycline. La protéine d’intérêt présente un poids moléculaire apparent d’environ 28 kDa. Après un premier round de sélection suivant la transfection (Figure 24A), les mutants paraissant positifs ont été amplifiés afin de pouvoir déposer dans un Western Blotting ultérieur plus de matériel biologique. Les lysats de clones de cellules PC3 surexprimant le répresseur sensible à la tétracycline, qui avaient été créés précédemment au laboratoire ont été déposés sur la droite de chacun des Western Blotting. Ils nous servent de contrôle positif. Lors du second round de sélection (Figure 24B), on peut voir que trois clones 3T3-L1 semblent exprimer le répresseur sensible à la tétracycline. Cependant, en comparant avec les clones PC3 (Figure 24B et 24C), on peut voir que les clones 3T3-L1 expriment faiblement le répresseur sensible à la tétracycline après avoir rapporté l’expression à Erk1/2. Nous avons effectué la suite des manipulations avec le clone de cellules 3T3-L1 qui exprimait le plus le répresseur sensible à la tétracycline.

⁴ Illustration provenant du User Guide de chez ThermoFisher

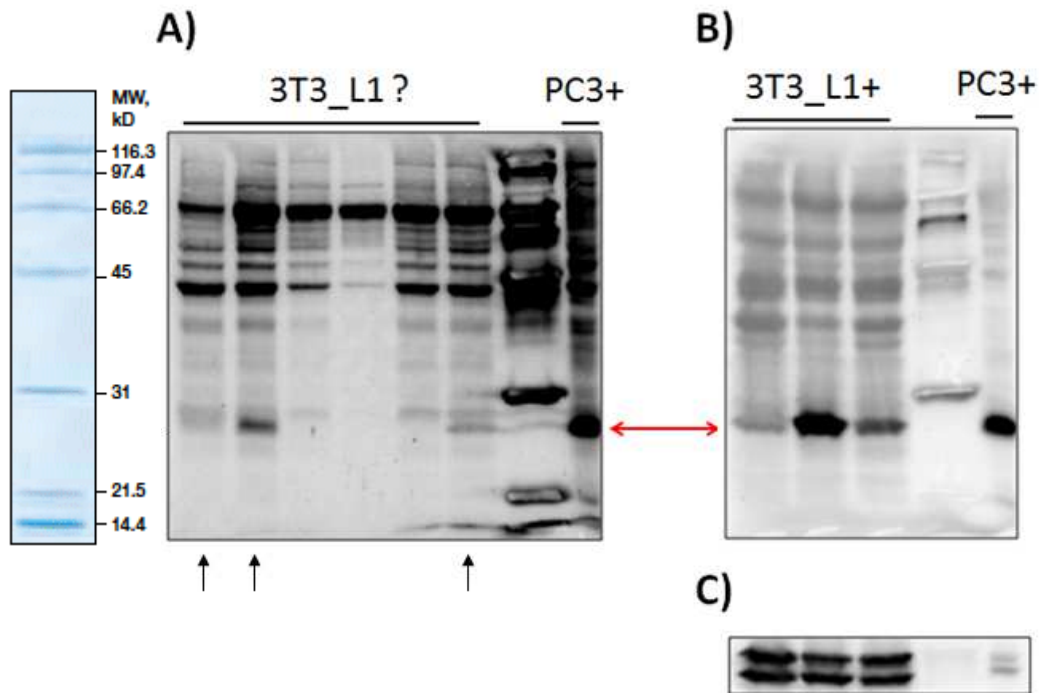


Figure 24 : Western Blotting des clones de cellules 3T3-L1 après transfection avec pcDNA6/TR. A) Clones 3T3-L1 isolés une première fois après le traitement à la blasticidine (à gauche) et clones PC3 exprimant le répresseur TR (à droite). **B)** Clones 3T3-L1 positifs après le premier traitement à la blasticidine remis en culture sous pression et retestés ensuite par Western Blotting (à droite) et clones PC3 exprimant le répresseur TR (à gauche). La double flèche en rouge représente la position de la protéine anti-TetR à 28 kDa. **C)** Contrôle de charge Erk1/2 pour la même membrane que le point B). L'échelle de poids moléculaire (Broad Range) provient du site Bio-Rad .

ii. Création de clones exprimant de façon inducible mGOS2

La séquence codante de mGOS2 a été clonée dans le plasmide pcDNA4/TO (voir Figure 25). Celui-ci contient aussi un promoteur fort de cytomégalovirus qui est situé en amont de 2 sites TetO₂ auxquels le répresseur sensible à la tétracycline se lie. Lorsque le répresseur est lié à ces sites, le promoteur CMV ne peut pas diriger la transcription de mGOS2. En présence de tétracycline, ou d'analogues telle que la doxycycline, le répresseur change de conformation, perd la capacité de se lier aux sites TetO₂ et la transcription de mGOS2 peut avoir lieu. Le plasmide pcDNA4/TO dispose en plus d'un gène de résistance à la zéocine qui nous permettra de sélectionner les clones résistants ayant intégré le plasmide. Les cellules ayant intégré les 2 plasmides possèdent les 2 résistances, celle à la blasticidine et celle à la zéocine. Les clones seront sélectionnés en incluant dans le milieu de culture les 2 antibiotiques. L'induction de l'expression de GOS2 sera obtenue en ajoutant de la doxycycline, un analogue de la tétracycline qui est plus stable, dans le milieu de culture.

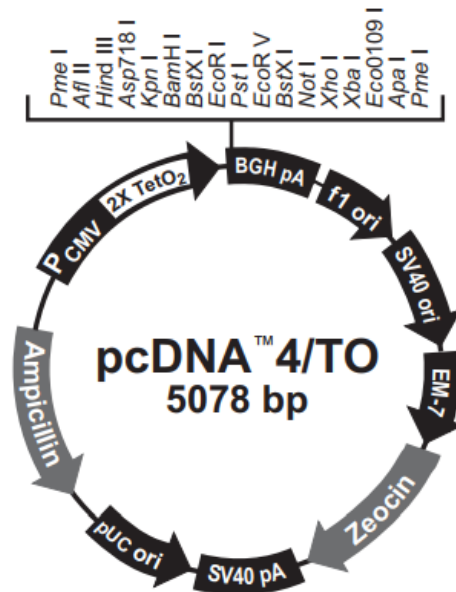


Figure 25 : pcDNA4/TO⁵ utilisé pour la seconde transfection. Celui-ci comprend un promoteur de cytomégalo virus sous contrôle du répresseur tétracycline, des sites de restriction KpnI et XhoI où nous avons inséré notre séquence d'intérêt mGOS2 et un gène de résistance à la zéocine pour la sélection.

Après la transfection avec le plasmide pcDNA4/TO mGOS2, les cellules 3T3-L1 ont été cultivées en présence de blasticidine et de zéocine afin de sélectionner les mutants ayant intégrés les 2 plasmides. Ceux ayant survécu à la sélection ont été isolés et amplifiés en culture afin de pouvoir les analyser par Western Blotting. La figure 26 représente une analyse des différents clones que nous avons isolés. Nous avons obtenu des clones qui expriment GOS2 que ce soit en présence ou non de doxycycline (Figure 26.1), des clones qui expriment plus GOS2 en présence de doxycycline (Figure 26.2) et des clones qui n'expriment pas du tout GOS2 (Figure 26.3). Les observations visuelles régulières de ces clones suggèrent que les cellules exprimant plus fortement GOS2 semblent se diviser et proliférer moins rapidement que celles qui ne l'expriment pas. Une mesure précise du niveau de prolifération de ces clones est cependant requise pour conclure définitivement. Cependant, nous n'avons pas obtenu de clone requis pour nos expériences, c'est-à-dire un clone qui n'exprimerait pas GOS2 en absence de doxycycline et qui exprimerait GOS2 en présence de doxycycline. Le clone 2 est celui qui s'en approche le plus. Cependant, l'expression de GOS2 en absence de doxycycline représente environ 30% de l'expression observée en présence de doxycycline. Cette « fuite » du système est probablement due au faible niveau d'expression du répresseur sensible à la tétracycline par rapport au niveau d'expression observé dans les cellules PC3 qui nous servaient de contrôle positif et avec lesquelles des clones inductibles avaient été créés

⁵ Illustration provenant du User Guide de chez ThermoFisher

antérieurement au laboratoire. Par ailleurs, cette expression basale du transgène G0S2 dans les clones 1 et 2 semble altérer leur capacité de différenciation en pré-adipocyte, car les clones 1 et 2 ne se différenciaient que partiellement en pré-adipocytes, alors que le clone 3 se différenciaient comme les cellules 3T3-L1 non transfectées. Il faudra envisager à l'avenir un nouveau protocole pour la transfection ou peut-être essayer avec d'autres vecteurs si l'on veut obtenir des clones de cellules 3T3-L1 exprimant G0S2 de façon inductible pour la suite de nos manipulations.

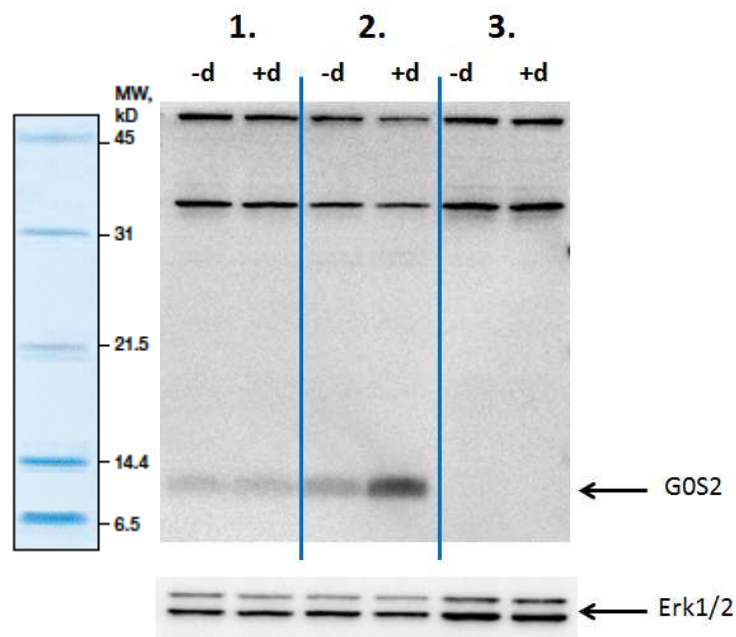


Figure 26 : Western Blotting de clones 3T3-L1 TR mG0S2. 1. Clone non inductible mais présentant un niveau basal de G0S2 dans les 2 cas. 2. Clone inductible présentant un niveau de G0S2 plus élevé en présence de doxycycline. 3. Clone n'exprimant pas G0S2 exogène. Chaque numéro signifie qu'il s'agit du même mutant sur les 2 bandes, "-d" signifie que l'on n'a pas ajouté de doxycycline et "+d" signifie que l'on en a ajouté à concentration de 1 µg/ml. Erk1/2 nous sert de contrôle de charge. L'échelle de poids moléculaire (Broad Range) provient du site Bio-Rad .

5. Discussion, perspectives et conclusions

a. L'expression de G0S2 diminue progressivement dans les co-cultures et lors de l'acidification du milieu de culture

Dans ce mémoire, notre objectif était d'analyser les mécanismes par lesquels les cellules cancéreuses provoquent la lipolyse dans les adipocytes. Lors d'une première série d'expériences, nous avons évalué les conséquences sur le phénotype de pré-adipocytes 3T3-L1 différenciés de la co-culture avec des cellules cancéreuses prostatiques, ce qui nous a permis de mettre en évidence des modifications de l'expression des gènes régulateurs de la lipolyse. Une forte diminution de l'expression de G0S2 et de HSL a été observée dans les 3T3-L1 co-cultivées avec les cellules cancéreuses alors que l'expression des autres gènes était moins affectée. A la fin de ces expériences, nous avons noté une acidification plus prononcée du milieu de culture des 3T3-L1 co-cultivées avec les cellules tumorales ce qui nous a poussé à évaluer l'effet de l'acidose sur l'expression de ces gènes. Nous avons observé que l'acidification du milieu de culture jusqu'à des valeurs de pH proches de celles du microenvironnement tumoral induisait des modifications de phénotype semblables à celles observées dans les co-cultures. En effet, l'expression de l'ensemble des gènes régulateurs à l'exception d'ATGL s'est retrouvée diminuée (Figure 11). Comme l'expression de l'inhibiteur G0S2 a fortement baissé ainsi que celle de l'activateur CGI-58, nous avons décidé d'effectuer un test de lipolyse afin de vérifier l'effet global que cela avait sur la lipolyse. La lipolyse s'est retrouvée augmentée et cela prouve bien que G0S2 pourrait être le frein principal à la première étape et que l'extinction de son expression suffit à lever l'inhibition d'ATGL malgré la diminution de l'expression de CGI-58.

L'augmentation de la lipolyse au sein des adipocytes entourant les tumeurs rapportée dans d'autres études (21) pourrait être due en partie à l'acidification du micro-environnement qui réprimerait notamment l'expression de G0S2 dans les adipocytes. Cette augmentation de la lipolyse favorise donc un rejet dans le milieu extracellulaire d'acides gras et de glycérol. Ces métabolites excrétés par les adipocytes représentent à la fois une source d'énergie de blocs de construction pour les futures membranes grandement utiles aux cellules cancéreuses. Pour une étude future, on pourrait effectuer une évaluation *in vivo* en comparant l'expression de G0S2 dans des tissus normaux et dans des adipocytes proches d'une tumeur par immunomarquage pour pouvoir comparer avec les études réalisées *in vitro*.

b. Le blocage de la glycolyse entraîne une diminution de l'expression de G0S2

Dans des études précédentes (56), il avait été démontré que les cellules 3T3-L1 étaient très glycolytiques. Celles-ci avaient fortement tendance à métaboliser le glucose mis à leur disposition en lactate. Lorsque nous avons mesuré le taux de glycolyse, nous avons observé un blocage conséquent de la glycolyse lorsque le pH s'acidifiait. Nous avons donc décidé d'évaluer l'importance de ce blocage dans les régulations que nous avons observé à pH acide car la glycolyse contribue à l'accumulation de TAG dans les cellules 3T3-L1 (56). Le blocage de la glycolyse dans des pré-adipocytes cultivés à pH neutre a induit une forte diminution d'expression de G0S2, ATGL, HSL et CGI-58. Le blocage de la glycolyse serait apparemment suffisant pour reproduire la plupart des régulations observées à pH acide. Les différences entre les cultures à pH acide et en présence de 2DG pourraient être dues au fait que le 2DG ne bloque pas seulement la glycolyse, mais qu'il peut aussi affecter la N-glycosylation. L'utilisation de mannose en même temps que le 2DG pourrait être envisagée afin d'éviter le blocage de la N-glycosylation, ce qui nous permettrait de ne voir que les effets dus au blocage de la glycolyse. Les mesures du taux de lipolyse seront à réaliser à l'avenir pour déterminer si le blocage de la glycolyse entraîne bien une augmentation de la lipolyse.

Suite à ces observations, nous avons suspecté une baisse du ratio ATP/AMP dans les 3T3-L1 cultivées à pH acide car elles ne pourraient plus produire d'ATP via la glycolyse. Pour mimer une diminution du rapport ATP/AMP, nous avons ajouté du dBcAMP dans le milieu de culture ce qui a inhibé fortement l'expression de l'ensemble des gènes régulateurs de la lipolyse. Il faudrait dès lors trouver par quel mécanisme cette diminution de l'expression est provoquée, et, avant tout, déterminer si le niveau énergétique de la cellule est bien diminué comme on peut le présager avec l'inhibition de la glycolyse. On pourrait comparer le niveau d'ATP présent dans les cellules cultivées à pH neutre et à pH acide avec un kit commercial et ainsi vérifier si notre hypothèse où le rapport ATP/AMP baisse à pH acide est la bonne. Cependant il faut aussi tenir compte d'un autre facteur, les cellules changeaient de forme et certaines étaient sur le point de se détacher lorsqu'on augmentait la concentration en dBcAMP. Il faudrait effectuer à l'avenir une mesure du taux de survie des cellules en évaluant le pourcentage de cellules en apoptose et en fonction de ces résultats, adapter les concentrations en dBcAMP. Une éventuelle diminution du rapport ATP/AMP est également susceptible d'activer la PKA, ce qui pourrait contribuer à la lipolyse dans les adipocytes (60).

L'utilisation d'un inhibiteur spécifique de cette kinase a montré que cette voie ne semblait pas impliquée dans notre modèle.

c. Le blocage de la voie PI3K/Akt kinase entraîne une diminution de l'expression de G0S2

Par ailleurs, nous avons observé une déphosphorylation d'Akt avec l'acidification du pH indiquant une désactivation de la voie PI3K/Akt. Une régulation de cette voie par l'acidose avait déjà été rapportée précédemment dans des cellules musculaires où elle était due à une altération de la signalisation entre le récepteur à l'insuline et PI3K (61). Cette régulation nous intéresse particulièrement car il a été rapporté que la déphosphorylation d'Akt lève l'inactivation du facteur de transcription FOXO1 qui peut alors réguler l'expression de G0S2 et d'Akt. L'inhibition de cette voie nous a montré que l'expression de G0S2 diminuait avec l'augmentation de la concentration de LY294 et donc avec l'augmentation de l'inactivation de la voie PI3K/Akt kinase. Ceci démontre que l'inactivation de la voie PI3K/Akt est suffisante pour réguler l'expression de G0S2 dans nos conditions de culture. Cependant, les autres gènes ne semblent pas être affectés par le blocage de la voie PI3K/Akt kinase, on devrait dès lors observer un taux de lipolyse assez élevé si seulement G0S2 est réprimé. Ceci doit encore être vérifié en effectuant un dosage de glycérol libre. A l'avenir, il serait également intéressant d'essayer d'activer constitutivement cette voie dans des cellules cultivées à pH acide afin de voir si cela permettrait de restaurer des niveaux d'expression génique et de lipolyse équivalents à ceux observés dans des 3T3-L1 cultivées à pH neutre. Un Western Blotting où l'on testerait le taux de phospho-FOXO1 serait également intéressant à réaliser à l'avenir afin de pouvoir évaluer l'activité de ce facteur de transcription. Cela nous permettrait de voir si l'inhibition de la voie Akt suffit bien pour activer ce facteur FOXO1 et donc à réguler l'expression de G0S2 (58).

d. Mutants 3T3-L1 TR mG0S2

Les mutants que nous avons essayé de produire ne sont malheureusement pas inductibles comme nous l'aurions souhaité. Soit ils surexpriment G0S2 en permanence, soit ils présentent déjà un niveau basal de G0S2 et celui-ci est légèrement augmenté lorsqu'on y ajoute de la doxycycline. Les mutants que nous aurions désiré produire auraient dû ne présenter aucun niveau de G0S2 sans induction et un niveau élevé lorsque nous ajoutons de la doxycycline.

Plusieurs solutions sont possibles pour pouvoir améliorer ce procédé. Nous pourrions à l'avenir utiliser des vecteurs provenant de lentivirus présentant généralement un meilleur taux de transfection et donc une meilleure expression du répresseur sensible à la tétracycline (TetR). Nous pourrions aussi utiliser un autre système où la protéine TetR agit comme un transactivateur et non comme un répresseur de la transcription. Un autre facteur que nous aurions pu modifier était la concentration en antibiotique, celle-ci était probablement trop faible et des mutants n'ayant probablement pas ou mal intégré le plasmide ont survécu. Nous nous étions basés sur des transfections précédemment faites avec des cellules PC3 et nous avons ajusté la concentration en antibiotiques par rapport à ces manipulations antérieures mais il semblerait que les cellules 3T3-L1 nécessiteraient une sélection plus sévère que les cellules cancéreuses. Une dernière modification possible pour la transfection serait d'utiliser une lignée cellulaire différente qui serait potentiellement plus transfectable. Nous pourrions essayer à l'avenir avec des 3T3-F442A qui sont un autre modèle de pré-adipocytes ou encore avec des ASC/TERT1 qui sont des cellules souches humaines dérivées d'adipocytes. Obtenir ces lignées mutantes serait très intéressant à l'avenir car cela nous permettrait de pouvoir réexprimer G0S2 dans des conditions où celui-ci disparaît, telles qu'après acidification du pH ou encore blocage de la glycolyse. Nous pourrions dès lors observer les effets que cela aurait sur la lipolyse et ainsi pouvoir s'assurer que G0S2 représente bien un frein réel pour la lipolyse et que le blocage de son expression permet aux cellules cancéreuses de se procurer les acides gras dont elles ont besoin pour leur prolifération et leur survie. A plus long terme, cette hypothèse pourra être testée in vivo en analysant la croissance tumorale dans un modèle de souris transgéniques surexprimant spécifiquement G0S2 dans les adipocytes (62).

6. Références :

- (1) Weinhouse, S., Warburg, O., Burk, D., & Schade, A. L. (1956). On Respiratory Impairment in Cancer Cells. *Science*, 124(3215), 267 LP – 272.
- (2) Furuta, E., Okuda, H., Kobayashi, A., & Watabe, K. (2010). Metabolic genes in cancer: Their roles in tumor progression and clinical implications. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1805(2), 141–152.
- (3) Baenke, F., Peck, B., Miess, H., & Schulze, A. (2013). Hooked on fat: The role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 6(6), 1353–1363.
- (4) Abramson, H. N. (2011). The lipogenesis pathway as a cancer target. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(16), 5615–5638.
- (5) Menendez, J. A., & Lupu, R. (2007). Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 7(10), 763–777.
- (6) Swinnen, J. V., Brusselmans, K., & Verhoeven, G. (2006). Increased lipogenesis in cancer cells: New players, novel targets. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 9(4), 358–365.
- (7) Zaidi, N., Swinnen, J. V., & Smans, K. (2012). ATP-citrate lyase: A key player in cancer metabolism. *Cancer Research*, 72(15), 3709–3714.
- (8) Zadra, G., Photopoulos, C., & Loda, M. (2013). The fat side of prostate cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1831(10), 1518–1532.
- (9) Marusyk, A., & Polyak, K. (2010). Tumor heterogeneity: Causes and consequences. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1805(1), 105–117.
- (10) Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674.
- (11) Koppenol, W. H., Bounds, P. L., & Dang, C. V. (2011). Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nature Reviews Cancer*, 11(5), 325–337.
- (12) Kroemer, G., & Pouyssegur, J. (2008). Tumor Cell Metabolism: Cancer's Achilles' Heel. *Cancer Cell*, 13(6), 472–482.
- (13) Jose, C., Bellance, N., & Rossignol, R. (2011). Choosing between glycolysis and oxidative phosphorylation: A tumor's dilemma? *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1807(6), 552–561.
- (14) Carracedo, A., Cantley, L. C., & Pandolfi, P. P. (2013). Cancer metabolism: Fatty acid oxidation in the limelight. *Nature Reviews Cancer*, 13(4), 227–232.
- (15) Davison, C. A., Durbin, S. M., Thau, M. R., Zellmer, V. R., Chapman, S. E., Diener, J., ... Schafer, Z. T. (2013). Antioxidant Enzymes Mediate Survival of Breast Cancer Cells Deprived of Extracellular Matrix. *Cancer Research*, 73(12), 3704 LP – 3715.
- (16) Schafer, Z. T., Grassian, A. R., Song, L., Jiang, Z., Gerhart-Hines, Z., Irie, H. Y., ... Brugge, J. S. (2009). Antioxidant and oncogene rescue of metabolic defects caused by loss of matrix attachment. *Nature*, 461(7260), 109–113.
- (17) Carracedo, A., Weiss, D., Leliaert, A. K., Bhasin, M., De Boer, V. C. J., Laurent, G., ... Pandolfi, P. P. (2012). A metabolic prosurvival role for PML in breast cancer. *Journal of Clinical Investigation*, 122(9), 3088–3100.
- (18) Samudio, I., Harmancey, R., Fiegl, M., Kantarjian, H., Konopleva, M., Korchin, B., ... Andreeff, M. (2010). Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to apoptosis induction. *Journal of Clinical Investigation*, 120(1), 142–156.

- (19) Wang, Y.-Y., Lehuédé, C., Laurent, V., Dirat, B., Dauvillier, S., Bochet, L., ... Muller, C. (2012). Adipose tissue and breast epithelial cells: A dangerous dynamic duo in breast cancer. *Cancer Letters*, 324(2), 142–151.
- (20) Bochet, L., Lehuédé, C., Dauvillier, S., Wang, Y. Y., Dirat, B., Laurent, V., ... Muller, C. (2013). Adipocyte-derived fibroblasts promote tumor progression and contribute to the desmoplastic reaction in breast cancer. *Cancer Research*, 73(18), 5657–5668.
- (21) Dirat, B., Bochet, L., Dabek, M., Daviaud, D., Dauvillier, S., Majed, B., ... Muller, C. (2011). Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer Research*, 71(7), 2455–2465.
- (22) Nieman, K. M., Kenny, H. A., Penicka, C. V, Ladanyi, A., Buell-Gutbrod, R., Zillhardt, M. R., ... Lengyel, E. (2011). Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nature Medicine*, 17(11), 1498–1503.
- (23) Dirat, B., Bochet, L., Escourrou, G., Valet, P., & Muller, C. (2010). Unraveling the obesity and breast cancer links: A role for cancer-associated adipocytes? *Endocrine Development*.
- (24) Gazi, E., Gardner, P., Lockyer, N. P., Hart, C. A., Brown, M. D., & Clarke, N. W. (2007). Direct evidence of lipid translocation between adipocytes and prostate cancer cells with imaging FTIR microspectroscopy. *Journal of Lipid Research*, 48(8), 1846–1856.
- (25) Wang, Y. Y., Attané, C., Milhas, D., Dirat, B., Dauvillier, S., Guerard, A., ... Muller, C. (2017). Mammary adipocytes stimulate breast cancer invasion through metabolic remodeling of tumor cells. *JCI Insight*, 2(4), e87489.
- (26) Vaupel, P., Kallinowski, F., & Okunieff, P. (1989). Blood Flow, Oxygen and Nutrient Supply, and Metabolic Microenvironment of Human Tumors: A Review. *Cancer Research*, 49(23), 6449–6465.
- (27) Justus, C. R., Dong, L., & Yang, L. V. (2013). Acidic tumor microenvironment and pH-sensing G protein-coupled receptors. *Frontiers in Physiology*, 4 DEC.
- (28) Lass, A., Zimmermann, R., Oberer, M., & Zechner, R. (2011). Lipolysis – A highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. *Progress in Lipid Research*, 50(1-4), 14–27.
- (29) Duncan, R. E., Ahmadian, M., Jaworski, K., Sarkadi-Nagy, E., & Sul, H. S. (2007). Regulation of Lipolysis in Adipocytes. *Annual Review of Nutrition*, 27, 79–101.
- (30) Lass, A., Zimmermann, R., Haemmerle, G., Riederer, M., Schoiswohl, G., Schweiger, M., ... Zechner, R. (2006). Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell Metabolism*, 3(5), 309–319.
- (31) Cornaciu, I., Boeszoermenyi, A., Lindermuth, H., Nagy, H. M., Cerk, I. K., Ebner, C., ... Oberer, M. (2011). The Minimal Domain of Adipose Triglyceride Lipase (ATGL) Ranges until Leucine 254 and Can Be Activated and Inhibited by CGI-58 and GOS2, Respectively. *PLoS ONE*, 6(10), e26349.
- (32) Holm, C. (2003). Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochemical Society Transactions*, 31(6), 1120 LP – 1124.
- (33) Karlsson, M., Contreras, J. A., Hellman, U., Tornqvist, H., & Holm, C. (1997). cDNA Cloning, Tissue Distribution, and Identification of the Catalytic Triad of Monoglyceride Lipase: Evolutionary relationship to esterases, lysophospholipases, and haloperoxidases. *Journal of Biological Chemistry*, 272 (43), 27218–27223.
- (34) L. Russell and D.R. Forsdyke. A Human Putative Lymphocyte G0/G1 Switch Gene Containing a CpG-Rich Island Encodes a Small Basic Protein with the Potential to Be Phosphorylated. *DNA and Cell Biology*. 1991, 10(8): 581-591.

- (35) Heckmann, B. L., Zhang, X., Xie, X., & Liu, J. (2013). The G0/G1 Switch Gene 2 (G0S2): Regulating metabolism and beyond. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1831(2), 276–281.
- (36) Arnold K, Bordoli L, Kopp J, and Schwede T (2006). The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 22, 195-201.
- (37) Tokumaru, Y., Yamashita, K., Osada, M., Nomoto, S., Sun, D.-I., Xiao, Y., ... Sidransky, D. (2004). Inverse Correlation between Cyclin A1 Hypermethylation and p53 Mutation in Head and Neck Cancer Identified by Reversal of Epigenetic Silencing. *Cancer Research*, 64(17), 5982 LP – 5987.
- (38) Kusakabe, M., Watanabe, K., Emoto, N., Aki, N., Kage, H., Nagase, T., ... Takai, D. (2009). Impact of DNA demethylation of the G0S2 gene on the transcription of G0S2 in squamous lung cancer cell lines with or without nuclear receptor agonists. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 390(4), 1283–1287.
- (39) Kusakabe, M., Kutomi, T., Watanabe, K., Emoto, N., Aki, N., Kage, H., ... Takai, D. (2010). Identification of G0S2 as a gene frequently methylated in squamous lung cancer by combination of in silico and experimental approaches. *International Journal of Cancer*, 126(8), 1895–1902.
- (40) Welch, C., Santra, M. K., El-Assaad, W., Zhu, X., Huber, W. E., Keys, R. A., ... Green, M. R. (2009). Identification of a protein, G0S2, that lacks Bcl-2 homology domains and interacts with and antagonizes Bcl-2. *Cancer Research*, 69(17), 6782–6789.
- (41) Kitarewan, S., Blumen, S., Sekula, D., Bissonnette, R. P., Lamph, W. W., Cui, Q., ... Dmitrovsky, E. (2008). G0S2 is an all-trans-retinoic acid target gene. *International Journal of Oncology*, 33(2), 397–404.
- (42) Yim, C. Y., Sekula, D. J., Hever-Jardine, M. P., Liu, X., Warzecha, J. M., Tam, J., ... Spinella, M. J. (2016). G0S2 suppresses oncogenic transformation by repressing a Myc-regulated transcriptional program. *Cancer Research*, 76(5), 1204–1213.
- (43) Yang, X., Lu, X., Lombès, M., Rha, G. B., Chi, Y.-I., Guerin, T. M., ... Liu, J. (2010). The G0/G1 Switch Gene 2 Regulates Adipose Lipolysis through Association with Adipose Triglyceride Lipase. *Cell Metabolism*, 11(3), 194–205.
- (44) Dessen, A., Tang, J., Schmidt, H., Stahl, M., Clark, J. D., Seehra, J., & Somers, W. S. (1999). Crystal Structure of Human Cytosolic Phospholipase A2 Reveals a Novel Topology and Catalytic Mechanism. *Cell*, 97(3), 349–360.
- (45) Rydel, T. J., Williams, J. M., Krieger, E., Moshiri, F., Stallings, W. C., Brown, S. M., ... Alibhai, M. F. (2003). The Crystal Structure, Mutagenesis, and Activity Studies Reveal that Patatin Is a Lipid Acyl Hydrolase with a Ser-Asp Catalytic Dyad. *Biochemistry*, 42(22), 6696–6708.
- (46) Zechner, R., Kienesberger, P. C., Haemmerle, G., Zimmermann, R., & Lass, A. (2009). Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. *Journal of Lipid Research*, 50(1), 3–21.
- (47) Lu, X., Yang, X., & Liu, J. (2010). Differential control of ATGL-mediated lipid droplet degradation by CGI-58 and G0S2. *Cell Cycle*, 9(14), 2719–2725.
- (48) Schweiger, M., Lass, A., Zimmermann, R., Eichmann, T. O., & Zechner, R. (2009). Neutral lipid storage disease: genetic disorders caused by mutations in adipose triglyceride lipase/PNPLA2 or CGI-58/ ABHD5. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*, 297(2), E289 LP – E296.
- (49) Lefèvre, C., Jobard, F., Caux, F., Bouadjar, B., Karaduman, A., Heilig, R., ... Fischer, J. (2001). Mutations in CGI-58, the Gene Encoding a New Protein of the

- Esterase/Lipase/Thioesterase Subfamily, in Chanarin-Dorfman Syndrome. *American Journal of Human Genetics*, 69(5), 1002–1012.
- (50) Schleinitz, N., Fischer, J., Sanchez, A., Veit, V., Harle, J., & Pelissier, J. (2005). Two new mutations of the *abhd5* gene in a new adult case of chanarin dorfman syndrome: An uncommon lipid storage disease. *Archives of Dermatology*, 141(6), 798–800.
- (51) Fischer, J., Lefevre, C., Morava, E., Mussini, J.-M., Laforet, P., Negre-Salvayre, A., ... Salvayre, R. (2007). The gene encoding adipose triglyceride lipase (PNPLA2) is mutated in neutral lipid storage disease with myopathy. *Nat Genet*, 39(1), 28–30.
- (52) Kobayashi, K., Inoguchi, T., Maeda, Y., Nakashima, N., Kuwano, A., Eto, E., ... Takayanagi, R. (2008). The Lack of the C-Terminal Domain of Adipose Triglyceride Lipase Causes Neutral Lipid Storage Disease through Impaired Interactions with Lipid Droplets. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 93(7), 2877–2884.
- (53) Schweiger, M., Paar, M., Eder, C., Brandis, J., Moser, E., Gorkiewicz, G., ... Lass, A. (2012). G0/G1 switch gene-2 regulates human adipocyte lipolysis by affecting activity and localization of adipose triglyceride lipase. *Journal of Lipid Research*, 53(11), 2307–2317.
- (54) Cawthorn, W. P., & Sethi, J. K. (2008). TNF- α and adipocyte biology. *FEBS Letters*, 582(1), 117–131.
- (55) Yang, X., Zhang, X., Heckmann, B. L., Lu, X., & Liu, J. (2011). Relative Contribution of Adipose Triglyceride Lipase and Hormone-sensitive Lipase to Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)-induced Lipolysis in Adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(47), 40477–40485.
- (56) Sabater, D., Arriarán, S., Romero, M. del M., Agnelli, S., Remesar, X., Fernández-López, J. A., & Alemany, M. (2014). Cultured 3T3L1 adipocytes dispose of excess medium glucose as lactate under abundant oxygen availability. *Scientific Reports*, 4, 3663.
- (57) Zhang, W., Bu, S. Y., Mashek, M. T., I, O. S., Sibai, Z., Khan, S. A., Ilkayeva, O., Newgard, C. B., Mashek, D. G., and Unterman, T. G. (2016) Integrated Regulation of Hepatic Lipid and Glucose Metabolism by Adipose Triacylglycerol Lipase and FoxO Proteins. *Cell Rep* 15, 349-359
- (58) Andresen, L., Skovbakke, S. L., Persson, G., Hagemann-Jensen, M., Hansen, K. A., Jensen, H., & Skov, S. (2012). 2-Deoxy-Glucose Prevents Cell Surface Expression of NKG2D Ligands through Inhibition of N-Linked Glycosylation. *The Journal of Immunology*, 188(4), 1847 LP – 1855.
- (59) Voss, T. S., Vendelbo, M. H., Kampmann, U., Pedersen, S. B., Nielsen, T. S., Johannsen, M., ... Møller, N. (2017). Effects of insulin-induced hypoglycaemia on lipolysis rate, lipid oxidation and adipose tissue signalling in human volunteers: a randomised clinical study. *Diabetologia*, 60(1), 143–152.
- (60) Omar, B., Zmuda-Trzebiatowska, E., Manganiello, V., Göransson, O., & Degerman, E. (2009). Regulation of AMP-activated protein kinase by cAMP in adipocytes: roles for Phosphodiesterases, Protein kinase B, Protein kinase A, Epac and lipolysis. *Cellular Signalling*, 21(5), 760–766.
- (61) Franch, H. A., Raissi, S., Wang, X., Zheng, B., Bailey, J. L., & Price, S. R. (2004). Acidosis impairs insulin receptor substrate-1-associated phosphoinositide 3-kinase signaling in muscle cells: consequences on proteolysis. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 287(4), F700 LP – F706.
- (62) Heckmann, B. L., Zhang, X., Xie, X., Saarinen, A., Lu, X., Yang, X., & Liu, J. (2014). Defective Adipose Lipolysis and Altered Global Energy Metabolism in Mice with Adipose Overexpression of the Lipolytic Inhibitor G(0)/G(1) Switch Gene 2 (G0S2). *The Journal of Biological Chemistry*, 289(4), 1905–1916.

