

Université de Montréal

**Le rôle protecteur de la périlipine 2 dans la cardiomyopathie
diabétique**

Par

Ali Akoumi

Département des sciences biomédicales

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la faculté de médecine

En vue de l'obtention du grade de Maîtrise

En sciences biomédicales

Mai 2017

© Ali Akoumi, 2017

Résumé

L'accumulation des lipides dans le réticulum endoplasmique (ER) perturbe ses fonctions et altère son homéostasie ce qui déclenche une voie de signalisation reconnue par le stress de l'ER (ERS). Cette voie a pour objectif initial de récupérer le fonctionnement de l'ER et de reprendre son homéostasie, mais une fois prolongée et chronique, elle aboutit à l'activation de la cascade apoptotique. On croit que les acides gras absorbés par les cardiomyocytes sont dirigés à l'ER où ils seront convertis en diacylglycérol (DAG) puis en triacylglycérol (TAG). Ces derniers bourgeonnent de la membrane de l'ER sous forme d'un cœur riche en TAG et entouré d'une monocouche phospholipidique : la gouttelette lipidique (LD). Dans notre laboratoire, nous sommes intéressés d'investiguer le mécanisme de toxicité associée aux acides gras saturés et celui protecteur associé aux acides gras mono-insaturés.

Nous avons démontré que le palmitate, l'acide gras saturé le plus abondant dans la diète humaine, conduit au stress de l'ER dans une lignée de cardiomyoblastes embryonnaires- H9C2. Ce stress est accompagné d'une déficience en LDs et d'une accumulation des DAG dans l'ER et suivi d'une haute mortalité des cellules suite à l'activation des voies apoptotiques. En plus, le palmitate provoque la dégradation de Plin2, réduit partiellement l'expression de Plin3 alors que Plin5 est intacte. Par contre, l'oléate, l'acide gras mono-insaturé le plus abondant dans la diète humaine, ne provoque pas l'ERS ni l'accumulation des DAG dans l'ER ni l'apoptose alors qu'il induit la formation des LDs dans le cytosol. La dégradation de Plin2 est encore causée par des inducteurs de l'ERS indépendants du mécanisme associé aux lipides comme la tunicamycine et la thapsigargine. L'absence de Plin2 dans les dernières conditions n'avait pas un effet remarquable sur la formation des LDs ni la synthèse des TAG. De l'autre côté, l'inhibition du

protéasome par MG132 récupère Plin2 légèrement et réduit l'ERS et la mortalité des cellules qui sont associés au palmitate. En plus, la co-administration de l'oléate avec le palmitate réduit la mortalité des cellules et induit l'expression de Plin2 d'une façon dépendante de la dose co-administrée. Enfin, la surexpression de Plin2 réduit l'ERS et la mortalité cellulaire associés au palmitate.

En bref, Plin2 joue un rôle protecteur contre l'ERS. Ce mécanisme semble être partiellement indépendant des lipides, celle-ci est une nouvelle fonction et un nouveau domaine référés aux Plins.

Mots clés : Cardiomyopathie diabétique, Lipotoxicité, Stress du réticulum endoplasmique, Gouttelette lipidique, Périlipine 2.

Abstract

The accumulation of lipids in the ER alter its functions and homeostasis which triggers a signalling pathway called ER stress (ERS). This pathway is initially programmed to recover ER homeostasis, but prolonged, it triggers an apoptosis cascade. Absorbed lipids are routed to the ER where they are converted to diacylglycerides (DAGs) and triacylglycerides (TAGs) which are packaged into lipid droplets. Lipid droplets contain a core of TAG and cholesterol esters which are converted by a phospholipid monolayer with associated proteins. In our laboratory, we are interested in investigating the mechanisms of lipotoxicity in the setting of diabetic cardiomyopathy.

We demonstrated that palmitate, the most abundant saturated fatty acid in the human diet, triggers ERS in H9c2, a cardiomyoblast cell line. This stress is accompanied with a lack of lipid droplets, accumulation of DAGs in the ER, and followed by a high mortality of cells via the activation of an apoptotic pathway. Moreover, palmitate causes the degradation of Plin2, a partial reduction of Plin3 expression, while Plin5 is intact. In contrast, oleate, the most abundant mono-unsaturated fatty acid in human diet, induces the formation of abundant lipid droplets but does not cause ERS nor DAG accumulation in the ER compartments. Plin2 degradation is also a result of ERS inducers that are independent of lipids associated mechanisms like tunicamycin and thapsigargin. The lack of Plin2 in these two conditions has no effect on the lipid droplets formation nor on the TAG synthesis. On the other hand, inhibition of proteasome slightly protected Plin2 and reduced the palmitate-associated cell death. Moreover, the co-administration of oleate with palmitate reduced the cell death and induced Plin2 expression, both in an oleate dose-dependant way. Finally, overexpressing Plin2 reduces palmitate-associated ERS and cell death.

In brief, Plin2 plays a protective role against ERS. This mechanism seems partially independent of lipids which is a novel function of Plin2.

Keywords: Diabetic Cardiomyopathy, Lipotoxicity, ER stress, Lipid Droplet, Perilipin 2.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iv
Liste des figures.....	vii
Liste des abréviations.....	viii
Remerciements.....	xi
Chapitre 1 : Introduction générale et recensement des écrits.....	1
1.1 Le cœur.....	1
1.1.1 Anatomie et description du cœur.....	1
1.1.2 Physiologie du cœur.....	2
1.2 Les cardiomyocytes.....	5
1.2.1 Description, histologie et contraction.....	5
1.2.2 Le métabolisme des cardiomyocytes.....	5
1.3 Les acides gras.....	8
1.3.1 Description et classifications.....	8
1.3.2 La synthèse des TAG.....	9
1.4 Le diabète.....	11
1.4.1 Introduction et T1DM.....	11
1.4.2 T2DM.....	12
1.5 La cardiomyopathie diabétique.....	13
1.5.1 Introduction.....	13
1.5.2 L’hypertrophie cardiaque.....	14
1.5.3 Les mécanismes cellulaires impliqués dans la cardiomyopathie diabétique.....	15
1.5.3.1 La lipotoxicité.....	15
1.5.3.1.1 Le Palmitate et l’oléate, et la DCM	17
1.5.3.2 La dysrégulation des ions calcium.....	18
1.5.3.3 Les ROS et la dysfonction mitochondriale.....	18
1.6 Les gouttelettes lipidiques.....	19
1.7 Les périlipines.....	23
1.7.1 Introduction.....	23
1.7.2 Périlipine 1.....	23
1.7.3 Périlipine 3.....	24
1.7.4 Périlipine 4.....	25

1.7.5	Péripiline 5.....	26
1.7.6	Péripiline 2.....	28
1.8	Le réticulum endoplasmique.....	30
1.8.1	Le stress du réticulum endoplasmique.....	30
1.8.2	Les voies du stress de l'ER.....	31
1.8.3	L'implication de l'ERS dans les pathologies cardiaques.....	33
1.8.4	Les voies pré-apoptotiques.....	35
1.9	L'apoptose.....	38
1.9.1	La voie extrinsèque.....	38
1.9.2	La voie intrinsèque.....	39
1.10	Objectifs.....	41
1.11	Hypothèses.....	42
Chapitre 2: Palmitate mediated diacylglycerol accumulation causes endoplasmic reticulum stress, Plin2 degradation, and cell death in H9C2 cardiomyoblasts.....		43
2.1	Avant-propos.....	44
2.2	Abstract.....	45
2.2.1	Acknowledgments.....	45
2.2.2	Conflict of interest.....	46
2.2.3	Appendix A. supplementary materiel.....	46
2.3	Introduction.....	46
2.4	Methods.....	48
2.4.1	Reagents.....	48
2.4.2	Histology.....	48
2.4.3	Lipid Uptake.....	48
2.4.4	Fatty acid oxidation assay.....	49
2.4.5	Acyl-CoA synthetase activity assay.....	49
2.4.6	Thin layer chromatography.....	49
2.4.7	Sub-cellular distribution of lipids.....	50
2.4.8	Real-time RT-PCR.....	50
2.4.9	Western blotting.....	51
2.4.10	Viability assay.....	51

2.4.11 Immunofluorescence analysis.....	51
2.4.12 Statistical analysis.....	52
2.5 Results.....	52
2.5.1 Palmitate is a poor inducer of lipid droplets.....	52
2.5.2 Palmitate causes accumulation of lipid in the ER.....	56
2.5.3 Palmitate is primarily incorporated into DAG.....	58
2.5.4 Palmitate selectively induces Plin2 degradation.....	58
2.5.5 ER stress induces Plin2 degradation.....	61
2.5.6 Proteasomal inhibition attenuates Plin2 degradation, ER stress, and cell death.....	63
2.5.7 Oleate prevents Plin2 degradation and cell death.....	63
2.6 Discussion.....	65
2.7 Conclusion.....	68
2.8 References.....	69
Chapitre 3 : La surexpression de Plin2 protège contre le stress de l'ER associé au palmitate.....	73
3.1 Méthodes.....	73
3.1.1 Transfection par SiRNA.....	73
3.1.2 essai de viabilité et RT-PCR.....	73
3.2 Résultats	73
3.2.1 La surexpression de Plin2 réduit le stress de l'ER et la mortalité associés au palmitate.....	73
Chapitre 4 : Discussion générale.....	75
4.1 Perspective.....	84
Chapitre 5 : Conclusion générale.....	85
Bibliographie.....	i

Liste des figures

Figure 1.1 : Anatomie du cœur, système de conduction et électrocardiogramme.....	4
Figure 1.2 : Le métabolisme des cardiomyocytes.....	7
Figure 1.3 : L'hypertrophie cardiaque.....	15
Figure 1.4 : Les acides gras et les gouttelettes lipidiques dans la cellule.....	22
Figure 1.5 : Le contrôle de la lipolyse par Plin5.....	27
Figure 1.6 : Les branches du stress du réticulum endoplasmique.....	34
Figure 1.7 : Les pré-apoptotiques et les anti-apoptotiques, en bref.....	37
Figure 1.8 : Les voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose.....	40
Figure 2.1: Poor lipid droplet formation in palmitate treated H9C2s.....	54
Figure 2.2: Palmitate impairs fatty acid oxidation and induces ER stress and cell death in H9C2 cardiomyoblasts.....	55
Figure 2.3: Oleate accumulates in lipid droplets as TAG while palmitate accumulates in the ER as DAG.....	57
Figure 2.4: Palmitate selectively induces Plin2 degradation.....	60
Figure 2.5: ER stress induces Plin2 degradation despite high TAG levels.....	62
Figure 2.6: MG132 and oleate attenuate palmitate mediated cell death and Plin2 degradation...	64
Figure 3.1: la surexpression de Plin2 réduit l'ERS et la mortalité des cellules induits par le palmitate.....	74

Liste des abréviations

Acs1: Acyl-CoA synthetase.

AGPAT: Acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase.

APAF: Apoptotic Protease Activating Factor.

Ask1: Apoptosis signal-regulating Kinase 1.

ATF-4: Activating Transcription Factor 4.

ATF-6: Activating Transcription Factor 6.

ATGL : Adipose Triglyceride Lipase.

ATP: adenosine triphosphate.

Bak: Bcl-2 homologous antagonist/killer.

Bax: Bcl-2-associated X protein, or Bcl-2 like protein 4.

Bcl-2: B-cell lymphoma 2.

BI-1: Bax inhibitor-1.

BiP: Binding Protein.

CD36: Cluster of Differentiation 36 or Fatty acid translocase.

CD-95: Cluster of Differentiation 95.

CGI-58 or ABHD5: abhydrolase domain containing 5.

CHOP: C/EBP Homology Protein.

CoA: Coenzyme A.

Cpt1b: Carnitine Palmitoyl Transferase 1b.

Cpt2: Carnitine Palmitoyl Transferase 2.

DAG: Diacylglycérol.

DCM: Diabetic Cardiomyopathy.

DGAT: Diglyceride acyl transferase.

DR-1: Down Regulator of transcription 1.

eIF2- α : eukaryotic translation initiation factor 2 α .

ERS: Endoplasmic Reticulum Stress.

FABP: Fatty Acid Binding Protein.

FADD: Fas-Associated protein with Death Domain.

FATP: Fatty Acid Transport Protein.

GADD: Growth Arrest DNA Damage Protein.

GluT-1: Glucose Transporter 1.

GPAT: Glycerol-3-Phosphate acyltransferase

GRP78: Glucose Related Protein 78kDa.

HDL: High Density Lipoprotein.

HSL: Hormone Sensitive Lipase.

IL-1 β : Interleukine 1 β .

IL-6: Interleukine 6.

IRE1: Inositol-Requiring Enzyme.

IRF: Interferon Regulatory Factor.

JNK: c-Jun N-terminal Kinase.

LD: Lipid droplet

LDL: Low Density Lipoprotein.

MAG: Monoacylglycérol.

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase.

MCP-1: Monocyte Chemoattractant Protein 1.

MGAT: Monoglyceride acyl transferase.

MGL: Monoglycerol lipase.

NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate.

NCX: Sodium-Calcium exchanger.

NF-kB: Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells.

NRF2: Nuclear Factor (erythroid-derived 2)- like 2.

PERK: Protein Kinase R (PKR)-Like endoplasmic reticulum kinase.

PI3K: Phosphoinositide 3-Kinase.

PKA: Protein Kinase A.

PKC: Protein Kinase C.

PP1: Protein Phosphatase 1.

PPAR: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor.

PPRE: PPAR Response Element.

ROS: Reactive Oxygen Species.

RXR: Retinoid X Receptor.

SERCA: Sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase.

SNARE: Soluble NSF Attachment Protein Receptor.

T1DM : Type 1 Diabetes Mellitus.

T2DM : Type 2 Diabetes Mellitus.

TAG: Triacylglycérol.

TL1A: TNF-Like Cytokine 1A.

TLR: Toll Like Receptor.

TNF- α : Tumor necrosis factor- α .

TNFR1: Tumor Necrosis Factor Receptor 1.

TRADD: Tumor Necrosis Factor Receptor type 1-associated Death Domain.

TRAIL: TNF-related apoptosis-inducing ligand.

TRAIL-R1: TRAIL receptor.

VLDL: Very Low Density Lipoprotein.

Remerciements

Je tiens à remercier mon superviseur, Dr. Nicolas Bousette, pour son accueil, ses conseils, son aide et son encadrement. Je le remercie pour sa confiance en moi qui m'a fourni cette première expérience en laboratoire de recherche. Son laboratoire fut un milieu d'apprentissages importants et stimulants.

Je tiens à remercier mon collègue et mon ami Taha avec lequel j'ai partagé mon environnement de travail. Il a fait le laboratoire un milieu de travail professionnel et familial en même temps.

Je tiens à remercier mon père, ma mère, mon frère et mes sœurs pour leurs prières, leur support et leur confiance.

Finalement, je tiens à remercier mes amis, Karim, Youssef, Bassem, Hamza, Amer et Abdallah pour leurs prières et leur support.

Chapitre 1 : Introduction

1.1 Le cœur

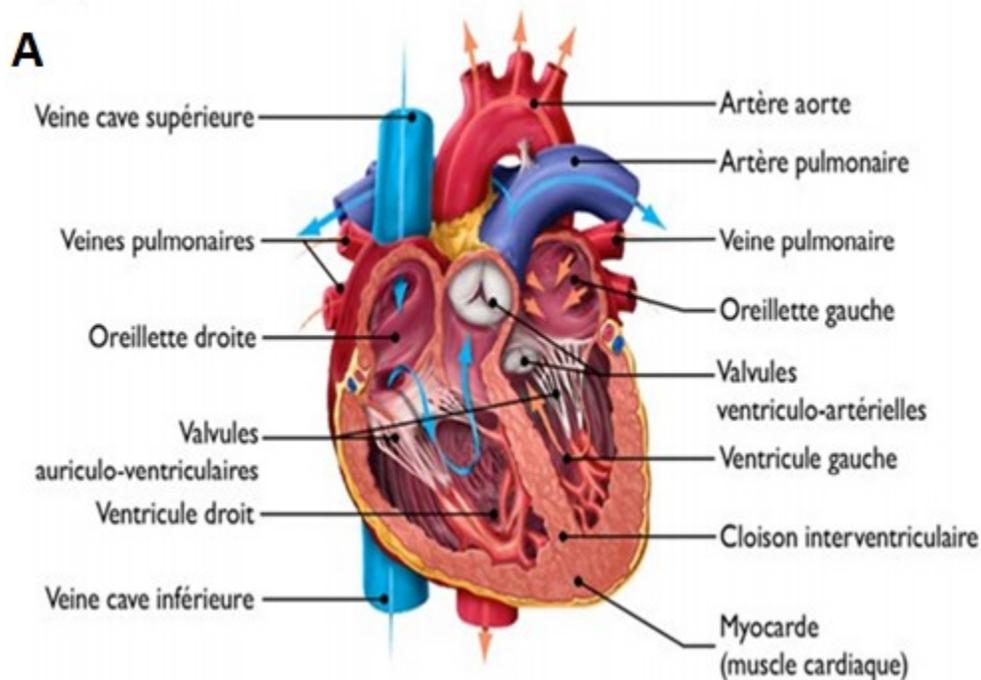
1.1.1 Anatomie et description du cœur (*Figure 1.1, A*)

Le cœur est l'organe responsable du pompage du sang aux organes et aux périphéries du corps. Il est formé de deux secteurs un droit et un gauche dont chacun est formé de deux cavités : une oreillette et un ventricule. Les oreillettes reçoivent le sang des veines, le pompent aux ventricules qui, à leur tour, le pompent à l'organisme à travers les artères. Une structure appelée valve, qui est une membrane élastique non musculaire, sépare chaque oreillette du ventricule adjacent, le ventricule gauche de l'artère aorte, et le ventricule droite de l'artère pulmonaire. Les valves ont pour rôle d'empêcher le retour du sang. Les valves sont de deux types, les auriculo-ventriculaires qui séparent les oreillettes des ventricules et les artérielles qui séparent les ventricules des artères. Le cœur droit (secteur droit) éjecte le sang vers les poumons ; c'est la circulation pulmonaire, et le cœur gauche éjecte le sang vers tous les organes et les périphéries du corps ; c'est la circulation systémique. Le battement du cœur est effectué par les cellules du myocarde (les cardiomyocytes). Le myocarde est le composant le plus épais de la paroi cardiaque qui est formée de l'endocarde (la couche intérieure qui assure le glissement du sang et l'empêche de se coaguler), le myocarde (le muscle cardiaque) et le péricarde (la couche extérieure qui contient le liquide péricardique ayant pour rôle de prévenir la friction lors du battement du cœur). Les cellules du cœur ne sont alimentées en oxygène et nutriments par aucune des deux circulations mais par une circulation qui leur est spécifique : la circulation coronaire. Cette dernière, qui est irriguée pendant la diastole, est formée de deux artères coronaires (droite et gauche), issues de l'artère aorte, et qui se divisent en un réseau amenant la nutrition aux cellules cardiaques.

1.1.2 Physiologie du cœur

Le battement du cœur se fait en trois grandes étapes (*Figure 1.1, C*) : la systole (ou contraction) auriculaire, la systole ventriculaire et la diastole (ou relaxation) ventriculaire. Pendant la première, les oreillettes pompent le sang aux ventricules- en notant que 70% du sang s'en écoule passivement. Pendant la deuxième, qui est la forte contraction, les ventricules se contractent et éjectent le sang qui y en est accumulé suite à la systole auriculaire aux différents organes et périphéries à travers les artères. Cette étape est suivie d'une phase de repos où la pression dans les ventricules baisse ce qui permet le remplissage des oreillettes et la préparation du battement suivant. Le rythme et la fréquence de ce cycle sont contrôlés par un système nerveux reconnu sous le nom : système de conduction (*Figure 1.1, B*). Ce dernier est un système autonome qui règle la durée du cycle cardiaque. Il est composé de cellules spécialisées qui génèrent et distribuent les influx électriques. Il est constitué de : nœud sinusal, nœud auriculo-ventriculaire, faisceau de His, branches droite et gauche du faisceau de His et fibres de Purkinje. Le nœud sinusal est le générateur de l'influx électrique et le centre d'automatisme primaire du cœur. Le nœud auriculo-ventriculaire constitue le centre d'automatisme secondaire ; Il ralentit l'influx électrique issu du nœud sinusal ce qui permet au sang de s'écouler dans les ventricules. Ceci protège les ventricules contre le rythme rapide provenant des oreillettes. Le faisceau de His qui est un prolongement du nœud auriculo-ventriculaire se divise en deux branches dont chacune se divise en son tour à un réseau de fibres appelé réseau ou fibres de Purkinje. L'ensemble de ces éléments constitue le centre d'automatisme tertiaire. La propagation de l'influx électrique du nœud sinusal aux cardiomyocytes induit leur contraction. Cette contraction qui est bien rythmée et synchronisée est modulée partiellement par les systèmes nerveux sympathique et parasympathique. Le système sympathique augmente la fréquence cardiaque alors que le

parasympathique la diminue. Les propriétés électriques du myocarde sont l'automatisme, la conductibilité et l'excitabilité. L'automatisme est contrôlée par le système de conduction tout en notant que les cardiomyocytes ont la capacité de conserver une certaine automatisme lorsqu'elles sont excitées. À côté des cellules du système de conduction, toutes les cellules du myocarde peuvent conduire un influx électrique. L'excitabilité est définie comme étant la capacité des cellules à réagir à un stimulus électrique, mécanique ou chimique et le convertir en influx électrique. L'excitabilité dépend de la période réfractaire qui est définie comme l'incapacité du myocarde à réagir à un nouvel influx lorsque la cellule est durant la dépolarisation (contraction) ou la repolarisation (relaxation). On appelle cette période absolue lorsque le stimulus quel que soit son intensité ne peut engendrer une deuxième dépolarisation. On l'appelle effective lorsque la cellule devient excitée sans qu'elle soit capable de transférer l'excitation aux cellules voisines. Et on l'appelle relative lorsque le stimulus déclenche un second potentiel d'excitation.



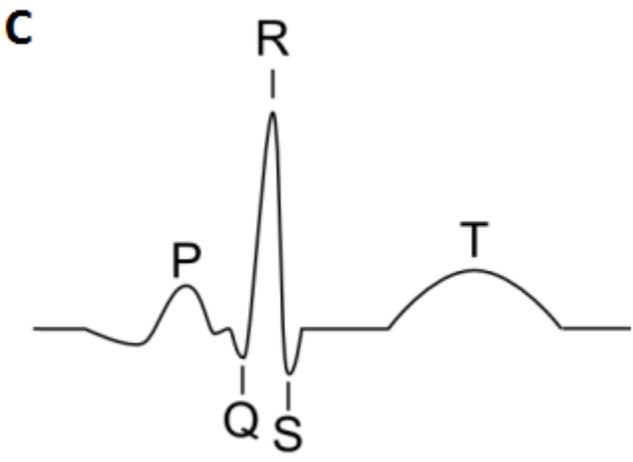
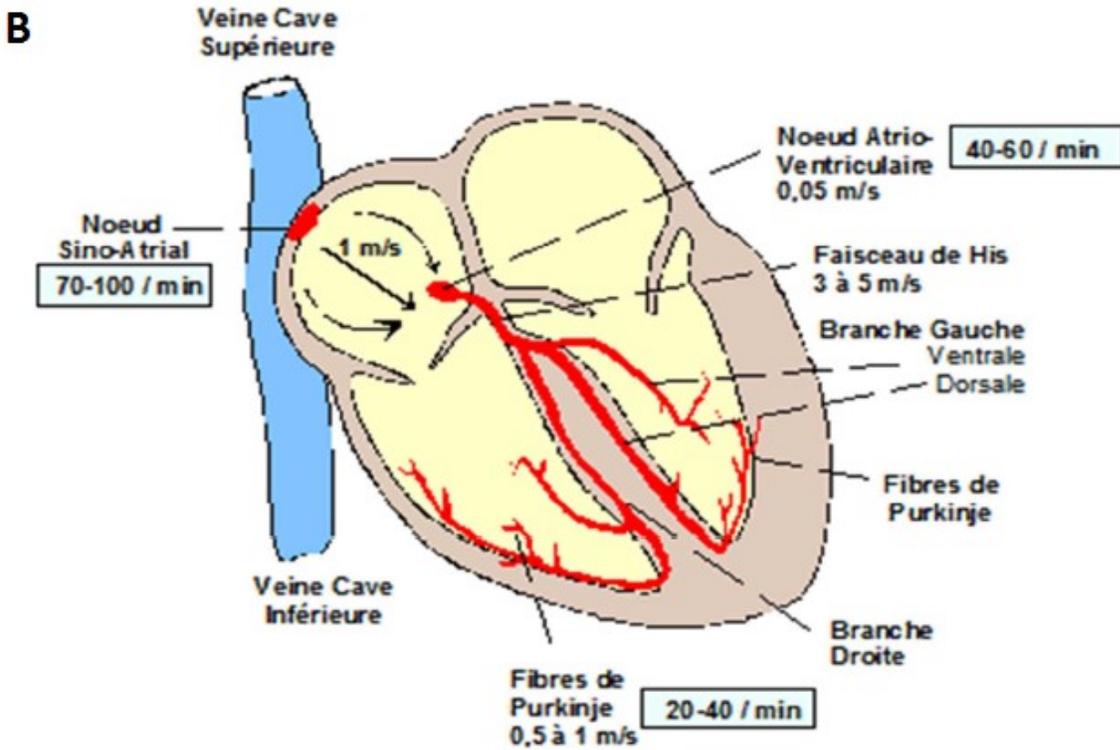


Figure 1.1 : anatomie du Cœur, système de conduction et électrocardiogramme.

A : image représentant les chambres du cœur, les valves, les vaisseaux sanguins essentiels, et le muscle cardiaque. **B** : les différents constituants du cœur, le rythme et la vitesse de propagation de chaque élément de ce système. **C** : électrocardiogramme du battement du cœur ; l'onde P représente la systole auriculaire, l'onde QRS représente la systole ventriculaire, et l'onde T représente la diastole ventriculaire. (Prise du cours PSL 6170 donné par Dr. Angelino Calderone).

1.2 Les cardiomyocytes

1.2.1 Description, histologie et contraction

Les myocytes cardiaques (ou cardiomyocytes) sont les cellules contractiles du cœur. Elles sont cylindriques, courtes, striées, pourvues d'un noyau unique localisé au centre de la cellule. Elles sont ramifiées et elles se connectent entre elles par les jonctions gap au niveau des traits scalariformes (la frontière entre deux cellules voisines). Ces cellules sont munies de myofibrilles (microfilaments d'actine et de myosine) qui constituent le sarcomère ; l'unité responsable de la contraction. Elles sont très riches en mitochondries (30-40% de l'espace du cytoplasme) ; ceci répond à leur haute demande d'énergie sous forme d'ATP qui résulte de l'activité continue du cœur. Le sarcomère est formé de deux types de filaments : l'actine (les filaments minces) et la myosine (les filaments épais). La tropomyosine qui inhibe l'interaction entre l'actine et la myosine est fixée à sa place par la troponine. L'action de cette dernière est inhibée par les ions calcium ce qui permet à la tropomyosine de se déplacer et libérer le site d'interaction entre les filaments du sarcomère. Ceci permet à l'actine et la myosine d'interagir et de se contracter.

1.2.2 Le métabolisme des cardiomyocytes (*Figure 1.2*)

Les cardiomyocytes peuvent utiliser les différents substrats comme les carbohydrates, les lipides, les acides aminés et les cétones (Kolwicz et al, 2013). La flexibilité des préférences métaboliques du cœur entre les différents substrats est très grande, par exemple : dans le cas de jeûne, le cœur utilise les acides gras pour la production de 60-70% d'ATP, le glucose pour 20% d'ATP, et le lactate pour 10%, alors que dans l'état postprandial, le glucose sera utilisé pour 60-70% de production d'ATP (Bertrand et al, 2008). La production d'énergie sous forme d'ATP se fait par

phosphorylation oxydative au sein des mitochondries. Le contrôle du métabolisme (la différence de préférence selon le cas) dépend de l'insuline qui est couplée à une cascade de signalisation mais ce contrôle est largement altéré dans le T2DM (Guo et al, 2017) (l'altération est détaillée dans 1.5.3.1). Le glucose traverse la membrane cellulaire via ses transporteurs Glut-1 et Glut-4. Les acides gras la traversent par diffusion simple ou par diffusion facilitée par ses transporteurs : CD36, FATP et FABP (Ehehalt et al, 2006 ; Schaffer and Lodish, 1994). Le glucose sera converti en pyruvate qui entre à la mitochondrie où il sera oxydé pour produire l'acetyl-CoA qui est le substrat du cycle de Krebs. De l'autre côté, dans le cytosol, l'Acsl ajoute le coenzyme A à l'acide gras pour qu'il sera reconnu par les enzymes cytoplasmiques (bioactif). Le Cpt1b (un enzyme mitochondrial) converti l'acyl-CoA (le produit de l'Acsl) en acyl-carnitine qui peut entrer à la mitochondrie où il sera reconverti (par Cpt2) en acyl-CoA qui subira la β -oxydation et produit plusieurs acetyl-CoA. Ces derniers feront les substrats du cycle de Krebs.

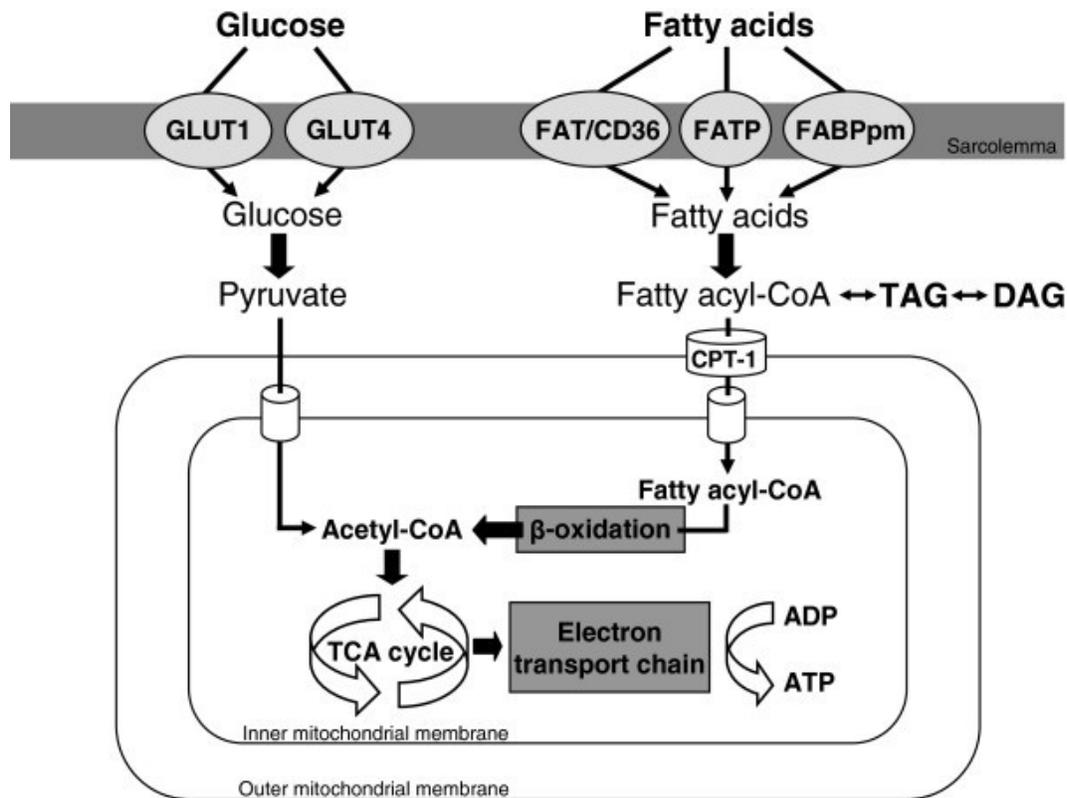


Figure 1.2 : Le métabolisme des cardiomyocytes.

Cette figure représente les voies de productions d'énergie dans les cardiomyocytes. Le glucose est absorbé par Glut 1 et Glut4 au cytosol où il sera converti en pyruvate. Le dernier entre à la mitochondrie où il est converti en acetyl-CoA qui est le substrat du cycle de Krebs. Les produits de ce cycle seront utilisés dans la chaîne de transport des électrons. De leur côté, les acides gras sont absorbés par trois transporteurs : CD36, FABP et FATP. Dans le cytosol, ils sont converti en acyl-CoA qui subi la β-oxydation pour produire des acetyl-CoA. Ces derniers sont des substrats pour le cycle de Krebs dont les produits seront utilisés dans la chaîne de transport des électrons pour la production d'ATP. (Prise de Van den Brom et al, 2013).

1.3 Les acides gras

1.3.1 Description et classifications

Description : Les acides gras sont des acides carboxyliques à chaîne aliphatique hydrophobe saturée ou insaturée. Les acides gras jouent des rôles essentiels dans l'organisme ; ils sont des composants indispensables des membranes biologiques (les phospholipides). Ils sont des messagers et des médiateurs cellulaires (les DAG et les céramides par exemple). Ils forment des réserves énergétiques (les triglycérides par exemple). Les acides gras font l'objet de différentes nomenclatures selon la longueur de la chaîne carbonée et le nombre, la position et la structure spatiale des in-saturations qui sont des doubles liaisons. Selon la longueur, on classifie les acides gras en 3 groupes : les acides gras à chaîne courte (6 à 10 atomes de carbone), les acides gras à chaîne moyenne (12 à 14 atomes de carbone), et les acides gras à chaîne longue (plus de 16 atomes de carbone). On classifie encore les acides gras selon la nomenclature ω (ω -3 ou ω -6) qui consiste à la position de la première double liaison comptée depuis le groupement méthyl.

Les acides gras saturés sont dépourvus des doubles liaisons. Leurs points de fusion augmentent en fonction de la longueur de la chaîne carbonée. Ces acides gras sont linéaires mais peuvent avoir des ramifications. Le plus abondant entre ces acides est l'acide palmitique ou le palmitate (C16 :0). Un excès des acides gras dans les membranes cellulaires peut altérer leur fonction d'interfaces biologiques entre le cytoplasme et le milieu extracellulaire en réduisant la perméabilité de ces membranes ou en modifiant le comportement de certains récepteurs membranaires. En plus, l'acide palmitique a tendance à augmenter le taux sérique des LDL. Ils sont plus répandus dans les viandes et les produits laitiers et surtout dans l'huile de coco.

Les acides gras insaturés sont pourvus de 1 à 6 doubles liaisons. Selon le cas (1 ou plus) on parle des acides gras mono ou polyinsaturés. En plus, on divise ces acides gras en Cis et Trans ; tous les acides gras naturels sont Cis alors que les Trans sont synthétiques. La configuration Cis introduit une courbure dans la chaîne hydrocarbonée ce qui réduit sa flexibilité mécanique, par suite la rigidité de la chaîne de l'acide gras est en corrélation positive avec le nombre de doubles liaisons. Ces courbures abaissent la température de fusion des membranes et augmentent leur fluidité. L'acide oléique est le plus fameux entre les mono insaturés (C18 :1) et l'acide linoléique (C18 :2) et le linoléique (C18 :3) sont les plus fameux entre les polyinsaturés.

L'acide α -linoléique (ou EPA) est un exemple des ω -3, et l'acide linoléique et l'acide arachidonique sont 2 exemples des ω -6. Les métabolites issus des ω -6 sont pro-inflammatoires, prothrombiques et hypertenseurs, alors que ceux issus des ω -3 ont des effets inverses. L'apport optimal de ces 2 groupes est de 1 à 4 fois d' ω -6 plus que l' ω -3, mais récemment cet apport est de 16 fois d' ω -6 plus qu' ω -3. Cet apport élevé d' ω -6 favorise les maladies cardiovasculaires, les cancers, les maladies inflammatoires et auto-immuns. Les éicosanoïdes sont des dérivés des ω -3 ou ω -6, et leurs effets varient selon leur origine ; ceux provenant des ω -3 sont protecteurs alors que ceux provenant des ω -6 sont inflammatoires, prothrombiques, et hypertenseurs.

1.3.2 La synthèse des TAG

Les acides gras qui ne sont pas utilisés dans l'oxydation seront estérifiés et utilisés pour la synthèse des triglycérides. Ceci prend place dans le réticulum endoplasmique. La production des glycérolipides, y inclus les TAG, est importante pour fournir des substrats énergétiques et structuraux. La synthèse des triglycérides (*Figure 1.4*) à partir d'un acide gras- bioactif- se fait en quatre étapes dont chacune est catalysée par une enzyme spécifique.

La première étape est la synthèse de l'acide lysophosphatidique à partir de l'acyl-CoA et le glycerol-3-phosphate. Cette réaction est catalysée par une acyl-transférase, la GPAT, et elle est suivie par la synthèse de l'acide phosphatidique qui est catalysée par une autre acyl-transférase, l'AGPAT ; c'est la deuxième étape. La troisième étape est la conversion de l'acide phosphatidique en DAG, cette réaction est catalysée par la phosphatase de l'acide phosphatidique. La dernière étape est la synthèse des TAG à partir des DAG par une acyl-transférase, la DGAT (*figure 1.4*).

Alternativement, la synthèse de TAG peut être produite à partir des MAG par une voie différente. La voie de MAG est de deux étapes : la première consiste à la synthèse des DAG par une acyl-transférase, la MGAT, suivie par la synthèse de TAG qui est catalysée par DGAT. Cette voie n'est pas active dans le myocarde mais dans d'autres tissus comme l'intestin, le foie et le tissu adipeux.

La réaction de conversion de DAG en TAG est l'étape la plus importante puisqu'elle aboutit à la conversion des lipides toxiques en lipides neutres. Ces derniers peuvent être stockés au sein des organites cellulaires appelés gouttelettes lipidiques (LDs). Ceci, si cet entreposage n'est pas exagéré, protège la cellule contre l'accumulation de métabolites lipidiques actifs et dangereux dans le cytoplasme ou au sein des organelles comme l'ER. De l'autre côté, les TAG stockés servent pour la production d'ATP suite à la lipolyse. Cette action est contrôlée par un ensemble de protéines (détaillé après). L'entreposage excessif des TAG provoque l'obésité dans le tissu adipeux (Yen et al, 2008) et la dysfonction dans les autres tissus. Par exemple, dans le cœur, l'accumulation excessive des TAG est associée à la cardiomyopathie diabétique (Unger et al, 2002).

Il existe deux isoformes de DGAT : DGAT1 et DGAT2. Les deux sont impliqués dans la synthèse des triglycérides, mais ils sont différents en structure protéique, et en fonctions biochimiques, cellulaires et physiologiques (Yen et al, 2008). DGAT1 contient plusieurs domaines hydrophobiques (transmembranaires) et elle forme des homotétramères (Cheng D et al, 2001) alors que DGAT2 ne contient qu'un ou deux domaines hydrophobiques (Yen et al, 2008) et la majorité de cette enzyme se trouve dans le feuillet cytosolique de la membrane de l'ER. DGAT1 est plus active lorsque les cellules sont incubées avec l'oléate par comparaison avec le palmitate (Cases et al, 2001) alors que DGAT2 n'a pas de préférence entre ces deux acides gras. DGAT2 joue un rôle indispensable dans l'homéostasie des TAG ; sa déficience induit une diminution sévère et létale de la quantité des TAG chez les nouveau-nés (Stone et al, 2004). De l'autre côté, la déficience en DGAT1 n'est pas létale mais elle réduit l'obésité en 50% environ (Zhao et al, 2008).

1.4 Le diabète

1.4.1 Introduction et T1DM

Le diabète est une maladie chronique qui affecte 300 millions personnes dans le monde. Elle est définie par un taux de glucose élevé dans le sang ou hyperglycémie. On distingue deux types majeurs de diabète : le type I qui atteint près de 10% de la population des diabétiques et le type II qui en atteint 90%. Le diabète de type I (T1DM) résulte de la perte des cellules productrices de l'insuline qui sont les cellules- β des îlots de Langerhans du pancréas. Cette perte cause une déficience d'insuline. En majorité des cas, la perte des cellules- β vient de leur attaque par les cellules T du système immunitaire. Les personnes atteintes de ce type de diabète présentent une sensibilité et une réponse normales à l'insuline surtout dans les stades premiers. Le T1DM est

partiellement héréditaire, et il peut être déclenché par plusieurs facteurs environnementaux comme l'infection virale ou la diète.

1.4.2 T2DM

Le T2DM est le type de diabète le plus abondant entre les humains ; il atteint près de 90% de la population diabétique. Il est reconnu par un ensemble de symptômes parmi lesquels la polyurie, la polydipsie, la polyphagie, la perte de poids, le flou de vision, et la fatigue.

L'étiologie du diabète de type II est compliquée. Des facteurs environnementaux et génétiques y sont impliqués. Un surplus calorique est une cause clé du T2DM. L'obésité et le syndrome métabolique sont des facteurs importants pour le développement du T2DM. L'état pré-diabétique est caractérisé par une résistance à l'insuline pendant laquelle la voie de signalisation de l'insuline est perturbée ce qui aboutit à une absorption et utilisation anormales du glucose dans les tissus périphériques comme les muscles squelettiques. La résistance à l'insuline cause l'hyperglycémie qui à son tour pousse le pancréas à sécréter plus et plus d'insuline. À ce titre, la résistance à l'insuline est associée à une hyper-insulinémie compensatoire. L'hyperglycémie prolongée provoque une décompensation pancréatique et la mort des cellules β ainsi la résistance à l'insuline se développe en T2DM. T2DM est associé avec une hypo-insulinémie parce que la mort des cellules β provoque une faible sécrétion d'insuline. La lipotoxicité et l'ERS sont impliqués dans la mort des cellules β . Ce processus est lent et prend plusieurs ans avant l'occurrence de T2DM (Utzchneider et al, 2006).

La mort des cellules β est attribuée à l'altération du métabolisme des adipocytes. La faible absorption du glucose altère le métabolisme des adipocytes ce qui aboutit à la production des acides gras non estérifiés qui sont impliqués dans la mort des cellules β (Leung et al, 2004 ;

Kahn et al, 2006). Ceci est un mécanisme de la lipotoxicité connue depuis (Randle et al, 1963). L'obésité est associée à la production des acides gras non estérifiés (Boden et al, 1997) au T2DM et à la résistance à l'insuline (Reaven et al, 1988) ; dans le tissu adipeux, l'obésité induit la libération de plusieurs substrats qui altèrent le métabolisme comme les acides gras non estérifiés, le glycérol, les hormones et les cytokines pro-inflammatoires (Wellen et al, 2005 ; Shoelson et al, 2006).

1.5 La cardiomyopathie diabétique

1.5.1 Introduction

Le diabète aboutit à des complications dans le système cardiovasculaire connues par le terme cardiomyopathie diabétique (DCM) qui était décrite pour la première fois par (Rubler et al, 1972). La DCM est définie par la présence d'anormalités de structure et de performance dans le myocarde sans l'intervention de la maladie de l'artère coronaire, l'hypertension et la valvulopathie (Yilmaz et al, 2015). Ces anomalies sont l'hypertrophie du ventricule gauche et les dysfonctions systolique et diastolique (Yilmaz et al, 2015). La DCM est provoquée par l'hyperglycémie, la glycosylation des protéines, la formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et l'accumulation et l'augmentation de l'oxydation des acides gras (Yilmaz et al, 2015). Le stage final de la DCM est l'insuffisance cardiaque qui est plus élevée chez les diabétiques par comparaison avec les non-diabétiques (Thrainsdottir et al, 2015). Le mécanisme de développement de l'insuffisance cardiaque chez les diabétiques comporte des mécanismes pathologiques y comprises la lipotoxicité, l'altération de manipulation du calcium et du

métabolisme cardiaque, l'augmentation de formation des ROS et les dysfonctions mitochondriales.

1.5.2 L'hypertrophie cardiaque (*Figure 1.3*)

L'hypertrophie est définie par l'augmentation de masse du myocarde cardiaque- généralement celui du ventricule gauche. Cette augmentation se produit grâce à la synthèse de nouveaux sarcomères (unités contractiles) qui impliquent une augmentation de volume des cardiomyocytes. On distingue deux façons d'alignement de sarcomères : l'alignement en parallèle qui rend les cellules plus épaisses par suite le myocarde devient plus épais aux dépens de la lumière du ventricule. Cet effet est induit par l'hypertension et défini par hypertrophie pathologique ou concentrique. Le deuxième alignement se fait en série, où les nouveaux sarcomères sont disposés en ligne ce qui rend les cellules plus longues par suite le diamètre du myocarde devient plus gros et la lumière du ventricule plus vaste. Cet effet est induit par l'augmentation du volume du sang et l'exercice et il est défini par hypertrophie physiologique ou excentrique (Calderone et al, 2014). Le T2DM (Jorgensen et al, 2016) et la résistance à l'insuline (Velagateli et al, 2010) sont associées à l'hypertrophie concentrique et la dysfonction diastolique. La dysfonction diastolique, qui est définie par une pression ventriculaire élevée pendant le remplissage (la diastole), est une caractéristique hémodynamique de DCM. Elle peut évoluer à une dysfonction systolique qui est définie par l'incapacité du ventricule gauche à pomper suffisamment le sang vers l'organisme (Yilmaz et al, 2015).

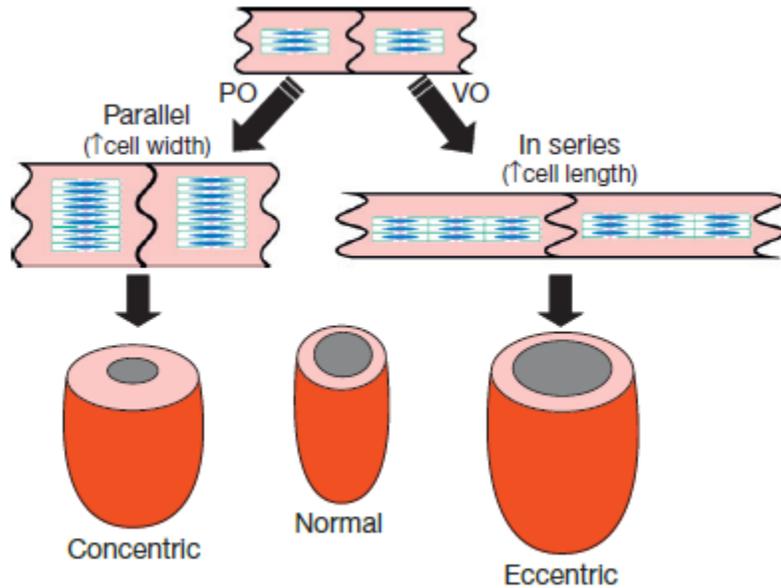


Figure 1.3 : l’hypertrophie cardiaque.

L’hypertrophie pathologique (concentrique) : La haute pression sanguine induit la synthèse de nouveaux sarcomères qui seront alignés en parallèle ce qui augmente la largeur des cardiomyocytes. Ceci augmente le volume du myocarde aux dépens de la lumière du ventricule. **L’hypertrophie physiologique (excentrique)** : le haut volume de sang induit la synthèse de nouveaux sarcomères qui seront alignés en série ce qui augmente la longueur des cardiomyocytes. Ceci augmente le volume du myocarde et de la lumière du ventricule. (Prise de Calderone A, 2014).

1.5.3 Les mécanismes cellulaires impliqués dans la DCM

Au niveau cellulaire, la DCM est associée à un ensemble de processus intracellulaires parmi lesquels la lipotoxicité (toxicité associée aux lipides), l’altération de la manipulation des ions calcium, le stress oxydatif causé par la formation des espèces réactives de l’oxygène et la dysfonction mitochondriale.

1.5.3.1 La lipotoxicité

La lipotoxicité est définie comme étant tout stress provoqué par les lipides comme le stress de l’ER, le stress oxydatif, la dysfonction mitochondriale et l’apoptose. Le cœur est capable

d'utiliser les acides gras, le glucose, le lactate, les acides aminés et les cétones pour la production d'énergie. Dans les conditions normales, les cardiomyocytes utilisent les acides gras pour 70% du métabolisme, alors que dans les conditions diabétiques, elles en deviennent plus dépendantes et les utilisent pour près de 90% des réactions métaboliques. Ceci est accompagné par une stéatose cardiaque causée par une augmentation de l'absorption des acides gras (Barsotti et al, 2009) qui est due en partie à une expression et une activité élevées du CD36 (un transporteur des acides gras) (Greenwalt et al, 1995). La résistance à l'insuline et/ou le taux faible d'insuline induit une diminution de l'absorption du glucose (Barsotti et al, 2009), de sa glycolyse et de son oxydation, et une augmentation de l'oxydation des acides gras (Yilmaz et al, 2015). Cette oxydation excessive provoque l'accumulation de plusieurs métabolites toxiques (comme les céramides et les DAG) qui détériorent l'homéostasie du calcium et la contraction des cardiomyocytes (Yilmaz et al, 2015).

Les acides gras saturés sont impliqués fortement dans le développement et la pathologie de la DCM ; ils induisent l'ERS et l'apoptose dans des cellules de plusieurs tissus y inclus le cœur (Haffar et al, 2015). Ils induisent encore la sécrétion des cytokines inflammatoires y incluses l'IL-6 et TNF- α dans les cellules musculaires lisses (Jove et al, 2005). En plus, ils induisent la production des ROS qui à leur tour activent PKC et ses voies de signalisation qui rendent le cas pathologique du cœur plus compliqué (Faria et al, 2017). PKC et ses voies de signalisation sont encore activées par les DAG qui sont plus abondants dans les cellules traitées avec des acides gras saturés. PKC est une protéine kinase qui est activée par une haute concentration de DAG et qui régule l'activité des protéines par phosphorylation. Parmi les cibles de PKC, on note : JNK, MAPK et NF-kB.

1.5.3.1.1 Le palmitate et l'oléate, et la DCM

Le palmitate, un acide gras saturé, induit l'ERS, la formation des ROS, l'accumulation de DAG- qui est associée avec l'induction de la résistance à l'insuline (Szendroedi et al, 2014) - et l'apoptose (Liu et al, 2011). L'accumulation de DAG active PKC (Coll et al, 2008), et les deux induisent la résistance à l'insuline chez les diabétiques obèses, et activent TLR pour induire l'inflammation (Senn et al, 2008). De l'autre part, le palmitate peut interagir directement avec MD2 qui est une protéine accessoire de TLR4 (un membre de la famille des TLR) pour induire l'inflammation (Wang et al, 2017). L'activation de PKC et TLR active NF- κ B qui régule les médiateurs inflammatoires comme l'IL-6 et le TNF- α et d'autres substances impliquées dans l'altération du métabolisme (Perdomo et al, 2015). En plus, le palmitate s'incorpore dans les phospholipides membranaires y inclus la membrane de l'ER ce qui provoque sa dilatation et la perte de son intégrité (Borradaile et al, 2006). Le palmitate est encore impliqué dans le développement et l'instabilité des plaques athérosclérotiques (Montecucco et al 2008).

Par contre, l'oléate, un acide gras mono-insaturé est protecteur ; pas seulement il n'induit pas des effets nuisibles pour les cardiomyocytes, mais il atténue la lipotoxicité associée au palmitate (Haffar et al, 2015, b). Cette caractéristique de l'oléate est affaiblie lorsqu'il est administré aux cellules pour plus de 24 heures. L'oléate améliore le profile lipidique (Hlais et al, 2013), et prévient la dysfonction mitochondriale, la résistance à l'insuline et la signalisation inflammatoire dans les myocytes (Salvado et al, 2013) ; les diètes riches en acide oléique sont associées à une réduction des évènements cardiovasculaires (Estruch et al 2013).

1.5.3.2 La dysrégulation des ions calcium

La manipulation des ions calcium est indispensable pour le contrôle du battement du cœur. Il existe deux sources de ces ions : une intracellulaire, le réticulum sarcoplasmique qui fonctionne comme un entrepôt de ces ions et une extracellulaire, les canaux ioniques à travers la membrane cytoplasmique. L'augmentation de la concentration cytoplasmique des ions calcium induit la contraction (le mécanisme est détaillé dans 1.2.1). Par suite, elle active des pompes qui retournent les ions calcium au réticulum sarcoplasmique, par les pompes Serca, ou vers l'extérieur de la cellule, par les canaux ioniques NCX. La diminution de la concentration cytosolique des ions calcium permet à la tropomyosine de reprendre sa position entre les filaments contractiles et la relaxation. Ce système est important pour un bon fonctionnement des cardiomyocytes qui s'achève en de bons rythme et physiologie du cœur. Un déséquilibre dans ce système provoque une dysrégulation de l'homéostasie des ions calcium qui est une marque commune de la DCM. Les cœurs diabétiques représentent une activité réduite de Serca et NCX ce qui prolonge le potentiel d'action des cardiomyocytes, retarde leur relaxation et leur réponse aux ions calcium, et contribue à la dysfonction contractile (Jweied et al, 2005). En plus, le pic de concentration intracellulaire des ions calcium et la fréquence de ces pics est faible par comparaison aux cœurs non diabétiques (Zhao et al, 2014).

1.5.3.3 Les ROS et la dysfonction mitochondriale

Les ROS sont des radicaux chimiques libres contenant l'oxygène. Ils se forment dans les mitochondries ou dans le cytosol (par NADPH oxidase) et contribuent à la progression de la DCM. Ces espèces oxydent les protéines, les acides nucléiques et les lipides, et réagissent avec

l'oxyde nitrique pour produire le peroxyde nitrite. Ce dernier est capable de réagir avec les lipoprotéines et la tyrosine des différentes protéines pour produire la nitrotyrosine qui est associée avec l'augmentation de l'apoptose (Cai et al, 2001). La nitrotyrosine est un marqueur du stress oxydatif dans les tissus. Les ROS sont associées à l'hypertrophie, la fibrose, la dysfonction contractile et l'insuffisance cardiaque (Yilmaz et al, 2015).

La dysfonction mitochondriale est caractérisée par la perte du potentiel de la membrane mitochondriale, la synthèse altérée d'ATP et la basse respiration maximale. Elle est le résultat de la dysrégulation du calcium, la haute production des ROS et l'accumulation des métabolites toxiques dans les cardiomyocytes (Anderson et al, 2009). L'ensemble de ces effets aboutissent à la dysfonction mitochondriale, la dysfonction contractile et l'insuffisance cardiaque.

1.6 Les gouttelettes lipidiques (*Figure 1.4*)

Les LDs jouent un rôle important dans l'entreposage des acides gras sous forme de TAG, la protection des cellules contre la lipotoxicité et la régulation du métabolisme des lipides. Une LD est un cœur lipidique formé essentiellement de TAG et de cholestérol-ester entouré par une monocouche de phospholipides (Tauchi-Sato et al, 2002). Sa taille varie de 20-40nm à 100um (Stobart et al, 1986). Le cholestérol-ester sert comme substrat pour la synthèse et la réparation des membranes (Brasaemle et al, 2007). La phosphatidyl-choline est le phospholipide majeur des membranes des LDs (Bartz et al, 2007). Les LDs riches en TAG sont polarisées vers la périphérie de la cellule alors que celles riches en cholestérol-ester sont plus au centre de la cellule (Hsieh et al, 2012). Les LDs se trouvent dans la plupart des cellules et elles jouent des rôles fondamentaux dans le métabolisme cellulaire. Elles jouent un rôle important dans le contrôle de l'homéostasie des lipides, servant ainsi comme un réservoir énergétique et

fournissant des substrats pour les processus oxydatifs quand il y a besoin et pour les membranes, la signalisation et la modification des protéines (Brasaemle et al, 2007 ; Paul et al, 2008). Les LDs sont une source des substrats utilisés dans la synthèse des médiateurs d'inflammation dans les leucocytes et d'autres types de cellules (Bozza et al, 2007). La structure de ces LDs permet aux cellules d'utiliser leur contenu de lipides émulsifiés quand il y a demande pour l'énergie métabolique ou un changement de la synthèse membranaire. Les LDs se forment au sein des membranes de l'ER ; les dernières étapes de la synthèse des lipides sont catalysées par des enzymes qui résident dans l'ER (Brasaemle et al, 2007). Leur formation est supposée comme suit : les TAG s'accumulent sous la forme des lentilles entre les deux feuilletts de la bicouche phospholipidique de la membrane de l'ER (Robenek et al, 2006 ; Scow et al, 1980). Les petites LDs fusionnent pour former des LDs plus grandes (Brasaemle et al, 2007 ; Guo et al, 2008). On suggère trois modèles pour la formation des LDs : le modèle le plus supporté est le modèle canonique qui postule que les lipides forment des lentilles d'huile dans l'ER puis elles bourgeonnent prenant des phospholipides du feuillet cytosolique de la membrane de l'ER (Guo et al, 2008). Un deuxième modèle proposé est le modèle de bicelle qui postule que les TAG s'accumulent entre les feuilletts de la membrane de l'ER formant des LDs naissantes qui seront excisées de la membrane prenant avec eux les phospholipides des deux feuilletts de la membrane (Ploegh et al, 2007). Le troisième modèle suggéré est le modèle de bourgeonnement vésiculaire où des petites bicouches vésiculaires restant attachées à la membrane de l'ER sont utilisées comme plate-forme pour la synthèse des LDs ; ainsi les LDs néo-synthétisées seront pompées dans le lumen des vésicules (Walther et al, 2008).

Les LDs interagissent entre elles, avec l'ER, les mitochondries, les endosomes, les peroxysomes et la membrane plasmique (Goodman et al, 2008 ; Murphy et al, 2008). Ceci serve pour le

transport des lipides entre les organelles dans la cellule ; quelques de ces interactions paraissent régulées ou médiées par Rab GTPases qui se trouvent sur les LDs (Liu et al, 2008). Les TAG dans les LDs peuvent être synthétisées localement par des enzymes localisées à leurs surface comme Dgat2, ceci est favorisé par la présence des enzymes de synthèse de phospholipides à la surface de ces LDs (Guo et al, 2008). De même, les TAG séquestrés dans les LDs subissent la lipolyse par des lipases pour fournir l'énergie métabolique (par oxydation des acides gras) et des lipides pour la synthèse des membranes (Zechner et al, 2005 ; Brasaemle et al, 2007 ; Ducharme and Bickel, 2008) et le glycérol libéré suite à cette lipolyse sera transporté au foie pour le métabolisme du glucose (glycolyse ou gluconéogenèse) (Brasaemle et al, 2007). On suggère que les LDs servent comme réservoir protecteur pour les protéines non-plissées ou autres composés pour prévenir les interactions nuisibles avec des autres composants (Ohsaki et al, 2006 ; Welte et al, 2007). En plus, elles servent pour la répllication efficace des pathogènes intracellulaires comme l'hépatite C et Chlamydia trachomatis (Guo et al, 2009). Myianari et al (2007) a mentionné que l'hépatite C utilise les LDs comme plate-forme pour l'assemblage du virus ; bloquer l'interaction de l'hépatite C avec les LDs atténue les répllications virales (Myianari et al, 2007). Plusieurs protéines sont associées aux LDs comme les périlipines, l'acyl-CoA carboxylase, Dgat2, et les lipases comme l'ATGL, ARF1, ... (Brasaemle et al, 2007 ; Kuerschner et al, 2008 ; Stone et al, 2009).

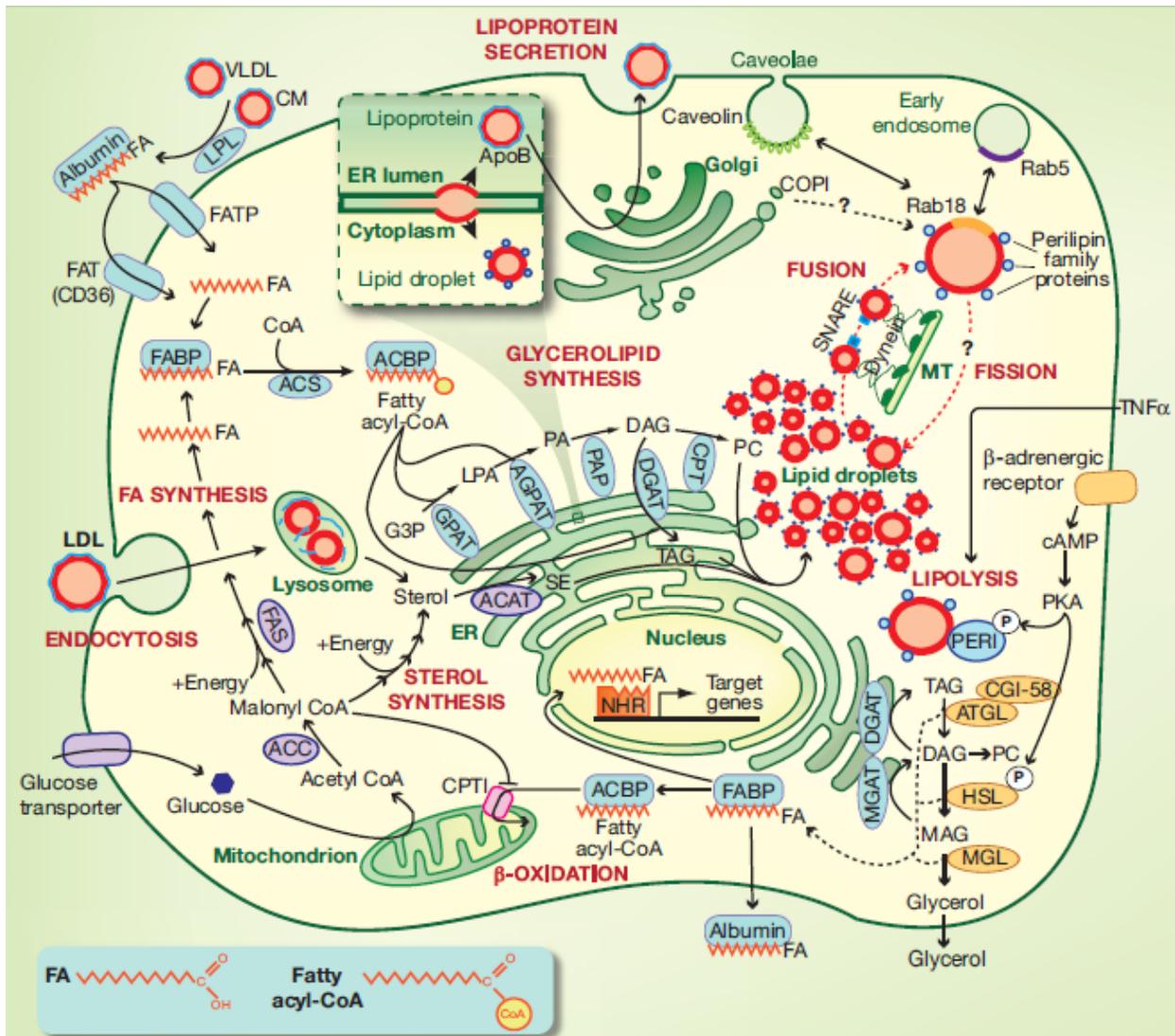


Figure 1.4 : les acides gras et les gouttelettes lipidiques dans la cellule

Les acides gras sont absorbés par CD36 et FATP puis activés par l'Acsl avant d'être utilisés dans la synthèse des TAG qui est un mécanisme impliquant GPAT, AGPAT, PAP et DGAT. Les TAG bourgeonnent sous forme des gouttelettes lipidiques. Les périlipines qui sont des protéines associées aux gouttelettes lipidiques contrôlent la lipolyse des TAG qui est un processus impliquant ATGL-CGI58, HSL et MGL. Les acides gras produits de la lipolyse sont transportés aux mitochondries où ils seront oxydés pour produire l'énergie. Les gouttelettes lipidiques néo-synthétisés fusionnent pour former des gouttelettes plus grandes. la fusion est catalysée par les protéines SNARE. De l'autre côté, le glucose est absorbé par ses transporteurs et est transféré directement aux mitochondries où il sera oxydé en acetyl-CoA qui peut entrer dans la voie de synthèse des acides gras et peut entrer dans le cycle de Krebs pour continuer la production d'énergie. (Prise de Guo et al, 2009).

1.7 Les périlipines

1.7.1 Introduction

Les périlipines (Plin1-5) ou PAT sont une famille de protéines associées aux LDs. Elles ont été découvertes et définies en 1991 par Greenberg et al. Cette famille est formée de cinq membres qui sont : Plin1 ou périlipine, Plin2 ou ADRP (Adipose Differentiation Related Protein), Plin3 ou Tip47 (Tail-Interacting Protein of 47kDa), Plin4 (ou S3-12), et Plin5 ou OXPAT ou LSDP5 (Lipid Storage Droplet Protein 5) (Brasaemle et al, 2007 ; Paul et al, 2008). Plin1 et Plin2 sont des Plins constitutives alors que Plin3 et Plin5 sont des Plins échangeables dans le cytosol (Wolins et al, 2006). Les constitutives sont des protéines dont l'expression est restreinte à la présence des LDs auxquelles elles sont associées alors que les échangeables sont les Plins exprimées dans toutes les conditions même en absence des LDs. Les Plins contrôlent le stockage et le métabolisme des lipides ; elles contrôlent la lipolyse et maintiennent les LDs (Guo et al, 2009 ; Mason et al, 2015). Ci-dessous nous discutons chaque Plin à son tour. Veuillez noter que Plin2 est la dernière parce qu'elle est essentielle pour le mémoire.

1.7.2 Plin1

Plin1 est essentiellement exprimée dans les tissus adipeux blanc et brun et les tissus stéroïdogènes (Servetnick et al, 1995), dans les macrophages (Hofnagel et al, 2007 ; Larigauderie et al, 2006 ; Persson et al, 2007), et dans les cellules spumeuses au niveau des lésions athérosclérotiques (Faber et al, 2001). Elle est associée aux LDs riches en TAG ou cholestérol-ester (Hsieh et al, 2012). Il existe trois isoformes de Plin1 ; Plin1A qui est le plus abondant et le plus grand (Greenberg et al, 1993), Plin1B qui est moins abondant et Plin1C qui est le moins abondant et le spécifique des cellules stéroïdogènes (Lu et al, 2001). Plin1 joue un rôle

fondamental dans le stockage des lipides et la libération des acides gras (Tansey et al, 2004) ; dans les conditions basales, elle empêche les lipases (ATGL et HSL) de réaliser la lipolyse des TAG séquestrés dans les LDs (Paul et al, 2008) alors que dans les conditions de stimulation β -adrénergique où les besoins métaboliques sont très importants, Plin1 permet la lipolyse en permettant aux lipases d'accéder aux lipides séquestrés dans les LDs. Dans ce dernier cas, Plin1 est phosphorylée par PKA (Tansey et al, 2004). Cette phosphorylation se fait au niveau de plusieurs sites (Greenberg et al, 1993 ; Lu et al, 2001). Le mécanisme rencontré dans les conditions de haut besoin d'énergie métabolique implique la présence des interactions entre cette Plin et les protéines impliquées dans la lipolyse (Brasaemle et al, 2007). Ces dernières sont l'ATGL qui hydrolyse le TAG en DAG, et l'HSL qui hydrolyse DAG en MAG. L'interaction entre CGI-58 et l'ATGL est indispensable pour l'activation de la dernière, et la phosphorylation de Plin1 permet cette interaction (Bolsoni-Lopes et al, 2015). La déficience ou la perte de Plin1 réduit l'accumulation des lipides intracellulaires dans les cellules adipeuses (Gandotra et al, 2011) et provoque une β -oxydation excessive et une production élevée des ROS et un stress oxydatif dans le cœur (Liu et al, 2014).

1.7.3 Plin3

Plin3 est exprimée partout dans l'organisme surtout dans les tissus oxydatifs comme le cœur et les muscles squelettiques. Sa distribution tissulaire est la plus proche de celle de Plin2 par comparaison aux autres Plins (Brasaemle et al, 2007). Elle est associée aux LDs riches en TAG ou cholestérol-ester (Hsieh et al, 2012). Elle est recrutée aux LDs néo-synthétisées lors de la synthèse et du stockage des TAG (Wolins et al, 2005). La diminution de l'expression de Plin3

réduit la stéatose du foie (Carr et al, 2012) alors que sa surexpression dans les macrophages induit l'accumulation des lipides (Gu et al, 2010).

1.7.4 Plin4

Plin4 est fortement exprimée dans le tissu adipeux blanc, et moins exprimée dans le cœur (Paul et al, 2008) et faiblement dans le tissu adipeux brun (Wolins et al, 2003). Elle n'est pas exprimée dans les macrophages ni les lésions athérosclérotiques (Paul et al, 2008). Elle est associée seulement aux LDs riches en cholestérol-ester. Elle est une cible du PPAR- γ qui stimule son expression dans les adipocytes (Dalen et al, 2004). L'ablation de Plin4 dans le cœur n'affecte pas la lipolyse mais réduit l'accumulation des lipides (Chen et al, 2013).

Le PPAR est une famille de récepteurs nucléaires qui régulent l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme et la différenciation cellulaire. Il existe trois isoformes des PPAR : PPAR- α qui est exprimé surtout dans le foie, les reins, le tissu adipeux et les muscles cardiaques et squelettiques, PPAR- β/δ qui est exprimé dans le tissu adipeux, et PPAR- γ qui est exprimé partout dans l'organisme mais il est plus abondant dans le tissu adipeux que dans le cœur. Tous les PPAR forment des hétéromères avec le RXR qui est un récepteur nucléaire pertinent qui se dimère avec les différents récepteurs nucléaires y inclus le PPAR ce qui leur permet de réaliser leurs fonctions. Le dimer PPAR-RXR s'attache à des séquences de l'ADN appelées PPREs. Ces séquences se trouvent dans la région promotrice des gènes cibles du PPAR ce qui fournit au PPAR sa fonction de facteur de transcription. Les ligands qui activent PPAR et induisent son activité sont très nombreux parmi lesquels on note : les acides gras, les éicosanoïdes, la prostaglandine, et différents métabolites dérivés des acides gras.

1.7.5 Plin5

Plin5 est exprimée fortement dans les tissus oxydatifs tel que le cœur et les muscles squelettiques (Paul et al, 2008). L'expression de Plin5 dans les muscles à contraction lente est plus forte que celle dans les muscles à contraction rapide, le foie, et le tissu adipeux brun (Dalen et al, 2007). Plin5 n'est pas majoritairement associée aux LDs mais lorsqu'elle l'est, elle est associée aux LDs riches en TAG (Mason et al, 2015). Plin5 se trouve encore associée à la membrane mitochondriale durant le stress et la contraction musculaire intense (Mason et al, 2015). PPAR- α induit l'expression de Plin5 (Barger et al, 2000). Plin5 est en colocation avec l'ATGL et CGI-58 dans les cellules musculaires au repos ou en exercice (Mason et al, 2014) ; comme Plin1, Plin5 est une cible de phosphorylation par PKA lorsque la cellule est en haut besoin d'énergie (*figure 1.5*). Cette phosphorylation permet l'activation des lipases et l'occurrence de la lipolyse par l'ATGL et l'HSL (Osumi et al, 2015 ; Mason et al, 2015 ; Pollak et al, 2015). Cette phosphorylation n'enlève pas complètement les propriétés protectrices contre la lipolyse et ceci prévient les effets détruisant de la lipolyse massive (Osumi et al, 2015). La surexpression de Plin5 augmente la quantité des LDs (Wolins et al, 2006 ; Dalen et al, 2007), induit la stéatose du myocarde (Wang et al, 2013), diminue des gènes cibles du PPAR, des fonctions mitochondriales, provoque l'hypertrophie du ventricule gauche (Wang et al, 2013), et favorise l'utilisation du glucose dans les cardiomyocytes (Pollak et al, 2015). Par contre, la déficience en Plin5 protège contre la stéatose (Kuramoto et al, 2014) et promeut l'oxydation des acides gras dans les cardiomyocytes (Kuramoto et al, 2012). En plus, l'ablation de Plin5 réduit le taux des acides gras, des DAG et des céramides dans le cœur (Osumi et al, 2015) et des LDs (Kuramoto et al, 2012).

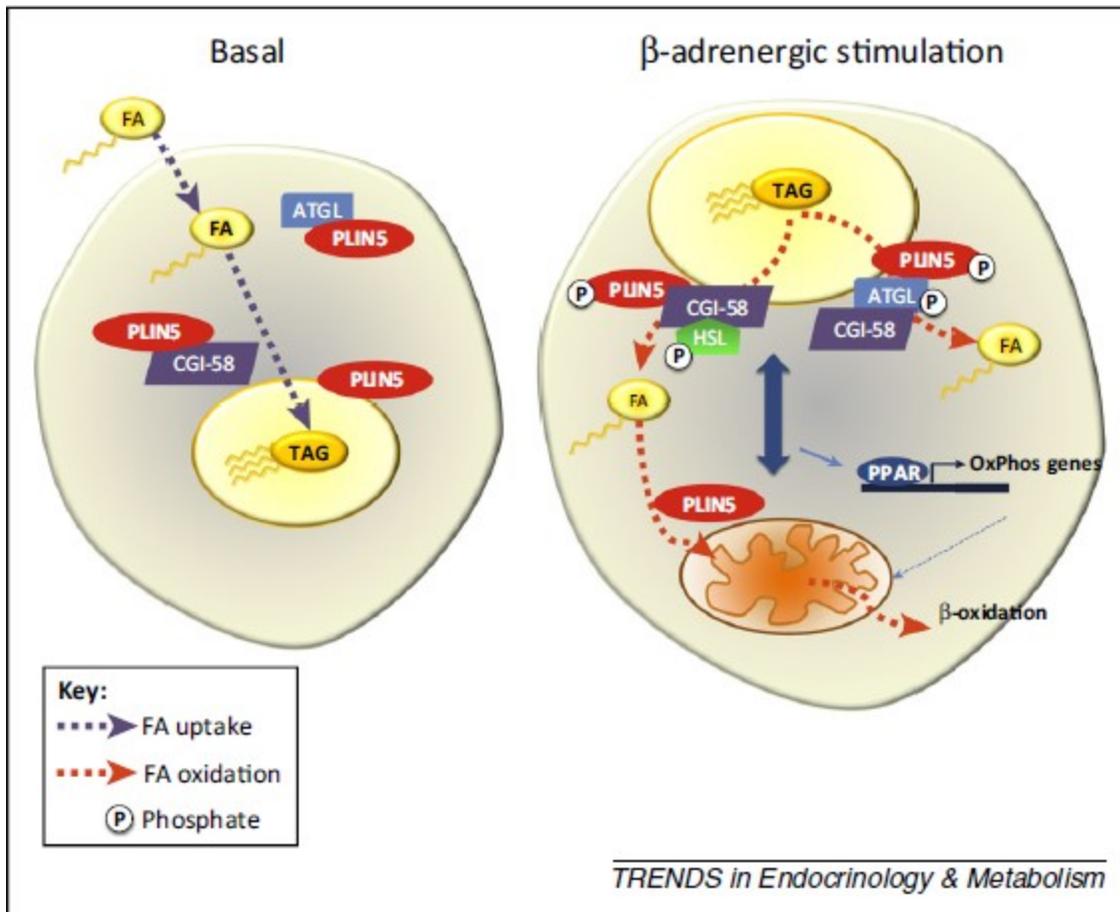


Figure 1.5 : Le contrôle de lipolyse par Plin5.

Dans les conditions basales : Plin5 se lie à l'ATGL et CGI-58, ceci empêche l'activation d'ATGL et réduit la lipolyse. En même temps, Plin5 facilite la séquestration des acides gras dans les gouttelettes lipidiques.

Dans les conditions de haut besoin d'énergie comme la stimulation β -adrénergique, Plin5 phosphorylée par PKA facilite l'activation de l'ATGL et la lipolyse. Dans ces conditions, Plin5 garde les gouttelettes lipidiques à la proximité des mitochondries. (Prise de Mason et al, 2015).

1.7.6 Plin2

Plin2 était découverte dans des cellules adipeuses murines en cours de différenciation par Jiang et al en 1992. Elle est la plus répandue entre les membres de la famille des Plins. Plin2 se trouve partout surtout dans le foie, le cœur et les muscles squelettiques, et elle se trouve encore associée aux pré-adipocytes (Brasaemle et al, 2007). Plin2 est associée aux LDs riches en TAG ou en cholestérol-ester (Hsieh et al, 2012). Plin2 est formée d'un motif N-terminal nommé PAT-1 et d'un autre distal nommé PAT-2 (Miura et al, 2002) et des répétitions hélicoïdales de 11-mer (Dalen et al, 2006). PAT-1 et PAT-2 se trouvent encore dans Plin1 et Plin3, et les répétitions hélicoïdales de 11-mer se trouvent chez toutes les Plins. Plin2 est induite dans les premiers stades de différenciation des adipocytes (Brasaemle et al, 1997) ce qui lui suggère un rôle dans la différenciation de ces cellules (Imamura et al, 2002), et par les acides gras à longue chaîne (Dalen et al, 2006) comme l'oléate (Miura et al, 2002 ; Imamura et al, 2002). L'induction de Plin2 par l'oléate dépend du PPAR et de l'élément DR-1 du PPRE (Dalen et al, 2006). Le gène de Plin2 est une cible des différents isoformes de PPAR exprimés dans les différents tissus (Targett-Adams et al, 2005 ; Chawla et al, 2003). Encore, Plin2 est exprimée fortement dans la cardiomyopathie, la stéatose hépatique, les maladies rénales, et l'ischémie du colon (Straub et al, 2013).

Plin2 est fortement et exclusivement associée aux LDs qui sont localisées dans la majorité des tissus (Brasaemle et al, 1997). Son expression est en corrélation avec le contenu cellulaire de TAG- un composant essentiel des LDs (Masuda et al, 2006). Plin2 favorise la synthèse de TAG et la formation des LDs dans les fibroblastes (Imamura et al, 2002), l'absorption des lipides dans les cellules rénales (Gao et al, 1999) et l'accumulation des lipides in vivo (Varela et al, 2008).

Dans des cellules rénales, Plin2 induit l'augmentation de la quantité de TAG en réduisant leur hydrolyse par inhibition de l'interaction entre l'ATGL et les LDs, et réduit l'association entre les LDs et Plin3 et d'autres protéines (Listenberger et al, 2007). Plin2 est encore associée à la stéatose du foie (Chang et al, 2006), à l'obésité induite par la diète riche en lipides (McManaman et al, 2013), et à la régulation du taux sérique des lipoprotéines HDL, LDL, et VLDL (Najt et al, 2016). Plin2 est hautement instable dans le cytosol lorsqu'elle n'est pas associée aux LDs et elle est soumise à la dégradation par le protéasome (Gross et al, 2006 ; Xu et al, 2005 ; Masuda et al, 2006). Ceci explique son absence dans les cellules dépourvues des LDs (Dalen et al, 2006). Malgré cela, les LDs entourées de Plin2 restent plus accessibles aux lipases que les LDs entourées de Plin5 (Pollak et al, 2015). Plin2 est associée à une amélioration de la sensibilité à l'insuline via l'augmentation de phosphorylation des récepteurs à l'insuline (de Wilde et al, 2009). L'expression de Plin2 est en corrélation positive avec l'induction de la sensibilité à l'insuline (Philips et al, 2005). En plus, Plin2 possède un rôle anti inflammatoire dans le tissu adipeux (Carr et al, 2014 ; Chang et al, 2006) et dans les myoblastes (Cho et al, 2015).

Les propriétés associées à Plin2 l'ont impliquée profondément dans l'athérosclérose. Plin2 est exprimée dans les cellules spumeuses au niveau des lésions athérosclérotiques (Faber et al, 2001). Plin2 est importante pour la formation des cellules spumeuses (Paul et al, 2008 ; Zhao et al, 2005 ; Persson et al, 2007) et son expression est en corrélation positive avec l'accumulation des lipides dans les macrophages (Larigauderie et al, 2004 ; Paul et al, 2008) et dans les plaques athérosclérotiques (Larigauderie et al, 2004). L'ablation ou l'inactivation de Plin2 protège contre l'athérosclérose (Paul et al, 2008).

L'ensemble de ces données décrivent un rôle important de la Plin2 dans la manipulation des lipides : Plin2 favorise la séquestration des lipides sous forme de TAG dans les différents cellules ou tissus y inclus les macrophages, les hépatocytes et les myocytes. Plin2 Contrôle partiellement la lipolyse des TAG des LDs. Plin2 paraît impliquée dans la différenciation des pré-adipocytes. Plin2 est une cible des acides gras via l'activation des PPAR. Sachant l'importance de la manipulation des lipides dans la prévention de la DCM induite par la lipotoxicité, il sera important et promettant d'en investiguer le rôle et l'effet de Plin2.

1.8 Le réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique est une organelle multifonctionnelle qui est impliquée dans la synthèse protéique, le plissement et les modifications post-traductionnelles des protéines, la synthèse des phospholipides et des stéroïdes, et la régulation de l'homéostasie des ions calcium.

1.8.1 Le stress du réticulum endoplasmique

Des perturbations de l'une ou des fonctions de l'ER, pouvant être provoquées par l'accumulation des lipides au sein de cette organelle, déclenchent l'ERS. La réponse à cette accumulation est une collection des signaux qui est désignée pour rétablir l'homéostasie protéique. Elle est déclenchée par l'activation de ces protéines : ATF-6 (activating transcription factor 6), IRE1 (inositol-requiring protein-1), et PERK (protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase). Cette activation a lieu lorsque la chapéronne GRP78 (Glucose Related Protein of 78kDa) qui est reconnue encore par le nom BiP (Binding Protein) se détache de ces trois protéines pour que chacune aurait sa voie de signalisation. La GRP78 est une protéine monomérique composée de

deux domaines : un qui se lie à l'ATP et un qui se lie aux peptides ; ces deux servent pour achever les fonctions de transport des protéines non-plissées (Groenendyk et al, 2010). Elle est responsable ou participe dans plusieurs activités principales pour le maintien du bon fonctionnement de l'ER parmi lesquelles le transport des protéines non-plissées au protéasome pour la dégradation, l'orientation de plissement des protéines, et la détection du stress dans l'ER (Hendershot et al, 2004). Elle interagit encore avec des récepteurs membranaires de l'ER pour contribuer dans le transport des ions calcium de l'ER à la mitochondrie (Dudek et al, 2009).

1.8.2 Les voies de l'ERS (*Figure 1.6*)

La voie d'IRE1 : IRE1 possède deux activités : une endoribonucléase et une kinase (Sano et al, 2013). Une fois Grp78 relâche IRE1, elle s'homodimérise ce qui lui permet de s'auto-phosphoryler (grâce à son activité kinase) (Groenendyk et al, 2010). Une fois activée, IRE1-grâce à son activité d'endoribonucléase- réalise l'épissage de l'ARNm de XBP1 (Lee et al, 2003) qui consiste en l'élimination d'une séquence de 26 nucléotides de cet ARNm (Basseri et al, 2011). L'XBP1 épissé qui est traduit en une protéine plus grande que l'XBP1 non-épissée à cause du décalage traductionnel, se déplace vers le noyau où il induit l'expression de plusieurs gènes impliqués la dégradation des protéines, et la production des chapérones (GRP-78 y inclue) et le déclenchement de la voie pro-apoptotique (comme CHOP) (Lee et al, 2003).

La voie de l'ATF-6 : Comme l'IRE1, ATF-6 est toujours inactive lorsqu'elle est attachée à GRP78. Une fois relâchée de GRP78, ATF-6 se déplace vers l'appareil de Golgi où les protéases, SIP et S2P, la clive (Yoshida et al, 2000 ; Ye et al, 1999 ; Lee et al, 2003). Le clivage sera au niveau de son domaine N-terminal qui est un facteur de transcription de taille de 370 acides aminés (Ye et al, 1999). Après le clivage, ce domaine entre au noyau (Haze et al, 1999) où il

induit l'expression de CHOP, XBP-1, GRP-78 et d'autres chapérones, et les protéines impliquées dans ERAD (Ye et al, 1999 ; Basseri et al, 2011 ; Lee et al, 2003). La liaison entre le domaine cytosolique et le génome dans le noyau se fait au niveau de CRE (ATF/cAMP response elements) et ERSE (ER stress response elements) (Yoshida et al, 1998 ; Sano et al, 2013). L'ERSE est le médiateur des réponses transcriptionnelles à l'ERS, il contient un site de liaison aux facteurs de transcription comme l'ATF6. Il faut mentionner qu'il y a deux isoformes de l'ATF-6 : l'ATF-6 α et l'ATF-6 β qui peuvent interagir et se lier aux ERSEs comme homo ou hétérodimères (Yoshida et al, 2000). L'ATF-6 α est un facteur de transcription efficace qui est susceptible à la dégradation par protéasome alors que l'ATF-6 β est un facteur de transcription faible mais plus stable (Groenendyk et al, 2010). L'ATF-6 β contient cinq sites de glycosylation et elle agit comme un répresseur et régulateur de l'activité transcriptionnelle de l'ATF6- α (Guan et al, 2009).

La voie de PERK : PERK est une serine thréonine kinase qui cible eIF2- α . Comme les IRE1 et ATF-6, elle est toujours inactive quand elle est liée à GRP78. Une fois relâchée, PERK, une homodimère, est autophosphorylée et activée, ainsi elle phosphoryle et inhibe eIF2- α (Basseri et al, 2011 ; Harding et al, 2000 ; Shi et al, 1998). L'inhibition d'eIF2- α cause une atténuation globale de la traduction. Un nombre faible d'ARNm s'échappe de cette atténuation parmi lesquels l'ATF4 (Basseri et al, 2011). Ceci est dû parce que sa traduction est indépendante de la manière 5'cap. Dans les stages premiers de l'ERS, ATF-4 induit des effets qui aident à la survie des cellules, alors le prolongement de l'ERS induit des effets pro-apoptotiques (Toth et al, 2007). L'ATF-4 entre au noyau et induit la transcription des gènes pro-apoptotiques comme Chop, GADD34 et ATF-3 (Sano et al, 2013). En fin de compte, cette branche de l'ERS bloque l'efflux des protéines nouvellement synthétisées (Sano et al, 2013; Harding et al, 2000; Shi et al, 1998).

PERK a été démontrée capable de phosphoryler NRF2. Cette phosphorylation active NRF2 qui migre au noyau pour faire face au stress oxydatif qui est un facteur de mort cellulaire (à côté de l'ERS) (Cullinan et al, 2004).

1.8.3 L'implication de l'ERS dans les pathologies cardiaques

L'ERS est associé à plusieurs pathologies cardiaques y incluses l'athérosclérose, l'ischémie, l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque. L'atténuation de l'ERS est une cible thérapeutique pour affronter l'athérosclérose (Minamino et al, 2010). L'activation des voies de l'ERS a été détectée dans les régions susceptibles à l'athérosclérose (Civelek et al, 2009). CHOP et GRP78 sont impliquées dans la rupture des plaques athérosclérotiques (Myoichi et al, 2007). L'exacerbation de l'ERS que ce soit par hypercholestérolémie ou hypertriglycéridémie rend le myocarde plus vulnérable à l'ischémie (Wu et al, 2015). Les gènes de l'ERS sont activés dans la région de l'infarction du myocarde (Thuerauf et al, 2006) et l'expression de CHOP est induite par l'hypoxie (Terai et al 2005). L'ERS est encore associé à l'hypertrophie ; il contribue à la dilatation du cœur (Mao et al, 2007 et 2008), et un groupe a montré que l'ablation de CHOP atténue l'hypertrophie et la dysfonction cardiaque (Minamino et al, 2010). La voie pro-apoptotique dérivée de l'ERS incluant CHOP, JNK et caspase-12 est activée dans l'insuffisance cardiaque (Okada et al, 2004).

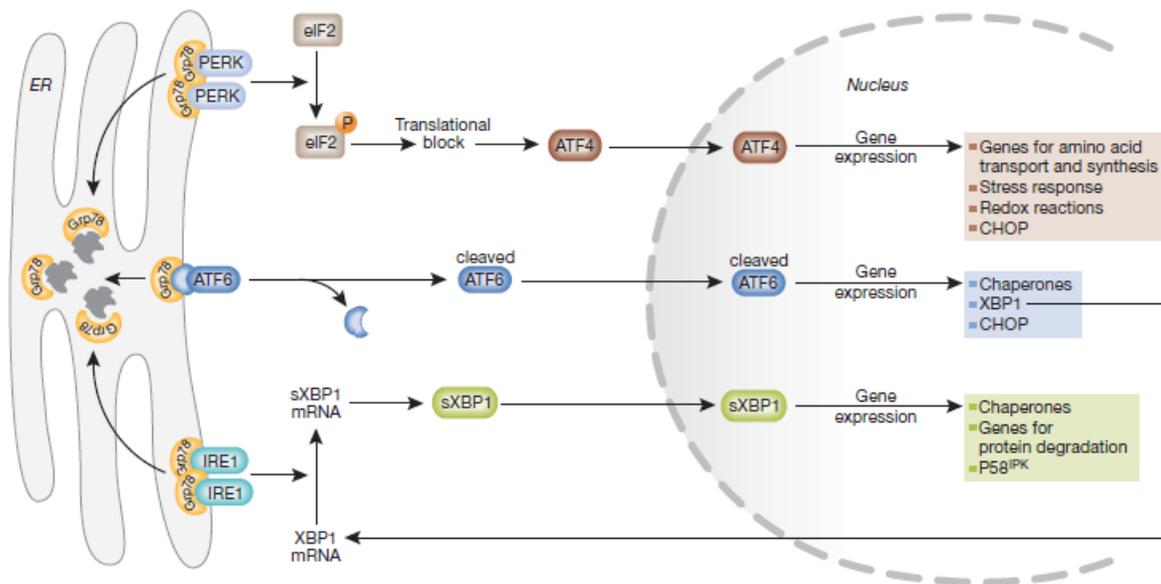


Figure 1.6 : Les branches du stress du réticulum endoplasmique.

Dans les conditions de stress dans le réticulum endoplasmique, GRP78 se dissocie des trois récepteurs de stress : PERK, ATF-6, et IRE-1 ce qui permet leur activation. **PERK** activée phosphoryle eIF2- α qui inhibe la synthèse des protéines sauf quelques une dont ATF-4. Ce dernier migre au noyau et induit la transcription de CHOP et des gènes qui aident au rétablissement de l'homéostasie de l'ER. L'**ATF-6** libérée de GRP-78 se déplace vers l'appareil de Golgi pour subir un clivage. Par suite à ce clivage qui l'active, ATF-6 migre au noyau et induit la transcription de XBP-1, des chapérones et de CHOP. La protéine de XBP-1 subira l'épissage dans le cytosol pour qu'elle soit active. Une fois activée, XBP1 rentre au noyau et induit la production des chapérones et des gènes impliqués dans la dégradation des protéines. L'**IRE-1** dissociée de GRP-78, s'active par autophosphorylation et induit l'épissage de XBP-1 qui agit de la même façon décrite dans la branche de l'ATF-6. (Prise de Szegzedi et al, 2006).

1.8.4 Les voies pré-apoptotiques

Une réponse prolongée au stress de l'ER déclenche des cascades et des voies de mort cellulaire. L'introduction de l'apoptose via l'ERS se fait par : l'activation de CHOP par PERK/eIF2 α , l'activation de la voie Ask1/JNK par IRE1, et la libération du calcium de l'ER via Bax/Bcl2 (Oyadomari et al, 2004).

PERK/eIF2 α est la voie de l'ERS la plus impliquée dans l'activation de CHOP qui est un facteur de transcription ciblant plusieurs gènes comme GADD34, TRB3 et Bcl-2 (Szegezdi et al, 2006). GADD34 est associée avec l'apoptose (Szegezdi et al, 2006 ; Brush et al, 2002). GADD34 est induite par le dommage de l'ADN et les différents stress des cellules. GADD34 interagit avec PP1, une phosphatase, pour activer eIF-2 α et redémarrer la synthèse protéique et exacerber l'ERS (Brush et al, 2002). TRB3 est un régulateur de l'activité transcriptionnelle de CHOP. Quand l'ERS est de courte durée, TRB3 inhibe l'activité de CHOP, alors que quand l'ERS est de longue durée, TRB3 sera un médiateur de l'apoptose (Ohoka et al, 2005). En plus, CHOP affaiblit l'expression de Bcl-2, une famille cible de la voie de JNK/Ask1 (Scegezdi et al, 2006 ; McCullough et al, 2001).

IRE-1 stimule Ask1 qui active JNK et p38 MAPK (Ron et al, 2008). Cette voie est bien dépendante de la famille des Bcl-2. Bcl-2 est une famille qui se divise en deux groupes : la sous-famille des anti-apoptotiques (Bcl-2 et Bcl-X_L) et la sous-famille des pré-apoptotiques (Bax et Bak et les BH3-only : Bad, Bid, Bim et HRK) (Tsujiimoto et al, 2003) (*Figure 1.7*). Les pré-apoptotiques se dimèrent pour devenir actifs. Les anti-apoptotiques se dimèrent avec les monomères des pré-apoptotiques, les inhibent (Cheng et al, 2001) et suppriment l'apoptose médiée par eux (Morishima et al, 2004). Les Bcl-2 anti-apoptotiques maintiennent le potentiel de

la membrane mitochondriale (Minn et al, 1999). Quand les anti-apoptotiques se dissocient des pré-apoptotiques, les derniers deviennent activés. Ainsi, Bid et Bim migrent aux mitochondries, activent Bax et Bak, et les quatre, ensemble, altèrent la perméabilité de la membrane mitochondriale ce qui permet la libération du cytochrome c (Putcha et al, 2003). Le cytochrome c active la caspase-9 (Putcha et al, 2003) qui est une protéine apoptotique initiatrice responsable de l'activation des caspases effectrices comme la caspase-3. Bax et Bak sont associées à l'activation de la cascade des caspases (Morishima et al, 2004) et à l'apoptose (Wei et al, 2001). L'action des Bcl-2 est régulée par IRE1 via Ask1/JNK (Ron et al, 2008). JNK phosphoryle les Bcl-2 anti-apoptotiques, ainsi, les hétéromères qu'elles forment avec les monomères des pré-apoptotiques seront dissociés, ce qui permet la libération et l'activation des pré-apoptotiques (Lei et al, 2002 ; Putcha et al, 2003). La phosphorylation alors inhibe l'activité anti-apoptotique de Bcl-2 (Yamamoto et al, 1999).

La même famille, Bcl-2, est impliquée dans la manipulation des ions calcium. BI-1, une protéine inhibitrice de Bax, fonctionne comme un pore permettant la fuite des ions calcium de l'ER (Bultynck et al, 2012). Ainsi, BI-1 agit comme inhibiteur de l'apoptose médiée par Bax (Xu et al, 1998) et comme régulateur de la libération des ions calcium de l'ER dans les cellules des mammifères (Chae et al, 2004).

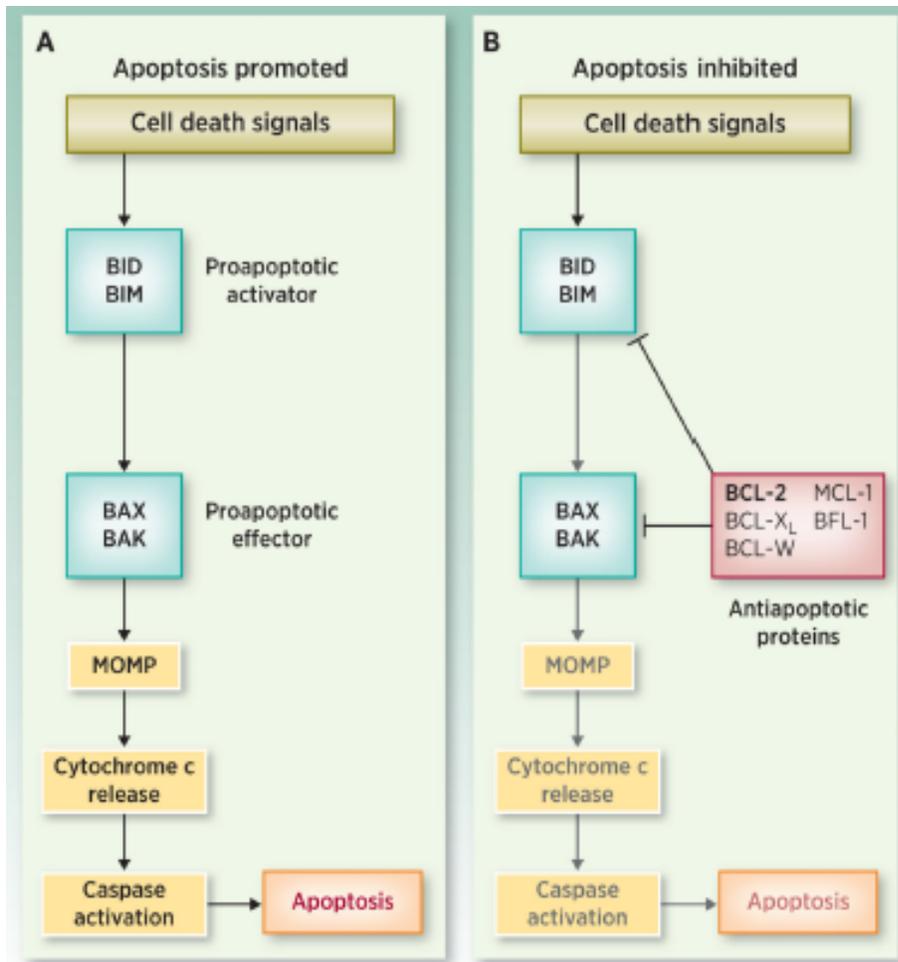


Figure 1.7 : Les pré-apoptotiques et les anti-apoptotiques, en bref.

A : Les signaux de mort cellulaire activent les pré-apoptotiques Bid et Bim. Ces dernières activent Bax et Bak qui altèrent la perméabilité de la membrane mitochondriale. Ceci permet la libération du cytochrome c qui active la cascade apoptotique et conduit à l'apoptose.

B : Les anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-X_L et d'autres inhibent Bid, Bim, Bax et Bak et bloquent la cascade apoptotique. (*Prise de : Gibson et al, 2015. (Modifiée)*).

1.9 L'apoptose

L'apoptose est la mort cellulaire programmée chez les eucaryotes. Elle est effectuée par une famille des protéines appelée caspases. Ces protéines sont classifiées en deux groupes ; les caspases initiatrices, les caspases-8, 9 et 10, et les caspases effectrices, les caspases-3, 6 et 7.

Il y a deux voies pour l'activation de l'apoptose ; la voie extrinsèque et la voie intrinsèque. On distingue ces deux voies par les protéines initiatrices les déclenchant et les protéines adaptatrices qui y sont impliquées dans chacune.

1.9.1 La voie extrinsèque (*Figure 1.8*)

Des signaux (ou ligands) se lient aux récepteurs de mort cellulaire. Ces ligands sont : TNF, CD-95 (ou Fas-L), TRAIL (ou APO2-L), et TL1A (ou TNF-like ligand 1A). Alors que les récepteurs qui font partie de la famille TNF (tumor necrosis factor) sont : TNFR1, CD95 (ou APO-1), DR-3 (Death Receptor-3), DR-4 (ou TRAIL-R1 : TNF-Related apoptosis-inducing ligand receptor-1), et DR-5 (ou TRAIL-R2).

Ces récepteurs sont couplés au FADD (Fas associated death domain) ou TRADD (TNFR-associated death domain) qui sont des protéines adaptatrices. La liaison des ligands à ces récepteurs recrute les monomères des caspases initiatrices et catalysent leurs dimérisation au niveau des protéines adaptatrices. Les dimères sont la forme active des caspases initiatrices (McIlwain et al, 2013). Une fois activées, elles clivent les caspases effectrices qui seront par suite activées et exercent leurs fonctions protéolytiques. En plus, la caspase-8 (initiatrice) active les caspases effectrices et clive Bid qui activera la voie intrinsèque (McIlwain et al, 2013).

1.9.2 La voie intrinsèque (*Figure 1.8*)

La voie intrinsèque est activée par plusieurs facteurs comme l'accumulation des protéines non plissées, le dommage de l'ADN, et l'hypoxie. Elle est nommée « la voie mitochondriale » parce qu'elle dépend fortement du cytochrome c libéré par ces organelles. Le cytochrome c avec l'APAF-1 recrute la procaspase-9. Les trois, ensemble, forment l'apoptosome qui active la procaspase-9 qui à son tour clive et active les caspases effectrices : caspase-3, 6 et 7 (McIlwain et al, 2013). La caspase-3 est la plus efficace parmi les autres caspases effectrices (Thornberry et al, 1998; Cryns et al, 1998). L'activation de la procaspase-9 est faite par l'APAF-1 (protéine adaptatrice) (Shiozaki et al, 2002). (Morishima et al, 2002) ont démontré une cascade de caspases spécifique à l'ERS et indépendante du cytochrome c ; la caspase-12 active la caspase-9 qui à son tour active la caspase-3, et que cette cascade se fait sans l'intervention du cytochrome-c. En plus, la caspase-12 est activée spécifiquement dans les cellules soumises à l'ERS (Nakagawa et al, 2000).

Plusieurs caspases sont impliquées dans l'inflammation. Les caspases-1, 4, 5 et 12 sont associées à l'inflammation. Elles sont activées après la formation des inflammasomes (Martinon et al, 2002). Ces derniers, qui sont formés après activation des NF-kB et AP-1 par les TLRs, facilitent la libération des protéines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β et l'IL-18 et les IRFs qui font l'intermédiaire des réponses antivirales. D'autres récepteurs sont impliqués dans le développement des inflammations via les caspases. (McIlwain et al, 2013).

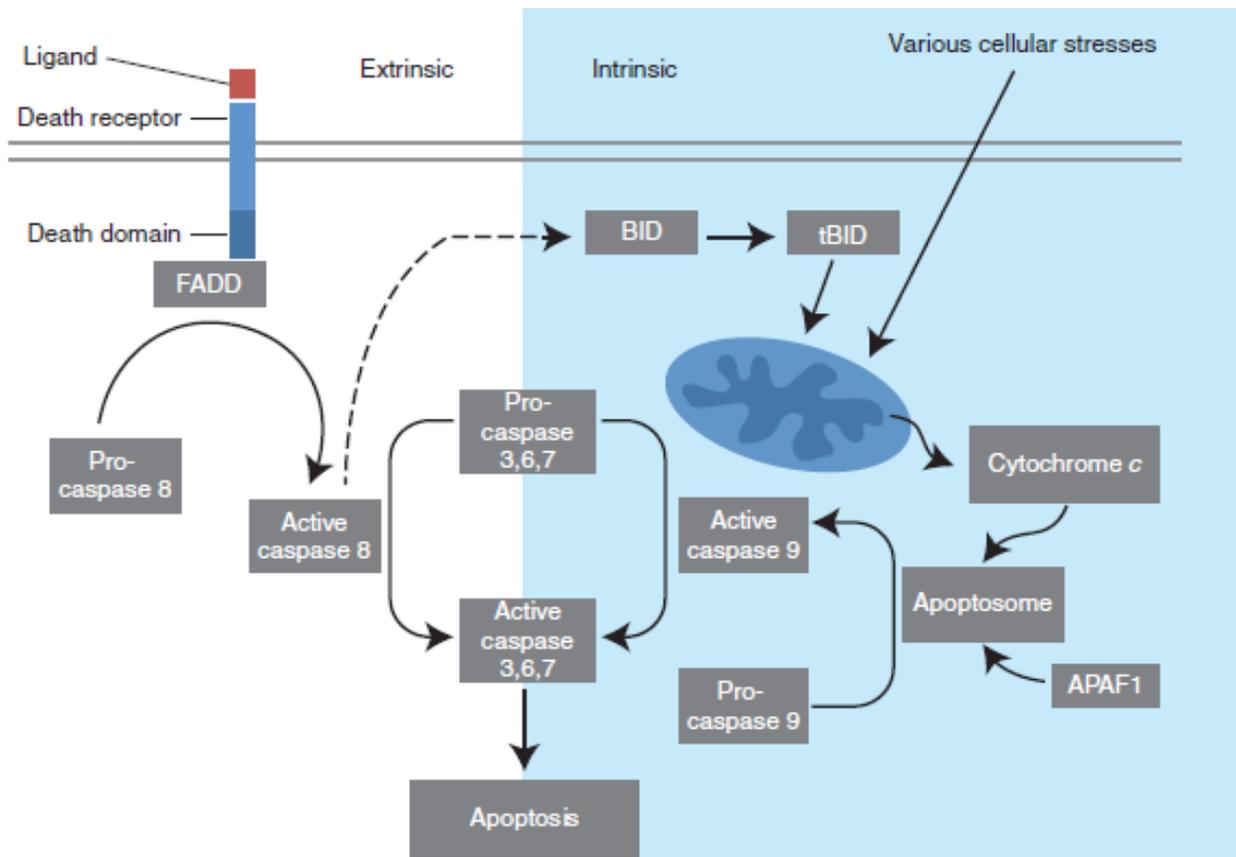


Figure 1.8 : Les voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose.

La voie extrinsèque : la liaison entre le ligand et le récepteur de mort associé à une protéine adaptatrice (FADD) recrute et active la caspase-8. Cette caspase initie l'apoptose par clivage des caspases effectrices (caspase-3, 6 et 7). En même temps, elle active Bid (par clivage) qui à son tour active la voie intrinsèque.

La voie intrinsèque : elle est déclenchée par la libération du cytochrome c suite aux différents signaux de stress cellulaires. Le cytochrome c forme l'apoptosome avec l'APAF-1 et la procaspase-9. Cet apoptosome active la caspase-9 qui clive les caspases effectrices (caspase-3, 6 et 7). (Prise de McIlwain et al, 2013).

1.10 Les objectifs

L'objectif global de notre laboratoire est d'investiguer des mécanismes de lipotoxicité associée au palmitate.

Ma recherche était concentrée sur l'investigation de l'acheminement du palmitate dans les cardiomyocytes et son association avec l'ERS et l'apoptose en le comparant avec l'oléate qui est protecteur contre la lipotoxicité.

Pour réaliser notre objectif, nous avons commencé par valider la lignée cellulaire des H9C2.

Montrer que la différence entre les deux acides gras n'est pas due à un mécanisme alternatif (faible absorption, faible activation, ou haute oxydation du palmitate).

Suivre l'acheminement du palmitate et de l'oléate dans les H9C2.

Déterminer quelle protéine associée aux LDs est la plus intervenante dans le mécanisme montré.

Investiguer l'effet de l'ERS sur cette protéine et sur le profil lipidique des cellules.

Étudier l'effet de cette protéine sur la lipotoxicité associée au palmitate.

1.11 Hypothèses

Dans les H9C2, l'oléate et le palmitate induisent une augmentation des lipides intracellulaires ; l'oléate et pas le palmitate induit la formation des LDs.

Le palmitate et pas l'oléate induit l'ERS et la mort cellulaire.

Les LDs formées dans les cellules traitées avec l'oléate sont associées à son effet protecteur.

La carence en formation des LDs dans les cellules traitées avec le palmitate peut être due à une faible absorption ou haute oxydation du palmitate par comparaison avec l'oléate.

Une baisse activité de l'Acs1 n'est pas incluse dans la faible oxydation du palmitate ni dans la faible synthèse des TAG à partir du palmitate.

Le palmitate s'accumule dans les cellules mais en dehors des LDs.

L'accumulation du palmitate est dans l'ER. Ceci, s'il avait lieu, induit l'ERS et l'apoptose.

Le palmitate s'accumule dans l'ER sous forme de DAG qui est associé à plusieurs effets toxiques.

La faible formation des LDs est due à une carence en une des protéines associées aux LDs, les périlipines.

Plin2 est associée aux LDs dans l'ER.

La dégradation de Plin2 est due à l'ERS et/ou la carence en LDs qui est associée au palmitate.

La dégradation de Plin2 causée par l'ERS a un effet sur la formation des LDs.

Inhiber le protéasome ou co-administrer l'oléate peut récupérer Plin2 dans les cellules traitées avec le palmitate, et ceci est associé à une réduction de la toxicité associée au palmitate.

Surexprimer Plin2 réduit l'ERS et la mort cellulaire associés au palmitate.

Chapitre 2: Palmitate mediated diacylglycerol accumulation causes endoplasmic reticulum stress, Plin2 degradation, and cell death in H9C2 cardiomyoblasts

Accepté par le journal *Experimental Cell Research* et publié le 21 Mars 2017

Auteurs :

Ali Akoumi^{a,e}

Taha Haffar^{a,e}

Maria Mousterji^{b,e}

Robert Scott Kiss^c

Nicolas Bousette^{d,e,*}

^aUniversité de Montréal, Département des sciences biomédicales, Canada

^bUniversité de Montréal, Département de biochimie, Canada

^cMcGill University, Département de médecine, Canada

^dUniversité de Montréal, Département de chirurgie, Canada

^eInstitut de Cardiologie de Montréal, Canada

Keywords: Diabetic cardiomyopathy, Lipotoxicity, ER stress, Lipid droplet, Plin2.

2.1 Avant-propos

Les auteurs de l'article 'Palmitate mediated diacylglycerol accumulation causes endoplasmic reticulum stress, Plin2 degradation, and cell death in H9C2 cardiomyoblasts' sont dans l'ordre:

Ali Akoumi, Taha Haffar, Maria Moustjerji, Robert Scott Kiss, Nicolas Bousette.

L'article est accepté par le journal Experimental Cell Research et publié le 21 Mars 2017.

L'auteur principal confirme avoir réaliser plus de 80% des expériences présentées dans l'article.

Taha Haffar a fait une expérience présentée dans l'article.

Maria Moustjerji était une stagiaire qui a travaillé sous ma supervision pour évaluer l'ER stress dans les conditions contrôle, oléate et palmitate.

Dr. Robert Scott Kiss a aidé à perfectionner le protocole de la chromatographie à couche mince.

Dr. Nicolas Bousette a supervisé l'ensemble de l'étude, à toutes les étapes.

2.2 Abstract

We have previously shown that palmitate causes ER stress in primary cardiomyocytes and this was associated with a diffuse lipid staining histology. In contrast, oleate, which was non-toxic, led to the formation of abundant, clearly delineated lipid droplets. The aberrant lipid histology in palmitate treated cells led us to hypothesize that perhaps there was an impairment in lipid droplet formation, which could lead to accumulation of lipids in the ER and consequent ER stress. To test this hypothesis we treated H9C2s (a cardiomyoblast cell line) with either 300 μ M oleate or palmitate for 8 h. We found that palmitate resulted in significantly less lipid droplet abundance despite elevated intracellular lipid accumulation. Next we showed that palmitate was packaged primarily as diacylglycerol (DAG), in contrast oleate formed primarily triacylglycerol (TAG). Furthermore, the palmitate induced DAG accumulated mostly in the ER, while oleate treatment resulted in accumulation of TAG primarily in lipid droplets. The palmitate-induced accumulation of lipid in the ER was associated with a strong ER stress response. Interestingly, we found that ER stress induced by either palmitate, tunicamycin, or thapsigargin led to the degradation of Plin2, an important lipid droplet binding protein. In contrast palmitate had little effect on either Plin3 or Plin5. Furthermore, we found that acute MG132 administration significantly attenuated palmitate mediated ER stress and cell death. This protection was associated with a moderate attenuation of Plin2 degradation.

2.2.1 Acknowledgments

This work was funded by the Heart and Stroke foundation of Canada (G14-0005849) and the Montreal Heart Institute Foundation.

2.2.2 Conflict of interest

No conflicts of interest to declare.

2.2.3 Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at [doi:10.1016/j.yexcr.2017.03.032](https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.03.032).

2.3 Introduction

Diabetic cardiomyopathy was first described by Rubler et al. in 1972 [1], and is now becoming increasingly recognized as a major contributor to morbidity and mortality in the diabetic population. One of the key pathological characteristics of this disease is cardiac steatosis. However, whether or not the accumulation of intracellular lipid is a contributing pathological factor or just a benign marker is still a matter of debate. There is a great deal of data showing that lipid accumulation is associated with insulin resistance, suggesting that lipid accumulation is pathological in nature. However, the athlete's paradox clouds this issue, as endurance athletes, which are insulin sensitive, have been shown to have abundant intramuscular lipid [2]. Therefore, lipid accumulation is likely too vague a parameter to predict the occurrence of pathophysiological mechanisms. As such, we need to more specifically characterize how lipids accumulate in cardiomyocytes as well as the downstream effects of said accumulation. We previously demonstrated that palmitate-mediated lipotoxicity was associated with impaired lipid droplet formation, ER stress, and cell death in primary neonatal cardiomyocytes [3]. This was in stark contrast to treatment with oleate, which led to abundant lipid droplet formation without the

occurrence of ER stress or cell death. Understanding the difference in how these two fatty acids accumulate may shed light on mechanisms of lipotoxicity. Lipid droplets are storage depots for neutral lipids [4]. Lipid droplet dynamics are regulated in large part through the function of key lipid droplet binding proteins called Perilipins. There are 5 mammalian isoforms of Perilipins (Plin1-5). In the heart, Plin2, 3, and 5 are the most abundant, while Plin1 and 4 are primarily expressed in adipose tissue. Perilipins are important regulators of lipid metabolism and storage by either inhibiting or promoting lipolysis of stored triglycerides. This gatekeeping activity involves interaction with metabolic enzymes such as adipose triglyceride lipase (Atgl) [5]. Lipid droplets are produced by the ER before being released into the cytosol [6]. As such the ER is responsible not only for the translation of secreted proteins and calcium homeostasis, but lipid metabolism as well. As such perturbations in lipid metabolism can lead to ER stress. Not surprisingly ER stress has been demonstrated in both in vitro lipotoxicity studies [3,7,8], as well as in vivo studies of diabetic cardiomyopathy [9–12]. ER stress induces the unfolded protein response, a compensatory mechanism aimed at restoring ER homeostasis by up-regulation of several stress response genes including transcription factors (e.g. Atf6, Chop, Xbp1) and chaperones (e.g Grp78) [13]. Prolonged or severe ER stress leads to cellular decompensation with consequent activation of apoptotic pathways. Therefore, ER stress has emerged as a potentially important therapeutic target. Here we aimed to further understand how differences in lipid accumulation, lipid droplet abundance, subcellular lipid distribution, and lipid profile might differentially affect lipotoxicity induced ER stress and cell death.

2.4 Methods

2.4.1 Reagents

Oleate (Sigma, O7501) was solubilized in anhydrous methanol, while palmitate (Sigma, P9767) was solubilized in 150 mM NaCl by heating to 70 °C. Both fatty acids were then complexed to bovine serum albumin (BSA) in a 6:1 ratio as previously described [3]. Radiolabelled oleate (American Radio-chemicals, ARC 0297) or palmitate (ARC 0172A) were also complexed to BSA. MG132 (M7449-200UL) was obtained from Sigma.

2.4.2 Histology

H9c2 cells (ATCC, CRL-1446) were maintained in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (Life Technologies). Cells were pre-treated with either 300 µM Oleate or 300 µM palmitate for 8 h and then washed and fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min. Cells were then stained with BODIPY 493/503 (Life Technologies), Rhodamine Phalloidin (Life Technologies) and DAPI (Life Technologies). Photomicrographs were taken using the IX83 inverted microscope from Olympus.

2.4.3 Lipid uptake assay

Cells were treated with either radiolabelled oleate or palmitate for 1 h. Cells were then washed with ice-cold PBS 4 times and then isolated. Cells were homogenized and added to scintillation fluid. Radioactivity was measured with the Scintillation counter (Beckman LS6500). Data are presented as picomol/mg protein.

2.4.4 Fatty acid oxidation assay

Following pre-treatment with either 300 μM oleate or 300 μM palmitate for 8 h, cells were treated with 0.4 μCi of radiolabelled oleate (American Radio-chemicals, ARC 0297) or palmitate (American Radiochemicals, ARC 0172A) for 2 h. CO_2 was released from cellular media by addition of 6 N HCl to cell media and then captured by a filter paper soaked in 2 M NaOH. The filter paper was then added to a scintillation vial with scintillation fluid and radioactivity was read with the Beckman LS6500 scintillation counter.

2.4.5 Acyl-CoA synthetase activity assay

Acsl activity was measured as previously described [14]. Briefly, following pre-treatment with either 300 μM oleate or 300 μM palmitate for 8 h, cells were isolated and sonicated on ice. Reaction buffer containing ATP, DTT, Coenzyme-A, and radiolabelled oleate was added to 200 μg of cell sonicate. This was incubated for 20 min at 37 $^\circ\text{C}$ and then 1 ml of Doles reagent was added to each sample. 2 ml of heptane was then added to each sample and the samples were vortexed. Following this 500 μl of water was added and the samples were vortexed and then centrifuged (800g for 5 min). The aqueous fraction was isolated and then washed with another 2 ml of heptane. These samples were then vortexed and centrifuged again and radioactivity was measured from the aqueous phase with the Beckman LS6500 scintillation counter.

2.4.6 Thin Layer Chromatography (TLC)

Cells were treated with various conditions as outlined in the results. Lipid samples were isolated by Bligh and Dyer method then spotted on a silica gel plate. The silica plate was then

placed in a TLC tank allowing the lipids to migrate with the mobile phase by capillary action. The TLC tank was equilibrated with 150 ml of 75:75:1.5 Chloroform:DiethylEther: Acetic acid. Lipid spots were then visualized on silica plate by rhodamine c (Sigma, R6626) labeling and quantified using Image J.

2.4.7 Sub-cellular distribution of lipid

Cells were treated as indicated in the results and then labelled with 20 μ M radiolabeled oleate (C-14) for 20 min. Cells were isolated and then overlaid onto a sucrose density gradient (10–50% W/V) and centrifuged at 21,000g for 1 h. Radioactivity of the individual fractions was then measured using a Beckman scintillation counter (Beckman LS6500). Western blotting was performed on all fractions to determine content of ER (Calnexin) and lipid droplet (Plin2) markers.

2.4.8 Real-time RT-PCR

Following oleate or palmitate treatment RNA was isolated using the Aurum Total RNA Mini Kit (Bio-Rad, 732–6820) as per manufacturer's instructions. cDNA was then synthesized using the 5X all-in-one RT MasterMix kit from (ABM, G485). Real-time PCR was carried out using the Go Taq® qPCR MasterMix 2X kit (Promega, A6002) on the Eco illumina real-time PCR machine. mRNA abundance was determined using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. Gene expression was normalized to the housekeeping gene, Rpl34. Primers were designed using the NCBI Primer-BLAST tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) and are listed in supplemental

table S1. Xbp1 primers only amplify the spliced isoform, they do not recognize the un-spliced Xbp1 isoform.

2.4.9 Western blotting

Western blotting was carried out as previously described [3,15]. Antibodies used include Anti-Atf6 (Santa Cruz Biotechnology, SC-22799), anti-Caspase-3 (Abcam, Cat. #: ab2302), Anti-Chop (Santa Cruz Biotechnology, SC-7351), anti-Grp78(Santa Cruz Biotechnology, SC-13968), anti-Plin2 (Abcam, ab108323), anti-Plin3 (Santa Cruz biotechnology, sc-14726-R), anti-Plin5 (Abnova, PAB12542), anti-Tubulin (Santa Cruz Biotechnology, SC-23948), and anti-Xbp1 (Santa Cruz Biotechnology, SC-7160).

2.4.10 Viability assay

Viability assay was carried out by measuring propidium iodide fluorescence as previously described [3].

2.4.11 Immunofluorescence analysis

Mouse neonatal cardiomyocytes were isolated and cultured as previously described [3,16]. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde, permeabilized with 0.5% Triton and 0.2% Tween in PBS, then cells were probed with anti-Plin2 antibody (also known as ADRP, SC32450 Texas red coupled secondary antibody was used for visualization. Cells were also co-stained with BODIPY 493/503 for lipid droplet visualization. Coverslips were bound to glass slides with ProLong (Molecular probes, cat#: P36931) containing the DAPI stain for nuclei.

2.4.12 Statistical analysis

All data are presented as mean \pm standard error. Statistics were carried out with StatGrapher software. Students T-test was used for two-group comparisons. Multiple groups were compared using oneway ANOVA with Tukey post-hoc test. Data involving multiple conditions (e.g. lipid distribution analysis) were analysed by two-way ANOVA with Tukey post-hoc test.

2.5 Results

2.5.1 Palmitate is a poor inducer of lipid droplets

Treatment of H9C2 cardiomyoblasts with 300 μ M oleate, caused the formation of abundant lipid droplets, while equi-molar palmitate led to very little lipid droplet formation (Fig. 2.1A). This is similar to what we have previously reported in primary cardiomyocytes. The nearly complete absence of lipid droplets was confirmed by quantitative measurement of BODIPY fluorescence in cells treated with oleate or palmitate (Fig. 2.1B). Importantly, the absence of lipid droplets in palmitate treated H9C2s was not due to a reduction in fatty acid uptake since palmitate accumulated to significantly greater degree than oleate (Fig. 2.1C). Furthermore, the lack of lipid droplets is not due to elevated fatty acid oxidation, since H9C2s treated with palmitate exhibited a significantly decreased rate of fatty acid oxidation (compared to oleate) (Fig. 2.2A). However, we found that palmitate treatment led to a small (~12%) but significant reduction in acyl-CoA synthetase (Acsl) activity (Fig. 2.2B). Therefore the reduction in lipid droplets may be partially due to a reduction in Acsl activity. However, it is unlikely that this small decrease in Acsl activity would be the primary cause of decreased lipid droplets especially

considering the fact that palmitate accumulated to a significantly greater extent and was catabolized at a significantly slower rate. We also confirmed that palmitate (but not oleate) induced ER stress (Fig. 2.2C-G), cell death (Fig. 2.2H), and caspase-3 activation (Fig. 2.2I) in H9C2 cardiomyoblasts just as it does in primary cardiomyocytes [3]. This indicates that H9C2s are a suitable in vitro model for evaluating the effects of palmitate lipotoxicity in cardiac cells.

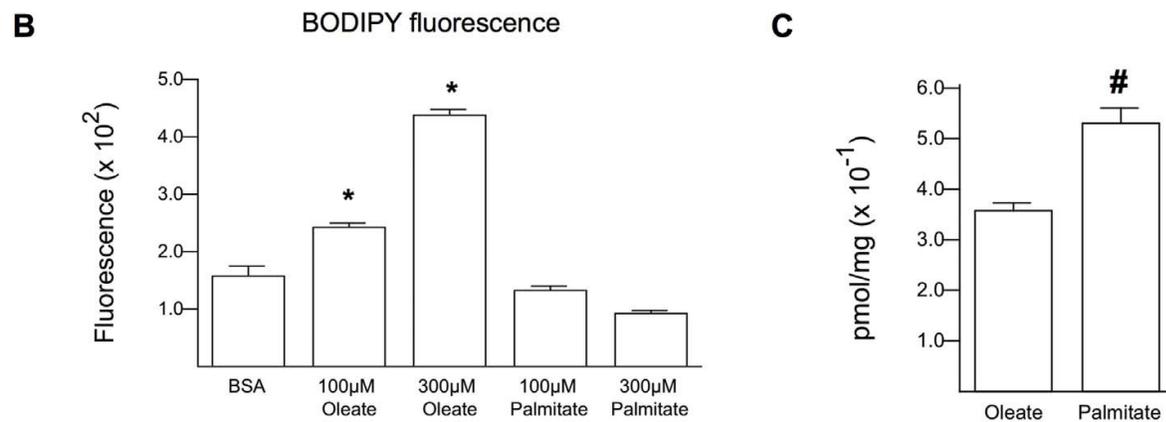
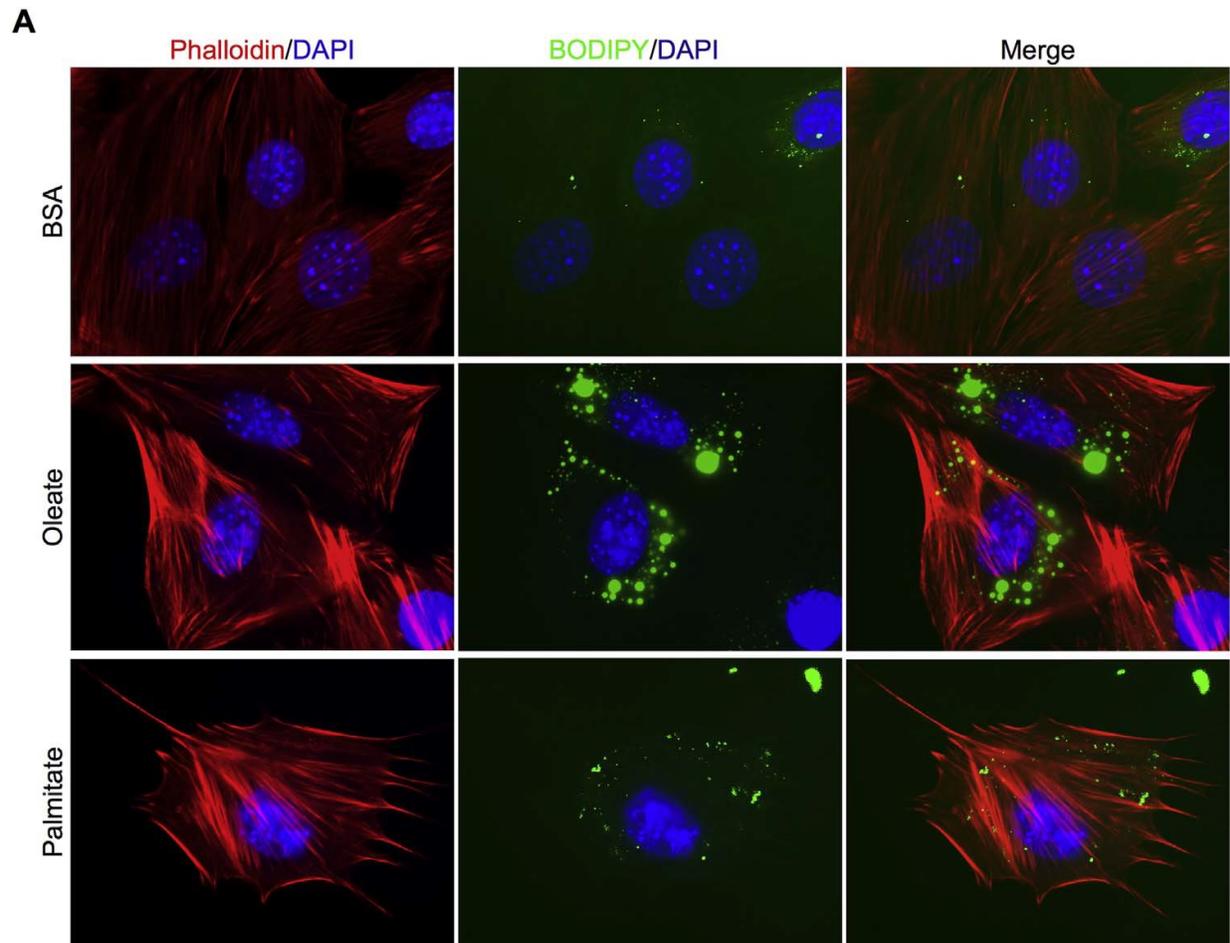


Fig. 2.1: Poor lipid droplet formation in palmitate treated H9C2s. (A) Images demonstrating H9C2s treated with either BSA (vehicle control), 300 μ M oleate or 300 μ M palmitate for 24 h. Cells were stained with Rhodamine Phalloidin (red), BODIPY 493/503 (green) and DAPI (blue). (B) Graph showing quantification of BODIPY 493/503 fluorescence in cells treated as indicated in the x-axis. * indicates $p < 0.05$ vs. BSA control. (C) Graph showing significantly increased accumulation of palmitate vs. oleate. # indicates $p < 0.05$ vs. oleate.

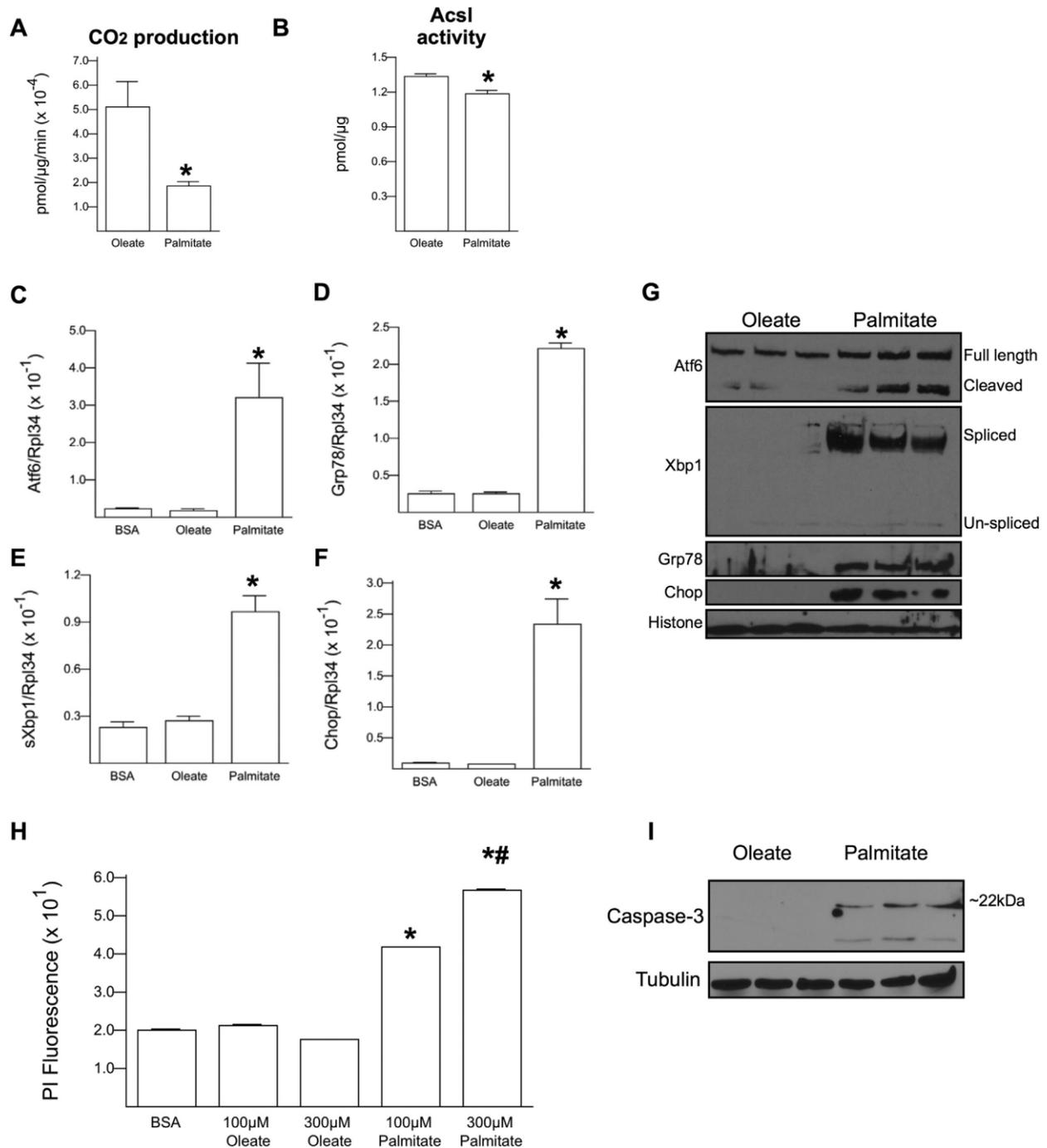


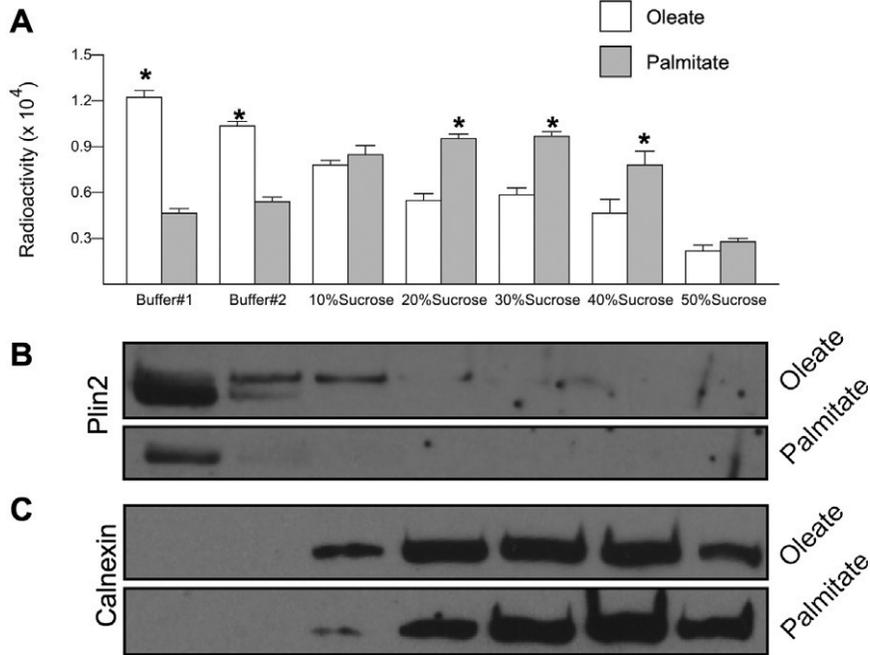
Fig. 2.2: Palmitate impairs fatty acid oxidation and induces ER stress and cell death in H9C2 cardiomyoblasts. (A) Graph showing significantly decreased CO₂ production in H9C2s treated with 300 μM palmitate for 8 h compared to those treated with 300 μM oleate. (B) Graph showing a slight, yet significant reduction in Acsl activity in H9C2s treated with 300 μM palmitate for 8 h compared to those treated with 300 μM oleate. (C-F) Graphs showing the relative mRNA expression of Atf6, Grp78, spliced Xbp1, and Chop (relative to housekeeping gene, Rpl34) in cells treated with either BSA (vehicle control), 300 μM oleate or 300 μM

palmitate for 8 h. * indicates $p < 0.05$ vs. BSA and oleate treated cells. (G) Western blots showing increased protein expression of Atf6, Grp78, spliced Xbp1, and Chop. Histone was used as loading control. (H) Graph showing quantification of propidium iodide (PI) fluorescence, an indicator of cell death in cells treated as indicated in x-axis. * indicates $p < 0.05$ vs. BSA and oleate treated cells. # indicates $p < 0.05$ vs. cells treated with 100 μM palmitate. (I) Blot showing increased cleaved caspase-3 in palmitate treated H9C2s compared to oleate treated H9C2s. Tubulin was probed to show equal loading conditions.

2.5.2 Palmitate causes accumulation of lipid in the ER

Lipid droplets are first synthesized in the ER [6]. Therefore the lack of abundant lipid droplets despite enhanced fatty acid accumulation in palmitate treated cells, led us to hypothesize that palmitate may be accumulating in the ER rather than in lipid droplets. To test this we treated H9C2 cardiomyoblasts with either 300 μM oleate or 300 μM palmitate for 8 h and then sub-fractionated the cells in a density gradient. H9C2s treated with oleate exhibited the greatest lipid accumulation in low-density fractions (Fig. 2.3A), which represent lipid droplets (as evidenced by the presence of Plin2, a lipid droplet binding protein, Fig. 2.3B). In contrast, palmitate caused most lipids to accumulate in higher density fractions, which represent ER (as evidenced by the presence of Calnexin, an ER resident chaperone protein, Fig. 2.3C). Therefore the absence of lipid droplets in palmitate treated cells results in a greater fraction of lipid being retained in the ER.

Lipid Distribution



Lipid Profile

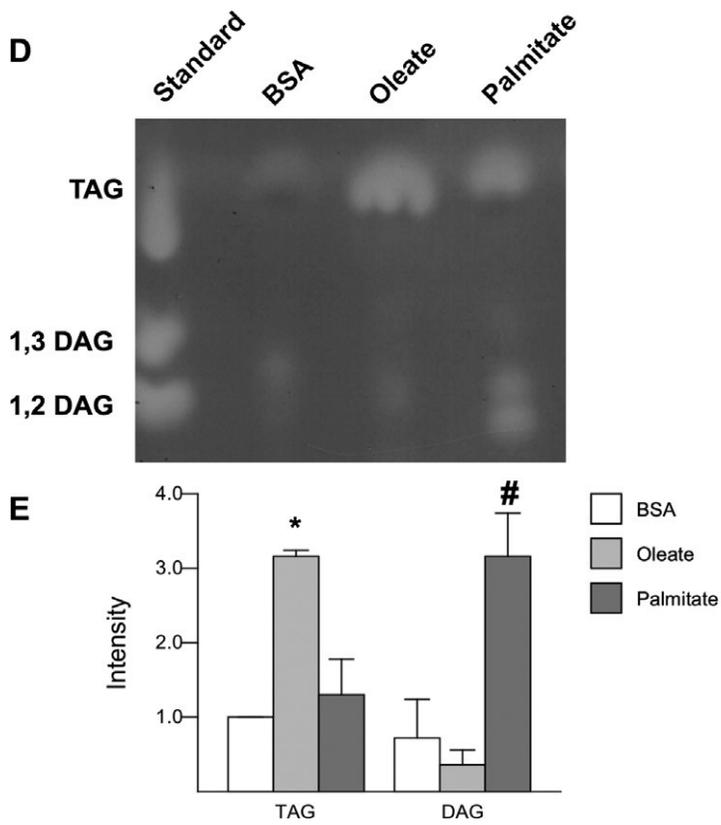


Fig. 2.3: Oleate accumulates in lipid droplets as TAG while palmitate accumulates in the ER as DAG. (A) Graph showing increased abundance of radiolabeled lipid in less dense fractions following oleate treatment compared to increased lipid in more dense fractions in palmitate treated cells.* indicates $p < 0.05$ vs. oleate treated cells. (B-C) Westerns showing the expression of Plin2 and Calnexin proteins in the fractions indicated in the x axis of the graph. (D) Image showing a representative silica plate loaded with MAG, DAG, TAG standard, as well as lipids isolated from cells treated with either BSA (vehicle control), 300 μ M oleate or 300 μ M palmitate for 16 h. (E) Graph showing quantification of spot intensity from representative silica plates. * indicates $p < 0.05$ vs. BSA and palmitate treated cells. # indicates $p < 0.05$ vs. BSA and oleate treated cells.

2.5.3 Palmitate is primarily incorporated into DAG

The fact that there was significantly less BODIPY (neutral lipid) fluorescence in palmitate treated cells, despite the enhanced accumulation, suggested that oleate and palmitate may be stored in different forms. Because lipid droplets consist primarily of neutral lipid in the form of TAG, we hypothesized that palmitate may form less TAG compared to oleate. To test this notion we assessed the lipid profile of cells treated with oleate or palmitate by thin layer chromatography. Interestingly, we found that oleate led to significantly increased TAG compared to both BSA (vehicle control) and palmitate treated cells (Fig. 3D-E). In contrast, palmitate led to the formation of significantly more DAG, but not TAG.

2.5.4 Palmitate selectively induces Plin2 degradation

The lack of lipid droplets in palmitate treated cells led us to evaluate the expression of perilipin proteins. The most abundant perilipin proteins in non-adipose tissue are Plin2, Plin3 and Plin5, while Plin1 and Plin4 are primarily found in adipocytes. Therefore we evaluated the effect of palmitate compared to oleate on the protein expression of Plin2, 3, and 5. We found that Plin2 protein was nearly absent in palmitate treated cells but highly expressed in oleate treated cells (Fig. 2.4A). In contrast, Plin3 was only slightly decreased by palmitate while palmitate had no

effect on Plin5. Interestingly, Plin2 mRNA levels were not decreased by palmitate (Fig. 2.4B), suggesting that palmitate may be inducing Plin2 protein degradation. To confirm that Plin2 was localized to lipid droplets we evaluated oleate and palmitate treated cells by immunofluorescence. We found that Plin2 localized specifically to lipid droplets in cells treated with oleate as evidenced by the characteristic ring shaped staining pattern as well as the colocalization to BODIPY stained lipid droplets (Fig. 2.4C). In contrast, cells treated with palmitate exhibited only a diffuse non-specific staining pattern.

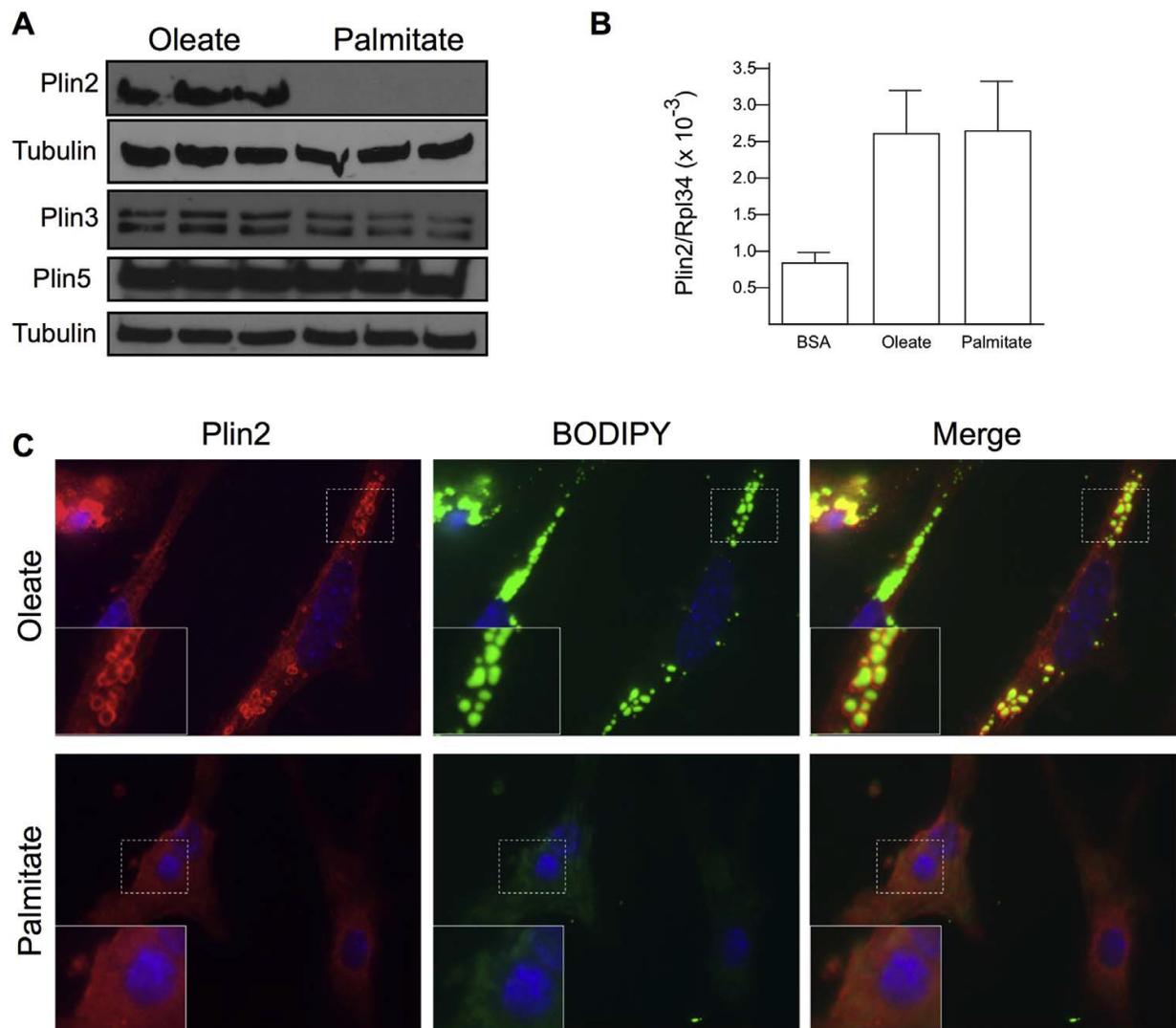


Fig. 2.4. Palmitate selectively induces Plin2 degradation (A) Western blots showing that oleate treated cells exhibit abundant Plin2 immunoreactivity while palmitate treated cells exhibit negligible levels. In contrast both oleate and palmitate treated H9C2s exhibit high levels of Plin3 and Plin5. Tubulin was probed as loading control. (B) Graph showing Plin2 mRNA levels (normalized to Rpl34, a housekeeping gene) in cells treated with either BSA (vehicle control), 300 μ M oleate or 300 μ M palmitate for 8 h. (C) Images (1000 \times magnification) of mouse neonatal cardiomyocytes treated with either 300 μ M oleate or 300 μ M palmitate for 24 h and then stained with Plin2 antibody (red), BODIPY493/503 (green) and DAPI (blue). Inset images are magnifications of dashed areas.

2.5.5 ER stress induces Plin2 degradation

We were next interested in determining whether the Plin2 degradation was the result of palmitate mediated ER stress or a direct effect of palmitate. To this end we evaluated the effect of tunicamycin, a known ER stressor on oleate treated cells, a condition in which Plin2 is highly expressed. As expected, addition of tunicamycin resulted in the significant induction of ER stress (Supplemental Fig. S1) and cell death (Fig. 2.5A). Furthermore, tunicamycin also decreased Plin2 protein (Fig. 2.5B), but not mRNA levels (Fig. 2.5C). Similarly, thapsigargin, another well-known ER stressor, also induced the loss of Plin2 protein and significant cell death (Fig. 2.5D-E). Interestingly Thapsigargin actually induced Plin2 mRNA levels (Fig. 2.5F). Therefore this indicates that ER stress in general, leads to Plin2 protein degradation and cell death. Interestingly, the loss of Plin2 in tunicamycin treated cells was not due to absence of TAG. Indeed, administration of tunicamycin did not reduce TAG levels or lipid droplets.

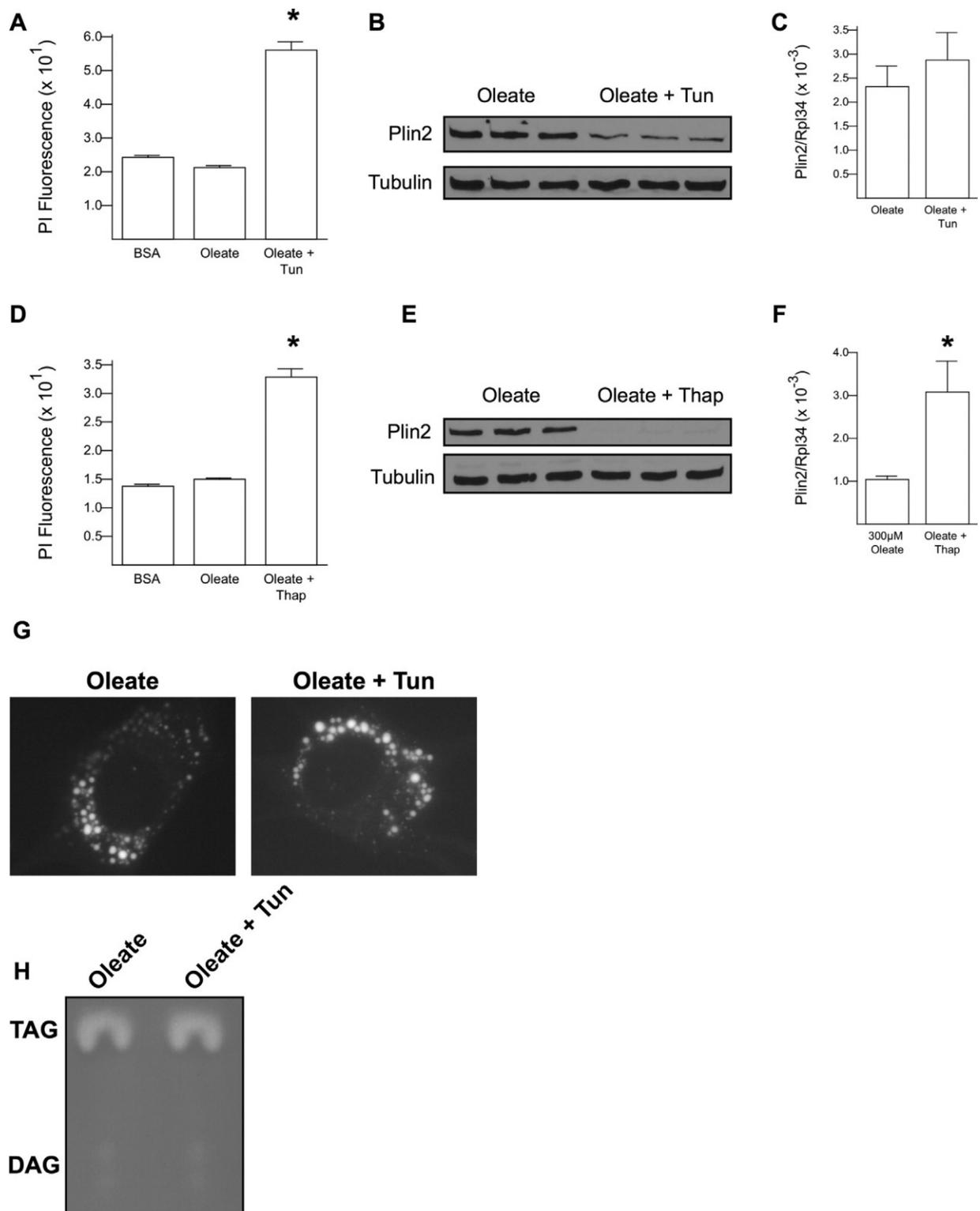


Fig. 2.5. ER stress induces Plin2 degradation despite high TAG levels. (A) Graph showing significantly elevated cell death (measured as propidium iodide fluorescence) in cells treated with oleate + tunicamycin vs. cells treated with oleate alone. * indicates $p < 0.05$. (B) Western

blot showing less Plin2 protein levels in cells treated with oleate + tunicamycin vs. cells treated with oleate alone. (C) Graph showing no difference in mRNA levels between cells treated with oleate + tunicamycin vs. cells treated with oleate alone. (D) Graph showing significantly elevated cell death (measured as propidium iodide fluorescence) in cells treated with oleate + thapsigargin vs. cells treated with oleate alone. * indicates $p < 0.05$. (E) Western blot showing less Plin2 protein levels in cells treated with oleate + thapsigargin vs. cells treated with oleate alone. (F) Graph showing significantly higher Plin2 mRNA levels in cells treated with oleate + thapsigargin vs. cells treated with oleate alone. (G) Photomicrographs of H9C2s treated with either oleate or oleate + tunicamycin and stained with BODIPY 493/503. (H) Thin layer chromatography silica plate exhibiting TAG and DAG isolated from H9C2s treated with either oleate or oleate + tunicamycin.

2.5.6 Proteasomal inhibition attenuates Plin2 degradation, ER stress, and cell death

Since ER stress led to Plin2 protein degradation, we next evaluated the effect of MG132 (a well-known proteasome inhibitor) on Plin2 expression in palmitate treated H9C2s. Interestingly, we found that MG132 moderately but significantly attenuated Plin2 degradation (Fig. 2.6A) and this was associated with a significant protective effect. Indeed MG132 markedly attenuated palmitate mediated cell death (Fig. 2.6B), and ER stress (Fig. 2.6C).

2.5.7 Oleate prevents Plin2 degradation and cell death

Because we [3] and others [17] have shown that oleate mitigates the lipotoxic effects of palmitate in primary cardiomyocytes, we next investigated the effects of oleate on Plin2 expression and cell death in H9C2 cardiomyoblasts. We show that oleate dose dependently decreased palmitate mediated cell death (Fig. 2.6D) and this was associated with a dose dependent increase in Plin2 protein levels (Fig. 2.6E). Therefore both MG132 and oleate prevent the loss of Plin2 and protect against palmitate-mediated lipotoxicity.

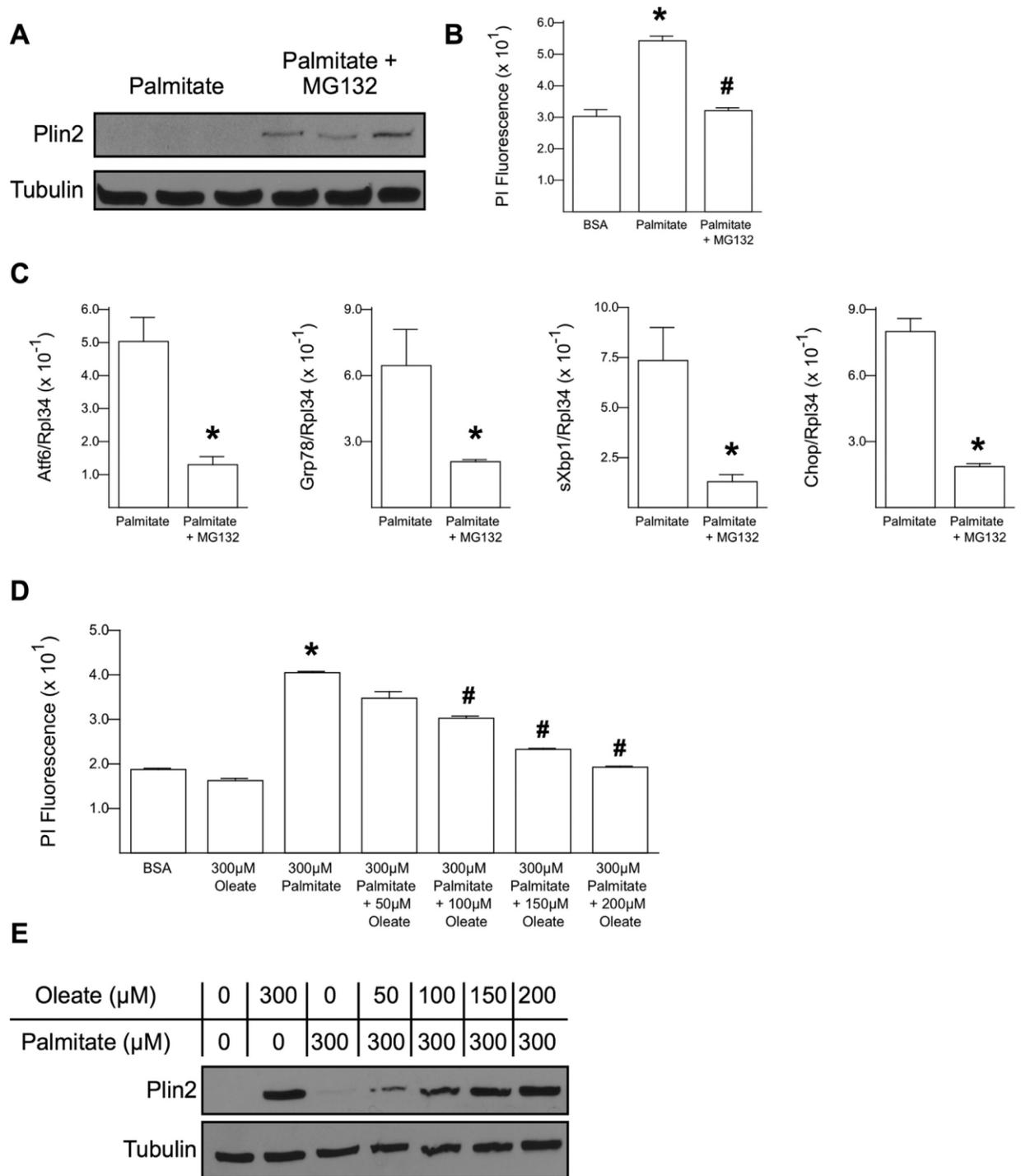


Fig. 2.6. MG132 and oleate attenuate palmitate mediated cell death and Plin2 degradation. (A) Western blot showing that 10 μ M MG132 reduces Plin2 protein degradation in palmitate treated H9C2s. (B) Graph showing 10 μ M MG132 significantly reduces cell death in palmitate treated H9C2s. * indicates $p < 0.05$ vs. BSA; # indicates $p < 0.05$ vs. palmitate alone. (C) Graphs showing that 10 μ M MG132 significantly reduces the mRNA levels of Atf6, Chop, Grp78, and spliced Xbp1 in palmitate treated H9C2s. * indicates $p < 0.05$ vs. palmitate alone. (D) Graph

showing that oleate dose-dependently reduces palmitate mediated cell death in H9C2s. * indicates $p < 0.05$ vs. BSA and oleate alone; # indicates $p < 0.05$ vs. palmitate alone. (E) Western blot shows that oleate dose dependently reduces Plin2 degradation in palmitate treated H9C2s.

2.6 Discussion

We and others [3,7,18,19], have shown that palmitate strongly induces ER stress but the exact mechanism for this has not been clearly delineated. Palmitate treated cardiomyocytes [3] and H9C2 cardiomyoblasts exhibit marked differences in lipid histology compared to oleate treated cells. Indeed, palmitate caused a faint diffuse lipidstaining pattern, whereas oleate led to the formation of clearly delineated lipid droplets. This prompted us to investigate the reasons for the difference in lipid histology induced by oleate compared to palmitate and to ascertain if this difference was related to the difference in toxicity between these two fatty acids. We found that palmitate was stored primarily as DAG, which was retained in the ER, while oleate produced primarily TAG which accumulated in the less dense lipid droplet fractions. Here we also showed that ER stress selectively degraded Plin2 with little effect on Plin3 or Plin5 protein levels. This could have important implications for a variety of cardiac diseases that are associated with ER stress.

Lipid droplets are pseudo organelles essential for storage of excess intracellular lipids. Here we showed that in the absence of lipid droplets, lipids accumulated in the ER which led to ER stress. Lipid droplets consist primarily of TAG and sterol esters. Since palmitate treated cells exhibited poor lipid droplet formation, we were initially interested in assessing the lipid profile of cells treated with either oleate or palmitate. We found by thin layer chromatography that oleate was highly incorporated into TAG with very little associated DAG. In contrast, palmitate led to abundant DAG formation with considerably less TAG formation. This is important

because DAG exhibits a much greater degree of lipotoxic potential than does the more neutral and inert TAG. Indeed DAG has been shown to induce ER stress [20], and insulin resistance [21], possibly through the activation of PKC. The poor lipid droplet formation may therefore be due to decreased TAG formation suggesting a possible role of impaired DGAT activity. In support of this, recent studies showed that cardiomyocyte specific overexpression of DGAT was protective in two different mouse models of cardiac lipotoxicity [22,23]. In contrast, cardiac specific loss of DGAT1 enhanced DAG accumulation and impaired cardiac function [24].

The absence of lipid droplets in palmitate treated cells, despite an elevated rate of fatty acid accumulation, led us to question where the lipid was accumulating. Because lipid droplets are formed from the ER, we hypothesized that palmitate was being retained in the ER as DAG instead of being incorporated into TAG and packaged in lipid droplets. Indeed, by sub-fractionating cells using differential ultracentrifugation of whole cell lysates on sucrose density gradients, we were able to demonstrate that palmitate led to more lipid accumulation in the ER, while oleate promoted more lipid accumulation in lipid droplets. This accumulation of ER lipid is the likely cause for the observed ER stress. A previous study in CHO cells demonstrated that palmitate accumulated in the ER membrane thus causing alterations in ER membrane integrity with consequent release of ER chaperones [8]. Our data supports and extends this notion by demonstrating that the reason for lipid accumulation in the ER was due to the lack of lipid droplet formation, which in turn may be due to the absence of TAG synthesis.

We also confirmed ER stress in these cells by showing that palmitate significantly increased Atf6, Grp78, Xbp1 and Chop expression and activity. Prolonged or severe ER stress can lead to cell death. In accordance with this, we showed that exposure to palmitate dose dependently

induced cell death in H9C2s. This toxicity was absent in cells treated with oleate for an equivalent dose and time.

The lack of lipid droplets also led us to evaluate the expression of the lipid droplet binding proteins including Plin2, Plin3 and Plin5. Interestingly Plin2, which has been shown to be an inducer of lipid droplet formation [25], was selectively targeted by ER stress. Indeed, we found that palmitate, tunicamycin, and thapsigargin all led to Plin2 degradation without decreasing Plin2 mRNA levels. Tunicamycin induces ER stress by inhibiting N-linked glycosylation, while thapsigargin induces ER stress by inhibiting SERCA2, an important calcium pump for the ER. Therefore, three different ER stressors, employing 3 different ER stress mechanisms, all induced Plin2 degradation. Importantly, this effect was selective for Plin2 as palmitate had no effect on Plin5 and induced only a minor decrease in Plin3 protein levels. Previous studies have demonstrated that Plin2 is rapidly degraded by the ubiquitin proteasome system in the absence of TAG [26,27]. However, this is the first demonstration that Plin2 is actively degraded even in the presence of lipid. Indeed, tunicamycin led to significant degradation of Plin2 despite the presence of abundant TAG filled lipid droplets.

Next we investigated the effect of MG132, a proteasome inhibitor on Plin2 protein levels in palmitate treated cells. MG132 moderately but significantly attenuated Plin2 degradation. Interestingly, MG132 had strong protective effects as it markedly reduced ER stress and cell death. Considering the fact that MG132 only moderately prevented Plin2 degradation suggests that Plin2 is degraded by other pathways besides the ubiquitin proteasome pathway. Indeed, ER stress has been previously associated with the lysosomal degradation pathway [28–30]. Furthermore, the fact that MG132 exhibited a strong protective effect but only moderately

attenuated Plin2 degradation, suggests that the protection afforded by MG132 is only partly mediated by Plin2.

One important caveat of the current study is that MG132 is only acutely protective. Indeed, MG132 had significant protective effects against palmitate mediated lipotoxicity for 8 h. However exposure of cells to palmitate + MG132 for 16 or 24 h exhibited no protection. In fact, cell death began to increase with the addition of MG132 for prolonged periods. Indeed, MG132 has been shown to induce ER stress in a variety of cells [31–33] including cardiomyocytes [34]. The reason for this is likely due to accumulation of proteins that would have normally been degraded through the proteasome system.

We also demonstrated that oleate attenuated palmitate mediated cell death and Plin2 protein degradation in a dose dependent manner. Future studies will be required to assess if oleate induced protection is mediated by Plin2 and/or other mechanisms.

2.7 Conclusion

Here we show that palmitate leads to DAG accumulation in the ER. This accumulation of lipid in the ER is likely the key mechanism for palmitate mediated ER stress. Furthermore, we also show for the first time that ER stress leads to degradation of Plin2 even in the presence of abundant lipid. Future studies will be needed to ascertain the degree of protection afforded by Plin2 in the setting of cardiomyocyte lipotoxicity. The notion of a protective role for Plin2 is supported by a previous study, which showed that Plin2 overexpression was associated with enhanced insulin sensitivity despite elevating lipid levels in muscle [35].

2.8 References

- [1] S. Rubler, J. Dlugash, Y.Z. Yuceoglu, T. Kumral, A.W. Branwood, A. Grishman, New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis, *Am. J. Cardiol.* 30 (1972) 595–602.
- [2] J.J. Dube, F. Amati, M. Stefanovic-Racic, F.G. Toledo, S.E. Sauers, B.H. Goodpaster, Exercise-induced alterations in intramyocellular lipids and insulin resistance: the athlete's paradox revisited, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 294 (2008) E882–E888.
- [3] T. Haffar, F.A. Berube-Simard, J.-C. Tardif, N. Bousette, Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress in primary cardiomyocytes, *Endoplasm. Reticul. Stress Dis.* (2015) 53–66.
- [4] D.L. Brasaemle, Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis, *J. Lipid Res.* 48 (2007) 2547–2559.
- [5] J.G. Granneman, H.P. Moore, R. Krishnamoorthy, M. Rathod, Perilipin controls lipolysis by regulating the interactions of AB-hydrolase containing 5 (Abhd5) and adipose triglyceride lipase (Atgl), *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 34538–34544.
- [6] Y. Guo, K.R. Cordes, R.V. Farese Jr., T.C. Walther, Lipid droplets at a glance, *J. Cell Sci.* 122 (2009) 749–752.
- [7] Y. Wei, D. Wang, F. Topczewski, M.J. Pagliassotti, Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 291 (2006) E275–E281.
- [8] N.M. Borradaile, X. Han, J.D. Harp, S.E. Gale, D.S. Ory, J.E. Schaffer, Disruption of endoplasmic reticulum structure and integrity in lipotoxic cell death, *J. Lipid Res.* 47 (2006) 2726–2737.
- [9] T. Wu, Z. Dong, J. Geng, Y. Sun, G. Liu, W. Kang, Y. Zhang, Z. Ge, Valsartan protects against ER stress-induced myocardial apoptosis via CHOP/Puma signaling pathway in streptozotocin-induced diabetic rats, *Eur. J. Pharm. Sci.* 42 (2011) 496–502.

- [10] J. Xu, Q. Zhou, W. Xu, L. Cai, Endoplasmic reticulum stress and diabetic cardiomyopathy, *Exp. Diabetes Res.* 2012 (2012) 827971.
- [11] Z.W. Liu, H.T. Zhu, K.L. Chen, X. Dong, J. Wei, C. Qiu, J.H. Xue, Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) signaling pathway plays a major role in reactive oxygen species (ROS)-mediated endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in diabetic cardiomyopathy, *Cardiovasc. Diabetol.* 12 (2013) 158.
- [12] X. Liu, Q. Xu, X. Wang, Z. Zhao, L. Zhang, L. Zhong, L. Li, W. Kang, Y. Zhang, Z. Ge, Irbesartan ameliorates diabetic cardiomyopathy by regulating protein kinase D and ER stress activation in a type 2 diabetes rat model, *Pharmacol. Res.* 93 (2015) 43–51.
- [13] G.S. Hotamisligil, Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease, *Cell* 140 (2010) 900–917.
- [14] B. Askari, J.E. Kanter, A.M. Sherrid, D.L. Golej, A.T. Bender, J. Liu, W.A. Hsueh, J.A. Beavo, R.A. Coleman, K.E. Bornfeldt, Rosiglitazone inhibits acyl-CoA synthetase activity and fatty acid partitioning to diacylglycerol and triacylglycerol via a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-independent mechanism in human arterial smooth muscle cells and macrophages, *Diabetes* 56 (2007) 1143–1152.
- [15] T. Haffar, F.A. Berube-Simard, N. Bousette, Cardiomyocyte lipotoxicity is mediated by Il-6 and causes down-regulation of PPARs, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 459 (2015) 54–59.
- [16] N. Bousette, S. Chugh, V. Fong, R. Isserlin, K.H. Kim, A. Volchuk, P.H. Backx, P. Liu, T. Kislinger, D.H. MacLennan, A. Emili, A.O. Gramolini, Constitutively active calcineurin induces cardiac endoplasmic reticulum stress and protects against apoptosis that is mediated by alpha-crystallin-B, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107 (2010) 18481–18486.
- [17] T.A. Miller, N.K. LeBrasseur, G.M. Cote, M.P. Trucillo, D.R. Pimentel, Y. Ido, N.B. Ruderman, D.B. Sawyer, Oleate prevents palmitate-induced cytotoxic stress in cardiac myocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336 (2005) 309–315.
- [18] E. Karaskov, C. Scott, L. Zhang, T. Teodoro, M. Ravazzola, A. Volchuk, Chronic palmitate but not oleate exposure induces endoplasmic reticulum stress, which may contribute to INS-1 pancreatic beta-cell apoptosis, *Endocrinology* 147 (2006) 3398–3407.
- [19] W. Guo, S. Wong, W. Xie, T. Lei, Z. Luo, Palmitate modulates intracellular signaling, induces endoplasmic reticulum stress, and causes apoptosis in mouse 3T3-L1 and rat primary preadipocytes, *American journal of physiology, Endocrinol. Metab.* 293 (2007) E576–E586.

- [20] Y.M. Liu, X. Wang, A. Nawaz, Z.H. Kong, Y. Hong, C.H. Wang, J.J. Zhang, Wogonin ameliorates lipotoxicity-induced apoptosis of cultured vascular smooth muscle cells via interfering with DAG-PKC pathway, *Acta Pharmacol. Sin.* 32 (2011) 1475–1482.
- [21] J. Szendroedi, T. Yoshimura, E. Phielix, C. Koliaki, M. Marcucci, D. Zhang, T. Jelenik, J. Muller, C. Herder, P. Nowotny, G.I. Shulman, M. Roden, Role of diacylglycerol activation of PKC θ in lipid-induced muscle insulin resistance in humans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111 (2014) 9597–9602.
- [22] L. Liu, X. Shi, K.G. Bharadwaj, S. Ikeda, H. Yamashita, H. Yagyu, J.E. Schaffer, Y.H. Yu, I.J. Goldberg, DGAT1 expression increases heart triglyceride content but ameliorates lipotoxicity, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 36312–36323.
- [23] L. Liu, S. Yu, R.S. Khan, S. Homma, P.C. Schulze, W.S. Blaner, Y. Yin, I.J. Goldberg, Diacylglycerol acyl transferase 1 overexpression detoxifies cardiac lipids in PPAR γ transgenic mice, *J. Lipid Res.* 53 (2012) 1482–1492.
- [24] L. Liu, C.M. Trent, X. Fang, N.H. Son, H. Jiang, W.S. Blaner, Y. Hu, Y.X. Yin, R.V. Farese Jr., S. Homma, A.V. Turnbull, J.W. Eriksson, S.L. Hu, H.N. Ginsberg, L.S. Huang, I.J. Goldberg, Cardiomyocyte-specific loss of diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) reproduces the abnormalities in lipids found in severe heart failure, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 29881–29891.
- [25] M. Imamura, T. Inoguchi, S. Ikuyama, S. Taniguchi, K. Kobayashi, N. Nakashima, H. Nawata, ADRP stimulates lipid accumulation and lipid droplet formation in murine fibroblasts, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283 (2002) E775–E783.
- [26] G. Xu, C. Sztalryd, X. Lu, J.T. Tansey, J. Gan, H. Dorward, A.R. Kimmel, C. Londos, Post-translational regulation of adipose differentiation-related protein by the ubiquitin/proteasome pathway, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 42841–42847.
- [27] Y. Masuda, H. Itabe, M. Odaki, K. Hama, Y. Fujimoto, M. Mori, N. Sasabe, J. Aoki, H. Arai, T. Takano, ADRP/adipophilin is degraded through the proteasome-dependent pathway during regression of lipid-storing cells, *J. Lipid Res.* 47 (2006) 87–98.
- [28] E. Fujita, Y. Kouroku, A. Isoai, H. Kumagai, A. Misutani, C. Matsuda, Y.K. Hayashi, T. Momoi, Two endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) systems for the novel variant of the mutant dysferlin: ubiquitin/proteasome ERAD(I) and autophagy/lysosome ERAD(II), *Hum. Mol. Genet.* 16 (2007) 618–629.

- [29] I.G. Ganley, P.M. Wong, N. Gammoh, X. Jiang, Distinct autophagosomal-lysosomal fusion mechanism revealed by thapsigargin-induced autophagy arrest, *Mol. Cell* 42 (2011) 731–743.
- [30] W.C. Chiang, C. Messah, J.H. Lin, IRE1 directs proteasomal and lysosomal degradation of misfolded rhodopsin, *Mol. Biol. Cell* 23 (2012) 758–770.
- [31] H.S. Park, Y. Jun, do, C.R. Han, H.J. Woo, Y.H. Kim, Proteasome inhibitor MG132-induced apoptosis via ER stress-mediated apoptotic pathway and its potentiation by protein tyrosine kinase p56lck in human Jurkat T cells, *Biochem. Pharmacol.* 82 (2011) 1110–1125.
- [32] A. Szokalska, M. Makowski, D. Nowis, G.M. Wilczynski, M. Kujawa, C. Wojcik, I. Mlynarczuk-Bialy, P. Salwa, J. Bil, S. Janowska, P. Agostinis, T. Verfaillie, M. Bugajski, J. Gietka, T. Issat, E. Glodkowska, P. Mrowka, T. Stoklosa, M.R. Hamblin, P. Mroz, M. Jakobisiak, J. Golab, Proteasome inhibition potentiates antitumor effects of photodynamic therapy in mice through induction of endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response, *Cancer Res.* 69 (2009) 4235–4243.
- [33] W. Bao, Y. Gu, L. Ta, K. Wang, Z. Xu, Induction of autophagy by the MG132 proteasome inhibitor is associated with endoplasmic reticulum stress in MCF7 cells, *Mol. Med. Rep.* 13 (2016) 796–804.
- [34] H.Y. Fu, T. Minamino, O. Tsukamoto, T. Sawada, M. Asai, H. Kato, Y. Asano, M. Fujita, S. Takashima, M. Hori, M. Kitakaze, Overexpression of endoplasmic reticulum-resident chaperone attenuates cardiomyocyte death induced by proteasome inhibition, *Cardiovasc. Res.* 79 (2008) 600–610.
- [35] M. Bosma, M.K. Hesselink, L.M. Sparks, S. Timmers, M.J. Ferraz, F. Mattijssen, D. van Beurden, G. Schaart, M.H. de Baets, F.K. Verheyen, S. Kersten, P. Schrauwen, Perilipin 2 improves insulin sensitivity in skeletal muscle despite elevated intramuscular lipid levels, *Diabetes* 61 (2012) 2679–2690.

Chapitre 3 : La surexpression de Plin2 protège contre l'ERS associé au palmitate

3.1 Méthodes

3.1.1 Transfection

Le mélange de transfection est préparé avec l'optimem, l'agent de transfection polyéthylèneimine (PEI) et le plasmide Plin2OE « pLenti-GIII-CMV-GFP-2A-Puro » provenant de « abm » et ayant le catalog number « LV458045 ». Ce mélange est incubé pour 25 minutes pour former le complexe de transfection puis ajouté aux cellules goutte à goutte. Un complexe formé avec un plasmide exprimant GFP est utilisé comme contrôle.

3.1.2 PCR temps réel et essai de viabilité

Déjà décrites dans 2.4.8 and 2.4.10 respectivement.

3.2 Résultats

3.2.1 La surexpression de Plin2 réduit le stress de l'ER et la mortalité associés au palmitate

La surexpression de Plin2 dans les H9C2 réduit le stress de l'ER associé au palmitate. Nous avons démontré une diminution significative dans la transcription de l'ATF6, sXBP1 et CHOP (Figure 3.1 A). Ceci est accompagné d'une réduction significative de la mortalité des cellules

induite par le palmitate (Figure 3.1 B). Ces résultats montrent la protection de Plin2 contre la lipotoxicité du palmitate.

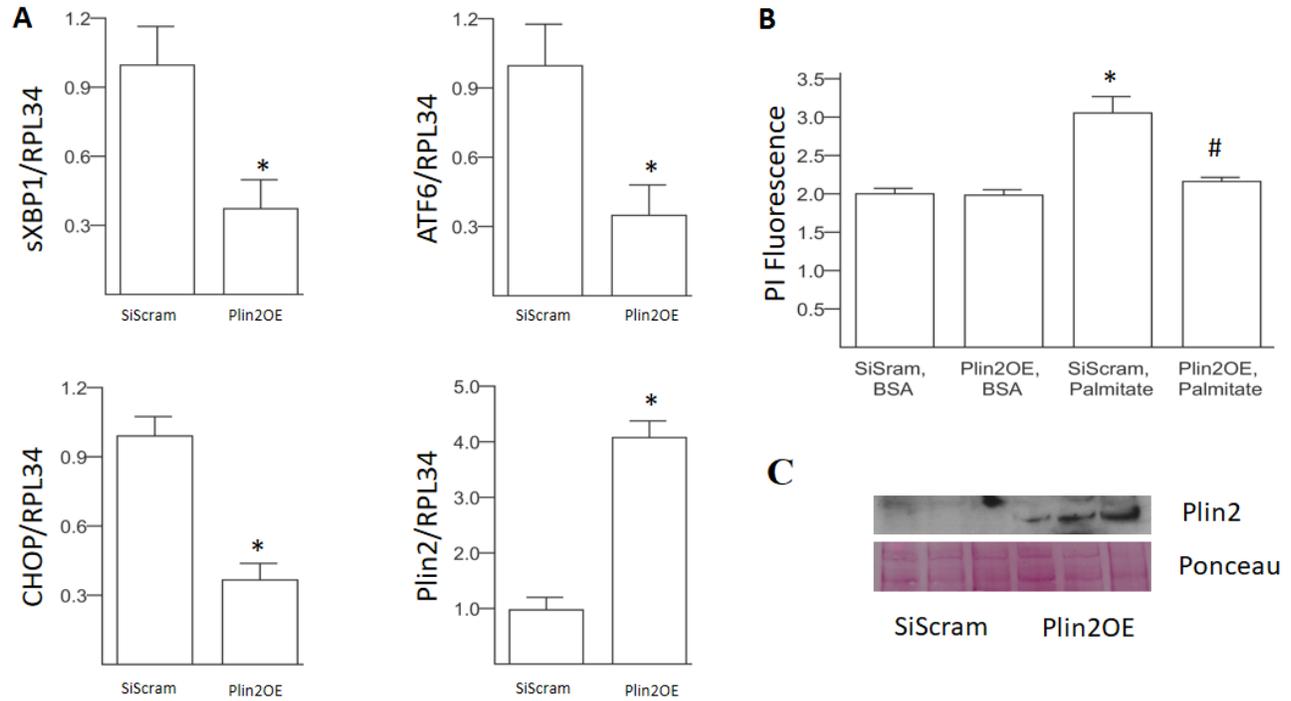


Figure 3.1 : La surexpression de Plin2 réduit l'ERS et la mortalité des cellules induits par le palmitate. (A) ATF6, sXBP1 et CHOP sont réduits significativement par l'effet de la surexpression de Plin2. (B) Ceci est associé à une réduction significative de la mortalité des cellules. (C) représentation de la surexpression de Plin2 par Western Blot.

Chapitre 4 : Discussion générale

Le réticulum endoplasmique est une organelle cellulaire très importante. La maintenance de son homéostasie et de son fonctionnement est indispensable pour la survie cellulaire. Une perturbation dans une fonction peut déclencher une voie de signalisation amenant vers la mort. Le métabolisme des lipides est une des fonctions de l'ER ; les lipides non dirigés vers l'oxydation pour la production d'énergie sous forme d'ATP sont estérifiés dans l'ER. Notre laboratoire a pour objectif d'investiguer des mécanismes de la lipotoxicité associée au palmitate. On a associé plein des effets toxiques au palmitate dans différents tissus et cellules (Voir 1.5.3.1.1). Ainsi, nous avons concentré notre recherche sur l'investigation de l'acheminement du palmitate dans les cardiomyocytes et son association avec l'ERS et l'apoptose en le comparant avec l'oléate qui est protecteur contre la lipotoxicité. En bref, nos résultats montrent que l'accumulation du palmitate dans l'ER sous forme de DAG est associée à l'ERS et l'apoptose. Ceci est accompagné d'une déficience en LDs et en Plin2- une protéine associée aux LDs. En plus, Plin2 est atténuée par l'ERS sans influencer la formation des LDs ni la synthèse des TAG. L'inhibition du protéasome ou la co-administration de l'oléate récupère Plin2 et atténue la mortalité des cellules médiée par l'ERS. Enfin, la surexpression de Plin2 atténue l'ERS et la mortalité des cellules associés au palmitate. Auparavant, dans notre laboratoire, nous avons montré dans les cardiomyocytes primaires que l'oléate et le palmitate induisent une augmentation des lipides intracellulaires, mais la différence entre ces deux acides gras est dans la nature des lipides que chacun favorise sa formation. L'oléate et pas le palmitate induit la formation des LDs. Le palmitate et pas l'oléate provoque l'ERS et la mort cellulaire (Haffar et al, 2015). De l'autre part, on sait que les TAG synthétisés dans l'ER bourgeonnent au cytosol sous forme de LDs (Guo et al, 2009) et ceci prévient l'accumulation des lipides dans l'ER sous forme

de DAG. Un tel mécanisme peut expliquer l'ERS et la mortalité des cardiomyocytes primaires dans les cellules traitées avec le palmitate dans Haffar et al, 2015.

En se basant sur ces données, nous avons commencé notre étude, sur une lignée de cardiomyoblastes embryonnaires (les H9C2). Nous avons émis l'hypothèse que les LDs formées dans les cellules traitées avec l'oléate et pas dans les cellules traitées avec le palmitate sont associées à l'effet protecteur de l'oléate. Pour ce fait, il était indispensable d'abord de valider la lignée H9C2, et pour ce fait, nous avons utilisé le BODIPY- une substance fluorescente qui s'attache aux lipides neutres (les TAG) - pour visualiser les LDs et nous avons utilisé la microscopie fluorescente et un fluoromètre pour évaluer et quantifier les LDs. Effectivement, nous avons trouvé que l'oléate et pas le palmitate induit la formation des LDs (figure 2.1 A&B). Cette différence peut être due à une faible absorption du palmitate par comparaison avec l'oléate. Ainsi, nous avons utilisé des acides gras radioactifs pour mesurer l'accumulation des lipides et pour vérifier que la différence de maculation par le BODIPY n'est pas due à une faible absorption du palmitate par rapport à l'oléate. Effectivement, nous avons trouvé que l'absorption du palmitate n'est pas plus faible que celle de l'oléate mais même significativement plus élevée (figure 2.1 C).

Ces résultats suggèrent que le palmitate est accumulé en dehors des LDs dans la cellule. On a supposé que le lieu de l'accumulation soit l'ER parce qu'il est le site de synthèse des DAG et des TAG. Une autre voie possible pour l'utilisation des lipides est leur oxydation en vue de la production d'énergie sous forme d'ATP. Cette réaction produit aussi le CO₂. Pour vérifier que cette voie n'est pas impliquée dans la déficience en LDs, nous avons mesuré la production du CO₂ dans les cellules traitées avec l'oléate et le palmitate. Selon les données de (Haffar et al,

2015, b) qui a mesuré cette production dans des cardiomyocytes isolées des rats nouveau-nés et qui a trouvé que la production de CO₂ dans les cellules traitées avec le palmitate est significativement faible par comparaison aux cellules traitées avec l'oléate, nous avons attendu un résultat similaire. Effectivement, le résultat dans les H9C2 est similaire et l'oxydation du palmitate est significativement plus faible que celle de l'oléate (figure 2.2 A). Une explication possible de la baisse utilisation du palmitate dans la synthèse des TAG et l'oxydation est une baisse activité de l'acyl-CoA synthétase. Cette enzyme est responsable de l'activation des acides gras absorbés par la cellule. Une activité réduite d'Acsl dans les cellules traitées avec le palmitate peut expliquer l'absence des LDs et la faible oxydation du palmitate. Pour ce fait, et pour investiguer cette possibilité, Nous avons mesuré l'activité de l'Acsl et nous avons trouvé une diminution de son activité dans les cellules traitées avec palmitate par comparaison à celles traitées avec l'oléate (figure 2.2 B). Cette diminution, malgré qu'elle soit significative, est faible et ne couvre pas la différence énorme dans la formation des LDs et l'oxydation entre les deux acides gras.

Ainsi, nous avons formulé l'hypothèse que ce qui explique la différence montrée dans les résultats précédents est l'accumulation du palmitate dans l'ER. Ceci, s'il avait lieu, induit l'ERS et l'apoptose (Szendroedi et al, 2014). L'ERS, qui est une voie de signalisation déclenchée par l'activation de trois protéines : ATF6, IRE1 et PERK et ayant comme objectif de reprendre l'homéostasie de l'ER, peut aboutir à l'apoptose via l'activation de CHOP quand les conditions de stress s'étendent pour une longue durée (Oyadomari et al, 2004). Pour ce fait, nous avons mesuré l'expression de plusieurs marqueurs de l'ERS au niveau transcriptionnel et traductionnel. Effectivement, nous avons trouvé que le palmitate et pas l'oléate induit l'ERS dans les H9C2 en induisant la transcription, la traduction et l'activation de plusieurs marqueurs de l'ERS comme

l'ATF6 (activée par clivage), l'XBP1 (activée par épissage), GRP78 (son expression est induite par la voie de l'ATF6 et l'IRE1), et CHOP qui est un pré-apoptotique induit par PERK et l'ATF6 (figure 2.C, D, E, F, & G). Ceci était associé à une haute mortalité de cellules qui est dépendante de la dose administrée du palmitate (figure 2.2 H). Pour confirmer que cette mortalité est causée par l'apoptose, nous avons mesuré l'expression protéique de la caspase-3 active (clivée). Effectivement, nous avons trouvé que la caspase-3 est activée seulement dans les cellules traitées avec le palmitate (figure 2.2 I) ce qui confirme que la mort cellulaire est un résultat de l'apoptose. Les retrouvailles de Morishima et al, (2002) qui a montré que la cascade apoptotique incluant les caspases-12, 9 et 3 est une voie spécifique de l'ERS où la caspase-3 est l'effectrice qui accomplit la mort de cellulaire suggèrent que l'apoptose de nos cellules est médiée par l'ERS. Cet ERS et l'apoptose sont associés à l'accumulation des DAG dans l'ER.

À ce point, nous avons voulu confirmer l'accumulation du palmitate dans l'ER. Pour ce fait, nous avons prétraité les cellules avec l'oléate ou le palmitate, puis nous les avons traitées avec l'oléate radioactif puis nous avons performé le fractionnement sur un gradient de densité préparé par des solutions de sucrose de différentes concentrations et nous avons mesuré la radioactivité dans chaque fraction. Le résultat (figure 2.3 A) était tellement clair : dans les cellules traitées avec l'oléate, la haute radioactivité est dans les fractions du tampon (les LDs sont moins denses que les organelles). Alors que dans les cellules traitées avec le palmitate, la haute radioactivité est dans les fractions denses surtout les sucroses 20, 30 et 40% qui représentent les organelles (parce qu'elles sont plus denses que le cytoplasme et les LDs). La différence de radioactivité entre les deux traitements est forte et significative. Pour la confirmer, nous avons mesuré l'expression de la calnexine- une protéine marqueur de l'ER- et de Plin2 - une protéine marqueur des LDs. Comme prévu, l'expression la plus forte de la calnexine est dans les fractions possédant

la plus haute radioactivité dans les cellules traitées avec le palmitate (figure 2.3 C) ce qui montre que l'intensité de la radioactivité est en corrélation avec la présence de l'ER. En plus, l'expression de Plin2 est stricte dans les fractions du tampon (cytosol), et la différence de l'expression de Plin2 entre les cellules traitées avec l'oléate et celles traitées avec le palmitate est très abondante (figure 2.3 B). La différence d'expression de Plin2 étant associée à la différence de distribution des lipides entre les cellules traitées avec l'oléate et celles traitées avec le palmitate suggère un rôle de Plin2 dans l'acheminement des TAG vers les LDs.

Le dernier résultat montre que le palmitate s'accumule dans l'ER. Le fait que l'accumulation du palmitate est plus élevée que celle de l'oléate sans être colorié par BODIPY qui s'attache aux triglycérides neutres suggère qu'il ne s'accumule pas sous forme des TAG. Donc, nous avons performé une chromatographie sur couche mince pour déterminer le profile lipidique des cellules traitées avec palmitate ou oléate. Nous avons isolé les lipides intracellulaires par la méthode de Bligh et Dyer. Puis nous avons séparé ces lipides sur une plaque silica selon un gradient d'hydrophobicité. Nous avons trouvé que la quantité de TAG dans les cellules traitées avec l'oléate est très élevée par rapport à la quantité de DAG. Alors que dans les cellules traitées avec le palmitate, la quantité de DAG est très élevée par rapport à celle de TAG. Ce résultat montre que l'accumulation du palmitate dans l'ER est sous forme de DAG. Ce résultat supporte les retrouvailles de Haffar et al (2015), et les deux sont supportés par le fait que DGAT1 préfère l'oléate plus que le palmitate comme substrat pour la synthèse de TAG (cases et al, 2001) qui est la forme des lipides constitutionnelle des LDs (Tauchi-Sato et al, 2002). Et en comparant les résultats des deux traitements, le ratio TAG/DAG obtenu par l'oléate est significativement élevé par comparaison à celui obtenu par le palmitate. Ce ratio reflète l'activité de la voie de synthèse des TAG et de la lipolyse. La synthèse des TAG se déroule dans l'ER, puis les TAG

bourgeonnent sous forme des LDs (Guo et al, 2009). La lipolyse consiste à la dégradation des TAG stockés dans les LDs pour qu'ils soient utilisés dans la production d'énergie. La faible oxydation du palmitate par comparaison avec l'oléate (*figure 2.2.A*) suggère que la lipolyse n'intervient pas dans le ratio TAG/DAG dans ces conditions.

Ainsi, nous n'avons pas une augmentation dans l'oxydation du palmitate par comparaison avec l'oléate, mais inversement l'oxydation du palmitate est significativement faible par comparaison à celle de l'oléate. En outre, l'oléate est stocké dans les LDs sous forme de TAG malgré que son oxydation soit comparativement élevée, alors que le palmitate s'accumule dans l'ER et favorise la formation des DAG. L'ensemble de ces données montre que l'accumulation de palmitate dans l'ER sous forme de DAG induit l'ERS qui aboutit à l'apoptose et la mort cellulaire. L'oléate n'est pas toxique parce que la voie de synthèse des triglycérides est complétée par la production de TAG qui est séquestré dans les LDs. La formation des LDs dépend d'une famille de protéines appelées les périlipines qui sont connues comme étant associées aux LDs et qui jouent un rôle important dans la maintenance de ces organites (Brasaemle et al, 2007 ; Paul et al, 2008). Plin2, 3 et 5 sont les Plins exprimées dans le cœur ; Plin2 est impliquée dans l'accumulation des lipides dans les macrophages (Wang et al, 1999), les fibroblastes (Imamura et al, 2002) et le foie (Chang et al, 2006), Plin3 est impliquée dans l'accumulation des lipides dans le foie (Carr et al, 2012) et les macrophages (Gu et al, 2010), et Plin5 est impliquée dans l'accumulation des lipides dans le myocarde (Kuramoto et al, 2012). Pour cela, nous avons évalué l'effet de chacun des deux acides gras de notre étude, l'oléate et le palmitate, sur l'expression protéique de ces trois protéines. Effectivement, nous avons trouvé que Plin2 est absente dans les cellules traitées avec le palmitate. Cette atténuation vient de l'absence des LDs auxquelles la survie de Plin2 est dépendante, et en absence d'elles, Plin2 est dégradée par protéasome (Gross et al, 2006 ; Xu et

al, 2005 ; Masuda et al, 2006). En outre, l'expression de Plin3 est faiblement réduite, et l'expression de Plin5 est intacte (Figure 2.4 A). La survie de Plin3 et Plin5 peut être due à leur indépendance des LDs. Ces résultats montrent que Plin2 est la Plin la plus touchée par l'effet du palmitate et ainsi ils nous ont guidés à cibler Plin2 par notre étude. L'oléate et le palmitate, les deux, induisent la transcription du gène de Plin2 (Figure 2.4 B), ceci indique que l'expression de Plin2 est régulée après la traduction. Ici, nous avons voulu nous rassurer de l'association de Plin2 aux LDs ; pour ce fait, nous avons réalisé une immunofluorescence qui a montré clairement que Plin2 est associée aux LDs dans les cellules traitées avec l'oléate et qu'elle est absente dans les cellules traitées avec le palmitate (figure 2.4 C). En fait, Plin2 n'est pas tellement absente, nous voyons une fluorescence rouge diffusée partout dans le cytoplasme, mais la distribution de Plin2 n'est pas spécifique puisqu'on ne voit pas les cercles remarquables dans les cellules traitées avec l'oléate. Ceci peut être expliqué par la non spécificité de l'anticorps qui est due à l'absence des protéines auxquelles il peut se lier. Ce dernier résultat réaffirme la dépendance de Plin2 des LDs puisque son absence peut être reliée à l'absence de ces LDs.

Mais, est-ce que la dégradation de Plin2 est due à un effet direct du palmitate ou à l'ERS ? Pour répondre à cette question, nous avons induit l'ERS par deux autres substrats. Chacun de ces substrats induit l'ERS par un mécanisme qui lui est spécifique : la tunicamycine induit l'ERS par l'inhibition de la N-glycosylation et la thapsigargine l'induit par l'inhibition de Serca. Nous avons co-administré ces deux substrats avec l'oléate parce qu'il est protecteur contre l'ERS et l'apoptose. La co-administration de la tunicamycine avec l'oléate induit l'ERS et la mort cellulaire (Figure 2.5 A), et intéressamment, réduit l'expression protéique de Plin2 (Figure 2.5 B) malgré qu'elle induise faiblement la transcription du gène de Plin2 (Figure 2.5 C). De l'autre côté, la co-administration de la thapsigargine avec l'oléate provoque la mort cellulaire (Figure

2.5 D) et réduit l'expression protéique de la Plin2. Étonnement, la thapsigargine induit une augmentation significative de la transcription de Plin2 (Figure 2.5 F). L'augmentation de l'expression de l'ARNm de Plin2 alors que l'expression protéique reste très faible suggère que le mécanisme régulateur principal de Plin2 est au niveau post-transcriptionnel. Dans cette étude, nous avons induit l'ERS par trois substrats : le palmitate, la tunicamycine et la thapsigargine. Chacun de ces substrats induit l'ERS par un mécanisme qui lui est spécifique. Les trois inducteurs de l'ERS causent une diminution très forte de l'expression protéique de Plin2. Ceci indique que l'ERS, quel que soit sa cause, induit la dégradation de Plin2. Ainsi nous pouvons conclure que la dégradation de Plin2 est une étape intermédiaire dans le mécanisme de toxicité associée à l'ERS ou le palmitate. En outre, ces résultats posent un ensemble de questions, est ce que Plin2 est dégradée à cause de l'absence des LDs ? C'est-à-dire, est ce que l'ERS altère la formation des LDs, ou est dû à cause de l'altération de la formation des LDs, ainsi Plin2 sera dégradée ce qui peut expliquer le dernier résultat ? Ou bien c'est l'inverse : Est ce que la dégradation de Plin2 avait un effet sur la formation des LDs et la synthèse des TAG ? Pour répondre, nous avons colorié les cellules traitées avec oléate ou oléate et tunicamycine avec BODIPY pour évaluer la formation des LDs par microscopie fluorescente, et pour évaluer la quantité des DAG et des TAG par la chromatographie sur couche mince. Les résultats étaient partiellement surprenant puisque nous n'avons trouvé aucun changement important ou clair dans la formation des LDs (Figure 2.5 G) ni dans la synthèse de TAG (Figure 2.5 H) malgré la déficience en Plin2. Ceci indique que Plin2 est dégradée directement par l'ERS, en présence des LDs et sans altérer le profil lipidique. C'est une innovation qui montre clairement que Plin2 est dégradée même en présence des LDs.

Pour supporter les derniers résultats, nous avons décidé d'investiguer l'effet de la protection de Plin2 contre la dégradation. Plin2 est dégradée par protéasome quand elle n'est pas associée aux LDs (Gross et al, 2006 ; Xu et al, 2005 ; Masuda et al, 2005). Ceci suggère que l'inhibition du protéasome ou la co-administration de l'oléate- qui induit la formation des LDs- pourrait récupérer Plin2 quand les cellules sont traitées avec le palmitate. Pour cela, nous avons inhibé le protéasome par MG132. Ceci a récupéré légèrement Plin2 (Figure 2.6 A) qui est accompagnée d'une forte réduction de la mortalité des cellules (Figure 2.6 B) et d'une réduction significative de la transcription des différents marqueurs de l'ERS, l'ATF6, le GRP78, le sXBP1, et le CHOP (figure 2.6 C). La faible récupération de Plin2 suggère que cette protéine est dégradée seulement partiellement par le protéasome. Encore, cette petite récupération n'explique pas la grande protection contre la mort cellulaire qui peut être due à d'autres protéines sauvées par l'inhibition du protéasome. De l'autre côté, la co-administration de l'oléate avec le palmitate montre une réduction de la mortalité des cellules (Figure 2.6 D) qui est en corrélation avec l'augmentation de l'expression protéique de Plin2 (Figure 2.6 E). Ces deux effets sont dépendants de la dose de l'oléate co-administrée avec le palmitate. Cette protection est peut-être due à la formation des LDs puisqu'on sait déjà que l'oléate induit la formation des LDs (figure 2.1 A&B).

Dans l'ensemble des résultats précédents, nous avons trouvé que la réduction de Plin2 est toujours associée à une augmentation de mortalité des cellules, alors que l'augmentation de l'expression de Plin2 est associée à une atténuation de la mortalité des cellules. Pour cela, nous avons décidé d'étudier l'effet de la surexpression de Plin2 sur l'ERS et la mortalité dans la cellule. Par ce moyen, tout effet qu'on voit sera spécifique de la Plin2. Effectivement, nous avons prévu que Plin2 est protectrice contre la lipotoxicité du palmitate. Le résultat confirme notre hypothèse et l'ensemble des résultats précédents. Nous avons trouvé une réduction

significative de l'expression des ARNm de l'ATF6, le sXBP1, et le CHOP (Figure 3.1 A). Cette réduction est accompagnée d'une atténuation de la mortalité cellulaire associée au palmitate (Figure 3.2 B).

4.1 Perspective

Malgré la clarté de ces résultats, il est nécessaire de les suivre par l'étude de l'effet de la surexpression de Plin2 sur la synthèse des TAG, la formation des LDs, la distribution des lipides entre l'ER et les LDs. Si nous trouvions des changements significatifs dans le profil et la distribution des lipides, nous serions sûrs que la réduction de l'ERS et la mortalité cellulaire sont dues à l'acheminement des lipides de l'ER aux LDs. Nous devons faire ces études dans des cellules traitées avec oléate et tunicamycine, oléate et thapsigargine, et palmitate. Ainsi nous pourrions bien comprendre l'effet ou les rôles possibles de Plin2. De même, nous pouvons étudier le rôle de Plin2 et/ou confirmer les résultats de la surexpression de Plin2 par l'atténuation de son expression.

Chapitre 5 : Conclusion générale

Ici nous montrons que la toxicité associée au palmitate est médiée, peut-être, par l'accumulation des DAG dans l'ER, et que Plin2 joue un rôle important dans la protection contre l'ERS et l'apoptose induits par le palmitate. Encore, nous sommes les premiers qui ont démontré que Plin2 est dégradée par l'ERS même en présence des LDs (l'ERS médié par la tunicamycine). En plus, nos données suggèrent un rôle de la Plin2 dans la protection contre l'ERS. Cet effet peut être indépendant des lipides puisque la réduction de l'expression de Plin2 n'a pas changé le profil lipidique ou la formation des LDs. Cette étude devra être suivie par l'investigation de l'effet de la surexpression de Plin2 sur l'ERS médié par le palmitate, la tunicamycine et la thapsigargine, et sur le profil et la distribution des lipides dans ces trois conditions.

Bibliographie

Anderson EJ, Kypson AP, Rodriguez E, Anderson CA, Lehr EJ, Neuffer PD. Substrate-specific derangements in mitochondrial metabolism and redox balance in the atrium of the type 2 diabetic human heart. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54:1891–1898.

Barger PM, Kelly DP. PPAR signaling in the control of cardiac energy metabolism. *Trends Cardiovasc Med* 2000;10:238–245. [PubMed: 11282301].

Barsotti A, Giannoni A, Di Napoli P, Emdin M. Energy metabolism in the normal and in the diabetic heart. *Curr Pharm Des.* 2009;15(8):836-40.

Bartz, R., Li, W. H., Venables, B., Zehmer, J. K., Roth, M. R., Welti, R., Anderson, R. G., Liu, P. and Chapman, K. D. (2007a). Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic. *J. Lipid Res.* 48, 837-847.

Basseri SI, Austin RC. Endoplasmic reticulum stress and lipid metabolism: mechanisms and therapeutical potential. *Biochem. Res. Int.* 2012;2012;841362. Doi: 10.1155/2012/841362. Epub 2011 Dec 13.

Bertrand L, Horman S, Beauloye C & Vanoverschelde JL 2008 Insulin signalling in the heart. *Cardiovasc Res* 79 238-248.

Boden, G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* 46, 3–10 (1997).

Bolsoni-Lopes A, Alonso-Vale MI. Lipolysis and lipases in white adipose tissue- An update. *Arch Endocrinol Metab.* 2015 Aug;59(4):335-42. Doi: 10.1590/2359-3997000000067. PMID:26331321.

Borradaile NM, Han X, Harp JD, Gale SE, Ory DS, Schaffer JE. Disruption of endoplasmic reticulum structure and integrity in lipotoxic cell death. *J Lipid Res.* 2006 Dec;47(12):2726-37. Epub 2006 Sep 7.

Bosma M, Hesselink MK, Sparks LM, Timmers S, Ferraz MJ, Mattijssen F, van Beurden D, Schaart G, de Baets MH, Verheyen FK, Kersten S, Schrauwen P. Perilipin 2 improves insulin sensitivity in skeletal muscle despite elevated intramuscular lipid levels. *Diabetes.* 2012 Nov;61(11):2679-90. Doi: 10.2337/db11-1402. Epub 2012 Jul 17.

Bozza, P. T., R. C. Melo, and C. Bandeira-Melo. 2007. Leukocyte lipid bodies regulation and function: contribution to allergy and host defense. *Pharmacol. Ther.* 113: 30–49.

Brasaemle, D. L., T. Barber, N. E. Wolins, G. Serrero, E. J. Blanchette-Mackie, and C. Londos. 1997. Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. *J. Lipid Res.* 38: 2249–2263.

Brasaemle, D. L. (2007). The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J. Lipid Res.* 48, 2547-2559.

Brush MH, Weiser DC, Shenolikar S. Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 targets protein phosphatase 1 alpha to the endoplasmic reticulum and promotes dephosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *Mol Cell Biol.* 2003 Feb;23(4):1292-303.

Bultynck G, Kiviluoto S, Henke N, Ivanova H, Schneider L, Rybalchenko V et al. The C terminus of Bax inhibitor-1 forms a Ca²⁺-permeable channel pore. *J Biol Chem* 2012; 287: 2544–2557.

Cai L, Wang J, Li Y, et al. Inhibition of superoxide generation and associated nitrosative damage is involved in metallothionein prevention of diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* 2005; 54:1829-37.

Calderone A. (2014) Myocardial Hypertrophy and Regeneration. In: Linda M. McManus, Richard N. Mitchell, editors. *Pathobiology of Human Disease*. San Diego: Elsevier; p. 580-592.

Carr, R.M. et al. Reduction of TIP47 improves hepatic steatosis and glucose homeostasis in mice. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 302, R996-1003 (2012).

Carr RM, Peralta G, Yin X, Ahima RS. Absence of perilipin 2 prevents hepatic steatosis, glucose intolerance and ceramide accumulation in alcohol-fed mice. *PLoS One* 9: e97118, 2014.

Cases, S., S. J. Stone, P. Zhou, E. Yen, B. Tow, K. D. Lardizabal, T. Voelker, and R. V. Farese, Jr. 2001. Cloning of DGAT2, a second mammalian diacylglycerol acyltransferase, and related family members. *J. Biol. Chem.* 276: 38870–38876.

Chae H-J, Kim H-R, Xu C, Bailly-Maitre B, Krajewska M, Krajewski S et al. BI-1 regulates an apoptosis pathway linked to endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell* 2004; 15: 355–366.

Chang, T. Y., C. C. Chang, N. Ohgami, and Y. Yamauchi. 2006. Cholesterol sensing, trafficking, and esterification. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22: 129–157.

Chawla, A., C. H. Lee, Y. Barak, W. He, J. Rosenfeld, D. Liao, J. Han, H. Kang, and R. M. Evans. 2003. PPARdelta is a very low-density lipoprotein sensor in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 1268–1273.

- Chen W, Chang B, Wu X, Li L, Sleeman M, Chan L. Inactivation of Plin4 downregulates Plin5 and reduces cardiac lipid accumulation in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013; 304:E770–E779.
- Cheng, D., R. L. Meegalla, B. He, D. A. Cromley, J. T. Billheimer, and P. R. Young. 2001. Human acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase is a tetrameric protein. *Biochem. J.* 359: 707–714.
- Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T, Korsmeyer SJ. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell.* 2001 Sep;8(3):705-11.
- Cho K, Kang PB. Plin2 inhibits insulin-induced glucose uptake in myoblasts through the activation of the NLRP3 inflammasome. *Intern J Mol Med* 36: 839–844, 2015.
- Civelek M, Manduchi E, Riley RJ, Stoeckert CJ Jr, Davies PF. Chronic endoplasmic reticulum stress activates unfolded protein response in arterial endothelium in regions of susceptibility to atherosclerosis *1080 Circulation Research* October 29, 2010 . *Circ Res.* 2009;105:453– 461
- Coll T, Eyre E, Rodríguez-Calvo R, Palomer X, Sánchez RM, Merlos M, et al. Oleate reverses palmitate-induced insulin resistance and inflammation in skeletal muscle cells. *J Biol Chem.* 2008 ;283 :11107–16.
- Covington JD, Noland RC, Hebert RC, Masinter BS, Smith SR, Rustan AC, Ravussin E, Bajpeyi S, Perlpin 3 Differentially Regulates Skeletal Muscle Lipid Oxidation in Active, Sedentary, and Type 2 Diabetes Males. *J Endocrinol Metab.* 2015 Oct;100(10):3683-92. Doi: 10.1210/JC.2014-4125. Epub 2015 Jul 14.
- Cryns V, Yuan J. Proteases to die for. *Genes Dev.* 1998 Jun 1;12(11):1551-70.
- Cullinan SB, Diehl JA. PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem.* 2004;279:20108 –20117.
- Dalen, K. T., K. Schoonjans, S. M. Ulven, M. S. Weedon-Fekjaer, T. G. Bentzen, H. Koutnikova, J. Auwerx, and H. I. Nebb. 2004. Adipose tissue expression of the lipid droplet-associated proteins S3-12 and perilipin is controlled by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Diabetes.* 53: 1243–1252.
- Dalen KT, Ulven SM, Arntsen BM, Solaas K, Nebb HI. PPARalpha activators and fasting induce the expression of adipose differentiation-related protein in liver. *J Lipid Res.* 2006 May;47(5):931-43. Epub 2006 Feb 17.
- Dalen, K. T., T. Dahl, E. Holter, B. Arntsen, C. Londos, C. Sztalryd, and H. I. Nebb. 2007. LSDP5 is a PAT protein specifically expressed in fatty acid oxidizing tissues. *Biochim. Biophys. Acta.* 1771: 210–227.

De Wilde J, Smith E, Snepvangers FJ, de Wit NW, Mohren R, Hulshof MF, Mariman EC. Adipophilin protein expression in muscle--a possible protective role against insulin resistance. *FEBS J.* 2010 Feb;277(3):761-73. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07525.x. Epub 2009 Dec 22.

Ducharme, N. and Bickel, P. (2008). Lipid droplets in lipogenesis and lipolysis. *Endocrinology* 149, 942-949.

Dudek J, Benedix J, Cappel S, Greiner M, Jalal C, Muller L, Zimmermann R. Functions and pathologies of BiP and its interaction partners. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66:1556–1569.

Eehalt R1, Füllekrug J, Pohl J, Ring A, Herrmann T, Stremmel W. Translocation of long chain fatty acids across the plasma membrane--lipid rafts and fatty acid transport proteins. *Mol Cell Biochem.* 2006 Mar;284(1-2):135-40. Epub 2006 Feb 14.

Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, Covas MI, Corella D, Arós F, et al. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *N Engl J Med.* 2013; 368:1279–90.

Faber BC, Cleutjens KB, Niessen RL, et al. Identification of genes potentially involved in rupture of human atherosclerotic plaques. *Circ Res* 2001; 89:547–554. [PubMed: 11557743].

Faria A, Persaud SJ. Cardiac oxidative stress in diabetes: Mechanisms and therapeutic potential. *Pharmacol Ther.* 2017 Apr;172:50-62. doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.11.013. Epub 2016 Dec 1.

Gandotra, S., Le Dour, C., Bottomley, W., Cervera, P., Giral, P., Reznik, Y., Charpentier, G., Auclair, M., Delepine, M., Barroso, I. et al. (2011). Perilipin deficiency and autosomal dominant partial lipodystrophy. *N. Engl. J. Med.* 364, 740-748.

Gao, J., and G. Serrero. 1999. Adipose differentiation related protein (ADRP) expressed in transfected COS-7 cells selectively stimulates long chain fatty acid uptake. *J. Biol. Chem.* 274: 16825–16830.

Gibson CJ, Davids MS. BCL-2 Antagonism to Target the Intrinsic Mitochondrial Pathway of Apoptosis. *Clin Cancer Res.* 2015 Nov 15;21(22):5021-9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0364.

Goodman, J. M. (2008). The gregarious lipid droplet. *J. Biol. Chem.* 283, 28005-28009.

Greenberg AS, Egan JJ, Wek SA, Garty NB, Blanchette-Mackie EJ, Londos C. Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. *J Biol Chem.* 1991 Jun 15;266(17):11341-6.

Greenberg, A. S., J. J. Egan, S. A. Wek, M. C. Moos, Jr., C. Londos, and A. R. Kimmel. 1993. Isolation of cDNAs for perilipins A and B: sequence and expression of lipid droplet-associated proteins of adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 12035–12039.

Greenwalt, D.E., Scheck, S.H. & Rhinehart-Jones, T. Heart CD36 expression is increased in murine models of diabetes and in mice fed a high fat diet. *The Journal of clinical investigation* **96**, 1382-1388 (1995).

Groenendyk J, Sreenivasaiah PK, Kim DH, Agellon LB, Michalak M. Biology of endoplasmic reticulum stress in the heart. *Circ Res.* 2010 Nov 12;107(10): 1185-97. Doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.227033.

Gross, D. N., H. Miyoshi, T. Hosaka, H. H. Zhang, E. C. Pino, S. Souza, M. Obin, A. S. Greenberg, and P. F. Pilch. 2006. Dynamics of lipid droplet-associated proteins during hormonally stimulated lipolysis in engineered adipocytes: stabilization and lipid droplet binding of adipocyte differentiation-related protein/adipophilin. *Mol. Endocrinol.* 20: 459–466.

Gu, J.Q. et al. A Toll-like receptor 9-mediated pathway stimulates perilipin 3 (TIP47) expression and induces lipid accumulation in macrophages. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 299, E593-600 (2010).

Guan D, Wang H, Li VE, Xu Y, Yang M, Shen Z. N-glycosylation of ATF6beta is essential for its proteolytic cleavage and transcriptional repressor function to ATF6alpha. *J Cell Biochem.* 2009 Nov 1;108(4):825-31. Doi: 10.1002/jcb.22310.

Guo, Y., Walther, T. C., Rao, M., Stuurman, N., Goshima, G., Terayama, K., Wong, J. S., Vale, R. D., Walter, P. and Farese, R. V., Jr (2008). Functional genomic screen reveals genes involved in lipid-droplet formation and utilization. *Nature* 453, 657-661.

Guo Y, Cordes KR, Farese RV Jr, Walther TC. Lipid droplets at a glance. *J Cell Sci.* 2009 Mar 15;122(Pt 6):749-52. doi: 10.1242/jcs.037630.

Guo CA, Guo S. Insulin receptor substrate signaling controls cardiac energy metabolism and heart failure. *J. Endocrinol.* 2017 Apr 5. pii: JOE-16-0679. doi: 10.1530/JOE-16-0679. [Epub ahead of print].

T. Haffar, F-A. Bérubé-Simard, J-C Tardif, N. Bousette. Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress in primary cardiomyocytes. *deGruyter* 2015-03 30. Doi: <https://doi.org/10.1515/ersc-2015-0004>.

(b) Haffar T, Bérubé-Simard F, Bousette N. Impaired fatty acid oxidation as a cause for lipotoxicity in cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Dec 4-11;468(1-2):73-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.10.162. Epub 2015 Nov 4.

H. P. Harding, Y. Zhang, A. Bertolotti, H. Zeng, and D. Ron, “Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response,” *Molecular Cell*, vol. 5, no. 5, pp. 897–904, 2000.

- K. Haze, H. Yoshida, H. Yanagi, T. Yura, and K. Mori, "Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress," *Molecular Biology of the Cell*, vol. 10, no. 11, pp. 3787–3799, 1999.
- L. M. Hendershot, "The ER chaperone BiP is a master regulator of ER function," *Mount Sinai Journal of Medicine*, vol. 71, no. 5, pp. 289–297, 2004.
- Hlais S, El-Bistami D, El Rahi B, Mattar MA, Obeid OA. Combined fish oil and high oleic sunflower oil supplements neutralize their individual effects on the lipid profile of healthy men. *Lipids*. 2013; 48:853–61.
- Hofnagel O, Buers I, Schnoor M, et al. Expression of perilipin isoforms in cell types involved in atherogenesis. *Atherosclerosis* 2007; 190:14–15. author reply 16–17. [PubMed: 16842797].
- Hsieh K, Lee YK, Londos C, Raaka BM, Dalen KT, Kimmel AR. Perilipin family members preferentially sequester to either triacylglycerol-specific or cholesteryl-ester-specific intracellular lipid storage droplets. *J Cell Sci*. 2012 Sep 1;125(Pt 17):4067-76. doi: 10.1242/jcs.104943. Epub 2012 Jun 8.
- Imamura M, Inoguchi T, Ikuyama S, Taniguchi S, Kobayashi K, Nakashima N, Nawata H. ADRP stimulates lipid accumulation and lipid droplet formation in murine fibroblasts. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002 Oct;283(4): E775-83.
- Jiang, H. P., and G. Serrero. 1992. Isolation and characterization of a full-length cDNA coding for an adipose differentiation-related protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89: 7856–7860.
- Jørgensen PG, Jensen MT, Mogelvang R, Fritz-Hansen T, Galatius S, Biering-Sørensen T, Storgaard H, Vilsbøll T, Rossing P, Jensen JS. Impact of type 2 diabetes and duration of type 2 diabetes on cardiac structure and function. *Int J Cardiol*. 2016 Oct 15;221:114-21. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.07.083. Epub 2016 Jul 5.
- Jove M, Planavila A, Laguna JC and Vazquez-Carrera M. Palmitate-induced interleukin 6 production is mediated by protein kinase C and nuclear-factor kappaB activation and leads to glucose transporter 4 down-regulation in skeletal muscle cells. *Endocrinology*. 2005;146:3087-95.
- Jweied EE, McKinney RD, Walker LA, et al. Depressed cardiac myofilament function in human diabetes mellitus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289:2478-83.
- Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*. 2006 Dec 14;444(7121):840-6.
- Kolwicz SC, Jr., Purohit S & Tian R 2013 Cardiac metabolism and its interactions with contraction, growth, and survival of cardiomyocytes. *Circ Res* **113** 603-616.

Kuerschner, L., Moessinger, C. and Thiele, C. (2008). Imaging of lipid biosynthesis: how a neutral lipid enters lipid droplets. *Traffic* 9, 338-352.

Kuramoto K, Okamura T, Yamaguchi T, Nakamura TY, Wakabayashi S, et al.(2012) Perilipin 5, a lipid droplet-binding protein, protects heart from oxidative burden by sequestering fatty acid from excessive oxidation. *Journal of Biological Chemistry* 287: 23852–23863.

Kuramoto K, Sakai F, Yoshinori N, Nakamura TY, Wakabayashi S, Kojidani T, Haraguchi T, Hirose F, Osumi T. Deficiency of lipid droplet protein, perilipin 5, suppresses myocardial lipid accumulation, thereby preventing type 1 diabetes-induced heart malfunction. *Mol Cell Biol*. 2014 Jul;34(14):2721-31.

Larigauderie G, Furman C, Jaye M, et al. Adipophilin enhances lipid accumulation and prevents lipid efflux from THP-1 macrophages: potential role in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:504–510. [PubMed: 14707038].

Larigauderie G, Bouhrel MA, Furman C, et al. Perilipin, a potential substitute for adipophilin in triglyceride storage in human macrophages. *Atherosclerosis* 2006; 189:142–148. [PubMed:16442115].

A.H.Lee, N. N. Iwakoshi, and L. H. Glimcher, “XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response,”*Molecular and Cellular Biology*, vol. 23, no. 21, pp. 7448–7459, 2003.

Lei K, Nimmual A, Zong WX, Kennedy NJ, Flavell RA, Thompson CB, Bar-Sagi D, Davis RJ. The Bax subfamily of Bcl-2 related proteins is essential for apoptotic signal transduction by c-JunNH(2)-terminal kinase. *Mol Cell Biol*. 2002 Jul;22(13):4929-42.

Leung, N. et al. Prolonged increase of plasma non-esterified fatty acids fully abolishes the stimulatory effect of 24 hours of moderate hyperglycaemia on insulin sensitivity and pancreatic beta-cell function in obese men. *Diabetologia* 47, 204–213 (2004).

Listenberger LL, Ostermeyer-Fay AG, Goldberg EB, et al. Adipocyte differentiation-related protein reduces the lipid droplet association of adipose triglyceride lipase and slows triacylglycerol turnover. *J Lipid Res* 2007;48:2751–2761. [PubMed: 17872589].

Liu, P., Bartz, R., Zehmer, J., Ying, Y. and Anderson,R. (2008). Rab-regulated membrane traffic between adiposomes and multiple endomembrane systems. *Methods Enzymol*. 439, 327-337.

Liu YM, Wang X, Nawaz A, Kong ZH, Hong Y, Wang CH, Zhang JJ. Wogonin ameliorates lipotoxicity-induced apoptosis of cultured vascular smooth muscle cells via interfering with DAG-PKC pathway. *Acta Pharmacol Sin*. 2011 Dec;32(12):1475-82. doi: 10.1038/aps.2011.120. Epub 2011 Oct 10.

- Liu S, Geng B, Zou L, Wei S, Wang W, Deng J, Xu C, Zhao X, Lyu Y, Su X, Xu G. Development of hypertrophic cardiomyopathy in perilipin-1 null mice with adipose tissue dysfunction. *Cardiovasc Res*. 2015 Jan 1;105(1):20-30. Epub 2014 Nov 21.
- Lu, X., J. Gruia-Gray, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, C. Londos, and A. R. Kimmel. 2001. The murine perilipin gene: the lipid droplet-associated perilipins derive from tissue-specific, mRNA splice variants and define a gene family of ancient origin. *Mamm. Genome*. 12: 741–749.
- Mao W, Fukuoka S, Iwai C, Liu J, Sharma VK, Sheu SS, Fu M, Liang CS. Cardiomyocyte apoptosis in autoimmune cardiomyopathy: mediated via endoplasmic reticulum stress and exaggerated by norepinephrine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293:H1636–H1645.
- Mao W, Iwai C, Liu J, Sheu SS, Fu M, Liang CS. Darbeoetin alfa exerts a cardioprotective effect in autoimmune cardiomyopathy via reduction of ER stress and activation of the PI3K/Akt and STAT3 pathways. *J Mol Cell Cardiol*. 2008;45:250–260.
- Martinon, F., Burns, K., and Tschopp, J. (2002). The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . *Mol. Cell* 10, 417–426.
- Mason RR, Meex RC, Russel AP, Canny BJ, Watt MJ. Cellular localization and associations of the major lipolytic proteins in human skeletal muscle at rest and during exercise. *PLoS One*. 2014 Jul 23;9(7): e103062. Doi: 10.1371/journal.pone.0103062. eCollection 2014.
- Mason RR, Watt MJ. Unraveling the roles of PLIN5: linking cell biology to physiology. *Trends Endocrinol Metab*. 2015 Mar;26(3):144-52. doi: 10.1016/j.tem.2015.01.005. Epub 2015 Feb 11.
- Masuda Y, Itabe H, Odaki M, Hama K, Fujimoto Y, Mori M, Sasabe N, Aoki H, Arai H, Takano T. ADRP/adipophilin is degraded through the proteasome-dependent pathway during regression of lipid-storing cells. *J Lipid Res*. 2006 Jan;47(1):87-98. Epub 2005 Oct 17.
- McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ (2001) Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol* 21: 1249–1259.
- McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013 Apr 1;5(4):a008656. doi: 10.1101/cshperspect.a008656. Review. Erratum in: *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015 Apr;7(4). pii: a026716. doi: 10.1101/cshperspect.a026716. PMID:23545416.
- Mcmanaman JL, Bales ES, Orlicky DJ, Jackman M, MacLean PS, Cain S, Crunk AE, Mansur A, Graham CE, Bowman TA, Greenberg AS. Perilipin-2-null mice are protected against diet-induced obesity, adipose inflammation, and fatty liver disease. *J Lipid Res*. 2013 May;54(5): 1346-59. doi: 10.1194/jlr.M035063. Epub 2013 Feb 12.

- Minamino T, Komuro I, Kitakaze M. Endoplasmic reticulum stress as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Circ Res.* 2010 Oct 29;107(9):1071-82. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.227819. Review.PMID:21030724.
- Minn AJ, Kettlun CS, Liang H, Kelekar A, Vander Heiden MG, Chang BS, Fesik SW, Fill M, Thompson CB. Bcl-xL regulates apoptosis by heterodimerization-dependent and -independent mechanisms. *EMBO J.* 1999 Feb 1;18(3):632-43.
- Miyanari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., Bartenschlager, R., Wakita, T., Hijikata, M. and Shimotohno, K. (2007). The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat. Cell Biol.* 9, 1089-1097.
- Miura, S., J. W. Gan, J. Brzostowski, M. J. Parisi, C. J. Schultz, C. Londos, B. Oliver, and A. R. Kimmel. 2002. Functional conservation for lipid storage droplet association among perilipin, ADRP, and TIP47 (PAT)-related proteins in mammals, *Drosophila*, and *Dictyostelium*. *J. Biol. Chem.* 277: 32253–32257.
- Montecucco F, Steffens S, Mach F. Insulin resistance: a proinflammatory state mediated by lipid-induced signaling dysfunction and involved in atherosclerotic plaque instability. *Mediators Inflamm* 2008; 2008: 767623.
- Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J. Biol Chem.* 2002 Sep 13;277(37):34287-94. Epub 2002 Jul 3.
- Morishima N, Nakanishi K, Tsuchiya K, Shibata T, Seiwa E. Translocation of Bim to the endoplasmic reticulum (ER) mediates ER stress signaling for activation of caspase-12 during ER stress-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2004 Nov 26;279(48):50375-81. Epub 2004 Sep 27.
- Murphy, S., Martin, S. and Parton, R. G. (2008). Lipid droplet-organelle interactions; sharing the fats. *Biochim. Biophys. Acta* doi: 10.1016/j.bbailip.2008.07.004.
- Myoishi M, Hao H, Minamino T, Watanabe K, Nishihira K, Hatakeyama K, Asada Y, Okada K, Ishibashi-Ueda H, Gabbiani G, Bochaton-Piallat ML, Mochizuki N, Kitakaze M. Increased endoplasmic reticulum stress in atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndrome. *Circulation.* 2007;116:1226–1233.
- Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature.* 2000 Jan 6;403(6765):98-103.
- Najt CP, Semthivinayagam S, Aljazi MB, Fader KA, Olenic SD, Brock JR, Lydic TA, Jones AD, Atshaves BP/ Liver-specific loss of Perilipin 2 alleviates diet-induced hepatic steatosis, inflammation, and fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2016 May 1;310(9):G726-38. Doi: 10.1152/ajpgi.00436.2015. Epub 2016 Mar 11.

Ohoka N, Ypshii S, Hattori T, Onozaki K, Hayashi H. TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. *EMBO J.* 2005 Mar 23;24(6):1243-55. Epub 2005 Mar 10.

Ohsaki, Y., Cheng, J., Fujita, A., Tokumoto, T. and Fujimoto, T. (2006). Cytoplasmic lipid droplets are sites of convergence of proteasomal and autophagic degradation of apolipoprotein B. *Mol. Biol. Cell* 17, 2674-2683.

Okada K, Minamino T, Tsukamoto Y, Liao Y, Tsukamoto O, Takashima S, Hirata A, Fujita M, Nagamachi Y, Nakatani T, Yutani C, Ozawa K, Ogawa S, Tomoike H, Hori M, Kitakaze M. Prolonged endoplasmic reticulum stress in hypertrophic and failing heart after aortic constriction: possible contribution of endoplasmic reticulum stress to cardiac myocyte apoptosis. *Circulation.* 2004;110:705–712.

Osumi T, Kuramoto K. Heart lipid droplets and lipid droplet-binding proteins: biochemistry, physiology, and pathology. *Exp. Cell. Res.* 2016 Jan 15;340(2):198-204. Doi: 10.1016/j.yexcr.2015.10.031. Epub 2015 Oct 30.

Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ.* 2004 Apr;11(4):381-9. Review. PMID:14685163.

Patel S, Yang W, Kozulko K, Saudek V, Savage DB. Perlipins 2 and 3 lack a carboxy terminal domain present in perlipin 1 involved in sequestering ABHD5 and suppressing basal lipolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Jun 24;111(25):9163-8. doi: 10.1073/pnas.1318791111. Epub 2014 Jun 9.

Paul A, Chan L, Bickel PE. The PAT family of lipid droplet proteins in heart and vascular cells. *Curr Hypertens Rep.* 2008 Dec;10(6):461-6.

Perdomo L, Beneit N, Otero YF, Escribano Ó, Díaz-Castroverde S, Gómez-Hernández A, Benito M. Protective role of oleic acid against cardiovascular insulin resistance and in the early and late cellular atherosclerotic process. *Cardiovasc Diabetol.* 2015 Jun 10 ; 14 :75. doi: 10.1186/s12933-015-0237-9.

Persson J, Degerman E, Nilsson J, Lindholm MW. Perilipin and adipophilin expression in lipid loaded macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;363:1020–1026. [PubMed: 17927964].

Philips et al, 2005: Phillips SA, Choe CC, Ciaraldi TP, Greenberg AS, Kong AP, Baxi SC, Christiansen L, Mudaliar SR & Henry RR (2005) Adipocyte differentiation-related protein in human skeletal muscle: relationship to insulin sensitivity. *Obes Res* 13, 1321–1329.

Ploegh, H. (2007). A lipid-based model for the creation of an escape hatch from the endoplasmic reticulum. *Nature* 448, 435-438.

- N.M. Pollak, D. Jaeger, S. Kolleritsch, R. Zimmermann, R. Zechner, A. Lass, G. Haemmerle. The interplay of protein kinase A and perilipin5 regulates cardiac lipolysis, *J. Biol. Chem.* 290(2015)1295–1306.
- Putchu GV, Le S, Frank S, Besirli CG, Clark K, Chu B, Alix S, Youle RJ, LaMarche A, Maroney AC, Johnson EM Jr. JNK-mediated BIM phosphorylation potentiates BAX-dependent apoptosis. *Neuron.* 2003 Jun 19;38(6):899-914.
- Ramos SV, Thurnbull PC, MacPherson RE, LeBlanc PJ, Ward WE, Peters SJ. Changes in mitochondrial perilipin 3 and perilipin 5 protein content in rat skeletal muscle following endurance training and acute stimulated contraction. *Exp. Physiol.* 2015 Apr 1;100(4):450-62. Doi: 10.1113/epphysiol.2014.084434. Epub 2015 Mar 21.
- Randle, P. J., Garland, P. B., Hales, C. N. & Newsholme, E. A. The glucose fatty-acid cycle: its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* i, 785–789 (1963).
- Reaven, G. M. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37, 1595–1607 (1988).
- Robenek, H., O. Hofnagel, I. Buers, M. J. Robenek, D. Troyer, and N. J. Severs. 2006. Adipophilin-enriched domains in the ER membrane are sites of lipid droplet biogenesis. *J. Cell Sci.* 119: 4215–4224.
- D. Ron, S.R. Hubbard, How IRE1 reacts to ER stress, *Cell* 132 (2008) 24–26.
- Rubler S, Dlugash J, Yuceoglu YZ, Kumral T, Branwood AW, Grishman A. New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. *Am J Cardiol* 1972; 30:595-602.
- Salvadó L, Coll T, Gómez-Foix AM, Salmerón E, Barroso E, Palomer X, et al. Oleate prevents saturated-fatty-acid-induced ER stress, inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells through an AMPK-dependent mechanism. *Diabetologia.* 2013 ; 56 :1372–82.
- Sano R, Reed JC. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Dec;1833(12):3460-70. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.06.028. Epub 2013 Jul 10.
- Schaffer JE, Lodish HF. Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell.* 1994 Nov 4;79(3):427-36. PMID:7954810.
- Scow, R. O., E. J. Blanchette-Mackie, and L. C. Smith. 1980. Transport of lipid across capillary endothelium. *Fed. Proc.* 39: 2610–2617.
- Senn JJ. Toll-like receptor-2 is essential for the development of palmitate-induced insulin resistance in myotubes. *J Biol Chem.* 2006;281:26865–75.

- Servetnick, D. A., D. L. Brasaemle, J. Gruia-Gray, A. R. Kimmel, J. Wolff, and C. Londos. 1995. Perilipins are associated with cholesteryl ester droplets in steroidogenic adrenal cortical and Leydig cells. *J. Biol. Chem.* 270: 16970–16973.
- Shi Y, Vattem KM, Sood R, An J, Liang J, Stramm L, Wek RC. Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit kinase, PEK, involved in translational control. *Mol Cell Biol.* 1998 Dec;18(12):7499-509.
- Shiozaki EN, Chai J, Shi Y. 2002. Oligomerization and activation of caspase-9, induced by Apaf-1 CARD. *Proc Natl. Acad Sci* 99: 4197–4202.
- Shoelson, S. E., Lee, J. & Goldfine, A. B. Inflammation and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 116, 1793–1801 (2006).
- Stobart, A. K., Stymne, S. and Höglund, S. (1986). Safflower microsomes catalyze oil accumulation in vitro: a model system. *Planta* 169, 33-37.
- Stone, S. J., H. Myers, B. E. Brown, S. M. Watkins, K. R. Feingold, P. M. Elias, and R. V. Farese, Jr. 2004. Lipopenia and skin barrier abnormalities in DGAT2-deficient mice. *J. Biol. Chem.* 279: 11767–11776.
- Stone, S. S., Levin, M. C., Zhou, P., Han, J., Walther, T. C. and Farese, R. V., Jr (2009). The endoplasmic reticulum enzyme, DGAT2, is found in mitochondria-associated membranes and has a mitochondrial targeting signal that promotes its association with mitochondria. *J. Biol. Chem.* 284, 5352-5361.
- Straub BK, Gyoengyoesi B, Koenig M, Hashani M, Pawella LM, Herpel E, Mueller W, Macher-Goeppinger S, Heid H, Schirmacher P. Adipophilin/perilipin-2 as a lipid droplet-specific marker for metabolically active cells and diseases associated with metabolic dysregulation. *Histopathology.* 2013 Mar;62(4):617-31. Doi:10.1111/his. 12038. Epub 2013 Jan 24.
- Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep.* 2006 Sep;7(9):880-5.
- Szendroedi J, Yoshimura T, Phielix E, Koliaki C, Marcucci M, Zhang D, Jelenik T, Müller J, Herder C, Nowotny P, Shulman GI, Roden M. Role of diacylglycerol activation of PKC θ in lipid-induced muscle insulin resistance in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Jul 1;111(26):9597-602. doi: 10.1073/pnas.1409229111. Epub 2014 Jun 16.
- John T. Tansey, Carole Sztalryd, Erica M. Hlavin, Alan R. Kimmel and Constantine Londos The Central Role of Perilipin A in Lipid Metabolism and Adipocyte Lipolysis. *IUBMB Life.* 2004 Jul;56(7):379-85. Review.
- Targett-Adams, P., M. J. McElwee, E. Ehrenborg, M. C. Gustafsson, C. N. Palmer, and J. McLauchlan. 2005. A PPAR response element regulates transcription of the gene for human adipose differentiation-related protein. *Biochim. Biophys. Acta.* 1728: 95–104.

Tauchi-Sato, K., S. Ozeki, T. Houjou, R. Taguchi, and T. Fujimoto. 2002. The surface of lipid droplets is a phospholipidmonolayer with a unique fatty acid composition. *J. Biol. Chem.* 277: 44507–44512.

Terai K, Hiramoto Y, Masaki M, Sugiyama S, Kuroda T, Hori M, Kawase I, Hirota H. AMP-activated protein kinase protects cardiomyocytes against hypoxic injury through attenuation of endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol.* 2005;25:9554 –9575.

Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science.* 1998 Aug 28;281(5381):1312-6.

Toth A, Nickson P, Mandl A, Bannister ML, Toth K, Erhardt P. Endoplasmic reticulum stress as a novel therapeutic target in heart diseases. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.* 2007;7:205–218.

Thrainsdottir IS, Aspelund T, Thorgeirsson G, Gudnason V, Hardarson T, Malmberg K, Sigurdsson G, Rydén L. The association between glucose abnormalities and heart failure in the population-based Reykjavik study. *Diabetes Care.* 2005 Mar;28(3):612-6. PMID:15735197.

Thuerauf DJ, Marcinko M, Gude N, Rubio M, Sussman MA, Glembotski CC. Activation of the unfolded protein response in infarcted mouse heart and hypoxic cultured cardiac myocytes. *Circ Res.* 2006;99: 275–282.

Tsujimoto Y . Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria. *J Cell Physiol.* 2003 May;195(2):158-67.

Unger, R. H. 2002. Lipotoxic diseases. *Annu. Rev. Med.* 53: 319–336.

Utzschneider, K. M. et al. Impact of differences in fasting glucose and glucose tolerance on the hyperbolic relationship between insulin sensitivity and insulin responses. *Diabetes Care* **29**, 356–362 (2006).

van den Brom CE, Bulte CS, Loer SA, Bouwman RA, Boer C. Diabetes, perioperative ischaemia and volatile anaesthetics: consequences of derangements in myocardial substrate metabolism. *Cardiovasc Diabetol.* 2013 Mar 4;12:42. doi: 10.1186/1475-2840-12-42.

Varela, G. M., D. A. Antwi , R. Dhir , X. Yin , N. S. Singhal , M. J. Graham , R. M. Crooke , and R. S. Ahima . 2008. Inhibition of ADRP prevents diet-induced insulin resistance. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 295: G621 – G628.

Velagaleti RS, Gona P, Chuang ML, et al. Relations of insulin resistance and glycemic abnormalities to cardiovascular magnetic resonance measures of cardiac structure and function: the Framingham Heart Study. *Circ Cardiovasc Imaging* 2010; 3:257-63.

Walther, T. C. and Farese, R. V., Jr (2008). The life of lipid droplets. *Biochim. Biophys. Acta* doi: 10.1016/j.bbaliip.2008.10.009.

Wang, X., T. J. Reape, X. Li, K. Rayner, C. L. Webb, K. G. Burnand, and P. G. Lyso. 1999. Induced expression of adipophilin mRNA in human macrophages stimulated with oxidized low-density lipoprotein and in atherosclerotic lesions. *FEBS Lett.* 462: 145–150.

Wang H, Sreenivasan U, Gong DW, et al. Cardiomyocyte-specific perilipin5 overexpression leads to myocardial steatosis and modest cardiac dysfunction. *J Lipid Res.* 2013; 54:953–965.

Wang Y, Qian Y, Fang Q, Zhong P, Li W, Wang L, Fu W, Zhang Y, Xu Z, Li X, Liang G. Saturated palmitic acid induces myocardial inflammatory injuries through direct binding to TLR4 accessory protein MD2. *Nat Commun.* 2017 Jan 3;8:13997. doi: 10.1038/ncomms13997.

Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science.* 2001 Apr 27;292(5517):727-30.

Wellen, K. E. & Hotamisligil, G. S. Inflammation, stress, and diabetes. *J. Clin. Invest.* **115**, 1111–1119 (2005).

Welte, M. A. (2007). Proteins under new management: lipid droplets deliver. *Trends Cell Biol.* 17, 363-369.

Wolins, N. E., J. R. Skinner, M. J. Schoenfish, A. Tzekov, K. G. Bensch, and P. E. Bickel. 2003. Adipocyte protein s3-12 coats nascent lipid droplets. *J. Biol. Chem.* 278: 37713–37721.

Wolins, N. E., B. K. Quaynor, J. R. Skinner, M. J. Schoenfish, A. Tzekov, and P. E. Bickel. 2005. S3-12, adipophilin, and TIP47 package lipid in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 280: 19146–19155.

Wolins NE, Quaynor BK, Skinner JR, et al. OXPAT/PAT-1 is a PPAR-induced lipid droplet protein that promotes fatty acid utilization. *Diabetes* 2006; 55:3418–3428. [PubMed: 17130488].

Wu N, Zhang X, Jia P, Jia D. Hypercholesterolemia aggravates myocardial ischemia reperfusion injury via activating endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis. *Exp Mol Pathol.* 2015 Dec;99(3):449-54. doi: 10.1016/j.yexmp.2015.08.010. Epub 2015 Aug 28. PMID:26318286.

Xu Q, Reed JC. Bax inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast. *Mol Cell* 1998; 1:337-346.

Xu, G., C. Sztalryd, X. Lu, J. T. Tansey, J. Gan, H. Dorward, A. R. Kimmel, and C. Londos. 2005. Post-translational regulation of adipose differentiation-related protein by the ubiquitin/proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* 280: 42841–42847.

Yamamoto K, Ichijo H, and Korsmeyer SJ. 1999. BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol. Cell Biol.* 19:8469_8478.

J. Ye, R. B. Rawson, R. Komuro et al., “ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs,”*Molecular Cell*, vol. 6, no. 6, pp. 1355–1364, 2000.

Yen CL, Stone SJ, Koliwad S, Harris C, Farese RV Jr. Thematic review series: glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *J Lipid Res.* 2008 Nov;49(11):2283-301. Doi: 10.1194/jlr.R800018-JLR200. Epub 2008 Aug 29. Review. PMID:18757836.

Yilmaz, S. et al. Diabetic Cardiomyopathy; Summary of 41 Years. *Korean Circ J.* 2015 Jul;45(4):266-72. doi: 10.4070/kcj.2015.45.4.266. Epub 2015 Jul 16.

Yoshida H, Haze K, Yanagi H, Yura T, Mori K. Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J Biol Chem.* 1998;273:33741–33749.

H. Yoshida, T. Okada, K. Haze et al., “ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response,”*Molecular and Cellular Biology*, vol. 20, no.18, pp. 6755–6767, 2000.

Zechner, R., Strauss, J. G., Haemmerle, G., Lass, A. and Zimmermann, R. (2005). Lipolysis: pathway under construction. *Curr. Opin. Lipidol.* 16, 333-340.

Zhao B, Fisher BJ, Clair RW, et al. Redistribution of macrophage cholesteryl ester hydrolase from cytoplasm to lipid droplets upon lipid loading. *J Lipid Res* 2005; 46:2114–2121. [PubMed: 16024911].

Zhao, G., A. Souers, M. Voorbach, H. Falls, B. Droz, S. Brodjian, Y. Lau, R. Iyengar, J. Gao, A. Judd, et al. 2008. Validation of diacyl glycerolacyltransferase I as a novel target for the treatment of obesity and dyslipidemia using a potent and selective small molecule inhibitor. *J. Med. Chem.* 51: 380–383.

Zhao SM, Wang YL, Guo CY, Chen JL, Wu YQ. Progressive decay of Ca²⁺ homeostasis in the development of diabetic cardiomyopathy. *Cardiovasc Diabetol.* 2014 Apr 9;13:75. doi: 10.1186/1475-2840-13-75.